ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Lilia Guadalupe
Arellano Galindo

Tesis doctoral

Nanoplataformas inorgánicas como elementos activos en sistemas teragnósticos y de biodetección

Santiago de Compostela, 2022

Programa de doctorado en Ciencia de Materiales

TESIS DE DOCTORADO

“NANOPLATAFORMAS INORGÁNICAS COMO ELEMENTOS ACTIVOS EN SISTEMAS TERAGNÓSTICOS Y DE BIODETECCIÓN”

M.C. Lilia Guadalupe Arellano Galindo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE MATERIALES

SANTIAGO DE COMPOSTELA
Septiembre 2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

Dna. **Lilia Guadalupe Arellano Galindo**

Título da tese: **Nanoplataformas inorgánicas como elementos activos en sistemas teragnósticos y de biodetección.**

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
4) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide a versión impresa coa presentada en formato electrónico

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En **Santiago de Compostela**, **28 de julio de 2022**.

Asdo. Lilia Guadalupe Arellano Galindo

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

D. **Pablo Taboada Antelo**

En condición de: **Director**

Título da tese: **Nanoplataformas inorgánicas como elementos activos en sistemas teragnósticos y de biodetección**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna Lilia Guadalupe Arellano Galindo, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Santiago de Compostela**, **28 de Xullo de 2022**

Sinatura electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

Dna. **Silvia Barbosa Fernández**

En condición de: **Directora**

Título da tese: **Nanoplataformas inorgánicas como elementos activos en sistemas teragnósticos y de biodetección**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna Lilia Guadalupe Arellano Galindo, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Santiago de Compostela**, **28 de Xullo de 2022**

Sinatura electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL **I**

ÍNDICE DE FIGURAS **X**

ÍNDICE DE TABLAS **XXXII**

LISTA DE PUBLICACIONES **XXXIV**

PUBLICACIONES ***XXXIV***

LIBROS Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS ***XXXV***

LISTA DE ABREVIATURAS **XXXIX**

AGRADECIMIENTOS **XLV**

RESUMEN **XLVIII**

ABSTRACT **LIII**

1 CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN **1**

1.1 ANTECEDENTES **1**

1.1.1 Nanociencia y nanotecnología *1*

1.1.2 La nanomedicina y los nanomateriales *2*

1.2 NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS DE ORO: PROPIEDADES OPTOELECTRÓNICAS **6**

1.2.1 Aplicaciones biomédicas de nanopartículas *9*

1.2.2 Las nanopartículas de oro como agentes de diagnostico *10*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3 LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO AGENTES TERAPÉUTICOS 13

1.3.1 Terapia farmacológica y génica 13

1.3.2 Terapia fototérmica (PPTT) 15

1.3.3 Terapia fotodinámica (PDT) 17

1.4 NANOTRANSPORTADORES METÁLICOS: NANOCILINDROS DE ORO 20

1.5 PROCESOS SINTÉTICOS DE NANOCILINDROS DE ORO 22

1.5.1 Métodos arriba-abajo (top-down) 22

1.5.2 Métodos abajo-arriba (bottom-up) 22

1.5.3 Síntesis de semillas de oro 23

1.5.4 Disolución de crecimiento y síntesis de nanocilindros de oro 24

1.6 ESTABILIZACIÓN DE AUNRS CON AGENTES BIOCOMPATIBLES 27

1.6.1 Revestimiento de la superficie 28

1.6.2 Intercambio de ligandos 29

1.6.3 Autoensamblaje capa por capa 29

1.7 NANOPARTÍCULAS LUMINISCENTES SOBRE-CONVERSORAS DOPADAS CON LANTÁNIDOS (UPCVS) 30

1.8 NANOPARTÍCULAS SOBRECONVERSORAS DOPADAS CON LANTÁNIDOS 32

1.9 MECANISMOS DE SOBRECONVERSIÓN 36

1.10 SÍNTESIS DE UPCVS DOPADOS CON LANTÁNIDOS 38

1.10.1 Método de coprecipitación 38

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.10.2 Método de descomposición térmica 39
1.10.3 Método sol-gel 40
1.10.4 Método hidrotermal/ solvotermal 40

1.11 MODIFICACIONES SUPERFICIALES EN LAS UPCVS DOPADAS CON LN **41**

1.12 REFERENCIAS **43**

1.13 OBJETIVOS **74**

CAPÍTULO 2:
MATERIALES, MÉTODOS Y CARACTERIZACIÓN **76**

2.a NANOCILINDROS DE ORO **76**

2.1 MATERIALES PARA EL PROCESO SINTÉTICO Y DE CARACTERIZACIÓN **76**

2.2 MATERIALES PARA LOS ESTUDIOS BIOLÓGICOS **77**

2.3 MÉTODOS SINTÉTICOS **77**

2.3.1 Síntesis de la nanoplataforma inorgánica: nanocilindros de oro (AuNRs) 77
2.3.2 Funcionalización de los AuNRs con polielectrolitos 79
2.3.3 Funcionalización de AuNRs con polielectrolitos y DOXO 80
2.3.4 Funcionalización de AuNRs con polielectrolitos e ICG 82
2.3.5 Funcionalización de AuNRs con polielectrolitos y DOXO, ICG y siRNA 83

2.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS NANOPLATAFORMAS **84**

2.4.1 Dispersión dinámica de luz, DLS 84
2.4.2 Espectrometría masas por plasma acoplado inductivamente, ICP-MS 84
2.4.3 Movilidad electroforética 84

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.4.4 Microscopía de transmisión electrónica, TEM 85
2.4.5 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) 85
2.4.6 Espectroscopía de fluorescencia 86
2.4.7 Efecto fototérmico inducido por los AuNRs bajo irradiación NIR 86
2.4.8 Análisis cuantitativo de la carga de DOXO 87
2.4.9 Liberación de DOXO en experimentos in vitro 88
2.4.10 Análisis cuantitativo de la carga de ICG 89
2.4.11 Fotoestabilidad de las nanoplataformas AUNRs/PSS/ PLL@ICG/HA 90
2.4.12 Liberación de ICG in vitro 90
2.4.13 Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), con las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA in vitro 91
2.4.14 Análisis cuantitativo de la carga de siRNA 91

2.5 SIMULACIONES Y MODELIZACIONES 93
2.5.1 Modelización de un AuNR para conocer su campo de energía y la liberación de calor al sistema 93
2.5.2 Eficiencia de conversión fototérmica, η 93

2.6 ESTUDIO BIOLÓGICO DE LAS NANOPLATAFORMAS EN CULTIVOS CELULARES 94
2.6.1 Ensayos de viabilidad celular de las nanoplataformas 95
2.6.2 Internalización celular de las nanoplataformas 96
2.6.3 Visualización de las nanoplataformas en las líneas celulares por TEM 96
2.6.4 Liberación medida en células mediante fluorescencia 97
2.6.5 Liberación de DOXO y citotoxicidad 98
2.6.6 Liberación de ICG y citotoxicidad 99

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.6.7 Ensayo ROS por microscopía de fluorescencia en células tumorales *99*

2.6.8 Inhibición de PD-L1 por PCR *100*

2.b NANOPARTÍCULAS SOBRECONVERSORAS **101**

2.7 MATERIALES PARA EL PROCESO SINTÉTICO **101**

2.8 MATERIALES PARA LOS ESTUDIOS BIOLÓGICOS **102**

2.9 MÉTODO SINTÉTICO **102**

2.9.1 Síntesis de las nanopartículas sobreconversoras *102*

2.9.2 Modificación de la superficie de las nanopartículas sobreconversoras con AET, DMSA y PEG *105*

2.10 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS NANOPARTÍCULAS SOBRE-CONVERSORAS **106**

2.10.1 Microscopía de transmisión electrónica, TEM, y de barrido de emisión de campo, FEI-SEM *106*

2.10.2 Dispersión dinámica de luz, DLS *106*

2.10.3 Movilidad electroforética *106*

2.10.4 Espectrometría masas por plasma acoplado inductivamente, ICP-MS *107*

2.10.5 Difracción de Rayos X, XRD *108*

2.10.6 Espectroscopía de fluorescencia *109*

2.10.7 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y reflectancia total atenuada, ATR-FTIR *109*

2.11 ESTUDIO BIOLÓGICO DE LAS NANOPARTÍCULAS SOBRECONVERSORAS EN CULTIVOS CELULARES **109**

2.11.1 Ensayos de viabilidad celular de las nanoplataformas *110*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.11.2 Internalización celular de nanopartículas sobreconversoras *110*
2.11.3 Visualización de las nanopartículas sobreconversoras en las líneas celulares por TEM *111*

2.12 REFERENCIAS **112**

CAPÍTULO 3: NANOPLATAFORMA MULTIMODAL BASADA EN AUNRS CON CAPACIDAD FOTOTÉRMICA Y QUIMIOTERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER **115**

3.1 INTRODUCCIÓN **115**

3.2 OBJETIVOS **118**

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN **119**
3.3.1 Caracterización de la plataforma metálica *119*
3.3.2 Funcionalización, estabilidad coloidal y conversión fototérmica de las plataformas metálicas *127*
3.3.3 Perfiles de liberación de la DOXO *135*
3.3.4 Evaluación biológica in vitro *136*

3.4 CONCLUSIÓN **149**

3.5 REFERENCIAS **151**

CAPÍTULO 4: NANOPLATAFORMA HÍBRIDA FOTO EXCITABLE BASADA EN NANOCILINDROS DE ORO PARA FOTOTERAPIAS BIMODALES SIMULTÁNEAS: PPTT Y PDT **160**

4.1 INTRODUCCIÓN **160**

4.2 OBJETIVOS **162**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 163

4.3.1 Síntesis y caracterización de las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA 163

4.3.2 Estabilidad fotoquímica de las nanoplataformas AuNRs/PSS/ PLL@ICG/HA 166

4.3.3 Perfiles de temperatura inducidos por irradiación de luz NIR en la nanoplataforma AuNRs/PSSPLL@ICG/HA. 169

4.3.4 Generación in vitro de ROS 173

4.3.5 Generación in vitro de ROS en células tumorales 175

4.3.6 Actividad terapéutica in vitro en las células tumorales 178

4.3.6.1 Citotoxicidad e internalización de la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL-ICG/HA in vitro. 178

4.4 CONCLUSIÓN 182

4.5 REFERENCIAS 184

CAPÍTULO 5: NANOPLATAFORMA HÍBRIDA BASADA EN AUNRS PARA TERAPIA MULTIMODAL 193

5.1 INTRODUCCIÓN 193

5.2 OBJETIVOS 195

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 196

5.3.1 Caracterización de la nanoplataforma de AuNRs/PSS/DOXO/ PLL@ICG/siRNA/HA 196

5.3.2 Encapsulación de los principios activos y estabilidad de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/ PLL@ICG/siRNA/HA 201

5.3.3 Liberación de las moléculas bioactivas desde la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/ HA 204

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3.4 Citocompatibilidad e internalización celular de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA *208*

5.3.5 Influencia de la aplicación de un estímulo lumínico externo en la actividad terapéutica de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA: Generación de ROS in vitro *212*

5.3.6 Influencia de la aplicación de un estímulo lumínico externo en la actividad de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/ PLL@ICG/siRNA/HA: Actividad terapéutica multimodal *215*

5.3.7 Mecanismo de muerte celular inducido por la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA *220*

5.4 CONCLUSIÓN **224**

5.5 BIBLIOGRAFIA **226**

CAPÍTULO 6: EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CERÁMICAS SOBRECONVERSORAS PARA POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS **236**

6.1 INTRODUCCIÓN **236**

6.2 OBJETIVOS **238**

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN **239**

6.3.1 Síntesis y caracterización física de las UpCvs *239*

6.3.2 Estabilidad estructural y coloidal de las nanopartículas UpCvs funcionalizadas *244*

6.3.3 Evaluación in vitro de las nanopartículas sobreconversoras *253*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.4 CONCLUSIÓN 258

6.5 REFERENCIAS 261

CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES 268

ANEXO I: PERMISO DE REPRODUCCIÓN DE FIGURAS 274

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Escala comparativa entre organismos biológicos y tecnológicos, para entender la escala de materiales nanométricos. Con licencia de creative commons de Guillaume Paumier. **1**

FIGURA 1.2 a) Esquema de división de una célula normal y la muerte de una célula dañada o mutada por reacción de los anticuerpos, b) Esquema de la división de una célula mutada o cancerígena en el cuerpo humano y su crecimiento descontrolado. **4**

FIGURA 1.3 (a) Esquema de oscilación del plasmón para una nanoesfera [34]. (b) Representación de los plasmones para AuNps [35]. (c) Micrografías donde se percibe diferentes morfologías de los AuNps, lo que se ve reflejado en el espectro de absorción y su desplazamiento [36, 37]. Imagen 3. (a) Modificada obtenida de la referencia [46] Copyright (2022) con permiso del Optica Publishing Group. Imagen 3. (b y c) Modificada obtenida de la referencia [37] Copyright (2022) con permiso del Elsevier. **8**

FIGURA 1.4 (a) Ventanas biológicas de absorbancia de especies biológicas [41, 42], (b) Formas de propagación de la luz a través de los tejidos [6]. Imagen (4 a) Modificada obtenida de la referencia [42] Copyright (2022) con permiso del Royal Society of Chemistry. Imagen (4 b) Modificada obtenida de la referencia [6] Copyright (2022) con permiso del Ivyspring International Publisher. **9**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[6] Copyright (2022) con permiso del Ivyspring International Publisher. **9**

FIGURA 1.5 Ilustración del proceso llevado a cabo por PDT en el que se inyectan un PS por la vía venosa, lo que permite su transporte por todo el cuerpo, localizándose en la zona dañada y siendo irradiado por un haz con una longitud de onda determinada cercano al infrarrojo, lo que inicia el proceso del PS y con ello una liberación de ROS.. **18**

FIGURA 1.6 Reacción fotodinámica tipo 1 y 2 [6]. Imagen modificada obtenida de la referencia [6] Copyright (2022) con permiso del Ivyspring International Publisher. **19**

FIGURA 1.7 (a) Diferentes morfologías de los AuNRs [36]. (b) Representación de los plasmones para AuNRs, representando los modos TSPR y LSPR para los distintos tamaños mostrados [35]. Imagen modificada obtenida de la referencia [36] Copyright (2022) con permiso del Optica Publishing Group. **21**

FIGURA 1.8 Ilustración esquemática del método mediado por semillas para el crecimiento de nanocilindros de oro [64,118, 119, 120]. Imagen modificada obtenida de la referencia [64] Copyright (2022) con permiso del Royal Society of Chemistry. **23**

FIGURA 1.9 Mecanismo de crecimiento de AuNRs. **25**

USC UNIVERSIDADE

FIGURA 1.10 Ilustración esquemática del mecanismo de crecimiento de AuNRs a partir de partículas de oro protegidas con CTAB en presencia de Ag^{+} [126, 127]. Imagen modificada obtenida de la referencia [127] Copyright (2022) con permiso del Elsevier. **26**

FIGURA 1.11 Diferentes tipos de morfologías que puede formar el CTAB dependiendo de la concentración y la temperatura. **27**

FIGURA 1.12 Métodos para la modificación superficial de AuNRs: (A) Esquema de cómo debe quedar el recubrimiento capa por capa, en cuanto a cargas [129]. (A.1) Autoensamblaje capa por capa. (B) Intercambio de ligandos [130]. (C) Recubrimiento de superficies [58]. Imagen modificada obtenida de la referencia [127] Copyright (2022) con permiso del Elsevier. **28**

FIGURA 1.13 Rangos de emisión de color, de las transiciones electrónicas típicas para cada ion lantánido trivalente [144]. Imagen modificada obtenida de la referencia [144] Copyright (2022) con permiso del Elsevier. **33**

FIGURA 1.14 Diagrama de los niveles de energía de los UpCvs de $Yb3^{+}$ dopados con Er^{3+} y Tm^{3+}, donde se muestra la excitación de conversión ascendente y la emisión de su luminiscencia en el infrarrojo visible. Las flechas indican la transferencia de energía radiativa y no radiativa y los procesos de relajación multifonónica [153]. Imagen modificada obtenida de la referencia [153] Copyright (2022) con permiso del John Wiley and Sons. **34**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FIGURA 1.15 Principales mecanismos de sobreconversión de partículas sobreconversoras dopadas con lantánidos: a) Absorción de estado excitado, ESA; b) Sobreconversión por transferencia de energía, ETU y c) Avalancha de fotones, PA. Las líneas roja, violeta y verde representan el fotón de excitación, la energía transferida y el proceso de emisión, respectivamente. Imagen adaptada reproducida de [164]. Imagen modificada obtenida de la referencia [164] Copyright (2022) con permiso del American Chemical Society. **38**

FIGURA 2.1 Ilustración del mecanismo de obtención de AuNRs por crecimiento de semilla, obteniendo en primera instancia las semillas de Au. Las semillas de Au en cristales se inyectan en la disolución de crecimiento, dando así el paso a la formación de nanocilindros de oro. **77**

FIGURA 2.2 Modelo propuesto para la formación de las semillas. **78**

FIGURA 2.3 Modelo propuesto para la obtención de AuNRs. **78**

FIGURA 2.4 Modelo propuesto para la obtención de AuNRs. **79**

FIGURA 2.5 Representación esquemática de los AuNRs recubiertos con PSS/PLL/HA. **80**

FIGURA 2.6 Representación esquemática de los AuNRs recubiertos con PSS/DOXO/PLL/HA. **81**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FIGURA 2.7 Representación esquemática de los AuNRs recubiertos con PSS/PLL@ICG/HA. **82**

FIGURA 2.8 Representación esquemática de los AuNRs recubiertos con PSS/DOXO/PLL-ICG/siRNA/HA. **83**

FIGURA 2.9 Curva de calibración obtenida por UV-Vis del fármaco DOXO medido a 480 nm. **88**

FIGURA 2.10 Curva de calibración obtenida por fluorescencia del marcador ICG libre medido a 810 nm. **89**

FIGURA 2.11 Curva de calibración obtenida por fluorescencia del inhibidor genético siRNA medido a λ_{exc}= 519 nm. **92**

FIGURA 3.1 Imágenes de TEM de AuNRs con dimensiones: a) 34 × 12, b) 33 × 11, c) 35 × 10, d) 32 × 8 nm, obtenidos después de la adición de 0.015, 0.037, 0.050 y 0.104 µM de $AgNO_3$ al complejo Au-CTAB, respectivamente. Cambios en: e) Espectro de absorción, f) máximo de LSPR y, g) AR de AuNRs después de cambios en la concentración de $AgNO_3$. Las líneas discontinuas son solo guías. En e) se observan los picos típicos de extinción: la banda LSPR transversal muestra ligeros cambios con el AR de los AuNRs (ca. 510 nm), mientras que la longitudinal está desplazada hacia el rojo a medida que aumenta el AR (de 700 a 816 nm). h) Dependencia de la temperatura de la disolución AuNRs@CTAB con la banda LSPR centrada a 816 nm para diferentes concentraciones de nanopartículas bajo iluminación NIR (808 nm, 30

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

min) a diferentes intensidades. i) Incrementos de temperatura (ΔT) para AuNRs con LSPRs localizados a (■) 816 nm, [33.1 × 8.1 nm], (●) 766 nm [36.6 × 11.1 nm], (▲) 755 nm [34.0 × 10.2 nm], (▼) 735 nm 33.2 × 10.1 nm], (◆) 717 nm [33.5 × 11.9 nm] y (◀) 700 nm [34.4 × 12.4 nm] usando una fuente de láser continua a 808 nm y 2,0 W/cm^2. J) Pérdida de eficiencia de los AuNRs en función del desplazamiento de la banda LSPR. Este desplazamiento se calcula como $\Delta\lambda = |\lambda_{láser} - \lambda_{SPRL}|$. **120**

FIGURA 3.2 Cambios en a) la longitud y b) el ancho de los AuNRs tras variaciones en la concentración de $AgNO_3$ durante la síntesis de los AuNRs. **121**

FIGURA 3.3 Distribuciones de frecuencia de longitud, ancho y AR (de izquierda a derecha) derivadas de mediciones de imágenes de TEM para varios tipos de AuNR obtenidos. Cada fila muestra el LSPR centrado a (a) 700 nm, (b) 717 nm, (c) 735 nm, (d) 755 nm, (e) 766 nm y (f) 792 nm (N = 800). Las mediciones se realizaron utilizando el software ImageJ. **122**

FIGURA 3.4 Aumentos de temperatura (ΔT) para AuNRs que poseen una banda LSPR centrada en 816 nm en función del tiempo bajo irradiación de luz NIR (808 nm) de intensidades (■) 0.25, (■) 0.5, (▲) 1.0, (▼) 2.0 y (◀) 3,0 W/cm2 para concentraciones de partículas de (a) $1 \cdot 10^{11}$, (b)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$1 \cdot 10^{10}$, (c) $1 \cdot 10^{9}$, (d) $1 \cdot 10^{8}$ AuNRs/mL. Las líneas son sólo de guía. **123**

FIGURA 3.5 Eficiencia de absorción (calculada como la razón entre la sección transversal de absorción y la sección transversal geométrica), y b) emisión de energía bajo irradiación láser en el NIR (1,0 W/cm^2 a 808 nm, 5 min). **125**

FIGURA 3.6 Mapa de liberación de energía para un AuNR iluminado con luz láser a 808 nm a 1,0 W/cm^2 durante 5 min con polarización a a) 0º y b) 90º. Mapas de calor para un AuNR iluminado a 808 nm a 1,0 W/cm^2 durante 5 min con polarización a c, e) 0º y d, f) 90º a una distancia de la partícula de c, d) 5 nm y e, f) 25 nm a lo largo del plano perpendicular de la Np. **126**

FIGURA 3.7 Espectro UV-Vis de la nanoplataforma basada en AuNRs tras la adición de las distintas capas por el método LbL; (b) desplazamientos del LSPR y edl decaimiento de la absorbancia tras cada capa depositada; (c) valores del potencial ζ tras cada capa añadida. **128**

FIGURA 3.8 Espectros FTIR de (–) DOXO libre y AuNRs recubiertos con (–) CTAB; (–) PSS/PLL y (–) PSS/DOXO/PLL/HA. **128**

FIGURA 3.9 Potenciales ζ (■) y cambios del LSPR (●) de AuNRs/PSS a diferentes concentraciones de NaCl. Las líneas punteadas y discontinuas son solo para guiar el ojo. (b) Espectros UV-Vis de

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA a diferentes condiciones de disolución para la encapsulación/ recubrimiento con el fármaco. Estabilidad temporal del recubrimiento de DOXO en AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA ea diferentes condiciones de la disolución para la carga de fármaco y tiempos de incubación según se determina por (c-e) UV-Vis y (f-h) potencial ζ. **130**

FIGURA 3.10 a) Cambios en las distribuciones de tamaño de población de AuNRs después de los diferentes pasos del recubrimiento polimérico. Imágenes TEM de b) AuNRs recubiertos con CTAB y c) PSS/DOXO/PLL/HA. Estabilidad coloidal de AuNRs recubiertos con PSS/PLL/HA mediante la monitorización de la evolución temporal de sus tamaños hidrodinámicos a (d) pH diferente, (e) en ausencia y presencia de suero fetal, y (e) en ausencia y presencia de tripsina a 37°C. Las muestras se diluyeron en tampones de pH 3,0 (■), 5,0 (●), 7,4 (▲) y 9,0 (▼). Perfiles de liberación de DOXO desde AuNRs recubiertos con PSS/DOXO/PLL/HA a (g) pH 5,0 y (h) 7,4 en ausencia (■), o en presencia de tripsina (●), luz NIR de 808 nm (1,0 W/cm^2, 5 min, a las 2, 5, 9, 12 y 24 h (▲), tripsina + luz NIR de 1,0 W/cm^2 (tiempos similares (▼) y 2,0 W/cm^2 (puntos similares de tiempo). Las barras de errores en los gráficos de liberación no se muestran para mayor claridad, pero las incertidumbres están por debajo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

del 15 %. Las flechas indican el punto de tiempo de la aplicación de la luz NIR. **132**

FIGURA 3.11 Estabilidad coloidal de AuNRs recubiertos con PSS/PLL/HA mediante la monitorización de la evolución temporal de su carga superficial a: (a) pH diferente, (b) en ausencia y presencia de suero fetal, y (c) en ausencia y presencia de tripsina a 37 ºC. Las muestras se diluyeron en disoluciones tampón de pH 3,0 (■), 5,0 (●), 7,4 (▲) y 9,0 (▼). **133**

FIGURA 3.12 (a) Incrementos de temperatura después de ciclos de irradiación sucesivos a (■), 1,0 (●), 2,0 (▲) y 3,0 W/cm^2 usando una luz láser NIR de 808 nm. (b) Espectros UV-Vis de AuNRs recubiertos con PSS/PLL/HA después de (–) 0, (–) 1, (–) 2 y (–) 3 ciclos de irradiación con una fluencia de 2,0 W/cm^2. Imágenes TEM de AuNRs recubiertos con PSS/PLL/HA después de (c) 1, (d) 2 y (e) 3 ciclos de irradiación. La barra de la escala es de 50 nm. **134**

FIGURA 3.13 Toxicidad celular expresada en función de razón de supervivencia para AuNRs recubiertos con (■, □) CTAB y (●, ○) PSS/PLL/HA a) células de tumor cervical HeLa, y b) fibroblastos murinos 3T3-Balb después de 24 (símbolos abiertos) y 48 h (símbolos cerrados) de incubación, respectivamente. **137**

FIGURA 3.14 Citotoxicidad celular expresada como tasa de supervivencia para las líneas celulares a) HeLa y b) 3T3 Balb a diferentes tiempos de incubación a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

37 ºC en ausencia de iluminación NIR. AuNRs/HA indica las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL/HA; AuNRs/DOXO se corresponde con la plataforma AuNRs/PSS/DOXO ;y AuNRs 75µg y AuNRs 100 µg corresponden a las plataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA conteniendo 75 y 100 µg del fármaco, respectivamente. Significado estadístico comparado a 4 ºC para cada grupo: * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.005. **139**

FIGURA 3.15 Citotoxicidad celular expresada como tasa de supervivencia para las líneas celulares a-d) HeLa y e-h) 3T3-Balb a (a, c, e, g) 24 y (b, d, f, h) 48 h de incubación y diferentes temperaturas en presencia de iluminación NIR de 808 nm de (a, b, e, f) 1,0 W/cm^2 y (b, d, g, h) 2,0 W/cm^2. AuNRs/HA indica la nanoplataforma AuNRs/PSS/ PLL/HA, AuNRs/DOXO se corresponde con AuNRs/ PSS/DOXO, y AuNRs 75 µg y AuNRs 100 µg corresponden a las plataformas AuNRs/PSS/DOXO/ PLL/HA conteniendo 75 y 100 µg del fármaco, respectivamente. Significado estadístico comparado a 4 ºC para cada grupo: * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.005. **140**

FIGURA 3.16 Internalización célular de la nanoplataforma obtenida a través de medidas de ICP-MS en células 3T3 Balb y HeLa tras la deposición de cada capa: AuNRs/PSS, AuNRs/PSS/PLL, AuNRs/PSS/PLL/ HA y célula sola. **142**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FIGURA 3.17 Imágenes de TEM de la nanoplataforma AuNRs/PSS/ DOXO/PLL/HA dentro de a-b) células 3T3 Balb en ausencia de irradiación NIR, c-d) células HeLa en ausencia de irradiación NIR, y e-f) células HeLa en presencia de irradiación NIR (808 nm, 1,0 W/cm^2). d) muestra una vesícula conteniendo numerosas nanoplataformas. En a-b) los círculos rojos denotan partículas dentro de las células, mientras que las flechas las muestran fuera. **143**

FIGURA 3.18 Imágenes de microscopía de fluorescencia de la internalización celular de AuNRs/PSS/DOXO/ PLL/HA y la posterior liberación de la DOXO encapsulada tras 24 h de incubación en las líneas celulares a) Balb 3T3 y b) HeLa. Las imágenes que se muestran son las correspondientes a cada canal de fluorescencia más la combinación de los tres canales empleados: el canal azul recoge la fluorescencia de los núcleos celulares teñidos con DAPI (λ_{ex} = 355 nm); el canal rojo la fluorescencia de la DOXO (λ_{ex} = 488 nm); y el canal de campo claro muestra la imagen óptica directa. Las barras de la escala corresponden a 10 µm. **144**

FIGURA 3.19 Imágenes de microscopía de fluorescencia combinadas de AuNRs recubiertos con PSS/DOXO y PSS/DOXO/PLL/HA dentro de a) células 3T3 Balb y b) HeLa a diferentes tiempos de incubación y condiciones de irradiación de luz NIR. El azul corresponde a los núcleos celulares teñidos con DAPI (λ_{ex} = 355 nm) y el rojo a la fluorescencia

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DOXO (λ_{ex} = 488 nm). Las barras de escala son de 10 µm. **145**

FIGURA 3.20 Principales mecanismos de muerte celular después de la administración de DOXO libre, AuNRs/PSS/PLL/HA y AuNRs/PSS/DOXO/ PLL/HA cargados con 75 µg y 100 µg de DOXO en las líneas celulares a) HeLa y b) 3T3 Balb a diferentes temperaturas y fluencias de luz NIR aplicadas. **147**

FIGURA 4.1 Espectro de absorción UV-Vis para la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA después de la deposición de cada capa en la superficie de la Np metálica. Se muestran algunas propiedades físicas del sistema: b) Desplazamiento de la banda plasmónica longitudinal (■) y disminución de la absorbancia de las bandas plasmónicas longitudinal (●) y transversal (○), y c) valores de potencial-ζ después de cada capa polimérica depositada. Las líneas sólidas y punteadas únicamente son guías visuales. d) Espectros FTIR de AuNRs/CTAB (—), ICG libre (—), AuNRs/PSS/PLL (—) y AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA (—). Imágenes TEM de e) AuNRs/CTAB; f) AuNRs/PSS; g) AuNRs/PSS/PLL@ICG; y h) AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA. **165**

FIGURA 4.2 a) Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia de ICG libre (■) y AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA (●). b)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Fotoestabilidad de la nanoplataforma AuNRs/PSS/ PLL@ICG/HA después de la iluminación continua con luz NIR de 3,0 (■); 1,0 (●) y (▲) 0,5 W/cm^2. La ICG libre a la máxima fluencia se muestra por comparación (▼). Las líneas son únicamente guías visuales. c) Liberación acumulativa de ICG desde AuNRs/PSS/ PLL@ICG/HA en ausencia (●, ▼) y presencia (■, ▲) de tripsina a pH 5,0 (●,■) y 7.4 (▼, ▲). d) Liberación acumulativa de ICG desde AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA a pH 5,0 en ausencia de tripsina y luz NIR (■), en presencia de tripsina (●), en presencia de iluminación NIR de 1,0 (▲) y 2,0 (◆) W/cm^2, y de la presencia simultánea de tripsina y radiación NIR a 1.0 (▼) y 2.0 (◀) W/cm^2 con una fuente de luz láser de 808 nm (5 min), respectivamente. Las líneas son únicamente guías visuales. Las flechas denotan los tiempos a los que se hicieron las irradiaciones: 2, 5, 9, 12 y 48 h. En (c) y (d) las barras de errores se omiten por claridad, pero las incertidumbres se encuentran dentro del ±15. **167**

FIGURA 4.3 Incrementos de temperatura con el tiempo bajo irradiación de luz NIR (808 nm). Se probaron tres fluencias: 2,0 (a-b), 1,0 (c-d), y 0,5 W/cm^2 (e-f) a dos concentraciones diferentes, $1 \cdot 10^{11}$ Np/mL (columna de la izquierda) y $1 \cdot 10^{10}$ Np/mL (columna de la derecha) para (■) AuNRs/PSS/PLL-ICG/HA y (●) AuNRs/PSS/PLL/HA, (▲) ICG libre, y (▼) disolución acuosa pura. **171**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FIGURA 4.4 Representación esquemática de la distribución de la luz NIR absorbida por AuNRs recubiertos con las capas de PE + ICG. (A%) se corresponde con la energía de la luz incidente. (B%) es una contribución a la conversión de luz en calor. (C%) está relacionado con la energía de la carga inducida por electrones calientes de la superficie del metal a las capas poliméricas que modulan su interacción. (D%) es la contribución de la luz emitida por fluorescencia y la producción de ROS por la ICG. **173**

FIGURA 4.5 Decaimiento de la absorbancia de la sonda DPIBF a 420 nm inducida por la plataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA (—), AuNRs/PSS/PLL/HA (—), ICG libre (—) y disolución acuosa pura (—) a (a) 3,0, (b) 1,0, y (c) 0,5 W/cm^2. (d) AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA iluminados durante 30 min a 3,0 (■), 1.0 (●), y 0.5 (▲) W/cm^2 para comparación de la producción de $^1O_2$. e) Imágenes TEM de AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA internalizadas dentro de endosomas de células HeLa; f) imagen aumentada. g) Imágenes de microscopía confocal de AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA en modo reflexión dentro de células HeLa. Núcleo teñido con DAPI. **174**

FIGURA 4.6 Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la producción de ROS por la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA dentro de células HeLa bajo irradiación NIR con una fuente de luz láser CW (1,0 W/cm^2) durante 15 min. Como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

control negativo se utilizaron células sin tratar, mientras que como control positivo se trataron con H_2O_2. En la imagen se muestra luz transmitida directamente (izquierda), el canal verde de fluorescencia (en el centro, λ_{em} = 520 nm para la detección del kit) e imágenes superpuestas (derecha). Escala = 75 µm. **176**

FIGURA 4.7 Detección de ROS generadas por las nanoplataformas AuNRs/PSS/ PLL@ICG/HA internalizadas en células HeLa bajo irradiación NIR de 1,0 y 2,0 W/cm^2 con un láser continuo a 808 nm por un período de (a) 5 min y (b) 10 min con un kit de detección de ROS por icroscopía de fluorescencia. Las barras de color corresponden a: 4ºC, 6 h de incubación; 25ºC, 6 h de incubación; 37 ºC, 6 h de incubación; 4ºC, 24 h de incubación; 25ºC, 24 h de incubación; 37ºC, 24 h de incubación. Las células sin tratar se utilizaron como control negativo, y las células tratadas con H_2O_2 como control positivo. **178**

FIGURA 4.8 Citotoxicidad celular inducida por la plataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA tras 6 y 24 h de incubación a la fluencia de a) 1,0 y b) 2,0 W/cm^2 tras 5 min de exposición a la irradiación NIR, y a c) 2,0 W/cm^2 tras 10 min de exposición. Las etiquetas corresponden a: células HeLa a las que se le administró H_2O_2 (800 µM), ICG libre (20 µM) AuNRs/PSS/PLL/HA y AuNRs/PSS/PLL@ICG. **181**

FIGURA 5.1 (a) Espectro UV-Vis de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA tras la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

adición de las distintas capas que forman el recubrimiento externo. (b) Desplazamientos de la banda LSPR (•) y decaimiento del LPSR (□) y del plasmón de resonancia superficial transversal, TSPR, (■) tras cada capa depositada. (c) Variación del potencial ζ tras cada capa depositada. (d) Espectros FTIR de (—) DOXO libre, (—) ICG, (—) SiRNA y AuNRs/PSS/DOXO/ PLL@ICG/SiRNA/HA (—). **197**

FIGURA 5.2 Imágenes TEM de la nanoplataforma AuNRs/PSS/ DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA AuNRs tras la deposición de las distintas capas que forman el recubrimiento: (a) CTAB, (b) PSS, (c) DOXO, (d) PLL-ICG, (e) SiRNA, y (f) HA. (g) distribución de tamaños por DLS. **199**

FIGURA 5.3 Determinación de la estabilidad coloidal de la nanoplataforma AuNR/PSS/DOXO/PLL@ICG /siRNA/HA mediante la monitorización de la evolución temporal de sus tamaños hidrodinámicos a (a) pH diferente, (b) en ausencia y presencia de suero bovino fetal (FBS, de sus siglas en inglés), y en presencia de tripsina, a 37ºC y de las variaciones de potencial ζ a (c) pH diferente, (d) en ausencia y presencia de suero bovino fetal (FBS, de sus siglas en inglés), y en presencia de tripsina, a 37ºC. (e) Distribución de población de tamaños de la nanoplataforma en agua + 10% (v/v) FBS tras 24 (—), 48 (—) y 72 h (—) de incubación. **203**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FIGURA 5.4 Perfiles de liberación de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA a (a-f) pH 5.0 y (g-l) pH 7.4 en (a, g) ausencia y (b, h) presencia de tripsina, en presencia de irradiación NIR de (c, i) 1,0 y (d, j) 2,0 W/cm^2, y en presencia de tripsina + irradiación NIR de (e, k) 1,0 y (f, l) 2,0 W/cm^2, respectivamente. (■) DOXO, (□) PLL-ICG, y (▲) SiRNA. Por claridad no se muestran las barras de error, pero la incertidumbre de las medidas se encuentra dentro del ± 15%. **206**

FIGURA 5.5 Viabilidad celular de la nanoplataforma AuNRs/PSS/ DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA en las líneas celulares a) HeLa y b) Balb 3T3 a 24 y 48 h de incubación a 37 ºC. **209**

FIGURA 5.6 Internalización de la nanoplataforma AuNRs/PSS/ DOXO/PLL@ICG/siRNA/ HA en células (a) HeLa y (b) Balb 3T3 tras 12 y 24 h de incubación. Se ha empleado el nanosistema AuNRs/PSS/PLL/HA como control. El canal rojo denota la fluorescencia de la DOXO (λ_{ex} = 488 nm), el canal azul corresponde a los núcleos celulares teñidos con DAPI (λ_{ex} = 355 nm), y el canal verde corresponde al siRNA (λ_{ex} = 530 nm). **211**

FIGURA 5.7 Imágenes de TEM de la nanoplataforma AuNRs/PSS/ DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA en a-b) células HeLa y c-d) células Balb 3T3. **212**

FIGURA 5.8 Generación de ROS (%) de la plataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA después de 30 min tras incubación de 6, 12, 24 y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

48 h en células HeLa bajo la aplicación de fluencias de 1.0 y 2.0 W/cm^2 con un láser continuo de 808 nm después de (a-d) 5 y 10 min (e-h) min de exposición. Como control positivo se empleó H_2O_2 (800 μM), y negativo células HeLa. El nanosistema AuNRs/PSS/PLL/HA se empleó como control adicional. **214**

FIGURA 5.9 Viabilidad celular de células (a-d) HeLa y (e-h) Balb 3T3 a diferentes tiempos de incubación y temperatura en presencia de iluminación NIR de (a, b, e, f) 1.0 W/cm^2 y (c, d, g, h) 2.0 W/cm^2 a (a, c, e, g) 24 y (b, d, f, h) 48 h de incubación. **216**

FIGURA 5.10 Perfiles de liberación de la (■) DOXO, (●) PLL-ICG y (▲) siRNA desde la nanoplataforma AuNRs/PSS/ DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA en células HeLa a una fluencia de (a) 1.0 W/cm^2 y (b) 2.0 W/cm^2 y (c), en células Balb 3T3 a 1.0 W/cm^2. (d) Expresión relativa de mRNA de PD-L1 obtenida por RT-PCR a distintos tiempos de incubación y fluencias (luz NIR de 808 nm durante 5 min). **219**

FIGURA 5.11 Indicación del mecanismo de muerte celular después de la administración de (a, f) DOXO, (b, g) ICG, (c, h) Lipofectamina + siRNA, (d, i) AuNRs/PSS/PLL/HA, (e,j) AuNRs/PSS/ PLL@ICG/siRNA/HA tras 48 h de incubación a distintas temperaturas y fluencias de irradiación NIR (808 nm, 5 min) en células (a-e) HeLa y (f-j)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Balb 3T3 mediante el ensayo de Anexina V-yoduro de propidio. **222**

FIGURA 5.12 Mecanismos de muerte celular obtenidos por citometría de flujo para la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/ PLL@ICG/siRNA/HA tras 48 h de incubación en células HeLa y comparación con el nanosistema AuNRs/PSS/PLL/HA. **223**

FIGURA 6.1 Imágenes de TEM de nanopartículas UpCvs $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ y su correspondiente distribución de tamaños para diferentes razones molares Ln^{3+}: OA de 1:16,5, 1:19, 1:20 and 1:21,5: cubos (a, e), nanocilindros (b, f), nanocilindros cortos (c, g) y esferas (d, h), respectivamente. Imágenes de TEM de nanopartículas UpCvs esféricas de composición $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Tm_{0.005}$ y su correspondiente distribución de tamaños para razones molares Ln^{3+}: OA de 1:18 (i, m) y 1:20 (j, n) y nanopartículas UpCvs esféricas de $NaGdF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ (k, o) y hexagonales de $NaYF_4$: $Yb_{0.3}$: $Nd_{0.01}$: $Er_{0.005}$ (l, p) obtenidas a una razón molar de Ln^{3+}: OA de 1:19. **241**

FIGURA 6.2 Análisis EDX de nanopartículas UpCvs de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ de simetría esférica obtenidas a una razón molar Ln^{3+}: OA de 1:20. **243**

FIGURA 6.3 Patrones de difracción de XRD de las nanopartículas UpCvs de composición $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ con morfología: cúbica (—), nanocilindro (—), nanocilindro corto (—), y esférica (—); de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Tm_{0.005}$ con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

morfología esférica a la razón molar de Ln^{3+}: OA de 1:18 (—) y1:20 (—); de $NaGdF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ de simetría esférica (—); y de $NaYF_4$: $Yb_{0.3}$: $Nd_{0.01}$: $Er_{0.005}$ de morfología hexagonal (—). Debajo se muestran los picos de difracción de las estructuras cristalinas α-cúbica y β-hexagonal de la matriz de $NaYF_4$. b) Espectros de fluorescencia de las nanopartículas UpCvs de composición NaYF4: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ con morfología cúbica (—), nanocilindro (—), nanocilindro corto (—), y esférica (—); y de NaYF4: $Yb_{0.18}$: $Tm_{0.005}$ con morfología esférica obtenidas a la razón molar de Ln^{3+}: OA de 1:18 (—) bajo excitación con una fuente de luz láser de 980 nm. **244**

FIGURA 6.4 Emisión de fluorescencia de nanopartículas UpCvs de $NaYF_4$: $Yb_{0.3}$: $Nd_{0.01}$: $Er_{0.005}$ en los rangos a) UV, b) visible y c) NIR; y d) de Nps de $NaGdF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ bajo excitación con luz laser a 980 nm. **245**

FIGURA 6.5 Espectros FTIR de nanopartículas UpCvs esféricas de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ recubiertas con OA (—), AET (—), DMSA (—), PEG (—), y PMA (—). b) Distribución de tamaños de nanopartículas UpCvs recubiertas con OA (—), AET (—), DMSA (—), PEG (—), y PMA (—). Fracción de iones F^- disueltos de nanopartículas UpCvs esféricas de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ (10 µg/mL) recubiertas de (●) AET, (■) DMSA, (▲) PEG, y (▼) PMA incubadas en c) disolución de tampón borato, d)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PSF, e) DMEM, f) DMEM+10 (v/v) FBS, y g) PFS+1 mM de KF. Razón de decaimiento de fluorescencia de nanopartículas UpCvs esféricas recubiertas de (●) AET, (■) DMSA, (▲) PEG, y (▼) PMA incubadas en h) disolución de tampón borato, i) PSF, j) DMEM, k) DMEM+10 (v/v) FBS. l) Razón de decaimiento de fluorescencia para nanopartículas UpCvs esféricas de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ recubiertas con AET e incubadas en PSF a una concentración de 10 μg/mL en presencia de (●) 0 y (■) 1 mM KF, y a una concentración de (▼) 50, (▲) 100 y (◆) 1000 μg/mL en ausencia de KF. **247**

FIGURA 6.6 Imágenes TEM de nanopartículas UpCvs esféricas de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ UpCvs recubiertas con AET (a-d), DMSA (e-h), PEG (i-l) y PMA (m-p) incubadas a 0 (a, c, e, g, i, k, m, o) y 48 h (b, d, f, h, j, l, n, p) en PSF (a, b, e, f, i, j, m, n) y DMEM+10% (v/v) FBS (c, d, g, h, k, l, o, p). **249**

FIGURA 6.7 Estabilidad coloidal analizada en términos de cambio de (a, c) tamaño hidrodinámico y (b, d) potenciales ζ después de 48h de incubación en medios (a, b) DMEM+10% v/v FBS y (c, d) PSF para nanopartículas UpCvs esféricas $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ recubiertas con (●) AET, (■) DMSA, (▲) PEG, y (▼) PMA. **252**

FIGURA 6.8 Viabilidad celular para nanopartículas UpCvs recubiertas con UpCvs@AET , UpCvs@DMSA , UpCv@PEG y UpCvs@PMA en células Hela después de a)

24 y b) 48 h de incubación, y en células 3T3 Balb después de c) 24 h y d) 48 h de incubación. **254**

FIGURA 6.9 Imágenes de microscopía confocal después de la administración de a) UpCvs@AET-6h, b) UpCvs-24h, c) UpCvs@DMSA-6h, d) UpCvs@DMSA-24h, e) UpCvs@PEG-6h, f) UpCvs@PEG-24 h, g) UpCvs@PMA-6h, y h) UpCvs@PMA-24h en células HeLa. Imágenes de TEM indicando la internalización celular de i) UpCvs@AET, j-k) UpCvs@DMSA y l) UpCvs@PMA. m) Nps endocitadas en células HeLa a diferentes tiempos de incubación: UpCvs@AET, UpCvs@DMSA, UpCvs@PEG y UCNP@PMA. n) Nanopartículas exocitadas desde células HeLa después de 6 y 24 h de incubación: UpCvs@AET, UpCvs@DMSA, UCNP@PEG y UCNP@PMA. **256**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1 Matrices anfitrión/dopante con tierras raras, sus estructuras cristalinas, morfología y la literatura donde se puede observar [160]. **35**

TABLA 2.1 Los cebadores. **101**

TABLA 2.2 Razones molares buscadas entre los precursores de tierras raras, LnCl3 y el estabilizante OA. **104**

TABLA 2.3 Concentración final y la composición de las nanopartículas sobreconversoras se realizó a través de medidas de ICP-MS **108**

TABLA 3.1 Eficiencia de conversión fototérmica, η, y razón característica de velocidad de calor, τs, de disoluciones de AuNRs a diferentes fluencias y ciclos de calentamiento-enfriamiento. **135**

TABLA 5.1 Propiedades de los AuNRs tras cada capa depositada en superficie. Los datos son el promedio de 3 lotes diferentes de AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/ HA. El desplazamiento del LSPR de los AuNRs se calculó como $\Delta\lambda = \lambda$ (i)-λ(CTAB). Los decaimientos longitudinales y transversales se expresan como la relación entre la absorbancia de la luz de la capa i con respecto a la de la capa de CTAB. **198**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TABLA 5.2 Porcentajes de liberación DOXO, ICG y siRNA desde la nanoplataforma AuNRs/PSS/ DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA tras 96 h de incubación a las distintas condiciones seleccionadas. **207**

TABLA 6.1 Composición elemental experimental de las nanopartículas UpCvs obtenidas por ICP-MS (en mol%). **242**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

LISTA DE PUBLICACIONES

A continuación, se muestra una lista de las potenciales publicaciones científicas que se esperan derivar del presente trabajo de investigación, así como aquellas en las que se ha colaborado a lo largo de estos años de doctorado y ya están publicadas, pero que no forman parte del cuerpo de la presente Tesis doctoral:

PUBLICACIONES

Lilia Arellano, Eva Villar-Alvarez, Alejandro Varela, Valeria Figueroa, Javier Fernández, Adriana Cambón, Gerardo Prieto, Silvia Barbosa, Pablo Taboada. *Multimodal nanoplatform based on AuNRs with photothermal and chemotherapeutic capacities for câncer treatment.*

Lilia Arellano, Eva Villar-Alvarez, Alejandro Varela, Alba Costa, Javier Fernández, Brenda Velasco, Adriana Cambón, Alberto Pardo, Silvia Barbosa, Pablo Taboada. *Light excitation of gold nanorod-based hybrid nanoplatforms for simultaneous bimodal phototherapies*.

Lilia Arellano, Eva Villar-Alvarez, Alejandro Varela, Silvia Barbosa, Pablo Taboada. *Gold nanorod-based hybrid nanoplatform for multimodal cancer therapy*.

Lilia Arellano, Eva Villar-Alvarez, Alejandro Varela, Silvia Barbosa, Pablo Taboada. *Evaluation of upconverting ceramic nanoparticles for potential biomedical applications.*

Lilia Guadalupe Arellano-Galindo, Ana Cecilia Reynosa-Martínez, Juniet Rebeca Gaitán-Arévalo, María Fernanda Valerio-Rodríguez, Ge¿regorio Vargas-Gutiérrez, Eddie López-Honorato. *Superhydrophobic to superhydrophilic wettability transition of functionalized* SiO_2. Ceramic International. 48, 21672-21678 (2022) DOI: https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.04.137

Rahimeh B.Attasgah, Brenda Velasco-Rodríguez, Alberto Pardo, Javier Fernández-Vega, **Lilia Arellano-Galindo**, Luis Carlos Rosales-Rivera, Gerardo

Prieto, Silvia Barbosa, José Félix Armando Soltero, Morteza Mahmoudi, Pablo Taboada. *Development of functional hybrid scaffolds for wound healing applications.* iScience, 25, 104019. (2022) DOI: https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104019

Baltazar Hiram Leal, Brenda Velasco, Adriana Cambón, Alberto Pardo, Javier Fernandez-Vega, **Lilia Arellano**, Abeer Al-Modlej, Víctor X. Mosquera, Alberto Bouzas, Gerardo Prieto, Silvia Barbosa, Pablo Taboada. *Combined Therapeutics for Atherosclerosis Treatment Using Polymeric Nanovectors*. Pharmaceutics. 14, 258, (2022) DOI: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020258

LIBROS Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS

L. Arellano, E. Villar, B. Velasco, A. V. Marcos, B. H. Leal, R. Martínez, A. Cambón, A. A. Almedlej, S. Barbosa, P. Taboada. *Hybrid nanoplatforms for cancer theranostics*. 8th Iberian Meeting on Colloids and Interfaces (RICI8) (Julio 2019 Aveiro Portugal).

B. Velasco Rodríguez, L. C. Rosales Rivera, J. F. A. Soltero Martinez, **L. G. Arellano**, A. V. Marcos, M. Navarro, J. Fernández-Vega, B. H. Leal, A. Almedlej, S. Barbosa, P. Taboada. *Development of polymeric gels for their application in regenerative medicine*. 8th Iberian Meeting on Colloids and Interfaces (RICI8) (Julio 2019 Aveiro Portugal).

A.V. Marcos, J. Fernández-Vega, B. Rodríguez, **L. Arellano**, M. Navarro, R. Martínez, A. Pardo, B. Pelaz, P. del Pino, S. Barbosa, P. Taboada. *Synthesis and characterization of Cobalt (II)/Nickel (II)-Imidazolate Nanoparticles*. 8th Iberian Meeting on Colloids and Interfaces (RICI8) (Julio 2019 Aveiro Portugal).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

L. Arellano, E. Villar, B. Velasco, A. V. Marcos, A. Cambón, A. A. Almedlej, S. Barbosa, P. Taboada. *Hybrid nanoplatforms for cancer theranostics*. V Reunión de Jóvenes Investigadores en Coloides e Interfases (JICI5) (Zaragoza, España. Marzo 2020). Tipo de presentación: Ponencia.

L. Arellano, B. Velasco, V. Figueroa, E. Villar, A. Cambón, A. A. Almodlej, S. Barbosa, P. Taboada. *Nanoplatforms based on plasmonic nanoparticles for multitherapy in the treatment of cancer*. The 2nd International Online Conference on Nanomaterials. (Online Noviembre 2020).

Lilia Guadalupe Arellano Galindo. *Nanoplataformas inorgánicas como elementos activos en sistemas teragnósticos y de biodetección*. 1er simposio relacionado a ciencia e ingeniería de materiales. (Online Mayo 2021)

Lilia Arellano*, Valeria. Figueroa, Adriana. Cambón, Silvia. Barbosa, Pablo. Taboada. *Nanoplataformas inorgánicas como elementos activos en sistemas teragnósticos y de biodetección*. 4to Coloquio en Materiales de Interés Biotecnológico: "Perspectivas en la Salud Humana". (Online Diciembre 2021)

Lilia Guadalupe Arellano Galindo. *Compartiendo experiencia entre Químicos*. Universidad Juárez del Estado de Durango. (Online Septiembre 2021.)

Arellano L, Velasco B, Figueroa V, Cambón A, Barbosa S, Taboada P. *Nanoplataformas inorgánicas como elementos activos en sistemas teragnósticos y de biodetección.* 1ra Jornada de Difusión y Divulgación de la Ciencia en el Posgrado. (Online Junio 2021).

L. Arellano, B. Velasco, V. Figueroa, E. Villar, A. Cambón, S. Barbosa, P. Taboada. *Nanoplatforms based on plasmonic nanoparticles for multitherapy in the treatment of cancer*. 4th Spanish Conference on Biomedical Applications of Nanomaterials (Online Julio 2021).

Lilia Guadalupe Arellano Galindo. *Nanoplataformas inorgánicas como elementos activos en sistemas teragnósticos y de biodetección*. VIII Encontro da Mocidade Investigadora. (Mayo 2021 Santiago de Compostela).

Lilia Guadalupe Arellano Galindo, Valeria Figueroa Velarde, Alejandro David Varela Dopico, Osvaldo Beltrán Osuna, Adriana Cambón Freire, Alberto Pardo Montero, Silvia Barbosa Fernández, Pablo Taboada Antelo. *P-78 - Nanoplatforms based on plasmonic nanoparticles for multitherapy in the treatment*

of cancer. IX Iberian Meeting on Colloids and Interfaces (RICI9). (Julio 2022 Santiago de Compostela).

Óscar Abelenda Caamaño, Brenda Velasco-Rodríguez, **Lilia Guadalupe Arellano Galindo**, Javier Fernández Vega, Adriana Cambón Freire, Pablo Taboada Antelo. *P-81 - New nanoplatforms for the controlled release of active agents for the treatment of inflammation*. IX Iberian Meeting on Colloids and Interfaces (RICI9). (Julio 2022 Santiago de Compostela).

Javier Fernández Vega, Brenda Velasco Rodríguez, Altair Victoria Marcos Gómez, Valeria Figueroa Velarde, **Lilia Guadalupe Arellano Galindo**, Silvia Barbosa Fernández, Pablo Taboada Antelo. *P-83 - Tunning the morphology of gold nanostars in Metal-Organic Frameworks through the control of surfactants*. IX Iberian Meeting on Colloids and Interfaces (RICI9). (Julio 2022 Santiago de Compostela).

Valeria Figueroa Velarde, Pablo Taboada Antelo, Brenda Velasco Rodríguez, Marisol Gastelum Cabrera, **Lilia Guadalupe Arellano Galindo**, J. Félix Armando, Soltero Martínez, Luis Carlos Rosales Rivera, Silvia Barbosa Fernández. *P-75 - Assessment of PEG functionalization onto AuNRs by potentiometric titration*. IX Iberian Meeting on Colloids and Interfaces (RICI9). (Julio 2022 Santiago de Compostela).

Brenda Velasco Rodríguez, Javier Fernández Vega, **Lilia Guadalupe Arellano Galindo**, Luis Carlos Rosales Rivera, J. Félix Armando Soltero Martínez, Vicente Domínguez Arca, Silvia Barbosa Fernández, Pablo Taboada Antelo. *P-77 - GelMA-HAMA hydrogels for bone regeneration*. IX Iberian Meeting on Colloids and Interfaces (RICI9). (Julio 2022 Santiago de Compostela).

Alejandro Ogando, Alejandro Varela, **Lilia Arellano**, Alberto Pardo, Silvia Barbosa, Pablo Taboada, Adriana Cambón. *P-84 - Gold nanoclusters embedded in bovine serum albumin as a therapeutic nanoplatform to fight against Alzheimer*. IX Iberian Meeting on Colloids and Interfaces (RICI9). (Julio 2022 Santiago de Compostela).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Xaniar Esmaeilzadeh, **Lilia Arellano**, Alba Costa, Brenda Velasco, Altair Victoria Marcos, Pablo Taboada, Silvia Barbosa, Adriana Cambon Freire. *P-86 - Optimization of the photothermal effect of gold nanoheaters under continuous and pulse laser*. IX Iberian Meeting on Colloids and Interfaces (RICI9). (Julio 2022 Santiago de Compostela).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

LISTA DE ABREVIATURAS

A

Au	Oro
AuNRs	Nanocilindros de oro
AA	Ácido ascórbico
Abs	Absorbancia
Abs_i	Absorbancia en magnitud *i*
AR	Aspecto / Radio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AET	2-aminoetil dihidrógeno fosfato

B

Balb 3T3	Fibroblastos de ratón

C

C	Concentración
Ca	Aproximadamente
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CCK-8	Kit de conteo de células-8

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

C_{ext}	Sección transversal de extinción
CMC	Concentración crítica de micelas
CMT	Temperatura crítica de la micela
CW	Luz de onda continua
CD44	Glicopoteína de superficie celular

D

DLS	Dispersión dinámica de la luz
DAPI	4´,6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOXO	Doxorrubicina; Adriamicina®
DPIBF	1,3-difenilisobenzofurano
DRX	Dispersión de Rayos X
DMSA	Meso-2,3 ácido dimercaptosucinico
DDA	Dodecilamina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

E

ECM	Matriz extracelular
EE	Eficiencia de encapsulación

F

FBS	Suero bovino fetal
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

H

HA	Ácido hialurónico
HeLa	Cáncer de cuello uterino
H_2O MQ	Agua Mili-Q

I

ICG	Verde de indocianina
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
I_E	Intensidad Emisión
IR	Espectroscopia infrarroja

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

L

LbyL	Capa por Capa

LSPR	Resonancia de plasmon superficial localizada

M

MoF	Estructura metal-orgánico

N

NHS	N-hidroxisuccinimida
NIR	Infrarrojo cercano
Np -Nps	Nanopartícula / nanopartículas

O

OD	Densidad óptica
OA	Ácido oleico
OE	Octadeceno

P

PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PDT	Terapia fotodinámica
PE	Polielectrolitos
pI	Punto isoeléctrico
pK*a*	Logarítmico de la constante de disociación ácida K_a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PLL	Poli-L-lisina
PPTT	Terapia fototérmica plasmónica
PSs	Fotosensibilizante
PSS	Poli (4-estirenosulfonato de sodio)
PEG	Polietilenglicol
PMA	Poli (isobtutileno-alt-maleico anhidro)
PSF	Ácido fosfórico

R

RI	Índice de refracción
RNA	Ácido ribonucleico
RNA*i*	interferencia de ARN
ROS	Especies de oxígeno reactivas

S

SD	Desviación estándar
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SiRNA	Pequeño ARN de interferencia
SLS	Dispersión de luz estática
STEM	Microscopio electrónico de transmisión de barrido
SBB	Borato de sodio

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

T

TEM	Microscopio de transmisión por electrones
T	Temperatura
TI	Tomografía infrarroja
TSPR	Resonancia de plasmon superficial Transversal

U

UV-Vis	Espectroscopia de ultravioleta visible
UpCvs	Sobreconversoras (Up-converting)

Letras griegas

ζ	Potencial Z
ε	Constante dieléctrica
λi	Longitud de onda relacionada con i
θ	Ángulo de dispersión
η	Eficiencia de conversión fototérmica
τs	Velocidad de transferencia de calor
ΔT	Diferencial de temperatura

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, agradezco a la vida y a Dios, por el esfuerzo que me han permitido tener para poder concluir este trabajo de investigación, lo cual culmina en una tesis que ha conllevado mucha energía, fuerza, dedicación, sudor, risas, lagrimas, soledad, compañía, pero aquí estamos, concluyendo una etapa importante en esta vida. Porque separarse de la vida, de tus raíces es difícil, pero es un gran sacrificio que no solo yo he realizado, por lo que quisiera agradecer a todos los que me han acompañado en este camino.

Antes de agradecer a todos los que han acompañado en este camino, quiero agradecer a la persona que me ha acompañado en esta vida, y que lo decide día a día, a ti mi Esposa Carolina, que has sido la persona que creyó en esta locura, que me ayudó a llenar esos papeles de la beca, y que jamás dejaste de confiar en mí, que aun con el amor a distancia, que vivimos mil cosas siempre estuviste aun con las 7 horas de diferencia, no hubo nunca algo que nos hiciera cambiar de parecer, gracias amor, por tanto, por arriesgarte a estar aquí, porque juntas hemos formado un camino, creímos en este sueño, y hoy se vuelve realidad, un pequeño escalón más amor, como un día me dijiste, nuestro más grande miedo no es la oscuridad, sino nuestra propia luz, pues veme amor brillando sin miedo a dar lo mejor, gracias por todo, por amarme y seguiremos en este camino, porque todo lo que me pase, quiero que me pase contigo.

Agradezco a mis directores de Tesis, los doctores Pablo Taboada y Silvia Barbosa, por haberme dado la oportunidad de realizar mi doctorado en el grupo de investigación y así como también por sus consejos, sabiduría y correcciones durante las diferentes etapas de este trabajo, por su apoyo tanto personal como profesional, son mis padres científicos, de los cuales he aprendido cada una de sus lecciones, y espero se sientan orgullosos de este trabajo, como yo de pertenecer a su grupo de investigación. Les agradezco de todo corazón el haberme enseñado tanto en este tiempo porque fueron 4 años de vida, lejos de mi hogar, de no dejarme sentir jamás sola, y que las crisis que se viven en esta carrera de fondo. También me escucharon

siempre, por todas sus charlas y palmaditas en la espalda cuando sentía que no podía más, gracias a ustedes he crecido, he madurado y tengo una razón muy fuerte para venir a Santiago de Compostela a visitarlos, y a que vean como su pupila llegará lejos.

De manera muy especial y sincera quiero agradecer al Dr. Gerardo Prieto y la Dra. Adriana Cambón, quien, con su apoyo, experiencia, conocimiento, paciencia y motivación a lo largo de este proceso y aprendizaje, me permitieron el desarrollo con éxito de este trabajo de investigación. Muchas gracias de corazón. También me gustaría agradecer a la Dra. Eva Villar y a la Dra. Raquel Martínez por la paciencia infinita que tuvieron en su final de doctorado, ya que me brindaron los inicios de este hermoso trabajo, y sus conocimientos me han acompañado en todo momento.

Mis agradecimientos también para todos los colaboradores que hicieron posible el desarrollo de este proyecto de investigación. De igual manera, gracias a la Universidad de Santiago de Compostela y al CIQUS (Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares) por haberme brindado sus equipos para el desarrollo de esta investigación, y por ende la culminación exitosa de mis estudios doctorales.

También quisiera agradecer a los miembros del Lab. de Física de Coloides y Polímeros (GFCP) y del Departamento de Física, al Dr. Alberto, Dr. Vicente (Señor Vicente, como me ayudo a centrarme cuando mi horizonte andaba muy perdido) Javier (Javi), Dra. Brenda, Valeria, Victoria, Zaniar, Dra. Natalia, Dra. María (CIQUS), Manuel (CIQUS) esos compañeros que iniciaron este sueño conmigo, algunos terminaron antes otros lo harán después, pero sufrimos juntos, reímos juntos, y vivimos este camino con todas las fuerzas que pudimos, logrando una amistad única. A los compañeros que fueron llegando Alba, Oscar, Mariángel, Osvaldo, Alejandro, Andrea, Clara, Xabi, Sabela, Iría, esos pequeños pupilos que a su paso fueron generando que, en mi la habilidad de enseñanza, pero sobre todo de amistad, personas que me han hecho este último año el más grande y genial de todos, esas amistades que jamás se olvidaran y sepan que siempre contaran conmigo, es su turno pequeños, de cumplir sus sueños, disfruten su doctorado, esfuércense como nunca que este camino es largo, a veces duro, pero genera muchas satisfacción. Pero

quiero hacer énfasis en ese pequeño pupilo que espero cumpla con el dicho el alumno supera al maestro, Alex, quien llego a mi vida para aprender, y termine aprendiendo yo también de él, ahora es tu turno, a romperla pequeño, que donde estemos sabes que tendrás un lugar.

Y, por supuesto, quiero agradecer profundamente y de corazón a toda mi familia, mi abuelita, la persona que siempre reza y nunca dudo de mí, que me enderezo en este camino y hoy en día espero que se sienta orgullosa de mí, como yo siempre le agradeceré a la vida por ponerla como mi segunda madre. A mis hermanos Gonzalo, Jessica, Sebastián, que siempre me dieron su apoyo. A mi padre Porfirio que me brindó todo de él, que es mi superhéroe y que nunca ha dudado de mí, gracias por todo lo que me ha dado, espero que este logro me permita agradecer tanto que usted me ha dado. A mi tía María Inez Galindo Reza que sin ella no hubiera llegado aquí, quien me trajo y siempre ha sido mi ejemplo para seguir, gracias por nunca dejar de creer en mí y por siempre mostrarme el amor a la investigación y a la ciencia, por sus abrazos que me hicieron creer siempre en mí, y cuando estuve sola jamás me dejó. A todos mis tíos, tías, primos que están siempre impulsando y creyendo en mí, gracias por su inspiración, por su ejemplo de motivación y apoyo a lo largo de todo este proceso. También agradecer a mi nueva familia, a la señora Mine, al señor Jaime, a Jaime y David, que siempre me han apoyado y me dan sus palabras de motivación y amor, que cada logro pequeño que cumplo me ha aplaudido y dado todo su apoyo, gracias por todo, sientan que todo este trabajo es gracias a ustedes, y le agradezco a Dios que están todos conmigo.

Finalmente, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) del Gobierno de México por hacer posible que realizará mis estudios doctorales en la Universidad de Santiago de Compostela con la financiación en toda mi etapa de doctorado mediante la concesión de la beca “Becas CONACYT Al Extranjero, Consejos Estatales Gobierno del Estado de Coahuila de Zaragoza (COECYT) 2018-2022, CVU. 685623.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

En las últimas dos décadas, la aplicación de la nanotecnología a la medicina ha dado lugar a un nuevo campo de la ciencia conocido como Nanomedicina. Una de las principales líneas de investigación en este nuevo campo del conocimiento se centra en el potencial acoplamiento de dos áreas clásicas de la medicina, como son el diagnóstico y la terapia, mediante el desarrollo de nuevos nanosistemas multimodales capaces de combinar y aplicar simultáneamente capacidades diagnósticas y terapéuticas, es decir, para convertirse en verdaderas plataformas teranósticas, especialmente indicadas para una enfermedad tan compleja como el cáncer. Con dicha información, se pueden diseñar plataformas teranósticas para tratamientos personalizados, así como para minimizar el daño a los tejidos sanos. Además, estas nanoestructuras teranósticas deben permitir la monitorización de la actividad terapéutica posibilitando su modificación conveniente para la optimización del tratamiento. Para cumplir adecuadamente estos objetivos, las plataformas teranósticas deben cumplir una serie de requisitos:

1. Permitir su acumulación rápida y selectiva en el tejido/célula enferma.
2. Proporcionar información sobre las características morfológicas y/o bioquímicas de la célula/tejido tumoral.
3. Para proporcionar un contraste de bioimagen avanzado.
4. Proteger y liberar biomoléculas terapéuticas de forma controlada y eficaz.
5. Ser no tóxico y biodegradable.
6. Ser controlable bajo demanda.

Existen diferentes nanosistemas/nanoestructuras que, gracias a sus propiedades, son susceptibles de ser utilizadas como plataformas teranósticas que se pueden clasificar en función de su núcleo: orgánicos como nanopartículas poliméricas, lipídicas, dendrímeras o de carbono (Nps); inorgánicos como metal, óxido de hierro, silicio, cerámica, puntos cuánticos semiconductores, etc.; y biológicos tales como proteínas, ácidos nucleicos y envolturas virales.

Entre las Nps de tipo inorgánico y carácter metálico, las Nps de oro, gracias a sus especiales propiedades físico-químicas y ópticas, muestran un especial interés en el campo de la teranóstica oncológica. En particular, las Nps de oro anisotrópicas bajo excitación lumínica adecuada, concretamente en el espectro electromagnético del infrarrojo cercano (NIR) dentro de la ventana biológica, dan lugar a la generación de calor localizado bajo desexcitación que puede ser utilizado para la erradicación selectiva de células tumorales, es decir, a la llamada terapia fototérmica plasmónica (PPTT). Además, la elevada área superficial de este tipo de Nps respecto a su volumen las convierte en excelentes nanovehículos para encapsular/adsorber en su superficie diferentes agentes bioactivos, como agentes quimioterapéuticos para quimioterapia, fotosensibilizadores para terapia fotodinámica (TFD), o material genético para genes terapia.

Otro tipo de nanoplataformas inorgánicas que están mostrando un gran potencial como nanoplataformas teranósticas son las basadas en upconverting Nps, UpCvs, dopadas con iones lantánidos ya que ambas son fácilmente funcionalizables y permiten obtener una imagen óptica para el diagnóstico in situ. Este tipo de Nps supera varias de las limitaciones que presentan las sondas de imagen convencionales, que suelen utilizar emisión de Stokes mediante excitación UV-Vis. Este tipo de excitación de luz tiene varios inconvenientes como su baja profundidad de penetración en los tejidos biológicos y alta dispersión y autofluorescencia tisular, alto potencial de daño en el ADN y muerte celular debido a exposiciones prolongadas y/o posibles efectos tóxicos cuando se utilizan sondas basadas en metales pesados como como puntos cuánticos. En este sentido, las nanopartículas de UpCvs dopadas con lantánidos se excitan siguiendo un proceso óptico no lineal en la región NIR, emitiendo luz en longitudes de onda más cortas gracias al espectáculo de iones trivalentes lantánidos de energía real tipo escalera que permite la producción de luminiscencia anti-Stokes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por todo ello, esta Tesis Doctoral se centra en la obtención y estudio de diferentes nanosistemas/plataformas multimodales teranósticos, que superen los inconvenientes de los tratamientos/nanoportadores existentes en la actualidad. De esta forma, este trabajo de investigación se divide en dos partes bien diferenciadas.

La primera parte se centra en la síntesis, caracterización y aplicaciones biológicas de nanoplataformas basadas en nanoportadores metálicos de oro cilíndricos, AuNRs, ya que su estructura anisotrópica permite generar una resonancia de plasmón longitudinal (LPSR) en el NIR que las convierte en potenciales nanoplataformas para aplicaciones térmicas y fotodinámicas. terapia, además de ser fácilmente funcionalizable en la superficie para terapia química y génica. La segunda parte de esta Tesis se centra en el desarrollo de nanosistemas basados en la conversión ascendente de nanopartículas dopadas con iones lantánidos de tierra para aplicaciones potenciales de bioimagen.

En concreto, esta Tesis Doctoral se distribuye en siete Capítulos organizados de la siguiente manera:

El capítulo 1 es un capítulo introductorio que se divide en 3 partes. La primera parte pretende proporcionar al lector los fundamentos generales y conceptos básicos de los nanomateriales y su aplicación en la lucha contra el cáncer. La segunda parte busca aportar conocimiento sobre las propiedades de los nanomateriales inorgánicos metálicos de Au y, en particular, los nanocilindros de oro, para comprender y demostrar el interés de esta geometría para las aplicaciones biomédicas previstas. La tercera parte está dedicada a la descripción de las propiedades básicas de las nanopartículas inorgánicas upconverting dopadas con iones lantánidos y su utilidad como sondas de bioimagen para aplicaciones biomédicas.

El Capítulo 2 presenta los diferentes materiales y técnicas de síntesis y caracterización de las diferentes nanoplataformas utilizadas en el presente trabajo, así como la descripción de los diferentes protocolos de caracterización y evaluación biológica de las diferentes nanoplataformas.

Los capítulos 3, 4 y 5 se centran en la síntesis, caracterización y aplicación biomédica de nanoplataformas terapéuticas multimodales basadas en nanovarillas de oro que absorben luz en la primera ventana biológica. Específicamente, el Capítulo 3 se enfoca en la síntesis y caracterización de nanovarillas de oro cargadas con doxorrubicina, un fármaco contra el cáncer comúnmente utilizado en quimioterapia, utilizando la metodología capa por capa (LbL), que se basa en la deposición alterna

de capas de polielectrolitos de poli(4-estirenosulfonato de sodio), PSS, poli-L-lisina, PLL y una capa externa final de ácido hialurónico, HA, este último proporciona una orientación activa hacia las células tumorales que sobreexpresan los receptores CD44 hacia los receptores CD44. Esta nanoplataforma tenía como objetivo liberar el quimiofármaco bajo irradiación NIR y/o estímulos enzimáticos y proporcionar una terapia química y fototérmica única o doble. Una vez obtenidas las nanoplataformas, se comprobó su actividad terapéutica mediante estudios in vitro en células de cáncer de cérvix, HeLa, y fibroblastos de ratón, 3T3 Balb. En el Capítulo 4, los nanorods se funcionalizaron con el fotosensibilizador verde de indocianina, ICG, conjugado con el polímero PLL con el objetivo de generar especies reactivas de oxígeno, ROS. Al igual que en el Capítulo 3, se realizó la caracterización físico-química de la plataforma desarrollada y se verificó su idoneidad para la terapia fotodinámica mediante la evaluación de la producción de ROS mediante la sonda 1,3-diphenilisibenzofuran, DPIBF bajo irradiación NIR a diferentes fluencias y tiempos de exposición. Esta nanoplataforma también se bioevaluó en líneas celulares HeLa y 3T3 Balb para probar su potencial para la terapia fototérmica y fotodinámica combinada. Finalmente, en el capítulo 5 se desarrolló una nanoplataforma capaz de incorporar terapia multimodal a través de la encapsulación de doxorrubicina, ICG, un agente silenciador génico como siRNA para la inhibición del punto de control de PD-L1. En este sentido, se realizó una caracterización físico-química del nanosistema completo, y nuevamente se realizó su validación in vitro en las líneas celulares mencionadas anteriormente bajo irradiación NIR en diferentes condiciones.

El capítulo 6 se centra en la obtención de nanopartículas upconverting de base cerámica con excelentes propiedades ópticas. Estos Nps están compuestos por una matriz cristalina dopada con iones lantánidos de tierras raras capaces de absorber múltiples fotones NIR y su conversión en otros de mayor energía. La longitud de onda de emisión y su intensidad dependen principalmente del tipo de dopante lantánido utilizado y su concentración, de la matriz cristalina y su estructura, del tamaño y forma de la nanopartícula y de su funcionalización superficial. Por ello, en este Capítulo se sintetizaron dos tipos de matrices cristalinas, NaYF4 y NaGdF4, dopadas con iones iterbio como sensibilizadores, y erbio, tulio y/o neodimio como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

activadores, mediante un método de descomposición térmica asistido por metanol. Las Nps se modificaron superficialmente con diferentes ligandos como dimercaptosuccínico, DMSA, polietilenglicol, PEG, 2-aminoetil dihidrógeno fosfato, AET y poli (isobutileno-alt-maleico anhidro), PMA, para proporcionarles la estabilidad coloidal adecuada y biocompatibilidad en diferentes medios de imitación biológicos: DMEM, DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % (v/v), medio de imitación de fagolisosomas (PSF) y uno básico tamponado con borato. También se evaluó la protección potencial que brindan estos recubrimientos para evitar la degradación de las partículas y, por lo tanto, la pérdida de sus excelentes propiedades de luminiscencia para su posible aplicación como agentes de contraste de bioimagen óptica. Posteriormente, también se realizaron estudios in vitro para analizar la biocompatibilidad, internalización y excreción de los diferentes tipos de efecto Nps.

Finalmente, el Capítulo 7 muestra las conclusiones más importantes del trabajo desarrollado.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABSTRACT

In the last two decades, the application of nanotechnology to medicine has given rise to a new field of science known as Nanomedicine. One of the main research lines in this new field of knowledge focuses on the potential coupling of two classic areas of medicine, such as diagnosis and therapy, through the development of new multimodal nanosystems able to simultaneously combine and apply diagnostic and therapeutic capabilities, that is, to become true theragnostic platforms, which are particularly suitable for a disease as complex as cancer. With such information, theragnostic platforms can be designed for personalized treatments as well as for minimizing damage to healthy tissues. In addition, these theragnostic nanostructures must allow the monitoring of the therapeutic activity enabling their convenient modification for optimization of the treatment. To fulfill these goals adequately, theranostic platforms must meet a series of requirements:

1. To allow their rapid and selective accumulation in the diseased tissue/cell.
2. To provide information on the morphological and/or biochemical characteristics of the tumor cell/tissue.
3. To provide advanced bioimaging contrast.
4. To protect and release therapeutic biomolecules in a controlled and effective way.
5. To be non-toxic and biodegradable.
6. To be controllable on demand.

There are different nanosystems/nanostructures that, thanks to their properties, are likely to be used as theragnostic platforms which can be classified on the basis of their core: organic ones such as polymeric, lipid, dendrimer, or carbon nanoparticles (Nps); inorganic ones such as metal, iron oxide, silicon, ceramics, semiconductor quantum dots, etc.; and biological ones such as protein, nucleic acid, and viral envelopes.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Amongst the Nps of inorganic type and metallic character, gold Nps thanks to their special and physico-chemical and optical properties, show a special interest in the field of oncological theragnostic. In particular, anisotropic gold Nps under suitable light excitation, specifically in the near infrared (NIR) electromagnetic spectrum within the biological window, give rise to the generation of localized heat under desexcitation that can be used for the selective eradication of tumor cells, that is, to the so-called plasmonic photothermal therapy (PPTT). In addition, the high surface area of this type of Nps regarding their volume makes them excellent nanovehicles for encapsulating/adsorbing different bioactive agents onto their surface, such as chemotherapeutic agents for chemotherapy, photosensitizers for photodynamic therapy (PDT), or genetic material for gene therapy.

Another type of inorganic nanoplatforms that are showing great potential as theragnostic nanoplatforms are those based on upconverting Nps, UpCvs, doped with lanthanide ions since they are both easily functionalizable and allow obtaining an optical image for on-site diagnosis. This type of Nps overcome several of the limitations presented by conventional imaging probes, which typically use Stokes emission by means of UV-Vis excitation. This type of light excitation has several drawbacks as its low penetration depth into biological tissues and high dispersion and tissue autofluorescence, high potential of DNA damage and cell death due to long exposures, and/or possible toxic effects when using probes based on heavy metals such as quantum dots. In this sense, UpCvs nanoparticles doped with lanthanides are excited following a nonlinear optical process in the NIR region, emitting light at shorter wavelengths thanks to the ladder-like real energy lanthanide-trivalent ions show which allows the production of anti-Stokes luminescence.

For all these reasons, this PhD Thesis focuses on obtaining and studying different theragnostic multimodal nanosystems/platforms, which overcome the disadvantages of currently existing treatments/nanocarriers. In this way, this research work is divided into two well differentiated parts. The first part focuses on the synthesis, characterization, and biological applications of nanoplatforms based on cylindrical gold metallic nanocarriers, AuNRs, since their anisotropic structure

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

allows the generation of a longitudinal plasmon resonance (LPSR) in the NIR that make them potential nanoplatforms for thermal and photodynamic therapy, as well as being easily surface funcionalizable for chemical and gene therapy. The second part of this Thesis focuses on the development of nanosystems based on upconverting nanoparticles doped with earth lanthanide ions for potential bioimaging applications.

Specifically, this PhD Thesis is distributed in seven Chapters organized as follows:

Chapter 1 is an introductory chapter that is divided into 3 parts. The first part aims to provide the reader with the general foundations and basic concepts of nanomaterials and their application to fight against cancer. The second part seeks to provide knowledge about the properties of Au metallic inorganic nanomaterials and, particularly, gold nanocylinders, to understand and demonstrate the interest of this geometry for the envisaged biomedical applications. The third part is dedicated to the description of the basic properties of inorganic upconverting nanoparticles doped with lanthanide ions and their benefit as bioimaging probes for biomedical application.

Chapter 2 presents the different materials and techniques of synthesis and characterization of the different nanoplatforms used in the present work, as well as the description of the different protocols for characterization and biological evaluation of the different nanoplatforms.

Chapters 3, 4 and 5 are focused on the synthesis, characterization, and biomedical application of multimodal therapeutic nanoplatforms based on gold nanorods that absorb light in the first biological window. Specifically, Chapter 3 focuses on the synthesis and characterization of gold nanorods loaded with doxorubicin, an anticancer drug commonly used in chemotherapy, using the layer-by-layer (LbL) methodology, which is based on the alternating deposition of polyelectrolyte layers of poly(sodium-4-styrenesulfonate), PSS, poly-L-lysine, PLL, and a final outer layer of hyaluronic acid, HA, the latter providing active targeting towards tumor cells that overexpress CD44 receptors towards CD44 receptors. This

nanoplatform aimed to release the chemodrug under NIR irradiation and/or enzymatic stimuli and provide single or dual chemical and photothermal therapy. Once the nanoplatforms were obtained, their therapeutic activity was verified through *in vitro* studies in cervical cancer cells, HeLa, and mouse fibroblasts, 3T3 Balb. In Chapter 4, the nanorods were functionalized with the indocyanine green photosensitizer, ICG, conjugated to the PLL polymer with the aim of generating reactive oxygen species, ROS. As in Chapter 3, the physical-chemical characterization of the developed platform was carried out and its suitability for photodynamic therapy was verified through the evaluation of ROS production by means of the 1,3-diphenilisibenzofuran probe, DPIBF under NIR irradiation at different fluences and exposure times. This nanoplatform was also bioevaluated in HeLa and 3T3 Balb cell lines in order to test their potential for combined photothermal and photodynamic therapy. Finally, in Chapter 5 a nanoplatform able to incorporate multimodal therapy through the encapsulation of doxorubicin, ICG, a gene silencing agent as siRNA for PD-L1 check point inhibition was developed. In this sense, a physical-chemical characterization of the complete nanosystem was carried out, and again its in vitro validation was carried out in the previously mentioned cell lines under NIR irradiation at different conditions.

Chapter 6 focuses on obtaining ceramic based upconverting nanoparticles with excellent optical properties. These Nps are composed of a crystalline matrix doped with rare earth lanthanide ions able to absorb multiple NIR photons and its conversion into higher energy ones. The emission wavelength and its intensity depend mainly on the type of lanthanide dopant used and its concentration, on the crystalline matrix and its structure, on the size and shape of the nanoparticle and on its surface functionalization. For this reason, in this Chapter two types of crystalline matrices, $NaYF_4$ and $NaGdF_4$, doped with ytterbium ions as sensitizers, and erbium, thulium and/or neodymium as activators were synthesized by a methanol-assisted thermal decomposition method. Nps were superfacey modified with different ligands such as dimercaptosuccinic, DMSA, polyethylene glycol, PEG, 2-aminoethyl dihydrogen phosphate, AET, and poly (isobutylene-alt-maleic anhydrous), PMA, to provide them with suitable colloidal stability and biocompatibility in different biological mimicking media: DMEM, DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal

bovine serum (FBS), phagolysosomal mimicking medium (PSF), and basic borate buffered one. The potential protection these coatings provide in order to prevent particle degradation and, thus, the loose of their outstanding luminescence properties for their potential application as optical bioimaging contrast agents, as also assessed. Subsequently, *in vitro* studies to analyze the biocompatibility, internalization, and excretion of the different types of Nps effect were also carried out.

Finally, Chapter 7 shows the most important conclusions of the developed work.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 1

"No sé dónde está el límite, pero sí sé dónde no está"

Josef Ajram

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Nanociencia y nanotecnología

En la ciencia de los materiales existen cuatro áreas de estudio: los minerales, los polímeros, las cerámicas y los materiales compuestos. Con el estudio de cada área, se han logrado obtener avances significativos a lo largo del tiempo, llegando a la actualidad, donde se presentan nuevos retos en las aplicaciones tecnológicas de los materiales, ya que los avances generados exigen mayor rendimiento, duración, potencia, etc. Esto generó que los materiales sufrieran una profunda metamorfosis a partir de la década de 1980 lo que permitió el inicio de nuevas áreas de trabajo, entre las que destaca la nanociencia [1].

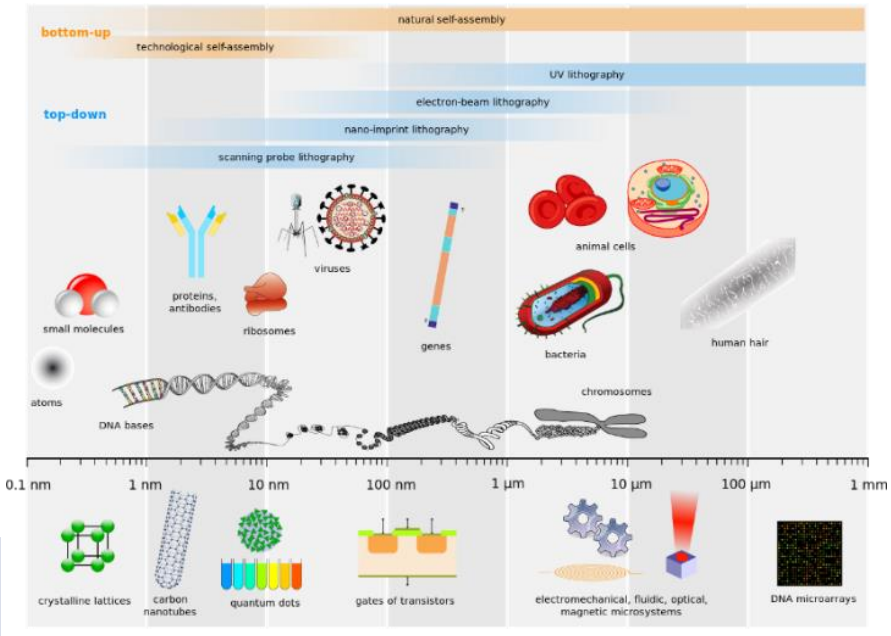


Figura 1.1 Escala comparativa entre organismos biológicos y tecnológicos, para entender la escala de materiales nanométricos. Con licencia de creative commons de Guillaume Paumier.

La nanociencia, es la rama del conocimiento que estudia los fenómenos, las propiedades y la manipulación de la materia a una escala nanométrica (ver **Figura 1.1**), generalmente comprendida entre 0,1-100 nm. Su estudio se centra en el comportamiento y la manipulación de los átomos. moléculas y macromoléculas que manifiestan diferentes propiedades a la de los materiales en la escala macroscópica. La nanociencia abarca diferentes áreas del conocimiento como la física y la química cuánticas, la ciencia de los materiales y la biología molecular [2], por lo que es una ciencia interdisciplinar. La aplicación de esta ciencia al diseño, caracterización y producción de dispositivos y materiales nanoscópicos es conocida como nanotecnología y ha supuesto importantes avances tecnológicos, médicos, espaciales, alimenticios, etc. [2, 3]

1.1.2 La nanomedicina y los nanomateriales

La aplicación de la nanotecnología a la medicina ha dado lugar a una nueva rama de estudio conocida como nanomedicina. En la actualidad constituye una de las principales áreas de investigación a nivel mundial gracias al avance de la tecnología y de los procesos quirúrgicos, diagnósticos, y tratamientos en cualquier disciplina médica. En países desarrollados como Estados Unidos, Francia, Alemania, entre otros, se busca apoyar instituciones que se dediquen a la investigación y desarrollo de bionanomateriales capaces de mejorar la calidad de vida del ser humano, sin causar secuelas o efectos adversos [4].

Así, la nanomedicina ha comenzado a tener un gran impacto en distintas áreas como, por ejemplo, la detección, diagnóstico y monitorización por imagen médica, tratamiento localizados y personalizados en enfermedades, autoinmunes, cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, entre otras [5]. En concreto, la aplicación de la nanomedicina al cáncer es una de las más estudiadas en los últimos años [6, 7]. El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento descontrolado de las células por causas genéticas y/o por factores ambientales y es causado por daños en el ADN celular (ver **Figura 1.2**). El cáncer puede formar tumores en los tejidos o crecer en el sistema de flujo corporal. Los tratamientos tradicionales contra el cáncer incluyen principalmente la cirugía, quimioterapia, radiación y aplicación de ultrasonidos [8]. La extracción quirúrgica es altamente efectiva en tumores en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

etapas primarias, pero se limita a tumores quirúrgicamente reconocibles y accesibles, puesto que las células cancerígenas pueden infiltrarse más allá de los límites reconocibles de la masa tumoral. Es por ello, que en muchas ocasiones estas células no se eliminan por completo con cirugía, por lo que es necesario realizar un tratamiento adicional y una monitorización continua del paciente. La radiación, el uso de partículas ionizadas de alta energía (rayos X, rayos gamma o electrones) utilizadas para "dañar/matar" las células y los tejidos a nivel molecular, a menudo se usa como un enfoque complementario para erradicar estas células cancerígenas restantes después de la cirugía. Sin embargo, esta radiación puede causar daños a los tejidos sanos ubicados cerca de las células cancerígenas o aquellos dentro del camino del haz de radiación, como efectos secundarios adversos. Por otro lado, la administración sistemática de fármacos químicos para eliminar células malignas (quimioterapia e inmunoterapia) es en ocasiones bastante eficaz para la eliminación del tumor completo en estadios I, II, y hasta III dependiendo del tipo de cáncer. Sin embargo, estos tratamientos farmacológicos poseen numerosos inconvenientes y efectos secundarios adversos como, por ejemplo:

- La toxicidad o daños colaterales irremediables en tejidos/órganos sanos como resultado del tratamiento no focalizado consecuencia de su administración sistémica.
- Desarrollo de fármaco-resistencia tras períodos de tratamiento prolongados, ya que normalmente una célula ya mutada tiende a mostrar más resistencia al fármaco mutando su genética.
- Escasez de fármacos adecuados para muchos de los cánceres existentes [8].
- Tiempos de circulación sanguínea extremadamente cortos de los medicamentos.
- Liberación incontrolada y no específica de los fármacos.
- Reacciones adversas al medicamento.
- Tiempos de curación y cicatrización del cuerpo.
- Citotoxicidad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

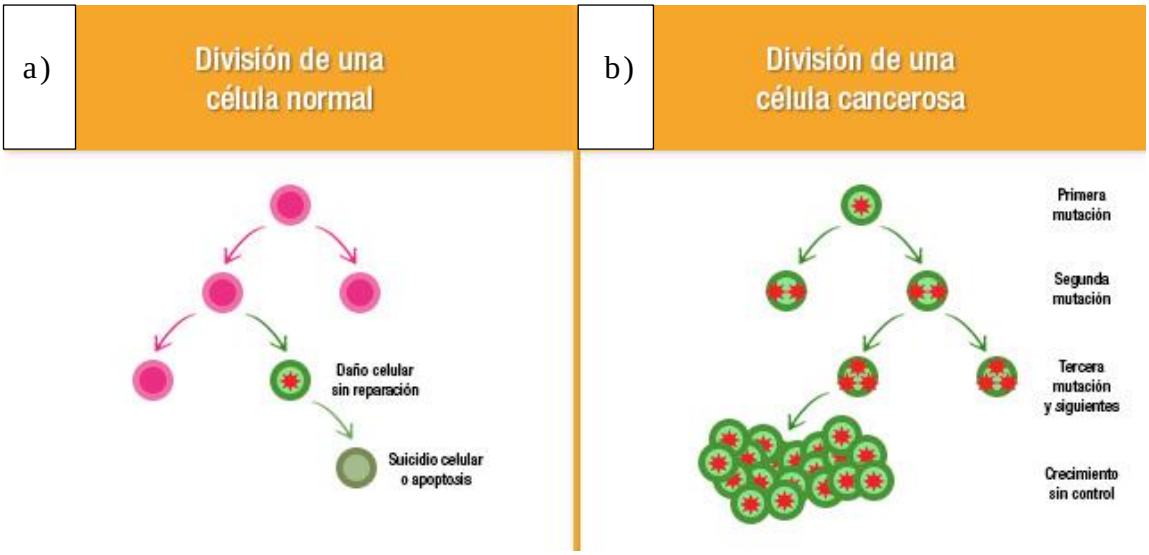


Figura 1.2 (a) Esquema de división de una célula normal y la muerte de una célula dañada o mutada por reacción de los anticuerpos, b) Esquema de la división de una célula mutada o cancerígena en el cuerpo humano y su crecimiento descontrolado.

Por otro lado, en muchos casos la imposibilidad de una detección temprana de tumores muy pequeños o células malignas que circulan en la sangre con las técnicas actuales de diagnóstico también disminuye la probabilidad de éxito de las terapias actuales. En este sentido las técnicas de imagen presentan en muchos casos mala resolución entre las células/tejidos sanos y los tumorales. Por ello, se hace necesaria la búsqueda de nuevas terapias o terapias alternativas que nos lleven a una mejora en la calidad de vida del paciente durante los tratamientos, así como aumentar la eficacia de estos y con ello el pronóstico del paciente [8].

En los últimos años, numerosas investigaciones [6, 9, 10] muestran que una estrategia muy prometedora para superar las limitaciones actuales es la combinación de fármacos antitumorales/elementos de contraste encapsulados/adsorbidos en distintas nanopartículas coloidales (Nps) tanto orgánicas (micelas poliméricas, liposomas, lípidos) [11, 12] como inorgánicas (metálicas, magnéticas, semiconductoras, upconverting) [13, 14] y que actúan como nanotransportadores.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En general, las nanopartículas se presentan como herramientas destacadas en biotecnología y nanomedicina, ya que pueden ser modificadas de tal manera que sean capaces de transportar y liberar una o más moléculas bioactivas [15], es decir,

las nanopartículas pueden modificar sus propiedades superficiales de modo que faciliten alguna tarea y/o guíen algún elemento en específico, como lo puede ser, medicina terapéutica, materiales de contraste, fármacos, moléculas guía, etc. al cuerpo humano.

Así, las nanoplataformas cargadas/modificadas superficialmente con fármacos presentan varias ventajas sobre la administración sistémica de los medicamentos libres gracias a:

- Su tamaño nanométrico que permite que el nanomaterial pueda ser introducido fácilmente en el cuerpo humano y pueda alcanzar las células/tejidos dañados, permitiendo la posibilidad de tener un sistema selectivo y con mayor retención [16].
- La elevada capacidad de encapsulación y protección de los medicamentos, lo que permite una vida media de circulación más prolongada y una toxicidad más reducida, que se traduce también en la necesidad de menores dosis aplicadas, logrando obtener tratamientos más focalizados [17].
- Menores reacciones inmunes [18].

El potencial direccionamiento selectivo (activo o pasivo) de los nanotransportadores hacia las células y tejidos cancerosos que sobreexpresan receptores específicos (direccionamiento activo) [19] es otro elemento importante puede mejorar el tratamiento haciéndolo más focalizado. **El direccionamiento pasivo** se produce gracias al llamado "efecto de aumento de la permeabilidad y retención" (EPR de sus siglas en inglés). Los tumores sólidos en crecimiento dan lugar a vasos sanguíneos "defectuosos" con una alta porosidad, esto es, un endotelio fenestrado que tiene en su superficie espacios entre 100 nm y 780 nm, como consecuencia de una angiogénesis sumamente acelerada producto de la gran necesidad de aporte de oxígeno y nutrientes a las células tumorales, que tienen tasas de replicación mucho más elevadas que las células sanas. Esto implica que las nanopartículas puedan infiltrarse más fácilmente hacia el tumor y permanecer durante un período más largo de tiempo debido a la disminución del drenaje linfático, lo que lleva a una mayor concentración de nanopartículas en la región del tumor que en los tejidos sanos [20] Este es el mecanismo de direccionamiento que

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

utilizan los nanotransportadores de primera generación como Doxcil ® o Abraxane ®[21]. Por su parte, **el direccionamiento activo** consiste en conjugar en la superficie de las nanopartículas ligandos que se unen de manera selectiva a receptores o antígenos que se sobreexpresan en la superficie de las células tumorales [22]. De este modo, al producirse este reconocimiento específico se podría mejorar la acumulación de las nanopartículas en la región donde se encuentra el tumor. Como ejemplo de este tipo de direccionamiento se puede mencionar, por ejemplo, los ensayos clínicos realizados con inmunoliposomas cargados con el fármaco anticancerígeno doxorrubicina dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [23, 24].

En este trabajo de Tesis Doctoral se han desarrollado dos tipos diferentes nanopartículas inorgánicas para su uso como nanotransportadores. En la primera parte de la Tesis (**Capítulos 3, 4 y 5**) se estudiaron nanopartículas inorgánicas metálicas (nanocilindros de oro (AuNRs)), las cuales se seleccionaron por sus propiedades optoelectrónicas descritas más adelante (**Sección 1.2**) y sus potenciales aplicaciones como nanoplataformas multifuncionales para el tratamiento del cáncer. En la segunda parte de esta Tesis (**Capítulo 6**) se estudiaron nanopartículas inorgánicas cerámicas dopadas con iones de lantánidos (sobreconversoras (UpCvs)) en donde se aprovechó la capacidad de conversión de energía de los lantánidos (ver **Sección 1.7**) para ser usados como sondas de contraste en bioimagen.

1.2 NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS DE ORO: PROPIEDADES OPTOELECTRÓNICAS

Entre los distintos tipos de nanovehículos, las nanopartículas metálicas en general y las de oro (AuNps) en particular, han generado un gran interés gracias a sus propiedades ópticas, químicas y físicas [25]. En concreto, las nanopartículas de metales nobles (Au, Ag, Pt y Pd) presentan interesantes, propiedades ópticas y catalíticas, que dependen en gran medida de su tamaño y geometría [26].

Michael Faraday fue el primer científico en estudiar metódicamente los efectos del color del Au coloidal, gracias a los antecedentes publicados en el primer

libro de Francisci Antonii, filósofo y médico, sobre el uso médico de partículas de este tipo [27]. Basándose en esos estudios, Faraday sugirió que el intenso color rojo provenía de partículas con tamaños imposibles de medir e invisibles al ojo humano [5, 28, 29]. Como se acaba de comentar y de acuerdo con la teoría de Mie [30], las nanopartículas de oro presentan propiedades optoelectrónicas [31], que son el resultado del acoplamiento entre el campo eléctricomagnético de la luz y la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción del metal formando un dipolo **Figura 1.3 a**, que recibe el nombre de plasmón de resonancia superficial localizado (LSPR) ya que la oscilación se produce en una región pequeña y localizada [32]. La longitud de onda de LSPR es dependiente del tamaño de la partícula, su forma, estructura, composición, las propiedades dieléctricas del metal, y el medio circundante, ya que estos factores afectan a la densidad de la carga de los electrones en la superficie de la partícula [33].

A diferencia de las AuNps esféricas isotrópicas que absorben en el visible y presentan una única banda plasmónica, la principal característica de las AuNps anisotrópicas es que presentan dos bandas plasmónicas (**Figura 1.3 b**) y es posible trabajar con ellas en el infrarrojo cercano (NIR) dentro de la conocida "ventana biológica" (**Figura 1.4 a**), donde la radiación de luz tiene mayor longitud de penetración y no daña tejidos, células, como ningún componente orgánico del cuerpo humano (**Figura 1.4 b**) [15, 37]

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

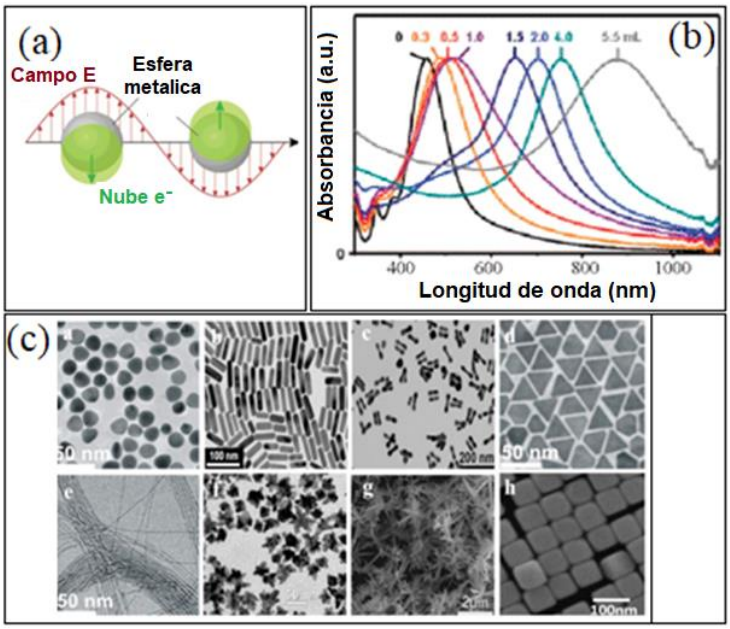


Figura 1.3 (a) Esquema de oscilación del plasmón para una nanoesfera [34]. (b) Representación de los plasmones para AuNps [35]. (c) Micrografías donde se percibe diferentes morfologías de los AuNps, lo que se ve reflejado en el espectro de absorción y su desplazamiento [36, 37]. Imagen 3. (a) Modificada obtenida de la referencia [46] Copyright (2022) con permiso del Optica Publishing Group. Imagen 3. (b y c) modificada obtenida de la referencia [37] Copyright (2022) con permiso del Elsevier.

Por ello son unas candidatas perfectas para ser utilizadas en diagnóstico y terapias contra el cáncer como la terapia fototérmica (PPTT), que permite la transformación de la energía en forma de luz en calor, o la terapia fotodinámica (PDT) que permite la formación de especies de oxígeno reactivas tóxicas (ROS) [38, 39, 15].

Las AuNps anisotrópicas se pueden dividir en tres grupos diferentes [28]:

- AuNps unidimensionales: nanocilindros (nanorods), nanoalambres (nanowires), nanocadenas (nanobelts).
- AuNps bidimensionales: nanoplatos (nanoplates), pentágonos, cuadrados /rectángulos, hexágonos, triángulos, decaedros, etc.
- AuNps tridimensionales: nanocuadros (nano tadoples), ramificados (nanopods), nanoestrellas (nanostars) y nanodendritas (nanodendrites) [15].

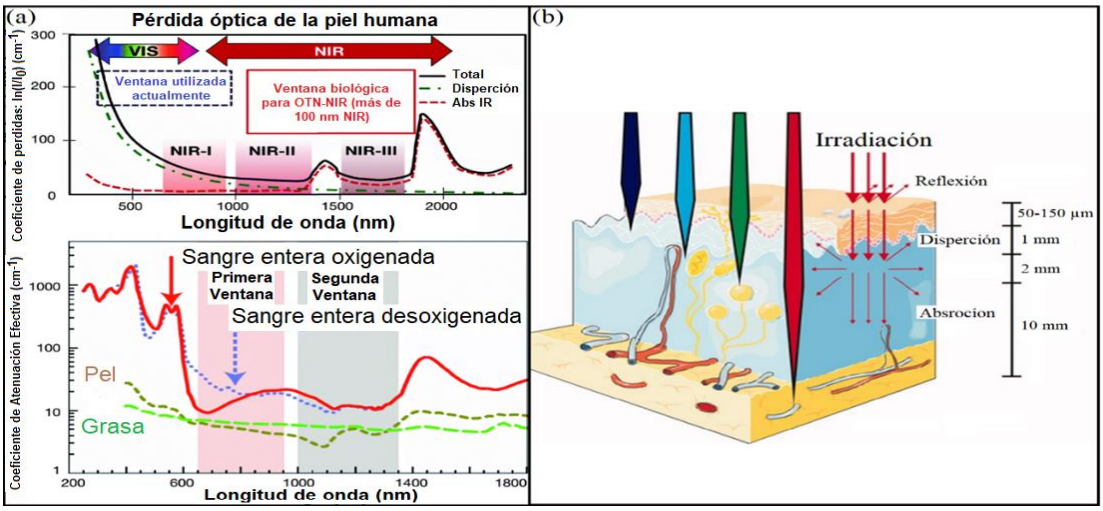


Figura 1.4 (a) Ventanas biológicas de absorbancia de especies biológicas [41, 42], (b) Formas de propagación de la luz a través de los tejidos [6]. Imagen (4 a) modificada obtenida de la referencia [42] Copyright (2022) con permiso del Royal Society of Chemistry. Imagen (4 b) modificada obtenida de la referencia [6] Copyright (2022) con permiso del Ivyspring International Publisher.

1.2.1 APLICACIONES BIOMÉDICAS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO

Las nanopartículas de oro han generado un gran interés en aplicaciones biomédicas debido a que son biocompatibles y a sus propiedades ópticas y electrónicas únicas pudiendo, tal y como se comentó en la sección anterior, absorber luz desde el espectro electromagnético visible (estructura isotrópica) hasta el infrarrojo cercano (NIR) (estructuras anisótropas) permitiendo, de este modo, emplearse como elementos de diagnóstico y terapia en un único dispositivo, la llamada Teragnóstica [41, 6, 42, 43].

El estudio de la aplicación de AuNps como sistemas teragnósticos en el tratamiento de enfermedades diferentes tipos de enfermedades ha aumentado en los últimos años por la combinación de diferentes propiedades que permiten que se puedan construir plataformas multifuncionales para diagnosticar y tratar simultáneamente procesos cancerígenos y entre las que destacan [44, 45]:

- Su estructura y tamaño, que permite que las AuNps se puedan cargar, funcionalizar o suministrar con una gran cantidad de fármacos, creando

sistemas de diferentes tipos, tratando de disminuir la dosis efectiva suministrada en un tratamiento. Además, manipulando su estructura y las propiedades fisicoquímicas, se pueden cargar/encapsular dos o más fármacos diferentes en un solo nanosistema para dar lugar a terapias de combinación [46].

- Su versatilidad química, que permite que las AuNps puedan ser funcionalizados en su superficie con moléculas que reconozcan selectivamente a la célula dañadas (péptidos, proteínas, anticuerpos), y con polímeros que optimicen su farmacocinética y permitan por lo tanto el direccionamiento selectivo [47].
- La posibilidad de diseñar sistemas que permitan superar o evitar la multi-resistencia celular, es decir, la defensa natural o adquirida después de varias mutaciones, que tienen las células a los agentes desconocidos y a los fármacos que trasportan [41].

1.2.2 Las nanopartículas de oro como agentes de diagnostico

Esta rama de la nanomedicina se enfoca en el diseño de nanodispositivos con la finalidad de identificar una enfermedad a nivel celular o molecular por medio de un nanosistema diagnóstico, que contiene un componente biológico capaz de detectar en tiempo real y con una alta sensibilidad algún analito determinado [48]. Dentro de los nanodispositivos, que se han estudiado existen los siguientes:

Biosensores: De acuerdo con la IUPAC, el término biosensor se reserva para definir un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico, biomimético, íntimamente asociado con un transductor fisicoquímico, que en presencia del analito produce una señal eléctrica discreta o de carácter continuo, proporcional a la cantidad presente del mismo. No debe confundirse con un sensor químico implantado en una matriz biológica para obtener datos de esta, ya que si carece del elemento biológico no se corresponderá con un biosensor [49].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los formatos de detección de los biosensores basados en AuNps más utilizados son principalmente sistemas que hacen uso de sus propiedades ópticas y electroquímicas. Los sensores ópticos cuentan con transductores que captan señales

en forma de radiaciones ultravioletas, visibles o infrarrojas a partir de una reacción química, física o biológica, y las trasformará en datos, cifras o en luminiscencia que será captada/medida por equipos especiales [50].

En literatura existen diferentes ejemplos de la aplicación como sensores. Por ejemplo, la elaboración de sondas de AuNRs basados en espectroscopía Raman aumentada en superficie (SERS) para la detección de células tumorales o identificación de múltiples patógenos [51]. La técnica SERS se desarrolló en base a la tecnología de imágenes Raman, esta última fue reportada por primera vez por CV Raman en 1928 [52].Esta técnica se basa en el incremento del campo electromagnético en las zonas puntiagudas de las nanopartículas metálicas, generando puntos calientes (hot spots) que permiten un aumento en la señal Raman [53, 54]. Biosensores de colorimetría basado en la agregación de las AuNRs es investigado para analizar la detección de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), esta es un importante biomarcador que se encuentra presente en la orina y en sangre de mujeres embarazadas, como también niveles altos de esta hormona son encontrados en numerosos tumores, como coriocarcinomas, tumores de células genitales, tumores de próstata y tumores de células de los islotes pancráticos. Las AuNps biofuncionalizadas pueden utilizarse como potenciales dispositivos de detección múltiple para distintos tipos de dianas biológicas. Algunos estudios han logrado detectar un elevado número de marcadores de superficie celular con este tipo de técnica [55], o incluso determinar la cinética de la reacción de unión a un determinado ligando mediante un modelo matemático, entre otros. Se ha llegado a reducir tanto el tamaño de estos biosensores que se han diseñado algunos con los tamaños a escala nanométrica [56].

Imagen biomédica: Una imagen médica es aquella que procede del conjunto de técnicas y procesos usados para crear imágenes del cuerpo humano, o partes de él, con propósitos clínicos, esto es, procedimientos médicos que buscan revelar, diagnosticar o examinar enfermedades, o bien con propósitos científicos médicos, tales como el estudio de la anatomía física y metabólica. Existen diferentes técnicas que se utilizan para obtener una imagen médica, como, por ejemplo; radiografía, fluoroscopia, angiografía, la densitometría ósea o DEXA (Dual Energy X-ray

Absorptiometry), tomografía por emisión de positrones (PET), Resonancia Magnética (MRI), Ultrasonografía Médica, termografía de coherencia óptica, fotoacústica y microscopia de campo oscuro [57, 58, 59] entre otras. Cada una de ellas utiliza ciertos mecanismos, sondas y elementos de contraste para mejorar la obtención de imágenes, pero dichas sondas o elementos que se utilizan en la actualidad para la obtención de imágenes son usadas con diferentes colorantes orgánicos que cuentan presentan ciertas limitaciones como la, fotoestabilidad, el bajo rendimiento cuántico, la baja sensibilidad de detección y la estabilidad insuficiente en sistemas biológicos. Todos estos contratiempos que se presentan en la actualidad pueden ser minimizados con la aplicación de las AuNps funcionalizadas ya que su alta energía superficial permite la adhesión de colorantes orgánicos o compuestos fotoluminiscentes que favorecerán la detección, volviéndolas más selectivas y obteniendo imágenes de mejor calidad [60].

Las propiedades ópticas con las que cuentan las AuNps son altamente sintonizables, esto quiere decir que pueden ajustarse a longitudes de onda deseables mediante la alteración de la forma y la composición de dichas nanopartículas [60]. Los componentes del tejido biológico en muchas ocasiones minimizan la absorción de la luz en el NIR, por lo que las AuNps pueden ser diseñadas de modo que se activen en dicha región del espectro de absorción, logrando así una mayor exactitud de la terapia [42,61,62]. Estas propiedades son de interés para ser utilizados como agentes de contraste en técnicas de imagen, lo que incluye desde el rastreo, la formación de imágenes de células, o el diagnóstico *in situ* determinadas enfermedades como el cáncer [63] [64]. Si se aplican agentes adecuadamente encapsulados y se modifica la superficie con anticuerpos o proteínas, las AuNps pueden ser utilizadas simultáneamente para la detección y el tratamiento *in vivo* de ciertas enfermedades [65].

La microscopía óptica es un método eficaz el diagnóstico de enfermedades. A este respecto, la microscopía de fluorescencia permite un diagnóstico *in vitro* precoz del cáncer, y además presenta las ventajas de un bajo coste, alta sensibilidad y resolución espacial [60, 66]. En la actualidad, se utilizan como agentes de contraste para las aplicaciones de imágenes biomédicas por fluorescencia, fluoróforos

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

orgánicos unidos a partículas inorgánicas y puntos cuánticos semiconductores (quantum dots), [67, 68].

También se ha desarrollado la técnica de imagen basada en SERS que permite bioimagen a través de biomarcadores Raman [53]. Los biomarcadores, son tintes orgánicos con un espectro de señal en Raman característico que se puede unir a las AuNps pudiéndose rastrear su presencia de forma eficiente dentro de células vivas usando microscopía confocal Raman [69]. Los marcadores Raman pueden estabilizarse mediante polietilenglicoles modificados con tiol y son considerablemente más brillantes que los puntos cuánticos semiconductores para obtener imágenes en las mismas condiciones. Por otro lado, nanopartículas magnéticas encapsuladas en partículas poliméricas e híbridas magnéticas@oro se han utilizado o como agentes de contraste para tomografías computarizadas o imágenes de resonancia magnética [70, 71].

1.3 LAS NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

1.3.1 Terapia farmacológica y génica

Los sistemas de liberación controlada de fármacos se han desarrollado para modificar la vía de administración en beneficio del paciente, mejorando la biodistribución del medicamento y su liberación, y con ello prolongar la dosis terapéutica efectiva y disminuir el número de administraciones farmacológicas. De este modo, se puede crear una formulación específica para cada paciente, y gracias a ello, se podrá optimizar el tratamiento y mejorar la calidad de vida del paciente [72].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

En un sistema de liberación controlada, el agente bioactivo es incorporado a un soporte que generalmente es un material polimérico o una combinación de varios materiales inorgánicos y orgánicos [73]. La velocidad de liberación de la sustancia activa desde dicho sistema al medio que la rodea viene determinada por las propiedades del propio nanotransportador ya través de la respuesta a estímulos

internos (pH, presencia de enzimas o un cambio del potencial redox) o externos (luz, temperatura, campo magnético) [74]. En este sentido, los procesos de liberación se pueden dividir en:

La liberación dependiente de estímulos. Se realiza mediante nanotransportadores que cambian su comportamiento/configuración/respuesta en función de la aplicación/existencia de un estímulo físico, químico o biológico. Cuando estos estímulos interfieren con la fase, la estructura o conformación del nanotransportador, se produce la liberación del fármaco [75]. La ventaja de utilizar sistemas sensibles a estímulos es obvia: El fármaco se libera a través de un desencadenante presente en el tejido neoplásico minimizando, así, la exposición del compuesto al medio circundante, por ejemplo. Los desencadenantes se pueden dividir en estímulos internos (condición fisiopatológica / patoquímica) y externos (estímulos físicos como temperatura, luz, ultrasonido, fuerza magnética y campos eléctricos) [76]. Por ejemplo, en los tumores sólidos, el pH extracelular es más ácido que el pH sistémico. De manera similar, el pH de los orgánulos intracelulares (por ejemplo, endosomas y lisosomas) difiere respecto al del citoplasma o al de la sangre [77, 78]. Esta condición se puede utilizar para mejorar la liberación intracelular de fármacos de los nanoportadores.

Dosificación controlada por vía química. La liberación del principio activo, como su nombre indica, se produce mediante una reacción química. Esta puede ser un ataque hidrolítico o enzimático a un enlace débil, ionización o protonación. Aunque hay infinitas posibilidades para el diseño de sistemas conjugados polímero-fármaco, el modelo más aceptado es el propuesto por Ringsdorf [79]. Dicho modelo considera que el enlace covalente que se produce entre el fármaco y el nanotransportador debe establecerse a través de grupos funcionales que puedan ser degradados en un medio fisiológico. Gracias a la gran cantidad de posibilidades ofrecidas por la química macromolecular desde un punto de vista sintético, es posible combinar propiedades como el carácter hidrófilo e hidrófobo, la reactividad hidrolítica en un medio hidratado o incluso interacciones específicas con enzimas y receptores [80].

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En el caso concreto de AuNps existen numerosos trabajos relacionados con la liberación de fármacos anticancerígenos, como paclitaxel, doxorrubicina o fármacos basados en platino, además de 5-fluorouracilo, un fármaco contra la leucemia que también ha sido probado en las AuNps para actividades antimicrobianas y antifúngicas [10, 81, 82, 83]. Existen también numerosos trabajos que utilizan nanopartículas metálicas en terapias génicas para el tratamiento contra el cáncer y que permiten restablecer la función del gen mutado que provoca la enfermedad, ya que este tipo de terapia regula negativamente la expresión de proteínas específicas silenciando la actividad de su gen modificado o seleccionado [84]. En este sentido, las nanoestructuras de oro han mostrado potencial como vehículos de suministros intracelular de oligonucleótidos antisentido y para los ácidos ribonucleicos (ARN) pequeño de interferencia terapéutico [13, 85, 86, 87].

1.3.2 Terapia fototérmica (PPTT)

La aplicación de terapias térmicas, esto es, el uso de energía en forma de calor en el tratamiento del cáncer no es nueva, y ya se usa desde 1900 [88]. Estas terapias se dividen en diatermia, hipertermia, ablación térmica de acuerdo con el rango de temperatura que se utilice [89] Así, la terapia por diatermia eleva la temperatura hasta los 41°C. Se utiliza sobre todo en fisioterapia para tratar enfermedades reumáticas como músculos y articulaciones. Su principio se basa en el uso de bajas temperaturas durante aproximadamente una hora para acelerar la curación celular y aumentar el flujo sanguíneo y las tasas metabólicas. La terapia por hipertermia es un tratamiento contra el cáncer en el que solo la zona del tumor del paciente está expuesto a temperaturas entre 41-43 °C generadas por la aplicación de diferentes tipos de energías (laser, electromagnéticas, ondas sonoras, etc.) por un período de tiempo definido para dañar y destruir las células cancerosas [90]. Y, finalmente, la terapia por ablación térmica utiliza temperaturas por encima de la temperatura usada en terapia hipertérmica (> 41 °C) y el calor tiene un efecto citotóxico directo tanto sobre células sanas, como sobre las tumorales.

En particular, en la hipertermia tradicional la región del cuerpo que contiene el tumor se calienta unos cuantos grados por encima de la temperatura fisiológica. El calor generado, provoca cambios en la fisiología de la célula, que incluyen el

incorrecto plegamiento de las proteínas y su agregación, alteraciones en las señales de transducción, cambios en el potencial y una disminución de la perfusión y oxigenación del tumor, llevando finalmente a la célula a la apoptosis [91]. La hipertermia tradicional se ha utilizado en combinación con la quimioterapia y la radiación, para eliminar algunos tipos de tumores. Hoy en día, debido a los avances de la nanotecnología se pueden utilizar nanopartículas para generar calor localizado y provocar muerte celular [92].

En este sentido, las nanopartículas metálicas pueden generar calor a partir de sus propiedades ópticas [44,74,93]. Así, gracias a la presencia de plasmones superficiales, cuando se somete a las Nps de oro a una irradiación lumínica a una determinada longitud de onda, se produce una absorción de energía en forma de luz que induce fuertes campos de superficie debido a la excitación coherente de los electrones de conducción. La rápida relajación de estos electrones excitados produce un fuerte calor localizado capaz de dañar o destruir las células cancerosa a través de un proceso hipertérmico. Este proceso es conocido como "efecto fototérmico" y da lugar a la terapia fototérmica, PPTT, generando un aumento en la temperatura circundante a la nanopartícula [94]. El-Sayed *et al.* [95], demostraron que la fotoexcitación de nanoestructuras metálicas da como resultado la formación de un gas electrónico caliente que, después, se enfría rápidamente dentro de ~1 ps intercambiando su energía con la red cristalina de las nanopartículas. Así, la absorción de luz por las AuNps se puede convertir en calor mediante un proceso de fonón incorporado, esto quiere decir que, la energía absorbida por la onda electromagnética incidente se transfiere primero a los electrones libres de las AuNps en forma de oscilación, y luego se relaja a través de los canales de desintegración no radiactiva. Esta rápida conversión y disipación de energía se puede usar fácilmente para calentar un punto localizado, utilizando radiación de luz con una frecuencia que se superpone fuertemente con la banda de absorción de LSPR de las partículas metálicas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Este calor local generado por la acumulación de las Nps metálicas en el tumor puede aumentar entre decenas o cientos de grados por encima de la temperatura fisiológica, provocando la entrada en apoptosis/necrosis (vía de destrucción o muerte celular programada o provocada) de las células cancerígenas [66, 96, 97, 98].

A este respecto, merece la pena comentar que el tejido tumoral es más hipóxico, más ácido y deficiente en nutrientes comparado con el tejido sano por lo que las células del primero son mucho más sensibles al calor [99].

Por otro lado, el fundamento de la combinación de fármacos citotóxicos con hipertermia se basa en pruebas experimentales y clínicas, en las cuales se pudo ver que al aplicar calor aumenta la destrucción de las células por toxicidad térmica directa y muestra una mejora térmica de la eficacia del fármaco [100]. Esto se debe a que la hipertermia puede aumentar la permeabilidad de la membrana celular, lo que favorece la penetración de fármacos quimioterapéuticos en los tejidos y la absorción de este en el núcleo del tumor. Cuando el tamaño de los poros de las membranas celulares aumenta en respuesta al calentamiento, la concentración de fármaco intracelular también aumenta [101]. Además, la hipertermia aumenta selectivamente el tamaño de las fenestraciones (una fenestración es el camino que un fármaco recorre en los vasos tumorales), mientras que no provoca este efecto en los tejidos normales [102].

1.3.3 Terapia fotodinámica (PDT)

La terapia fotodinámica (PDT) se considera un tratamiento importante y selectivo para las enfermedades oncológicas y ciertas enfermedades de la piel o infecciosas. Este tipo de tratamiento emplea fotosensibilizadores como agentes sensibles y reactivos a la luz ambiental o una luz láser (ya que existen longitudes de onda más elevadas, asociadas a un pico de absorción). La apoptosis o necrosis celular se induce en las células tumorales mediante la liberación de oxígeno singlete y radicales libres de oxígeno altamente activos generados a través de la energía de los fotosensibilizadores [103, 104].

En su reacción inicial la PDT (ver **Figura 2.5**) es una terapia local ya que su reacción se limita al lugar donde se encuentra el portador del fotosensibilizante y donde se emplea la irradiación de luz. Sin embargo, en la actualidad se ha descubierto que la destrucción celular causada por la PDT provoca la liberación masiva de mediadores inmunes que van a desencadenar en una respuesta inflamatoria en el cuerpo [105].

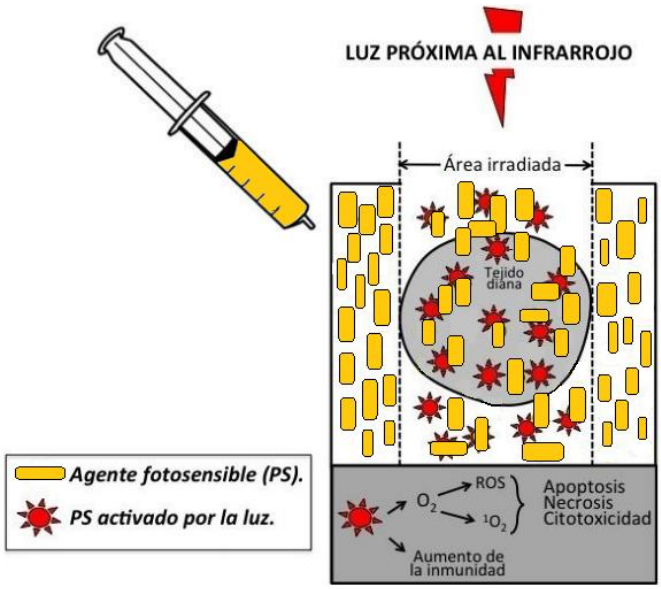


Figura 1.5 Ilustración del proceso llevado a cabo por PDT en el que se inyectan un PS por la vía venosa, lo que permite su transporte por todo el cuerpo, localizándose en la zona dañada y siendo irradiado por un haz con una longitud de onda determinada cercano al infrarrojo, lo que inicia el proceso del PS y con ello una liberación de ROS.

Los elementos esenciales para poder realizar una terapia PDT son tres:

- Agente fotosensibilizante (PS): compuesto capaz de absorber la luz y desencadenar de reacciones fotoquímicas o fotofísicas.
- Luz de longitud de onda apropiada en el NIR dentro de la "ventana biológica".
- Especies de oxígeno reactivas (ROS): elemento necesario para la reacción PDT, ya que permiten la formación de radicales tóxicos al ser irradiados con el haz de luz [106].

La acción por terapia PDT se basa en la irradiación con luz NIR del PS distribuido en el organismo en estado basal o singlete, SO. En este estado fundamental, el PS cuenta con dos electrones con espines opuestos situados generalmente en el orbital eléctrico más externo, llegando a una suma total de espines y de los electrones igual a cero. Cuando el PS es expuesto a la irradiación lumínica absorbe energía, lo que permite que uno de esos electrones pase a un orbital de mayor energía, es decir, a uno de mayor grado de excitación (S1) muy inestable. Al volver al estado fundamental, el exceso de energía se transforma generalmente

en calor o fluorescencia. Pero también puede suceder, que una vez en S1 el electrón pase a un nivel de excitación de menor energía en el que puede permanecer más tiempo conocido como triplete (T1) a través de un proceso conocido como entrecruzamiento de sistemas. Cuando esto se produce, los electrones tienen espín inverso al normal, lo que quiere decir que ambos electrones desapareados tienen el mismo espín, llegando a una suma total en la molécula de 1. Desde este estado T1, el PS es capaz de interaccionar con las distintas moléculas de su entorno para dar lugar a dos tipos distintos de reacciones (**Figura 1.6**) [107, 108]:

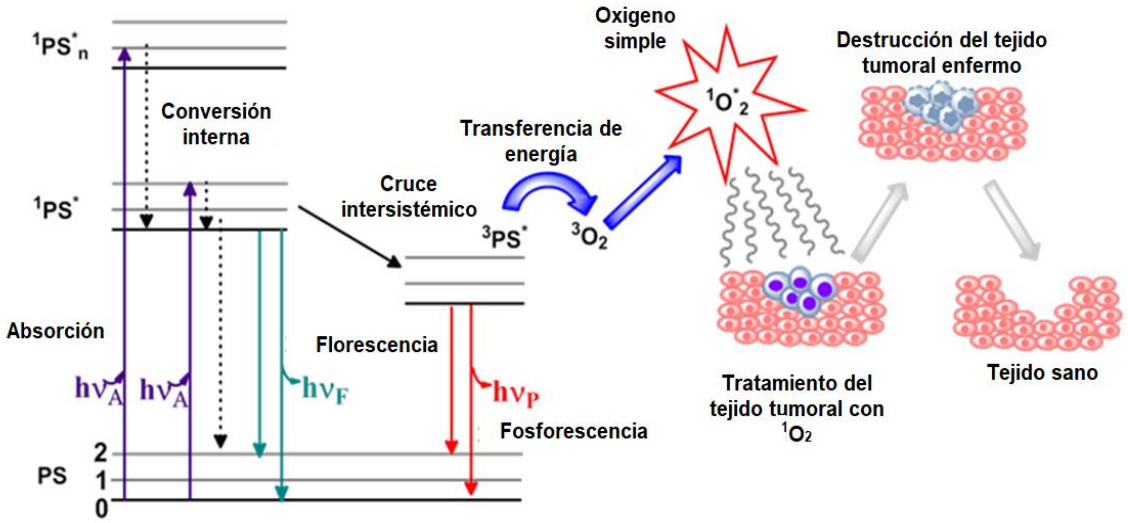


Figura 1.6 Reacción fotodinámica tipo 1 y 2 [6]. Imagen modificada obtenida de la referencia [6] Copyright (2022) con permiso del Ivyspring International Publisher.

Tipo 1: Se transfieren electrones desde el PS activado a otras moléculas cercanas y, como resultado, se forman radicales iónicos, los cuales reaccionarán posteriormente con el oxígeno en su estado basal O_2 para dar lugar a radicales libres de oxígeno (ROS), anión superóxido ($-O_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos (OH-).

Tipo 2: En este caso, el PS en su estado triplete (T1) reacciona directamente con el O_2, logrando transformarlo en oxígeno singlete. La reacción tipo 2 se produce en un número limitado de moléculas, ya que, para reaccionar con el oxígeno que se encuentra en su estado basal, es necesario que la otra molécula también esté en el estado T1.

1.4 NANOTRANSPORTADORES METÁLICOS: NANOCILINDROS DE ORO

La mayoría de los sistemas de diagnóstico y terapia empleados en la detección y tratamiento del cáncer, incluso los basados en nanopartículas, no aprovechan las anomalías fisiológicas de las células cancerígenas y causan efectos colaterales adversos que limitan su eficacia. Además, las etapas de diagnóstico y terapia se realizan independientemente, lo que implica retrasos en a la aplicación del tratamiento y el consiguiente riesgo para la salud del paciente, por ello la nanomedicina a partir sistemas teragnósticos se presenta como una buena alternativa a la medicina tradicional.

Como ya se introdujo en la **sección 2** la luz aparece como un estímulo especialmente atractivo pues permite la posibilidad de emplear nanosistemas fotosensibles como elementos de diagnóstico por imagen (magnética, ultrasónica, fluorescencia, etc.) y sensores de respuesta a la terapia (o para la detección temprana de biomarcadores que indiquen la presencia de la enfermedad en estadios sumamente iniciales) mientras se controla espacial y temporalmente de forma precisa la liberación del/los principio/s activo/s [109]. Al mismo tiempo, también permite complementar la acción terapéutica farmacológica clásica mediante terapias adicionales como la fototérmica plasmónica (PPTT) [42] o la fotodinámica (PDT) [61]. La capacidad de fotoestimulación y fotocontrol puede lograrse mediante la presencia en la estructura/composición de los nanosistemas de moléculas fotosensibilizadoras, nanoestructuras metálicas, nanotubos de carbono, puntos cuánticos, etc. En particular los sistemas basados en nanopartículas de oro anisótropas absorben en el NIR permitiendo un mayor poder de penetración de la luz en el organismo sin dañar los tejidos y reduciendo la autofluorescencia y la dispersión en el proceso de interacción.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Así, para intentar aportar nuevos sistemas para el tratamiento contra el cáncer, proponemos la creación de **tres nanoplataformas de nanopartículas metálicas de Au** para diagnóstico y/o terapia médica que sean fotoexcitables y fotocontrolables, y susceptibles de ser empleadas simultáneamente en el tratamiento

de células y masas cancerígenas mediante el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad por técnicas de imagen simples o combinadas (por ejemplo, tomografía óptica, resonancia magnética y/o luminiscencia) de la zona afectada, y/o la acción terapéutica otorgada por la combinación de la quimioterapia, el silenciamiento génico, la terapia fotodinámica y/o la fototérmica (la denominada terapia multimodal o combinatoria) [43].

Con este objetivo, las nanoplataformas a obtener estarán basadas en nanopartículas metálicas (Nps) de oro de forma cilíndrica (nanocilindros, en inglés nanorods, AuNRs) debido a su biocompatibilidad y propiedades ópticas características relativas a su anisotropía. Este tipo de nanopartículas muestran dos bandas plasmónicas características: una debida a la oscilación colectiva de los electrones de la banda de conducción en la dirección transversal del AuNRs conocida como banda de plasmón superficial localizada transversal (TSPR), y otra debida a la oscilación en la dirección longitudinal llamada plasmón superficial longitudinal localizado (LSPR) [82,110,111,112].

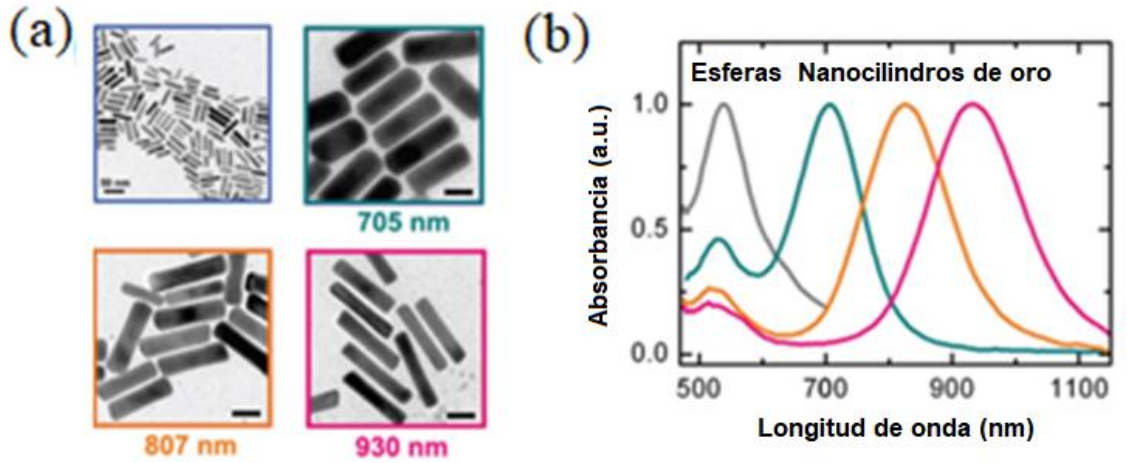


Figura 1.7 Diferentes morfologías de los AuNRs [36]. (b) Representación de los plasmones para AuNRs, representando los modos TSPR y LSPR para los distintos tamaños mostrados [35]. Imagen modificada obtenida de la referencia [36] Copyright (2022) con permiso del Optica Publishing Group.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE

Mientras que la banda trasversal es insensible al tamaño de los AuNRs, la banda longitudinal se desplaza de la región del visible a la región del infrarrojo cercano (NIR) con el aumento de la relación largo/ancho del AuNRs tal y como se puede observar en la **Figura 1.7 b**, que presenta los espectros UV-Vis de los AuNRs

de diferentes tamaños que se pueden observar en las imágenes de transmisión electrónica de barrido (TEM) en la **Figura 1.7 a**.

1.5 PROCESOS SINTÉTICOS DE NANO-CILINDROS DE ORO

Los procesos sintéticos de producción de AuNRs se pueden dividir metodologías arriba-abajo (top-down) y otras abajo-arriba (bottom-up) [5].

1.5.1 Métodos arriba-abajo (top-down)

Los principales procesos sintéticos para obtener AuNRs son: por métodos de arriba hacia abajo o conocido en inglés "top-down", lo cual se lleva a cabo con la eliminación de oro, de piezas de oro desechadas fundidas obteniendo un líquido de oro, el cual es predepositado de acuerdo con el patrón seleccionado, el cual fue diseñado usando un haz de iones enfocado o técnicas de grabado [113]. otro proceso utilizado es por métodos físicos, como la evaporación térmica con haz de electrones o la pulverización catódica para depositar átomos de oro en el sustrato modificado para obtener la morfología que se busca, los AuNRs se obtienen posteriormente después del proceso de despegue. La litografía por haz de electrones es el enfoque de arriba hacia abajo más utilizado para preparar AuNRs con una resolución relativamente alta [114]. En este método, el tamaño y la forma de los AuNRs se pueden controlar y modelar con precisión mediante la manipulación del diseño del software y, por lo tanto, se pueden producir fácilmente AuNRs simétricos [115].

1.5.2 *Métodos abajo-arriba (bottom-up)*

Los métodos de abajo hacia arriba o conocido en inglés como "bottom-up" para la síntesis de las Nps se basan procesos de ensamblaje de átomos o moleculares en los que se produce una reducción química o biológica [39]. Los métodos químicos en los que se basan las técnicas "bottom-up" implican dos pasos: formación de núcleos (nucleación) y crecimiento sucesivo de estos núcleos en forma anisotrópica.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cuando ambos pasos se completan en el mismo proceso, se trata de un procedimiento en un único paso, lo que quiere decir que tanto la nucleación y el crecimiento de los AuNRs no están separados, en este caso el crecimiento de la Nps no se puede separar y la monodispersidad no se pude controlar por tanto disminuye. En el método de dos pasos (nucleación y crecimiento), se tiene una disolución de crecimiento a la cual se le añadan semillas de Au, estamos ante un procedimiento denominado de crecimiento de semilla, permite la obtención de nanopartículas monodispersas, y procesos sintéticos reproducibles y de bajo coste [10].

La síntesis utilizada en el presente trabajo de investigación se basa en el método bottom-up optimizado de crecimiento de semilla de oro de con una medida de 8 nm x 36 nm (+/- 3 nm) [104] y optimizado para los objetivos de esta Tesis Doctoral, el cual sigue se basa en una serie componentes y de pasos que se describen en la **Figura 1.8** y se comentan a continuación. El proceso de síntesis de los nanocilindros se divide en dos pasos. Por un lado, se preparan las semillas que actuarán como núcleos y por otro lado se prepara una disolución de crecimiento sobre la que se añadirán las semillas y dará lugar a las nanoestructuras buscadas.

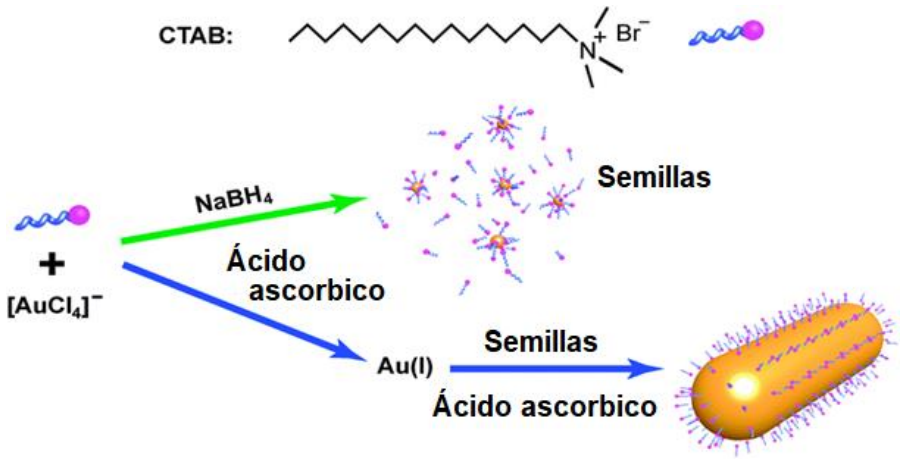


Figura 1.8 Ilustración esquemática del método mediado por semillas para el crecimiento de nanocilindros de oro [64,118,119,120]. Imagen modificada obtenida de la referencia [64] Copyright (2022) con permiso del Royal Society of Chemistry.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.5.3 Síntesis de semillas de oro

Las síntesis de semillas de oro con morfología esférica y unas dimensiones en el rango de 5-15 nm y se obtienen a partir de la reducción de la sal metálicas de

ácido cloroáurico ($HAuCl_4$) usando el borohidruro de sodio ($NaBH_4$) como agente reductor y el surfactante de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) como estabilizante.

Durante la reacción de reducción, la sal metálica presenta tres estados de reducción diferentes Au^{+3} (precursor), Au^{+1} (intermedio) y Au^{0} (núcleo) [51]. Según la teoría de ligando, la fuerza de complejación del Au (III) con iones de haluro sigue la serie $I^- \rightarrow Br^- \rightarrow Cl^-$, por lo que la reacción que se lleva a cabo en un medio de CTAB los cuatro ligandos del $AuCl_4$ serán remplazados por iones bromuro como se describe en la siguiente ecuación [119]:

$$[AuCl_4]^- \leftrightarrow [AuCl_3Br]^- \leftrightarrow [AuCl_2Br_2]^- \leftrightarrow [AuCl_2Br_2]^- \leftrightarrow [AuBr_4]^- \quad (1)$$

logrando así una modificación en la solución de pasar a ser amarillo claro a ser amarillo oscuro, y su máximo de absorción ronda entre 396-450 nm [120]. Para garantizar que la disolución de $AuCl_4$ a $AuBr_4$ es el intercambio de ligandos formando $AuBr_4$-CTA, esta formación compleja influirá en la reacción redox y en el potencial redox que se cambian catódicamente. Esta variación en el potencial redox ayuda favorece en la cinética de crecimiento, dando paso así a una solución estable de semillas de oro [121].

1.5.4 Disolución de crecimiento y síntesis de nanocilindros de oro

Una vez obtenidas las semillas, se procede a la preparación de la disolución de crecimiento que está formada por CTAB que es un surfactante catiónico que actúa no solo como agente inductor para el crecimiento de los AuNRs sino también como **estabilizante** de estos [122]. La función del CTAB en primera instancia, es permitir un crecimiento preferencial de determinadas caras de las semillas, ya que forma una estructura bicapa sobre la superficie de los AuNRs y proporciona cargas positivas efectivas sobre su superficie (ver **Figura 1.9**). Dichas cargas positivas previenen la agregación de los AuNRs en agua por el impedimento estérico.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

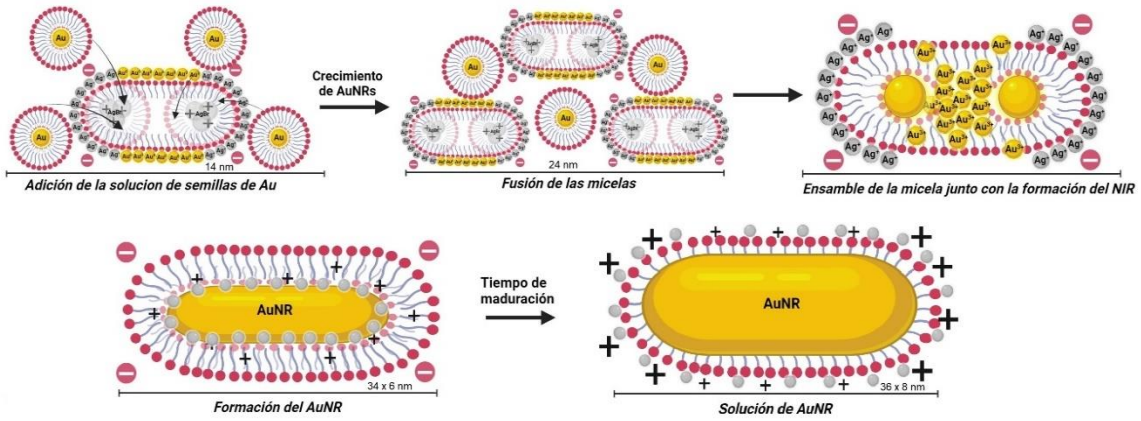


Figura 1.9 Mecanismo de crecimiento de AuNRs.

Otro elemento importante de la disolución es el agente reductor, en este caso, el ácido ascórbico, AA. Los iones Au se difunden en el medio de solución a la micela que forma el CTAB, ya que forma una plantilla "blanda" en forma de barra, y así permitir el crecimiento de semillas en partículas anisotrópicas [123]. Típicamente, en una solución de crecimiento, el color amarillo de la sal de Au en la solución de CTAB desaparece cuando se agregó AA [124]. Este cambio de color se atribuye a la reducción de Au (III) a Au (0), esta reacción se explica [125]:

$$AuCl^-_2 + 2e^- \rightarrow AuCl_2^- + 2Cl^- \quad (1)$$

$$AuCl_2^- + e^- \rightarrow Au\,(0) + 2Cl^- \quad (2)$$

Viendo la ecuación (1), la reducción de Au (I) a Au (0) no sucede ya que el AA es demasiado débil para reducir completamente el Au. Sin embargo, la reducción de Au (I) tiene lugar en la superficie de las semillas, esto permite el crecimiento de las partículas, esto se puede ver después en la reacción (ver ecuación 2) [125]. Esto se evidencia por un rápido desarrollo de un color rosa/rojo en la solución (dependiendo de la relación de aspecto/longitud de los AuNRs), lo que indica la formación correcta de los AuNRs [116].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

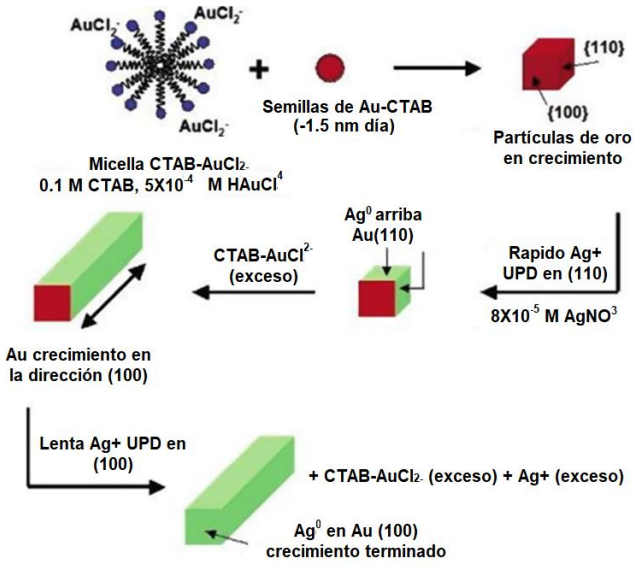


Figura 1.10 Ilustración esquemática del mecanismo de crecimiento de AuNRs a partir de partículas de oro protegidas con CTAB en presencia de Ag^{+} [126, 127]. Imagen modificada obtenida de la referencia [127] Copyright (2022) con permiso del Elsevier.

Finalmente, el nitrato de plata ($AgNO_3$), que aumenta el rendimiento de los AuNRs resultantes de las síntesis y también permite ajustar su relación de aspecto [116]. Sin embargo, el mecanismo por el cual los iones de plata ayudan a controlar la forma de las partículas no se comprende completamente. Se ha sugerido [125] que acido ascórbico puede reducir el nitrato de plata a Ag (0) en la superficie de AuNRs en crecimiento a pesar de ser un reductor débil. El método under-potential deposition (UPD) [126] de plata es más favorable cuando el crecimiento del AuNRs se va realizando, redirigiendo su crecimiento longitudinal lo que condujo a un crecimiento preferencial a lo largo de la dirección {110} [126]. Esto implica que la zona cristalográfica {110} se ve influenciada por dicha deposición en las superficies del AuNRs (como se puede ver en la **Figura 1.10**), como también, la interfaz oro-CTAB es más propensa a la deposición de plata. Además, el CTAB también se une a través del ion bromuro a las zonas cristalográficas laterales formando una bicapa más densa. Por lo tanto, el crecimiento por deposición de oro en la zona cristalográfica {110} se ve ralentizado, permitiendo solo el crecimiento unidimensional en las puntas. Recientemente, Burrows *et. al.* [127] han demostrado que la plata no influye directamente en la longitud o el ancho de la barra, sino que actúa como un agente catalítico, promoviendo la reducción de iones de oro en las puntas de las partículas [127].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

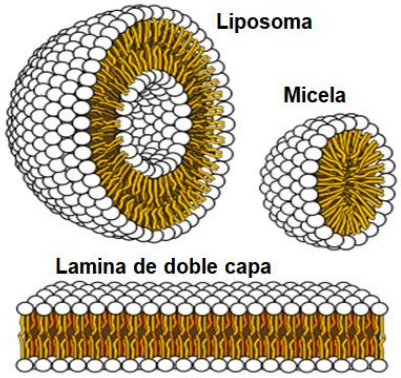


Figura 1.11 Diferentes tipos de morfologías que puede formar el CTAB dependiendo de la concentración y la temperatura.

Este método de síntesis mediado por semillas puede modificarse para obtener diferentes tamaños de AuNRs, se puede modificar la concentración de los reductores como lo son el ácido ascórbico y la $AgNO_3$, también se puede modificar la morfología cambiando la temperatura en la que el CTAB se disuelve debido a su CMC [128] (Observar **Figura 1.11**).

1.6 ESTABILIZACIÓN DE AUNRS CON AGENTES BIOCOMPATIBLES

Tal y como se acaba de comentar, la ruta de obtención más utilizada de AuNRs es aquella que, utiliza CTAB como estabilizante. Sin embargo, este compuesto es tóxico para el cuerpo humano [127], por lo que, para aplicaciones biomédicas de los AuNRs es necesaria la modificación de su superficie con estabilizantes biocompatibles. Así, esta modificación con materiales orgánicos debe proporcionar a los AuNRs estabilidad en condiciones fisiológicas y proporcionar, de ser posible, funcionalidades adicionales. En la actualidad, existen tres métodos comunes para la modificación de la superficie de los AuNR's: revestimiento de la superficie de la NP, intercambio de ligandos, y autoensamblaje capa por capa (**Figura 1.12**).

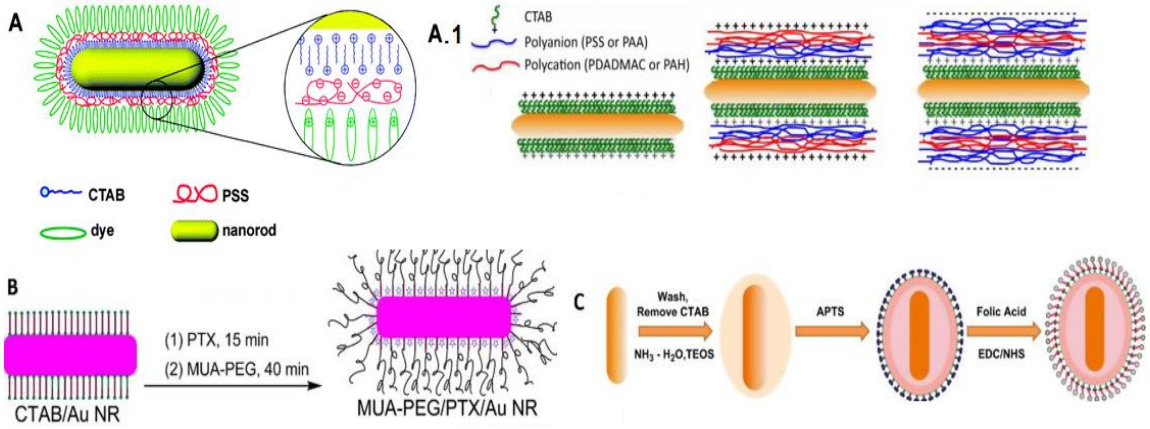


Figura 1.12 Métodos para la modificación superficial de AuNRs: (A) Esquema de cómo debe quedar el recubrimiento capa por capa, en cuanto a cargas [129]. (A.1) Autoensamblaje capa por capa. (B) Intercambio de ligandos [130]. (C) Recubrimiento de superficies [58]. Imagen modificada obtenida de la referencia [127] Copyright (2022) con permiso del Elsevier.

1.6.1 Revestimiento de la superficie

El método de revestimiento de la superficie de la NP comprende la cobertura de AuNRs con una capa delgada de materiales inorgánicos. Este método puede eliminar efectivamente el CTAB y mejorar la biocompatibilidad de los AuNRs [131]. La sílice mesoporosa ($mSiO_2$) es el material de recubrimiento más comúnmente utilizado debido a su bioseguridad y su fácil síntesis. El conocido método Stöber se emplea generalmente para recubrir con sílice los AuNRs ($AuNRs@mSiO_2$) [132].

El grosor de la cubierta de sílice se puede controlar con precisión variando la cantidad de tetraetoxisilano (TEOS) o prolongando el tiempo de reacción. Los $AuNRs@mSiO_2$se usan frecuentemente como vehículo de administración de medicamentos debido a la gran área de superficie interna y el volumen de poros de la sílice mesoporosa [9].

Además de la sílice, otros materiales inorgánicos como el grafeno, los nanotubos de carbono (CNT), metales como lo es el cobre y la plata también se emplean para la funcionalización de los AuNRs [131].

1.6.2 Intercambio de ligandos

El método de intercambio de ligandos se refiere a la unión de moléculas orgánicas o biológicas a la superficie de AuNRs, lo que lleva al desplazamiento de la doble capa de CTAB a través de un proceso impulsado por el intercambio de masas [130]. El grupo tiol es el grupo funcional más utilizado en el método de intercambio de ligandos debido al fuerte enlace Au – S que se forma. Los ligandos tiolados (como, por ejemplo, el polietilenglicol (PEG), quitosano y ADN) se unen fuertemente a las superficies de oro para formar una capa protectora orgánica, que reduce en gran medida la citotoxicidad del CTAB, y mejora la estabilidad y la biocompatibilidad de los AuNRs en la mayoría de los casos [133].

Además, grupos funcionales adicionales como, por ejemplo, los grupos carboxilo e hidroxilo en los ligandos tiolados proporcionan posibilidades para una funcionalización secundaria a través de química de carbodiimida que permite la modificación de la superficie de las nanopartículas por ejemplo con anticuerpos monoclonales se usan ampliamente como agentes de detección, fármacos, moléculas guía [133].

1.6.3 Autoensamblaje capa por capa

Un área importante de modificación superficial de partículas coloidales se basa en el recubrimiento con polielectrolitos (polímeros iónicos) que se fundamenta en la atracción electrostática, enlaces de Van Der Waals, puentes de hidrogeno, química de clic, etc., para su deposición [134]. Los estudios previos de la adsorción de monocapas de polielectrolitos sobre nanopartículas metálicas solo proporcionan una visión de la química de acoplamiento involucrada [135]. Los polielectrolitos tienen una ventaja sobre los polímeros no cargados, ya que pueden depositarse sobre las superficies capa por capa (LbL), lo que permite que el espesor total del polímero se determine por el número de capas depositadas. El enfoque LbL, en su forma más simple, utiliza dos disoluciones de polímeros de carga opuesta en las que se puede sumergir el sustrato (superficie), o partículas mezcladas (coloides) [136]. La inmersión o mezcla secuencial hace que el material polimérico se deposite en la superficie debido a las interacciones electrostáticas e hidrófobas entre la superficie

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cargada y el polielectrolito. Una vez depositada, la capa de polielectrolito invierte la carga superficial del material al que se adsorbe, lo que permite que una capa posterior de polímero de carga opuesta se deposite en la segunda disolución. Este proceso se puede repetir indefinidamente para formar una película uniforme de varias capas de material polimérico. El proceso LbL se ha aplicado a una multitud de sustratos, incluidos diversos soportes sólidos y una gama amplia de nanopartículas [135]. Además, una de las disoluciones de polielectrolito puede reemplazarse con una especie cargada de manera similar, como proteínas, colorantes, nanoarcillas, nanopartículas, etc., para formar multicapas compuestas.

Esta técnica de recubrimiento tiene varias ventajas como [137];

- Control del grosor del recubrimiento del polímero.
- La modificación del número de capas depositadas.
- La elección de una gran variedad de polímeros.
- La aplicación de diferentes tamaños de nanopartículas.

La facilidad de aplicación de polielectrolitos y de fármacos aniónicos o catiónicos, lo que también permite aplicar varias capas de diferentes fármacos modificando sus cargas [138].

1.7 NANOPARTÍCULAS LUMINISCENTES SOBRECONVERSORAS DOPADAS CON LANTÁNIDOS (UPCVS)

Tal y como se ha comentado al inicio de este Capítulo, la búsqueda de nuevos nanosistemas que permitan la adición de más funciones terapéuticas, con menos efectos secundarios en el paciente y con ello la generación de una medicina personalizada a través de sistemas multimodales teragnósticos, se ha vuelto una prioridad. Según se ha mostrado en la primera parte de la introducción, la luz es un estímulo realmente atractivo en sistemas fotosensibles como lo son las nanopartículas de oro modificadas con elementos de diagnóstico por imagen que, además y gracias a sus propiedades plasmónicas, permiten complementar su acción

terapéutica con terapia fototérmica y fotodinámica. Sin embargo, estos sistemas tienen algunas limitaciones:

- Absorben en el espectro UV-Vis lo que puede provocar la descomposición irreversible de ciertas moléculas ópticamente activas generando la formación de radicales tóxicos [139],y presentan alta absorción de la radiación lumínica de ciertos elementos del cuerpo humano en el visible lo que impide un mayor poder de penetración de la radiación en los tejidos. Para intentar superar estas dos limitaciones, se han desarrollado sistemas fotoexcitables en el infrarrojo cercano (NIR), pero que necesitan altas energías alcanzadas con láseres pulsantes cuyo coste es muy elevado por lo que tampoco es una alternativa adecuada.
- Los marcadores fotosensibles pueden presentar inestabilidad química debido al incremento de temperatura de estas nanoplataformas cuando están sometidas a irradiación. Además, los agentes de contraste de las nanoplataformas metálicas suelen ser exógenos como tintes orgánicos o proteínas fluorescentes PDT, que presentan emisión Stokes, teniendo una excitación en el rango UV-Vis.

Por esto, los nuevos nanomateriales buscados deberían presentar absorción en la "ventana de transparencia biológica" en el rango NIR (700-1100 nm) para una mayor profundidad de penetración [140] y emisión en el UV-Vis, gran estabilidad fotoquímica y ausencia de fluorescencia de fondo [140], [141].

Un tipo de nanopartículas que cumple estos requisitos son las nanopartículas sobreconversoras, UpCvs ya que por su composición presentan capacidad de actividad terapéutica fotodinámica y/o fototérmica [142], y posibilidad de funcionalizar su superficie con principios activos que se pueden ser liberados de forma controlada mediante la absorción de múltiples fotones de luz NIR y su conversión en fotones de mayor energía [143]. Por otro lado, la fotoexcitación en el NIR elimina la autofluorescencia (AF) de la materia biológica, lo que nos presenta una mejora significativa en la relación señal/ruido. Además, las bandas de emisión estrechas que minimizan la separación espectral de los picos de emisión de la luz y los diferentes marcadores permiten también que se puedan utilizar para diagnóstico por imagen [142], [143].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

1.8 NANOPARTÍCULAS SOBRECONVERSORAS DOPADAS CON LANTÁNIDOS

Las UpCvs dopadas con tierra raras, en concreto con lantánidos, son esencialmente nanosistemas híbridos huésped-anfitrión compuestos por una matriz de cristal, fibras o cerámica, que actúa como anfitrión y que está dopada con iones lantánidos trivalentes (huéspedes) que actúan como absorbentes (sensibilizador) y emisores (activador) [144] y que se pueden obtener mediante síntesis solvotermal, coprecipitación, procesos sol-gel o descomposición térmica [145]. Además, estos nanosistemas sobreconversores presentan una alta estabilidad química y física, baja toxicidad química y vida larga de luminiscencia [146].

Las UpCvs presenta un gran desplazamiento anti-Stokes entre λ_{ex} y λ_{em} ya que absorbe fotones de baja energía, en la ventana NIR (longitudes de onda largas), y emite fotones de alta energía en el espectro visible (longitudes de onda cortas) [147], fenómeno denominado ***luminiscencia de sobreconversión*** (UCL) [148]. Más en concreto, el mecanismo básico de funcionamiento de estos sistemas híbridos está basado en la absorción de fotones por el sensibilizador en el NIR llevándolo a un estado excitado en el que transfiere energía al activador. Cuando los iones activadores ganan energía, también se excitan emitiendo a longitudes de onda cortas. La presencia de estos dos tipos de iones minimiza la pérdida de energía por relajación cruzada tal y como se comenta con más detalle más abajo y dependiendo de la concentración del dopante, se puede modificar la longitud de emisión de luminiscencia que de forma esquematizada se puede observar en la **Figura 1.13** para cada ion lantánido.

Las características propiedades de las UpCvs dopadas con lantánidos se deben a la estructura electrónica $4f^n5s^25p^6$ con n=0-14 de los iones lantánido, donde la capa 4*f* está parcialmente llena y permite gran cantidad de transiciones electrónicas dentro de la capa [149]. Para n electrones en 14 orbitales posibles hay 14 sobre n configuraciones posibles y todas las configuraciones pueden tener diferentes energías dando lugar a una estructura en niveles de energía en el rango NIR, visible y ultravioleta. En este sentido, el recubrimiento de los electrones 4*f* por una capa

externa 5*s* y 5*p* da lugar a una emisión nítida en forma de línea, que presenta gran resistencia a la degradación fotoquímica y al fotoblanqueo. Desde un punto de vista estricto, las transiciones electrónicas 4*f*-4*f* de los iones lantánidos son dipolos eléctricos prohibidos por las reglas de selección cuántica, pero debido a la mezcla de configuración electrónica superiores con estados *f*, estas transiciones son posibles [150].

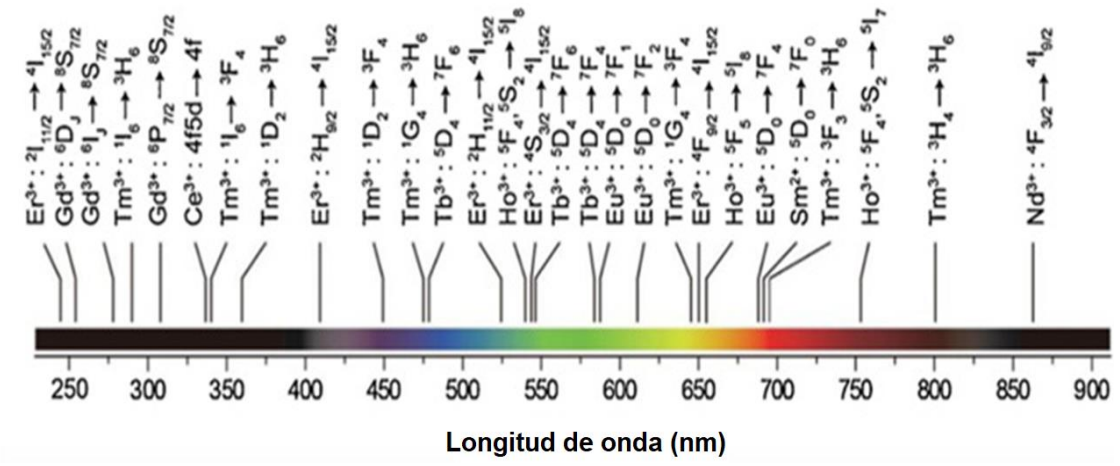


Figura 1.13 Rangos de emisión de color, de las transiciones electrónicas típicas para cada ion lantánido trivalente [144]. Imagen modificada obtenida de la referencia [144] Copyright (2022) con permiso del Elsevier.

La selección del dopante como sensibilizador o como activador se basa en los niveles energéticos espaciados característicos que generan la absorción de fotones por el sensibilizador y su transferencia al activador, siendo los iones de Yb^{3+} los escogidos habitualmente como sensibilizadores ya que presentan un único nivel excitado y presentan un elevado coeficiente de absorción en el NIR [151]. Por su parte, Ln3+ (Ln = Er^{3+} y Tm^{3+}, aunque otros iones como Ho^{3+}, Nd^{3+}, Gd^{3+} o Lu^{3+}) [152], son buenos candidatos como activadores, ya que poseen niveles de energía en escalera lo suficientemente cercanos entre sí para facilitar la adsorción de fotones y la transferencia de energía. Además, las diferencias energéticas entre estos activadores coinciden con la diferencia energética entre el estado fundamental del Yb^{3+} y el excitado lo que permite una transferencia energética resonante entre los iones sensibilizadores y activadores y con ello un aumento de la transferencia de energía eficiente entre ellos [145] tal y como se puede observar en **Figura 1.14.**

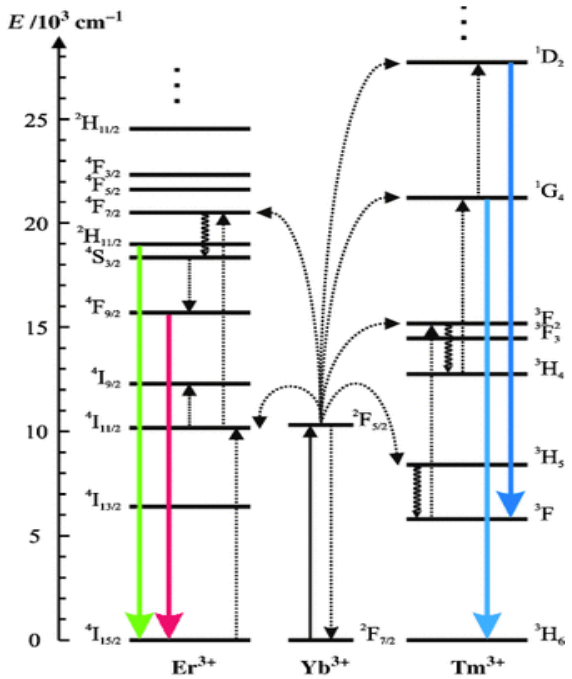


Figura 1.14 Diagrama de los niveles de energía de los UpCvs de $Yb3^{+}$ dopados con Er^{3+} y Tm^{3+}, donde se muestra la excitación de conversión ascendente y la emisión de su luminiscencia en el infrarrojo visible. Las flechas indican la transferencia de energía radiativa y no radiativa y los procesos de relajación multifonónica [153]. Imagen modificada obtenida de la referencia [153] Copyright (2022) con permiso del John Wiley and Sons.

Tal y como se ha ido comentando a lo largo de esta sección, los dopantes basados en lantánidos son centros ópticamente activos que producen emisión cuando son excitados gracias a su configuración orbital-*f*. Sin embargo, la excitación directa de estos iones en ausencia de un anfitrión genera emisiones luminiscentes relativamente bajas a causa de las transiciones electrónicas prohibidas entre esos niveles energéticos. De ahí el interés de incorporar estos iones sobre matrices anfitrionas que van a servir de medio estable para la emisión más eficiente de los iones, ya que muchas veces estas matrices incluso presentan mayores coeficientes de absorción que los iones lantánidos [154]. Estas matrices cristalinas deben cumplir una serie de requisitos tales como una red cristalina coincidente con la de los iones dopantes, buena estabilidad química y baja energía de vibración de fonón [155]. En base a esto, las principales matrices inorgánicas empleadas para preparar UpCvs son las basadas en fluoruros (algunos ejemplos son: $NaYF_4$ y LaF_3) debido a su baja energía vibracional fonónica que asegura un dopaje homogéneo, evita defectos en la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

red cristalina imprescindible para una sobreconversión eficiente y minimiza las tensiones en la red y las pérdidas de energía no radiactiva [156].

Otro elemento importante a la hora de la síntesis de las nanopartículas sobreconversoras para obtener la máxima eficiencia sobreconversora es conseguir la interdistancia atómica adecuada entre el sensibilizador y el activador en la matriz. Como los dopantes lantánidos se colocan al azar en los sitios catiónicos de la matriz cerámica, la distancia entre ellos se puede ajustar en base a la concentración de los dopantes y a las constantes de red. Una razón inadecuada entre las concentraciones de los dopantes da lugar a procesos de relajación/apagada cruzada de la emisión o a la desactivación de la transferencia de energía [157].En este sentido, el sensibilizador Yb^{3+} se utiliza a razones de dopaje elevado (20%-30%) debido a su único nivel energético de excitación y elevado coeficiente de absorción en el NIR; sin embargo, los activadores están presentes a una concentración de dopaje baja (< 2%) debido a sus niveles energéticos en escalera. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de sistemas anfitrión cerámico-dopante lantánido utilizados en sobreconversión [158, 159].

Tabla 1.1 Matrices anfitrión/dopante con tierras raras, sus estructuras cristalinas, morfología y la literatura donde se puede observar [160].

Iones dopantes			**Principales emisiones (nm)**		
Matrices anfitrionas	**sensibilizador**	**Activador**	**Azul**	**Verde**	**Rojo**
$NaYF_4$	Yb	Er		518, 537	652
	Yb	Er		540	660
	Yb	Er		510–530	635–675
	Yb	Er		521,539	651
	Yb	Tm	450, 475		647
	Yb	Er, Tm	499, 474	525	644, 693
	Yb	Ho		540	
	Yb	Ho		542	645, 658
LaF_3	Yb	Tm	475		
	Yb	Er		520, 545	659

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	Yb	Ho		542	645, 658
CaF_2	Yb	Er		524	654
Y_2O_3	Yb	Er		550	660
	Yb	Ho		543	665
Lu_2O_3	Yb	Er, Tm	490	540	662
$LuPO_4$	Yb	Tm	475		649

1.9 MECANISMOS DE SOBRECONVERSIÓN

En óptica lineal se supone que las propiedades ópticas son independientes de la intensidad de la luz incidente, sin embargo, existe una "óptica no lineal" la cual se utiliza para describir todos los fenómenos en los cuales, las propiedades ópticas del material son dependientes de la densidad de flujo radiante obtenida de fuente de excitación de excitación [161]. Tal y como se comentó en la sección anterior, la sobreconversión de fotones (UC) es uno de los fenómenos de óptica no lineal que se caracteriza por la conversión de radiación de longitud de onda larga, por ejemplo, radiación infrarroja o infrarrojo cercano, longitudes de onda en el visible y el ultravioleta mediante de la absorción sucesiva de dos o más fotones a través de estados de energía intermedios seguidos por la emisión de fotones a longitudes de onda más cortas. Frecuentemente, el proceso de sobreconversión comienza mediante la excitación de los electrones que se encuentran en el nivel fundamental (0), saltando a un nivel intermedio (1), debido a la absorción de los fotones entre los niveles 0 y 1 [162]. Llegado a este punto es donde se presentan los diversos mecanismos de sobreconversión, los cuales pueden dividirse en tres clases [154]

- Absorción de estado excitado (ESA): en este proceso (**Figura 1.15 a**), la excitación conlleva la sucesiva absorción de fotones por un ion simple debido a una estructura en forma de escalera de un sistema simple de tres niveles. Este mecanismo necesita una separación igual del estado fundamental al estado excitado E_1 y del estado E_1 y E_2, así como la capacidad de almacenamiento del nivel intermedio E_1. Cuando un ion se excita del estado fundamental al nivel E_1, otros fotones tienen la posibilidad de promocionar el ion de E_1 al nivel E_2 debido al tiempo de vida largo del

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estado E_1. Finalmente, la emisión del estado E_2 al fundamental (proceso de relajación) da lugar al fenómeno de upconverting.

- Transferencia de energía por sobreconversión (ETU): en este mecanismo (**Figura 1.15 b**), un ión1, conocido como sensibilizador, absorbe de forma secuencial fotones pasando del estado fundamental, G, a uno metaestable E_1 y transfiere la energía almacenada a su estado fundamental y a un estado excitado de un segundo ion, conocido como activador. Estos procesos provocan la excitación del ion 2 a un estado E_2, mientras que el ion sensibilizador relaja al estado fundamental. La eficiencia de sobreconversión depende fuertemente de la distancia media entre los iones activador-sensibilizador, que se determina por la concentración de dopante.
- Avalancha de fotones (PA): en este mecanismo, [163], es esencial una potencia de excitación mínima denominada valor umbral (**Figura 1.15 c**). Por debajo de ese umbral casi no se produce fluorescencia por sobreconversión. El proceso bucle se inicia con un mecanismo ESA para elevar el ion 2 del estado E_1 al nivel emisor E_2. Posteriormente se produce el proceso E_2(ion 2) +G (ion 1) $\rightarrow$$E_1$(ion 2) +$E_1$ (ion 1) entre los iones 1 y 2. Después el ion 1 transfiere su energía al ion 2 para poblar su nivel E_2, formando el bucle completo. El siguiente efecto del proceso bucle es que un ion 2 en el estado metaestable E_1 produce dos iones 2 en ese estado. Cuando el proceso bucle sucede, 2 iones 2 en el estado E_1 producirán 4, 4 producirán 8 y así sucesivamente.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

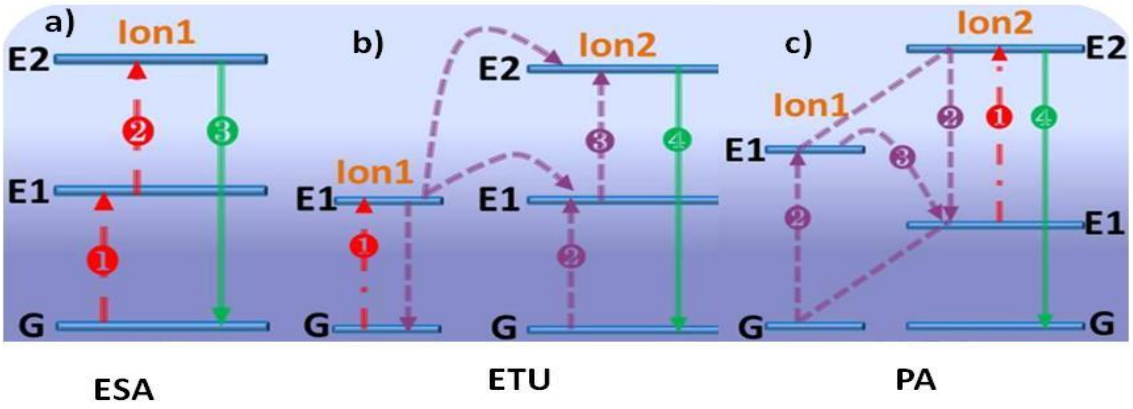


Figura 1.15 Principales mecanismos de sobreconversión de partículas sobreconversoras dopadas con lantánidos: a) Absorción de estado excitado, ESA; b) Sobreconversión por transferencia de energía, ETU y c) Avalancha de fotones, PA. Las líneas roja, violeta y verde representan el fotón de excitación, la energía transferida y el proceso de emisión, respectivamente. Imagen adaptada reproducida de [164]. Imagen modificada obtenida de la referencia [164] Copyright (2022) con permiso del American Chemical Society.

1.10 SÍNTESIS DE UPCVS DOPADOS CON LANTÁNIDOS

Como se ha mencionado anteriormente, el tamaño de las UpCvs dopadas con lantánidos, la pureza de la fase cristalina, la monodispersidad y la morfología son las parámetros más importantes y críticos que influyen directamente en las propiedades obtenidas de las UpCvs y con ello en la propiedad fluorescente de sobreconversión [165]. Por ello, se han dedicado bastantes esfuerzos en el desarrollo diferentes técnicas químicas que optimicen la obtención de estas nanopartículas híbridas. Entre las técnicas más utilizadas están la coprecipitación, la descomposición térmica, el procesamiento por sol-gel [145] y el método hidro (solvo) térmico [166].

1.10.1 Método de coprecipitación

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Este método de coprecipitación es simple debido a que no consume mucho tiempo y no requiere grandes costes en su producción, es un procedimiento sencillo, y no implica reacciones complejas. El crecimiento de las nanopartículas se puede controlar y estabilizar con la adición en el disolvente de ligandos como

polivinilpirrolidona (PVP), polietilenimina (PEI) [167, 168], ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) [169]. Sin embargo, a partir de este método no es habitual que se formen nanopartículas cristalinas y esto implica la necesidad de un tratamiento de calor posterior [170]. En el caso concreto de las de las nanopartículas $NaYF_4$; Yb, Er, el método de la coprecipitación provoca que generen estructuras cristalinas en fase cúbica lo que implica una menor eficiencia sobreconversora ya que es la fase hexagonal de los nanocristales formados la que presentaría intensidades de fluorescencia superiores hasta 40 veces [170]. Este calentamiento posterior a altas temperaturas permite una transferencia parcial de fase cúbica a hexagonal mejorando las propiedades sobreconversoras. Sin embargo, después del calentamiento, las nanopartículas sobreconversoras tienden a agregase y por lo tanto a ser inestables, lo que limita sus posibles aplicaciones y por ello este método de síntesis es bastante limitado actualmente.

1.10.2 Método de descomposición térmica

La descomposición térmica es otra técnica ampliamente utilizada en la obtención de nanopartículas sobreconversoras y fue implementada por primera vez por Zhang et al. en el año 2006 [171]. Consiste básicamente en disolver precursores orgánicos en disolventes de alto punto de ebullición (ácido oleico (AO), oleilamina (OM), octadeceno (ODE)), con el objetivo de obtener nanopartículas híbridas altamente monodispersa. Así, este método se basa en la termolización los trifluoroacetatos de tierras raras, esto es, la descomposición térmica de los precursores en sus correspondientes fluoruros metálicos, en presencia de disolventes de alto punto de ebullición a una temperatura superior a 300 °C [149]. En este sentido, el ODE con un punto de ebullición en 315 ºC [172] proporciona el entorno de elevada temperatura necesario para el proceso sintético y el OA y la OM ayudan a recubrir la superficie de las Nps para evitar la aglomeración y, por lo tanto, presentar una buena dispersión y una morfología bien definida [173, 174]. Con este método se comenzaron sintetizando cristales monodispersos en fase cúbica y hexagonal de $NaYF_4$ dopados con Er^{3+}, Yb^{3+} usando como disolvente mezclas de OA/OM/ODE y para los dopados con Tm^{3+}, Yb^{3+} la mezcla de disolventes compuesta por OA/ODE [175]. Desde ese momento se volvió una síntesis bastante

utilizada para obtener UpCvs de $NaYF_4$ dopadas con tierras raras de alta calidad [176]. Este protocolo sintético se fue optimizado en varios estudios posteriores para poder controlar el tamaño de las nanopartículas y su eficiencia sobreconversora. En este sentido se estudiaron diferentes parámetros tales como la composición de los disolventes, la temperatura de descomposición, la concentración y especie de los precursores y formación de una estructura núcleo-coraza [177]. Sin embargo, esta técnica presenta la gran desventaja del alto coste de los precursores metálicos, su sensibilidad al aire y con ello su oxidación y la generación de productos tóxicos. [173, 174]. [149].

1.10.3 Método sol-gel

El proceso de sol-gel es un método sintético en el que las UpCvs se obtienen a partir la hidrólisis y la policondensación de precursores basados en acetato o alcóxido metálicos [172]. Por esta ruta de síntesis se han obtenido varias UpCvs dopadas con Ln basados en óxidos metálicos, como YVO_4: Yb, Er, $Lu_3Ga_5O_{12}$: Er, $BaTiO_3$: Er y ZrO_2: Er. Sin embargo, a pesar de su éxito y el bajo coste de los precursores, el método sol-gel tienen un control limitado sobre del tamaño de nanopartículas y la agregación de partículas puede ocurrir cuando se dispersan en disoluciones acuosas, para su posterior aplicación en biomedicina [178]. Además, a menudo se necesita un tratamiento térmico posterior para mejorar la pureza de la fase cristalina y con ello la eficiencia de la luminiscencia, y que puede generar agregación indeseada en las nanopartículas [179].

1.10.4 Método hidrotermal/ solvotermal

El método de obtención hidrotermal/solvotérmico es un procedimiento de síntesis química dentro de un entorno sellado a alta presión y temperatura (generalmente por debajo de 200 ºC [180]en donde se mezclan sales de fluoruros (por ejemplo, NH_4F) con sales lantánidas en un disolvente de alto punto de ebullición como el etileno glicol. Estas condiciones de presión y temperatura aceleran la reacción entre los diferentes componentes y [181] permitiendo obtener nanocristales altamente cristalinos con tamaño, morfología, propiedades ópticas y magnéticas ajustables a través del control de temperatura/ tiempo de la reacción,

concentración, valores de pH, precursores, etc. [182, 183]. Sin embargo, entre la principal limitación de este método está la imposibilidad de observar el proceso de crecimiento del cristal. [168]

Con este método se han obtenido diferentes tipos de UpCvs con el uso de precursores oleato como por ejemplo las basadas en matrices cerámicas de NaYF4 en fase hexagonal utilizando EDTA, CTAB y ácido acético en mezclas agua/etanol [184, 185]. También se han obtenido matrices cerámicas de $NaYF_4$ en fase cúbica dopadas con Yb^{3+}/Er^{3+} o Yb^{3+}/Tm^{3+} y recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) en un sistema glicol etileno con posibilidad de disolverse en medio acuoso y en disolventes orgánicos [186]. El crecimiento de las nanopartículas de α-$NaYF_4$ se puede controlar utilizando polietilenimina en un sistema solvotérmico de etilenglicol [177].

1.11 MODIFICACIONES SUPERFICIALES EN LAS UPCVS DOPADAS CON LN

En general, todos estos métodos de síntesis utilizan ligandos orgánicos hidrófobos que se sitúan en la superficie de las UpCvs, por lo que en muchos casos se obtienen nanopartículas poco hidrófilas que limitan su utilidad en aplicaciones biomédicas. Incluso las que son solubles en agua no presentan grupos funcionales adecuados para poder unirles moléculas bioactivas. Para superar estas limitaciones, la solubilidad se puede conseguir a través de grupos cargados o grupos polares en la superficie orgánica. En este sentido, las UpCvs hidrófobas se pueden transferir a disoluciones acuosas a través de diferentes modificaciones superficiales como polímeros anfifílicos [187], lípidos [188], capas de sílica [189]e intercambio u oxidación de ligando [190, 191]. En el caso de polímeros anfifílicos (por ejemplo, poliacrílico ramificado con octilamina/isopropilamina), las cadenas hidrófobas de estos polímeros se unen a los ligandos de superficie de las UpCvs (por ejemplo, el OA) vía interacciones hidrófobas de Van der Waals, mientras que los grupos carboxilos del ácido poliacrílico generan sitios hidrófilos. Siguiendo el mismo protocolo, se pueden hidrofilizar UpCvs con fosfolípidos. En el caso de la

modificación de los grupos hidrófobos mediante sinalización, esta se consigue generando una capa de hidrófila de sílica hidrolizando precursores tetraetoxisilano. En este caso, la modificación de los sitos se consigue con la introducción de grupos amino contenidos en los silanos. demás, el recubrimiento con capas de sílice también es aplicable a UpCvs hidrófilas [192]. Estas superficies modificadas se pueden a su vez diseñar con grupos funcionales más complejos que permiten modular las interacciones intermoleculares entre partículas. Estos grupos funcionales pueden abarcar desde ligandos simples hasta componentes biológicamente activos como péptidos, proteínas y ADN.

Además, de evitar los problemas de solubilidad, estas modificaciones superficiales también mejoran la eficiencia sobreconversora al generar una capa protectora sobre los iones lantánido que evita la pérdida de energía no radiactiva aumentando de este modo la eficiencia luminiscente de las UpCvs.

Por lo tanto, entender la modificación superficial de las UpCvs es muy importante para poder mejorar su eficiencia de sobreconversión (evitando pérdidas de energía no radiactiva), su solubilidad en medio acuoso y otorgarles capacidades particulares para aplicaciones biomédicas (terapia contra el cáncer, imagen o biodetección) [193, 194, 195].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.12 REFERENCIAS

[1] D. R. Askeland, P. P. Fulay y W. J. Wright, The Science and Engineering of Materials, Sixth Edition, Cengage Learning, 2011.

[2] J. J. Atoche Medrano, Técnicas usadas en Nanociencia y Nanotecnología: Síntesis y caracterización de nanomateriales estructurados, EAE, 2015.

[3] M. Bermejo Bermejo y P. A. Serena Domingo, Los riesgos de la Nanotecnología, Madrid: CSIC, 2017.

[4] T. Shelley, Nanotechonlogy, new promises, new dangers, London and New York: Zed Books, 2006.

[5] Z. C. N. P. R. H. X. W. J. Q. S. C. T. G. X. K.-T. Y. Jie Zhou, «Functionalized gold nanorods for nanomedicine: Past, present and future,» *Coordination Cjemistry Reviews*, vol. 352, pp. 15-66, 2017.

[6] O. T. C. Y. J. P. Z. X. G. L. P. R. James NS, «Comparative Tumor Imaging and PDT Efficacy of HPPH Conjugated in the Mono- and Di-Forms to Various Polymethine Cyanine Dyes: Part - 2,» *Theranostics*, vol. 3, nº 9, pp. 703-718, 2013.

[7] S. Bhattacharyya, S. Wang, D. Reinecke, W. Kiser Jr, R. A. Kruger y T. R. DeGrado, «Synthesis and evaluation of near-infrared (NIR) dye-herceptin conjugates as photoacoustic computed

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tomography (PCT) probes for HER2 expression in breast cancer,» *Bioconjug Chem,* vol. 19, nº 6, pp. 1186-93, 2008.

[8] N. S. Awad, P. Vinod, N. M. AlSawaftah, G. Ter Haar, T. M Allen, W. G Pitt y G. A Husseini, «Ultrasound-Responsive Nanocarriers in Cancer Treatment: A Review,» *ACS Pharmacology & Translational Science,* vol. 4, nº 2, pp. 589-612, 2021.

[9] S. Amorim, A. Martins, N. M. Neves, R. L. Reis y R. A. Pires, «Hyaluronic acid/poly-L-lysine bilayered silica nanoparticles enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells,» *Journal of Materials Chemistry B,* vol. 2, nº 40, pp. 6939-6946, 2014.

[10] X. Cai, S. Conley y M. Naash, «Nanoparticle applications in ocular gene therapy,» *Vision Research,* vol. 48, nº 3, pp. 319-324, 2008.

[11] D. Fisher, T. Bieber, Y. Li, H.-P. Elsässer y T. Kissel, «A Novel Non-Viral Vector for DNA Delivery Based on Low Molecular Weight, Branched Polyethylenimine: Effect of Molecular Weight on Transfection Efficiency and Cytotoxicity,» *Pharmaceutical Research,* vol. 16, pp. 1273-1279, 1999.

[12] R. Jain y T. Stylianopoulos, «Delivering nanomedicine to solid tumors,» *Nature Reviews Clinical Oncology,* vol. 7, nº 11, pp. 653-664, 2010.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[13] G. B. Braun, A. Pallaoro, G. Wu, D. Missirlis, J. A. Zasadzinski, M. Tirrell y N. O. Reich, «Laser-Activated Gene

Silencing via Gold Nanoshell− Conjugates,» *ACS Nano,* vol. 3, nº 7, pp. 2007-2015, 2009.

[14] E. Hao, G. C. Schatz y J. T. Hupp , «Synthesis and Optical Properties of Anisotropic Metal Nanoparticles,» *Journal of Fluorescence,* vol. 14, pp. 331-341, 2004.

[15] J. H. Amanda, A. S. Duglas, N. Shuming y R. P. Van Duyne, «Using Solution-Phase Nanoparticles, Surface-Confined Nanoparticle Arrays and Single Nanoparticles as Biological Sensing Platforms,» *Journal of Fluorescence,* vol. 14, pp. 355-367, 2004.

[16] E. Villar-Alvarez, A. Cambón, A. Pardo, V. X. Mosquera, A. Bouzas-Mosquera, A. Topete, S. Barbosa, P. Taboada y V. Mosquera, «Gold Nanorod-Based Nanohybrids for Combinatorial Therapeutics,» *ACS Omega.,* vol. 10, nº 3, p. 12633–12647, 2018.

[17] S. You, J. Luo, H. E. Grossniklaus, . M.-L. Gou, K. Meng y Q. Zhang, «Nanomedicine in the application of uveal melanoma,» *International Journal of Ophthalmology,* vol. 9, nº 8, pp. 1215-1225, 2016.

[18] D. Banerjee y S. Sengupta, «Nanoparticles in cancer chemotherapy,» *Progress in Molecular Biology and Translational Science,* vol. 104, pp. 489-507, 2011.

[19] M. E. Davis, Z. G. Chen y D. M. Shin, «Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer,» *Nature Reviews Drug Discovery,* vol. 7, nº 9, pp. 771-782, 2008.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[20] P. Golden, J. Huwyler y W. Pardridge, «Treatment of large solid tumors in mice with daunomycin-loaded sterically stabilized liposomes,» *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents,* vol. 5, nº 3, pp. 207-212, 1998.

[21] T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink y G. Storm, «Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress,» *Journal of Controlled Release,* vol. 161, nº 2, pp. 175-187, 2012.

[22] F. Jia-You y S. A. Al-Suwayeh, «Nanoparticles as delivery carriers for anticancer prodrugs,» *Expert Opinion on Drug Delivery,* vol. 9, nº 6, pp. 657-669, 2012.

[23] C. Mamot, R. Ritschard, A. Wicki, G. Stehle, T. Dieterle, L. Bubendorf, C. Hilker, S. Deuster, R. Herrmann y C. Rochlitz, «Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study,» *The Lancet Oncology,* vol. 13, nº 12, pp. 1234-1241, 2012.

[24] C. Mamot, R. Ritschard, A. Wicki, W. Küng, J. Schuller, R. Herrmann y C. Rochlitz, «Immunoliposomal delivery of doxorubicin can overcome multidrug resistance mechanisms in EGFR-overexpressing tumor cells,» *Journal of Drug Targeting,* vol. 20, nº 5, pp. 422-432, 2012.

[25] G. Cao y Y. Wang, Nanostructures And Nanomaterials: Synthesis, Properties And Applications, USA: World Scientific, 2004.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[26] A. J. Haes, D. A. Stuart, S. Nie y R. P. Van Duyne, «Using Solution-Phase Nanoparticles, Surface-Confined Nanoparticle Arrays and Single Nanoparticles as Biological Sensing Platforms,» *Journal of Fluorescence,* vol. 14, nº 4, pp. 355-367, 2004.

[27] F. Antonii, Panacea aurea-aurum Potabile, Hamburgo, Alemania: Bibliopolio Froebeliano, 1618.

[28] M.-C. A. D. Daniel, «Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology,» *Chemical Reviews,* vol. 103, pp. 293 -346, 2003.

[29] J. Kunckels, Nuetliche Observationes oder Anmerkungen von Auro und Argento Potabili, Hamburg, Germany: Schutzens, 1676.

[30] G. Mie, «Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions,» *Ann. Phys (Leipzig),* vol. 25, nº 3, pp. 377-445, 1908.

[31] S. Singh, «Nanostructures: Enhancing Potential Applications in Biomedicals,» *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology,* vol. 4, pp. 12-16, 2013.

[32] S.-S. Chang, C.-W. Shih, C.-D. Chen, W.-C. Mai y C. Wang, «The Shape Transition of Gold Nanorods,» *Langmuir,* vol. 15, nº 3, pp. 701-709, 1999.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[33] K. Kelly, E. Coronado y L. Zhao, «The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment,» *The Jornal of Physical Chemistry B,* vol. 107, nº 3, pp. 668-677, 2003.

[34] E. Hutter y J. H. Fendler, «Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance,» *Advanced Materials,* vol. 16, nº 19, pp. 1685-1706, 2004.

[35] J. Li, S. Liu, Y. Liu, F. Zhou y Z.-Y. Li, «Anisotropic and enhanced absorptive nonlinearities in a macroscopic film induced by aligned gold nanorods,» *Applied Physics Letters,* vol. 26, p. 96, 2010.

[36] J. Li, H. Guo y Z.-Y. Li, «Microscopic and macroscopic manipulation of gold nanorod and its hybrid nanostructures [Invited],» *Photonics Research,* vol. 1, nº 1, pp. 28-41, 2013.

[37] N. Elahi, M. Kamali y M. H. Baghersed, «Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review,» *Talanta,* vol. 184, pp. 537-556, 2018.

[38] G. W. L. Y. F. W. A. L. Yang Zhang, «Recent advances in gold nanostructures based biosensing and biomaging,» *Coordination Chemistry Reviews,* vol. 370, pp. 1-21, 2018.

[39] S. Y. K.-T. ,. R. I. D. X.-Q. Y. X. L. F. Zeng, «A Review on Functionalized Gold Nanoparticles for Biosensing Applications,» *Plasmonics,* vol. 6, nº 3, pp. 491-506, 2011.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[40] Y.-Y. C. S.-S. L. C.-L. W. C. Yu, «Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties,» *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 101, nº 34, pp. 6661-6664, 1997.

[41] E. Hemmer, A. Benayas, F. Légaré y F. Vetrone, «Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm,» *Nanoscale Horiz.*, vol. 1, pp. 168-184, 2016.

[42] E. Hemmer, A. Benayas, F. Légaré y F. Vetrone, «Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm,» *Nanoscale Horizons*, vol. 1, nº 3, pp. 168-184, 2016.

[43] Y. Bao, M. Yin, X. Hu, X. Zhuang, Y. Sun, Y. Guo, S. Tan y Z. Zhang, «A safe, simple and efficient doxorubicin prodrug hybrid micelle for overcoming tumor multidrug resistance and targeting delivery,» *Journal of Controlled Release*, vol. 235, pp. 182-194, 2016.

[44] R. Bardhan, S. Lal, A. Joshi y N. Halas, «Theranostic Nanoshells: From Probe Design to Imaging and Treatment of Cancer,» *Accounts of Chemical Reserch*, vol. 44, nº 10, pp. 936-946, 2011.

[45] J. Cancino-Bernardi, V. Marangoni, J. Besson, M. Cancino y M. Natali, «Gold-based nanospheres and nanorods particles used as theranostic agents: an in vitro and in vivo toxicology studies.,» *Chemosphere*, vol. 213, pp. 41-52, 2018.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[46] S. Mura y P. Couvreur, «Nanotheranostics for personalized medicine,» *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, nº 13, pp. 1394-1416, 2012.

[47] R. Misra, S. Acharya y S. K. Sahoo, «Cancer nanotechnology: application of nanotechnology on cancer therapy,» *Drug Discovery Today*, vol. 15, nº 19-20, pp. 842-850, 2010.

[48] R. X. Zhang, H. L. Wong, H. Y. Xue, J. Y. Eoh y X. Y. Wu, «Nnomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy-Strategies and perspectives,» *Journal of Controlled Release*, vol. 240, nº 28, pp. 489-503, 2016.

[49] D. Liu, D. T. y T. Auguste, «Cancer targeted therapeutics: From molecules to drug delivery vehicles,» *Journal of Controlled Release*, vol. 219, pp. 632-643, 2015.

[50] R. Duncan y R. Gaspar, «Nanomedicine(s) under the Miscroscope,» *Molecular Pharaceutics*, vol. 8, pp. 2101-2141, 2011.

[51] A. Turner, I. Karube y G. S. Wilson, Biosensors: Fundamentals and Applications, Oxford: Oxford University Press, 1987.

[52] A. Rhouati, G. Bulbul, U. Latif, A. Hayat, Z.-h. Li y J. L. Marty, «Nano-Aptasensing in Mycotoxin Analysis: Recent Updates and Progress,» *Toxins*, vol. 9, nº 11, pp. 349-359, 2017.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[53] G. K. Darbha , U. S. Rai, A. K. Singh y P. C. Ray, «Gold-Nanorod-Based Sensing of Sequence Specific HIV-1 Virus DNA by

Using Hyper-Rayleigh Scattering Spectroscopy,» *Chemistry Eurpoe Journal,* vol. 14, nº 13, pp. 3896-3903, 2008.

[54] K. S. K. C. V. RAMAN, «A New Type of Secondary Radiation,» *Nature,* vol. 121, pp. 501-502, 1928.

[55] X.-M. Qian y S. M. Nie, «Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications,» *Royal Society of Chemistry,* vol. 37, pp. 912-920, 2008.

[56] S. A. A. R.-L. L. P.-S. I. A.-P. R. A. K. A. W. H. &. L.-M. L. M. Barbosa, «Tuning size and sensing properties in colloidal gold nanostars,» *Langmuir,* vol. 26, nº 18, pp. 14943-14950, 2010.

[57] C. Yu, L. Varghese y J. Irudayaraj, «Surface Modification of Cetyltrimethylammonium Bromide-Capped Gold Nanorods to Make Molecular Probes,» *Langmuir,* vol. 23, pp. 9114-9119, 2007.

[58] C.-Z. Li, K. B. Male, S. Hrapovic y J. H. Luong, «Fluorescence properties of gold nanorods and their application for DNA biosensing,» *Chemical Communications,* nº 31, pp. 3924-3926, 2005.

[59] H. Gong, R. Peng y Z. Liu, «Carbon nanotubes for biomedical imaging: the recent advances,» *Adv Drug Deliv Rev,* vol. 65, nº 15, pp. 1951-63, 2013.

[60] X. Huang y M. A. El-Sayed, «Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT),» *Alexandria Journal of Medicine* , vol. 47, nº 1, pp. 1-9, 2011.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[61] M.-L. Li, J.-T. Oh, X. Xie, G. Ku, W. Wang, C. Li, G. Lungu, G. Stoica y L. V. Wang, «Simultaneous Molecular and Hypoxia Imaging of Brain Tumors In Vivo Using Spectroscopic Photoacoustic Tomography,» *Proceedings of the IEEE,* vol. 96, nº 3, pp. 481-489, 2008.

[62] J. Conde, G. Doria y P. Baptista, «Noble Metal Nanoparticles Applications in Cancer,» *Journal of Drug Delivery,* vol. 2012, pp. 1-12, 2012.

[63] J. P. Celli, B. Q. Spring, I. Rizvi, C. L. Evans, K. S. Samkoe, S. Verma, B. W. Pogue y T. Hasan, «Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring and Optimization,» *Chemical Reviews,* vol. 110, nº 5, pp. 2795-2838, 2010.

[64] H. Chen, L. Shao, Q. Li y J. Wang, «Gold nanorods and their plasmonic properties,» *Chemical Society Review,* vol. 42, nº 7, pp. 2679-2724, 2013.

[65] D. Kim, M. K. Yu, T. S. Lee, J. J. Park, Y. Y. Jeong y S. Jon, «Amphiphilic polymer-coated hybrid nanoparticles as CT/MRI dual contrast agents,» *Nanotechnology,* vol. 22, nº 15, p. 155101, 20011.

[66] H.-Y. Tseng, C.-K. Lee, S.-Y. Wu, T.-T. Chi, K.-M. Yang, J.-Y. Wang, Y.-W. Kiang, C. C. Yang, M.-T. Tsai y Y.-C. Wo, «Au nanorings for enhancing absorption and backscattering monitored with optical coherence tomography,» *Nanotechnology*, vol. 21, nº 29, p. 295102, 2010.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[67] W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka y W. C. W. Chan, «Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent,» *Nature Nanotechnology,* vol. 3, pp. 145-150, 2008.

[68] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian y M. A. El-Sayed, «Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 128, nº 6, p. 2115–2120, 2006.

[69] J. Zhang, Y. Fu, Y. Mei, F. Jiang y J. R. Lakowicz, «Fluorescent Metal Nanoshell Probe to Detect Single miRNA in Lung Cancer Cell,» *Analytical Chemistry,* vol. 82, nº 11, pp. 4464-4471, 2010.

[70] K. J. Hatanpaa, S. Burma, D. Zhao y A. A. Habib, «Epidermal Growth Factor Receptor in Glioma: Signal Transduction, Neuropathology, Imaging, and Radioresistance,» *Neoplasia,* vol. 12, nº 9, pp. 675-684, 2010.

[71] X. Qian, X.-H. Peng, D. O. Ansari, Q. Yin-Goen, G. Z. Chen, D. M. Shin, L. Yang, A. N. Young, M. D. Wang y S. Nie, «In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags,» *Nature Biotechnology,* vol. 26, nº 1, pp. 83-90, 2008.

[72] D. Song, R. Yang, F. Long y A. Zhu, «Applications of magnetic nanoparticles in surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection of environmental pollutants,» *Journal of Environmental Sciences,* vol. 80, pp. 14-34, 2019.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[73] M. M. E. K. A. &. W.-H. S. Kahraman, «Fundamentals and applications of SERS-based bioanalytical sensing,» *Nanophotonics,* vol. 6, nº 5, pp. 831-852, 2017.

[74] A. R. Maity y D. Stepensky, «Delivery of drugs to intracellular organelles using drug delivery systems: Analysis of research trends and targeting efficiencies,» *Interantional Journal of Pharmaceutics,* vol. 496, nº 2, pp. 268-274, 2015.

[75] H. Zare-Zardini, F. Ferdowsian, H. Soltaninejad, A. Ghorani, S. Soleymani, M. Zare-Shehneh, M. Mofidi, R. Rafati y L. Ebrahimi, «Application of nanotechnology in biomedicine: A major focus on cancer therapy,» *Journal of Nano Research,* vol. 35, pp. 55-66, 2015.

[76] S. Mura, J. Nicolas y P. Couvreur, «Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery,» *Natrure Materials,* vol. 12, pp. 991-1003, 2013.

[77] M. N. Holme, I. A. Fedotenko, D. Abegg, J. Althaus, L. Babel, F. Favarger, R. Reiter, R. Tanasescu, P.-L. Zaffalon, A. Ziegler, B. Müller, T. Saxer y A. Zumbuehl, «Shear-stress sensitive lenticular vesicles for targeted drug delivery,» *Nature Nanotechnology,* vol. 7, pp. 536-543, 2012.

[78] A. Jhaveri, P. Deshpande y V. Torchilin, «Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy,» *Journal of Controlled Release,* vol. 190, pp. 352-370, 2014.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[79] I. Tannock y D. Rotin, «Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation,» *Cancer Research,* vol. 49, nº 16, pp. 4373-4384, 1989.

[80] Y. Obata, S. Tajima y S. Takeoka, «Evaluation of pH-responsive liposomes containing amino acid-based zwitterionic lipids for improving intracellular drug delivery in vitro and in vivo,» *Journal of Controlled Release,* vol. 142, nº 2, pp. 267-276, 2010.

[81] H. Ringsdorf, «Structure and properties of pharmacologically active polymers,» *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia,* vol. 51, nº 1, pp. 135-153, 1975.

[82] E. C. Dreaden, B. E. Gryder, L. A. Austin, B. A. Tene Defo, S. C. Hayden, M. Pi, L. D. Quarles, A. K. Oyelere y M. A. El-Sayed, «Antiandrogen Gold Nanoparticles Dual-Target and Overcome Treatment Resistance in Hormone-Insensitive Prostate Cancer Cells,» *Bioconjugate Chemistry,* vol. 23, nº 8, p. 1507–1512, 2012.

[83] V. Selvaraj y M. Alagar, «Analytical detection and biological assay of antileukemic drug 5-fluorouracil using gold nanoparticles as probe,» *International Journal of Pharmaceutics,* vol. 337, nº 1-2, pp. 275-281, 2007.

[84] A. Brioude, X. Jiang y M. Pileni, «Optical Properties of Gold Nanorods: DDA Simulations Supported by Experiments,» *The Journal of Physical Chemistry,* vol. 109, nº 27, pp. 13138-13142, 2005.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[85] A. Agarwal, M. A. Mackey, M. A. El-Sayed y R. V. Bellamkonda, «Remote Triggered Release of Doxorubicin in Tumors by Synergistic Application of Thermosensitive Liposomes and Gold Nanorods,» *ACS Nano,* vol. 5, nº 6, pp. 4919-4926, 2011.

[86] Y. Arthanari, A. Pluen, R. Rajendran, H. Aojula y C. Demonacos, «Delivery of therapeutic shRNA and by Tat fusion peptide targeting bcr–abl fusion gene in Chronic Myeloid Leukemia cells,» *Journal of Controlled Release,* vol. 145, pp. 272-280, 2010.

[87] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, A. E. Prigodich, P. C. Patel y C. A. Mirkin, «Gene Regulation with Polyvalent −Nanoparticle Conjugates,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 131, nº 6, pp. 2072-2073, 2009.

[88] J.-S. Lee, J. J. Green, K. T. Love, J. Sunshine, R. Langer y D. G. Anderson, «Gold, Poly(β-amino ester) Nanoparticles for Small Interfering RNA Delivery,» *Nano Letters,* vol. 9, nº 6, pp. 2403-2-2406, 2009.

[89] D. Cui, P. Huang, C. Zhang, C. S. Ozkan, B. Pan y P. Xu, «Dendrimer-modified gold nanorods as efficient controlled gene delivery system under near-infrared light irradiation,» *Journal of Controlled Release,* vol. 152, nº 1, pp. 137-139, 2011.

[90] A. O. E. K. a. A. L. Idir Mellal, «Thermal Therapy Modalities for Cancer Treatment: A Review and Future Perspectives,» *International Journal of Applied Science,* vol. 4, nº 2:14, pp. 1-11, 2017.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[91] S. Zhao, N. Hao, J. Zhang, P. Hoopes, F. Shubitidze y Z. Chen, «Fabrication of monodisperse magnetic nanorods for improving hyperthermia efficacy,» *Journal of Nanobiotechnology,* vol. 19, nº 63, 2021.

[92] H. Xiang, L. Zhao, L. Yu, H. Chen, C. Wei, Y. Chen y Y. Zhao, «Self-assembled organic nanomedicine enables ultrastable photo-to-heat converting theranostics in the second near-infrared biowindow,» *Nature Communications,* vol. 12, nº 1, 2021.

[93] N. S. Abadeer y C. J. Murphy, «Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles,» *The Journal of Physical Chemistry C,* vol. 120, nº 9, p. 4691–4716, 2016.

[94] X. Li, Y. Hou, X. Meng, G. Li, F. Xu, L. Teng, F. Sun y Y. Li, «Folate receptor-targeting mesoporous silica-coated gold nanorod nanoparticles for the synergistic photothermal therapy and chemotherapy of rheumatoid arthritis,» *RSC Advances,* vol. 11, nº 6, pp. 3567-3574, 2021.

[95] J. A. Kemp, M. S. Shim, C. Y. Heo y Y. J. Kwon, «"Combo" nanomedicine: Co-delivery of multi-modal therapeutics for efficient, targeted, and safe cancer therapy,» *Advanced Drug Delivery Reviews,* vol. 98, pp. 3-18, 2016.

[96] X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed y M. A. El-Sayed, «Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles,» *Lasers in Medical Science,* vol. 23, pp. 217-228, 2008.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[97] S. Link y M. A. El-Sayed, «Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals,» *International Reviews in Physical Chemistry,* vol. 19, nº 3, pp. 409-453, 2000.

[98] G. v. Maltzahn, A. Centrone, J.-H. Park, R. Ramanathan, M. J. Sailor, T. A. Hatton y S. N. Bhatia, «SERS-Coded Gold Nanorods as a Multifunctional Platform for Densely Multiplexed Near-Infrared Imaging and Photothermal Heating,» *Advanced Materials,* vol. 21, pp. 3175-3180, 2009.

[99] A. M. Gobin, M. H. Lee, N. J. Halas, W. D. James, R. A. Drezek y J. L. West, «Near-Infrared Resonant Nanoshells for Combined Optical Imaging and Photothermal Cancer Therapy,» *Nano Letter,* vol. 7, nº 7, pp. 1929-1934, 2007.

[100] Y. Cheng, A. Samia, J. Meyers, I. Panagopoulos, B. Fei y C. Burda, «Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 130, nº 32, pp. 10643-10647, 2008.

[101] J. Wang, X. Wu, P. Shen, J. Wang, Y. Shen, Y. Shen, T. Webster y J. Deng, «Applications of inorganic nanomaterials in photothermal therapy based on combinational cancer treatment,» *International Journal of Nanomedicine,* vol. 15, pp. 1903-1914, 2020.

[102] L. Al-Sagheer, A. Alshahrie y W. Mahmoud, «Facile approach for developing gold nanorods with various aspect ratios for an efficient photothermal treatment of cancer,» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* vol. 618, nº 126394, 2021.

USC UNIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[103] A. Baeza, D. Ruiz-Molina y M. Vallet-Regí, «Recent advances in porous nanoparticles for drug delivery in antitumoral applications: inorganic nanoparticles and nanoscale metal-organic frameworks,» *Expert Opinion on Drug Delivery,* vol. 14, nº 6, pp. 783-796, 2017.

[104] A. M. Ponce, Z. Vujaskovic, F. Yuan, D. Needham y M. W. Dewhirst, «Hyperthermia mediated liposomal drug delivery,» *International Journal of Hyperthermia,* vol. 22, nº 3, pp. 205-213, 2006.

[105] J. Narang, N. Malhotra, G. Singh y C. Pundir, «Electrochemical impediometric detection of anti-HIV drug taking gold nanorods as a sensing interface,» *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 66, pp. 332-337, 2015.

[106] C. J. Murphy, L. B. Thompson, A. M. Alkilany, P. N. Sisco, S. P. Boulos, S. T. Sivapalan, J. A. Yang, D. J. Chernak y J. Huang, «The Many Faces of Gold Nanorods,» *The Journal of Physical Chemistry Letters,* vol. 1, nº 19, pp. 2867-2875, 2010.

[107] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan y Q. Peng, «Photodynamic Therapy,» *Journal of the National Cancer Institute,* vol. 90, nº 12, pp. 889-905, 1998.

[108] R. Tong y D. Kohane, «Shedding light on nanomedicine.,» *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol,* vol. 4, nº 6, pp. 638-662, 2012.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[109] B. W. Stewart, M. LaPlant, S. Kim y C. Distler, «An in vitro Comparison of Laser Parameters for Photodynamic Therapy,» *LASER Optoelectronics in Medicine,* pp. 645-649.

[110] K. Weishaupt, C. Gomer y T. Dougherty, «Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor.,» *Cancer Res,* vol. 36, nº 7, pp. 2326-2329, 1976.

[111] M. Alatorre-Meda, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro y P. Taboada , «UV and Near-IR Triggered Release from Polymeric Micelles and Nanoparticles,» *Royal Society of Chemistry,* vol. 1, pp. 304-348, 2013.

[112] S. Link, M. Mohamed y M. El-Sayed, «Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant,» *Letter,* vol. 103, nº 16, pp. 3073-3077, 1999.

[113] R. Hu, K.-T. Yong, I. Roy, H. Ding, S. He y P. N. Prasad, «Metallic Nanostructures as Localized Plasmon Resonance Enhanced Scattering Probes for Multiplex Dark-Field Targeted Imaging of Cancer Cells,» *The Journal of Physical Chemistry,* vol. 113, nº 7, pp. 2676-2684, 2009.

[114] K. Seok Lee y M. A. El-Sayed, «Dependence of the Enhanced Optical Scattering Efficiency Relative to That of Absorption for Gold Metal Nanorods on Aspect Ratio, Size, End-Cap Shape, and Medium Refractive Index,» *The Journal of Physical Chemistry,* vol. 109, nº 43, pp. 20331-20338, 2005.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[115] N. N. W. L. Y. C. P. H. Q. M. &. Q. Y. J. F. Huang, «Oxidation behaviour of hydrothermal modified carbon/carbon composites,» *Materials Research Innovations,* vol. 14, nº 2, pp. 150-153, 2010.

[116] L. d. l. C. M. A.-S. A. D. J.-L. P.-M. P. Billot L., «Surface enhanced Raman scattering on gold nanowire arrays: Evidence of strong multipolar surface plasmon resonance enhancement,» *Chemical Physics Letters,* vol. 422, nº 4-6, pp. 303-307, 2006.

[117] L. Billot, M. Lamy de la Chapelle, A.-S. Grimault, A. Vial, D. Barchiesi, J.-L. Bijeon, p.-M. Adam y P. Royer, «Surface enhanced Raman scattering on gold nanowire arrays: Evidence of strong multipolar surface plasmon resonance enhancement,» *Chemical Physics Letters,* vol. 422, nº 4-6, pp. 303-307, 2006.

[118] B. Nikoobakht y M. A. El-Sayed, «Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method,» *Chemistry of Materials,* vol. 15, nº 10, pp. 1957-1962, 2003.

[119] A. Gole y C. J. Murphy, «Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods: Role of the Size and Nature of the Seed,» *Chemistry of Materials,* vol. 16, nº 19, pp. 3633-3640, 2004.

[120] N. Jana, L. Gearheart y C. Murphy, «Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template,» *Advanced Materials,* vol. 13, nº 18, pp. 1389-1393, 2001.

[121] L. Scarabelli, A. Sanchez-Iglesias, J. Perez-Juste y L. M. Liz-Marzán, «A "Tips and Tricks" Practical Guide to the Synthesis of Gold

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nanorods,» *The Journal of Physical Chemistry Letters,* vol. 6, pp. 4270-4279, 2015.

[122] L. Scarabelli, M. Grzelczak y L. M. Liz-Marzán, «Tuning Gold Nanorod Synthesis through Prereduction with Salicylic Acid,» *cm Chemistry of Materials,* vol. 25, nº 21, pp. 4232-4238, 2013.

[123] J. Rodríguez-Fernández, J. Pérez-Juste, P. Mulvaney y L. M. Liz-Marzán, «Spatially-Directed Oxidation of Gold Nanoparticles by Au(III)−CTAB Complexes,» *Letter,* vol. 109, nº 30, pp. 14257-14261, 2005.

[124] N. R. Jana, L. Gearheart y C. J. Murphy, «Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods,» *The Journal of Physical Chemistry,* vol. 105, pp. 4065-4067, 2001.

[125] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán y P. Mulvaney, «Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications,» *Coordination Chemistry Reviews,* vol. 249, nº 18, pp. 1870-1901, 2005.

[126] N. R. Jana, L. Gearheart y C. J. Murphy, «Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods,» *The Journal of Physical Chemistry B,* vol. 105, nº 19, pp. 4065-4067, 2001.

[127] H.-Y. Wu, W.-L. Huang y M. H. Huang, «Direct High-Yield Synthesis of High Aspect Ratio Gold Nanorods,» *Crystal Growth & Design,* vol. 7, nº 4, pp. 831-835, 2007.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[128] C. J. Orendorff y C. J. Murphy, «Quantitation of Metal Content in the Silver-Assisted Growth of Gold Nanorods,» *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 110, nº 9, pp. 3990-3994, 2006.

[129] N. D. Burrows, S. Harvey, F. A. Idesis y C. J. Murphy, «Understanding the Seed-Mediated Growth of Gold Nanorods through a Fractional Factorial Design of Experiments,» *Langmuir*, vol. 33, nº 8, pp. 1891-1907, 2017.

[130] H.-Y. Wu, W.-L. Huang y M. Huang, «Direct high-yield synthesis of high aspect ratio gold nanorods,» *Crystal Growth and Design*, vol. 7, nº 4, pp. 831-835, 2007.

[131] C. G. Wilson, P. N. Sisco, F. A. Gadala-Maria, C. J. Murphy y E. C. Goldsmith, «Polyelectrolyte-coated gold nanorods and their interactions with type I collagen,» *Biomaterials*, vol. 30, nº 29, pp. 5639-5648, 2009.

[132] F. Ren, S. Bhana, D. D. Norman, J. Johnson, L. Xu, D. L. Baker, A. L. Parrill y X. Huang, «Gold nanorods carrying paclitaxel for photothermal-chemotherapy of cancer,» *Bioconjugate Chemistry*, vol. 24, nº 3, pp. 376-386, 2013.

[133] X. Cheng, Y. Darong, M. Lin, L. Qiuhong, Z. Haizhen y W. Taihong, «Targeting chemophotothermal therapy of hepatoma by gold nanorods/graphene oxide core/shell nanocomposites,» *Applied Materials and Interfaces*, vol. 24, nº 5, pp. 12911-12920, 2013.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[134] L. Vigderman, B. P. Khanal y E. R. Zubarev, «Functional Gold Nanorods: Synthesis, Self-Assembly, and Sensing Applications,» *Advanced Materials,* vol. 24, pp. 4811-4841, 2012.

[135] J. Love, L. Estroff, J. Kriebel , R. Nuzzo y G. Whitesides, «Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology,» *Chemical Reviews,* vol. 105, nº 4, pp. 1103-1169, 2005.

[136] H. N. T. K. T. Takahashi, «Surface modification of gold nanorods using layer-by-layer technique for cellular uptake,» *Journal of Nanoparticle Research,* vol. 10, pp. 221-228, 2008.

[137] G. Decher, «Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites,» *Science,* vol. 277, pp. 1232-1237, 1997.

[138] F. Caruso, «Nanoengineering of Particle Surfaces,» *Advanced Materials,* vol. 13, nº 1, pp. 11-22, 2001.

[139] S. Obare, N. Jana y C. Murphy, «Preparation of Polystyrene- and Silica-Coated Gold Nanorods and Their Use as Templates for the Synthesis of Hollow Nanotubes,» *Nano Letters,* vol. 1, nº 11, pp. 601-603, 2001.

[140] S. Gómez-Graña, F. Hubert , F. Testard, A. Guerrero-Martínez, I. Grillo, L. M. Liz-Marzán y O. Spalla, «Surfactant (Bi) Layers on Nanorods Gold,» *Langmuir,* vol. 28, nº 2, pp. 1453-1459, 2012.

[141] A. G. A. A. A. S. D. G. &. S. G. B. Skirtach, «Remote activation of capsules containing Ag nanoparticles and IR dye by laser light.,»

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, vol. 20, nº 17, p. 6988–6992, 2004.

[142] P. N. Prasad, Introduction to Nanomedicine and Nanobioengineering, NJ: Wiley: Hoboken, 2012.

[143] T. V. Truong, W. Supatto, D. S. Koos, J. M. Choi y S. Fraser, «Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy,» *Nature Methods,* vol. 8, pp. 757-760, 2011.

[144] C. Wang, H. Tao, L. Cheng y Z. Liu, «Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles,» *Biomaterials,* vol. 32, nº 26, pp. 6145-6154, 2011.

[145] C.-J. C. B. D. G. a. N. R. B. John-Christopher Boyer, «Two-Way Photoswitching Using One Type of Near-Infrared Light, Upconverting Nanoparticles, and Changing Only the Light Intensity,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 132, nº 44, pp. 15766-15772, 2010.

[146] K. Zheng, K. Y. Loh, Y. Wang, Q. Chen, J. Fan, T. Jung, S. Hwan, Y. D. Suh y X. Liu, «Recent advances in upconversion nanocrystals: Expanding the kaleidoscopic toolbox for emerging applications,» *NanoToday,* vol. 29, p. 100797, 2019.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[147] S. L. C. Y. P. &. L. J. Gai, «Recent progress in rare earth micro/nanocrystals: soft chemical synthesis, luminescent properties, and biomedical applications,» *Chemical reviews,* vol. 114, nº 4, pp. 2343-2389, 2014.

[148] F. Auzel, «Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids,» *Chemical Reviews,* vol. 104, nº 1, pp. 139-174, 2004.

[149] F. Auzel, «Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids,» *Chemical Reviews,* vol. 104, nº 1, pp. 139-174, 2004.

[150] D. R. G. a. H. U. Güdel, «Design of Luminescent Inorganic Materials: New Photophysical Processes Studied by Optical Spectroscopy,» *Accounts of Chemical Research,* vol. 33, nº 4, pp. 235-242, 2000.

[151] M. Wang, G. Abbineni, A. Clevenger, C. Mao y S. Xu, «Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications,» *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine,* vol. 7, nº 6, pp. 710-729, 2011.

[152] Y.-W. Z. L.-D. S. a. C.-H. Y. Hao-Xin Mai, «Highly Efficient Multicolor Up-Conversion Emissions and Their Mechanisms of Monodisperse NaYF4:Yb,Er Core and Core/Shell-Structured Nanocrystals,» *The Journal of Physical Chemistry C,* vol. 111, nº 37, pp. 13721-13729, 2007.

[153] T. R. T. &. K. K. Soukka, «Photon upconversion in homogeneous fluorescence-based bioanalytical assays.,» *Annals of the New York Academy of Sciences,* vol. 1130, p. 188–200, 2008.

[154] F. &. L. X. Wang, «ecent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals.,» *Chemical Society reviews,* vol. 38, nº 4, pp. 976-989, 2009.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[155] K. K.-U. G. H. S. Heer, «Highly Efficient Multicolour Upconversion Emission in Transparent Colloids of Lanthanide-Doped NaYF4 Nanocrystals,» *Advanced Materials,* vol. 16, nº 23-24, pp. 2102-2105, 2004.

[156] S. Wilhelm, M. Kasier, C. Würth, J. Heiland, C. Carrillo-Carrion, V. Muhr, O. S. Wolfbeis, W. J. Parak, U. Resch-Genger y T. Hirsch, «Water dispersible upconverting nanoparticles: effects of surface modification on their luminescence and colloidal stability,» *Nanoscale,* vol. 7, pp. 1403-1410, 2015.

[157] F. Wang y X. Liu, «Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals,» *Chemical Society Reviews,* vol. 38, pp. 976-989, 2009.

[158] J. C. C. L. A. &. C. J. A. Boyer, «Synthesis of colloidal upconverting NaYF4: Er3+/Yb3+ and Tm3+/Yb3+ monodisperse nanocrystals.,» *Nano letters,* vol. 7, nº 3, pp. 847-852, 2007.

[159] A. Yin, Y. Zhang, L. Sun y C. Yan, «Colloidal synthesis and blue based multicolor upconversion emissions of size and composition controlled monodisperse hexagonal NaYF4[thin space (1/6-em)]:[thin space (1/6-em)]Yb,Tm nanocrystals,» *Nanoscale,* vol. 2, pp. 953-959, 2010.

[160] F. Zhang, «Upconversion Luminescence of Lanthanide Ion-Doped Nanocrystals,» *Photon Upconversion Nanomaterials,* pp. 73-119, 2014.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[161] X. Li, F. Zhang y D. Zhao, «Lab on upconversion nanoparticles: optical properties and applications engineering via designed nanostructure,» *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, pp. 1346-1378, 2015.

[162] M. Lin, Y. Zhao, S. Wang, M. Liu, Z. Duan, Y. Chen, F. Li, F. Xu y T. Lu, «Recent advances in synthesis and surface modification of lanthanide-doped upconversion nanoparticles for biomedical applications,» *Biotechnology Advances,* vol. 30, nº 6, pp. 1551-1561, 2012.

[163] M. Haase y H. Schäfer, «Upconverting Nanoparticles,» *Angewandte International Edition Chemie,* vol. 50, nº 26, pp. 5808-5829, 2011.

[164] X. Zhu, J. Zhang y Y. Zhang, «Recent Progress of Rare-Earth Doped Upconversion Nanoparticles: Synthesis, Optimization, and Applications,» *Advanced Science,* vol. 6, nº 22, p. 1901358, 2019.

[165] J. S. Chivian, W. E. Case y D. D. Eden, «The photon avalanche: A new phenomenon in Pr3+-based infrared quantum counters,» *Appl. Phys. Lett.*, vol. 35, nº 124, 1979.

[166] G. Q. H. P. P. N. &. C. X. Chen, «Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics.,» *Chemical reviews,* vol. 114, nº 10, p. 5161–5214, 2014.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[167] J. Shan y Y. Ju, «A single-step synthesis and the kinetic mechanism for monodisperse and hexagonal-phase NaYF4:Yb, Er

upconversion nanophosphors,» *Nanotechnology,* vol. 20, p. 275603, 2009.

[168] f. Wang y X. Liu, «Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals,» *Chem. Soc. Rev.,* vol. 38, pp. 976-989, 2009.

[169] H. Du, W. Zhang y J. Sun, «Structure and upconversion luminescence properties of BaYF5:Yb3+, Er3+ nanoparticles prepared by different methods,» *Journal of Alloys and Compounds,* vol. 509, nº 7, pp. 3413-3418, 2011.

[170] F. Wang, D. K. Chatterjee, Z. Li, Y. Zhang, X. Fan y M. Wang, «Synthesis of polyethylenimine/NaYF4 nanoparticles with upconversion fluorescence,» *Nanotechnology,* vol. 17, p. 5786, 2006.

[171] H. L. S. Z. Y. G. W. Y. D. C. a. L.-H. G. Guangshun Yi, «Synthesis, Characterization, and Biological Application of Size-Controlled Nanocrystalline NaYF4:Yb,Er Infrared-to-Visible Up-Conversion Phosphors,» *Nano Letters,* vol. 4, nº 11, pp. 2191-2196, 2004.

[172] F. H. Y. L. C. e. a. Wang, «Simultaneous phase and size control of upconversion nanocrystals through lanthanide doping,» *Nature,* vol. 463, pp. 1061-1065, 2010.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[173] X. S. R. S. L.-P. Y. a. C.-H. Y. Ya-Wen Zhang, «Single-Crystalline and Monodisperse LaF3 Triangular Nanoplates from a Single-Source Precursor,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 127, nº 10, pp. 3260-3261, 2005.

[174] J. M. Y. W. K. J. Y. Y. C. D. e. a. X. Liu, «Ionothermal synthesis of hexagonal-phase NaYF4:Yb3+,Er3+/Tm3+ upconversion nanophosphors,» *Chem Commun,* vol. 43, pp. 6628-6630, 2009.

[175] F. V. L. C. J. C. J.C. Boyer, «Synthesis of colloidal upconverting NaYF4 nanocrystals doped with Er3+, Yb3+ and Tm3+, Yb3+ via thermal decomposition of lanthanide trifluoroacetate precursors,» *J Am Chem Soc,* vol. 128, pp. 7444-7445, 2006.

[176] R. N. F. V. J. C. V. Mahalingam, «Sensitized Ce3+ and Gd3+ ultraviolet emissions by Tm3+ in colloidal LiYF4 nanocrystals,» *Chem Eur J,* vol. 15, pp. 9660-9663, 2009.

[177] H. X. Z. Y. W. S. R. Y. Z. G. S. L. D. Y. L. P. &. Y. C. H. Mai, «High-quality sodium rare-earth fluoride nanocrystals: controlled synthesis and optical properties.,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 128, nº 19, pp. 6426-6436, 2006.

[178] Y.-W. Z. R. S. Z.-G. Y. L.-d. S. L.-P. Y. a. C.-H. Y. Hao-Xin Mai, «High-Quality Sodium Rare-Earth Fluoride Nanocrystals: Controlled Synthesis and Optical Properties,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 128, nº 19, pp. 6426-6436, 2006.

[179] J. Shen, L. Zhao y G. Han, «Lanthanide-doped upconverting luminescent nanoparticle platforms for optical imaging-guided drug delivery and therapy,» *Advanced Drug Delivery Reviews,* vol. 65, nº 5, pp. 744-755, 2013.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[180] C. F. R. K. P. P. A. Patra, «Upconversion in Er3+:ZrO2 nanocrystals,» *J Phys Chem B,* vol. 106, pp. 1909-1912, 2002.

[181] D. Y. C. L. D. K. P. Y. Z. C. Z.W. Quan, «Multicolor tuning of manganese-doped ZnS colloidal nanocrystals,» *Langmuir,* vol. 25, pp. 10259-10262, 2009.

[182] M. A. G. C. A. M. C. &. X. S. Wang, «Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications.,» *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine,* vol. 7, nº 6, pp. 710-729, 2011.

[183] S. W. S. Z. J. L. L. L. W.B. Niu, «Multicolor output and shape controlled synthesis of lanthanide-ion doped fluorides upconversion nanoparticles,» *Dalton Trans,* vol. 40, pp. 3305-3314, 2011.

[184] D. Z. D. Z. K. Z. C. H. F. S. X.H. Chuai, «Synthesis and characterization of Yb3+,Tm3+:Ba2YF7 nanocrystalline with efficient upconversion fluorescence,» *Mater Lett,* vol. 65, pp. 2368-2370, 2011.

[185] W. Z. J. S. H.Y. Du, «Structure and upconversion luminescence properties of BaYF5:Yb3+,Er3+ nanoparticles prepared by different methods,» *J Alloys Compd,* vol. 509, pp. 3413-3418, 2011.

[186] Z. Q. P. Y. J. Y. H. L. J. L. C.X. Li, «Shape controllable synthesis and upconversion properties of NaYbF4/NaYbF4:Er3+ and YbF3/YbF3:Er3+ microstructures,» *J Mater Chem,* vol. 18, pp. 1353-1361, 2008.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[187] H. S. &. Z. Y. Qian, «Synthesis of hexagonal-phase core-shell NaYF4 nanocrystals with tunable upconversion fluorescence.,» *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids,* vol. 24, nº 21, pp. 12123-12125, 2008.

[188] Z. Li y Y. Zhang, «Monodisperse Silica-Coated Polyvinylpyrrolidone/NaYF4 Nanocrystals with Multicolor Upconversion Fluorescence Emission,» *Angewandte Chemie,* vol. 45, pp. 7732-7735, 2006.

[189] C. T. F. V. V. M.-A. a. M. D. C. Luccardini, «Size, Charge, and Interactions with Giant Lipid Vesicles of Quantum Dots Coated with an Amphiphilic Macromolecule,» *Langmuir,* vol. 22, nº 5, pp. 2304-2310, 2006.

[190] Y. Z. D. J. v. d. H. H. C. G. D. P. C. R. K. M. M. v. S. J. A. P. E. A. F. Z. A. F. C. d. M. D. A. M. a. W. J. M. M. Torjus Skajaa, «Quantum Dot and Cy5.5 Labeled Nanoparticles to Investigate Lipoprotein Biointeractions via Förster Resonance Energy Transfer,» *Nano Letters,* vol. 10, nº 12, pp. 5131-5138, 2010.

[191] H. O. a. R. B. Zhivko Zhelev, «Single Quantum Dot-Micelles Coated with Silica Shell as Potentially Non-Cytotoxic Fluorescent Cell Tracers,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 128, nº 19, pp. 6324-6325, 2006.

[192] K. Susumu, H. T. Uyeda, I. L. Medintz y H. Mattoussi, «Design of Biotin-Functionalized Luminescent Quantum Dots,» *Biomedical Applications of Colloidal Nanocrystals,* p. 090651, 2007.

USC UNIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[193] H. C. H. H. M. Y. F. L. Q. Z. Z. Z. T. Y. a. C. H. Zhigang Chen, «Versatile Synthesis Strategy for Carboxylic Acid−functionalized Upconverting Nanophosphors as Biological Labels,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, nº 10, pp. 3023-3029, 2008.

[194] S. L. L. Z. Q. Y. S. L. Liu Tao, «Rare-Earth Upconversion Nanophosphors,» *Progress in Chemistry*, vol. 24, nº 2-3, 2011.

[195] C. C. L. &. L. Z. Wang, «Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy.,» *Biomaterials*, vol. 32, nº 4, pp. 1110-1120, 2011.

[196] F. Z. H. L. S. V. T. R. A. K. N. R. S. &. T. H. J. van De Rijke, «Up-converting phosphor reporters for nucleic acid microarrays.,» *Nature biotechnology*, vol. 19, nº 3, pp. 273-276, 2001.

[197] J. Liao, Z. Yang, S. Lai y Y. Yang, «Upconversion Emission Enhancement of NaYF 4 :Yb,Er Nanoparticles by Coupling Silver Nanoparticle Plasmons and Photonic Crystal Effects,» *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 118, nº 31, pp. 17992-17999, 2014.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.13 OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el diseño, caracterización y evaluación de sistemas inorgánicos para el tratamiento y/o diagnóstico del cáncer todos ellos con propiedades optoelectrónicas adecuadas para trabajar en la *ventana biológica*. De este modo, el presente trabajo se divide en dos partes bien diferenciadas. En la primera (Capítulos 3, 4 y 5), los nanoplataformas tienen como fundamento nanopartículas de oro con forma de cilindro y la segunda (Capítulo 6) en la que se proponen nanopartículas sobreconversoras dopadas con iones lantánidos.

En concreto, la primera parte de esta Tesis Doctoral se centrará en la síntesis y caracterización de tres nanosistemas híbridos basados en nanocilindros de oro (AuNRs) que pudieran ser utilizados de manera simultánea en terapia química, génica, fototérmica plasmónica (PPTT) y/o fotodinámica (PDT). Para ello los objetivos parciales de este trabajo de investigación son:

1. Síntesis y caracterización de nanoplataformas basadas en AuNRs biocompatibles con direccionamiento específico hacia receptores sobreexpresados en células cancerígenas a través de una estrategia de funcionalización de la superficie de estas Nps mediante el uso de polielectrolitos biocompatibles (poli (sulfonato de estireno) (PSS), poli(lisina) (PLL) y ácido hialurónico (HA)) por la técnica de capa por capa (LbL). En concreto, las nanoplataformas propuestas presentan los agentes bioactivos doxorrubicina (DOXO), indocianina verde (ICG) y/o SiRNA dando lugar a las siguientes nanoplataforma: AuNRs/PSS/DOXO/HA, AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA y AuNR/PSS/DOXO/PLL@ICG/SiRNA/HA.
2. Estudio de las estabilidades de las nanoplataformas en diferentes medios acuosos de diferente pH, en medio de cultivo celular suplementado con proteínas séricas y en presencia de enzimas.
3. Estudio de la internalización celular de las nanoplataformas en dos líneas celulares, una de cáncer cervical, HeLa, con receptores sobreexpresados

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CD44 afines al HA y otros fibroblastos de ratón, 3T3 Balb, sin la presencia de estos receptores.

4. Estudio de la citotoxicidad de estas nanoplataformas a través del control sobre los mecanismos de activación que permiten regular los perfiles de liberación de los diferentes agentes bioactivos en ausencia y presencia de estímulos internos (acción enzimáticos) y externos (irradiación NIR).
5. Estudio y comparación del efecto terapéutico individual y combinado evaluando el mecanismo de muerte celular de las terapias química, génica, PPTT (por las propias propiedades ópticas de las nanopartículas de oro) y/o PDT (por ICG) en las líneas celulares HeLa y 3T3 Balb.

En la segunda parte de la Tesis Doctoral, se desarrollará una nanoplataforma nanoscópica biocompatibles multifuncional para su uso como agente de contraste para diagnóstico por imagen óptica basada en las propiedades luminiscentes de las UpCvs, obtenida por un proceso descomposición térmica asistida por metanol. En concreto, los objetivos parciales en esta parte son:

1. Síntesis y caracterización de nanopartículas sobreconversoras matrices cerámicas con estructura cristalina hexagonal de $NaYF_4$/ $NaGdF_4$ dopadas con diferentes razones entre iones lantánidos Iterbio (Yb), Erbio (Er), Tulio (Tm) y/o Neodimio (Nd).
2. Estudio de la estabilidad, propiedades ópticas, integridad y solubilidad en medio acuoso (disolución tampón borato, PSF, DMEN y DMEN+FBS) de las nanopartículas UpCvs a través de su modificación superficial con diferentes agentes estabilización como el ácido dimercaptosucínico, DMSA, polietileno glicol, PEG, 2-aminoetil dihidrógeno fosfato, AET y poli (isobutileno-alt-maleico anhidro), PMA.
3. Estudio de la biocompatibilidad, internalización y excreción celular de las nanopartículas UpCvs con las diferentes modificaciones superficiales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 2

"Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos"

Marie Curie

MATERIALES, MÉTODOS Y CARACTERIZACIÓN

2.a NANOCILINDROS DE ORO

2.1 MATERIALES PARA EL PROCESO SINTÉTICO Y DE CARACTERIZACIÓN

Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) grado biológico, ácido tetracloroaúrico (HAuCl4·3H2O), nitrato de plata (AgNO3), borohidruro de sodio (NaBH4), ácido ascórbico (AA) (C6H8O6), poli (sodio-4-styrenesulfonato) (PSS) de peso molecular (Mw) ≈ 70000 g/mol, bromohidrato de poli-L-lisina (PLL) de Mw ≈ 22000 g/mol, ácido hialurónico (HA) de Mw ≈ Mw=80000-100000 kDa, 1,3-diphenilisibenzofurano (DBIPF), BLOCK-iT™ fluorescente (un oligómero de siRNA marcado con fluoresceína, FTIC, con la misma longitud, carga eléctrica y estructura que el siRNA estándar) (1 mM), todos suministrados por Sigma Aldrich. Ester Sulfo-NHS verde de indocianina (ICG) de Flamma® Fluors, clorhidrato de doxorrubicina (C27H29NO11-HCl) de Mw = 579.98 g/mol de MCE MedChemExpress, La secuencia de siRNA usada para configurar la nanoplataforma completa AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA fue: PD-L1 siRNA: (codificante GACUCAAGAUGGAACCUGA; anticodificante: UCAGGUUCCAUCUUGAGUC), Control siRNA: (codificante TTCTCCGAACGTGTCACGT; anticodificante: ACGTGACACGTTCGGAGAA). Ambos siRNA fueron suministrados por Sigma-Aldrich. verde indocianina (ICG) de MP Biomedicals LLC. Agua MiliQ y agua libre de RNA de Fisher bioreagents y etanol absoluto de Scharlau. Los Reactivos y disolventes fueron de grado analítico.

2.2 MATERIALES PARA LOS ESTUDIOS BIOLÓGICOS

Los estudios celulares se realizaron en fibroblastos de embrión de ratón (3T3 Balb), y las células de cáncer cérvico-uterino HeLa suministradas por Sigma Aldrich. El suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, la tripsina al 0.25% con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el PBS pH 7.4 (10X) fueron suministrados por Hyclone (ThermoScientific, USA). El medio de cultivo celular estaba compuesto por DMEM suplementado con 10% FBS, 0.1 mM aminoácidos no esenciales (NEAA), 2 mM L-Glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y un 1% de penicilina estreptomicina todas suministradas por ThermoScientific. Colorantes celulares DAPI con (antifade Pro-Long Gold) y kit de Anexina V & Muerte celular, de Invitrogen, el kit de ROS BOCkit (DCFH-DA) suministrado por Bio QuiChem y el kit CCK-8 por Gerbu Biotechnik GmbH (Alemania). Los reactivos y disolventes fueron de grado analítico.

2.3 MÉTODOS SINTÉTICOS

2.3.1 Síntesis de la nanoplataforma inorgánica: nanocilindros de oro (AuNRs)

Los AuNRs se sintetizaron utilizando el método de crecimiento mediado por semillas [1] y que se esquematiza en la **Figura 2.1**.

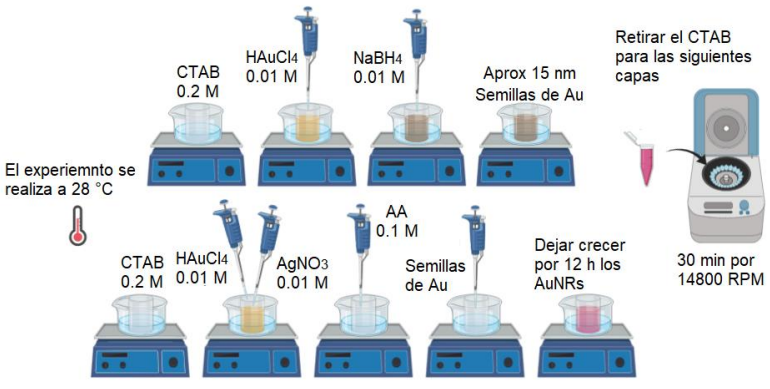


Figura 2.1 Ilustración del mecanismo de obtención de AuNRs por crecimiento de semilla, obteniendo en primera instancia las semillas de Au. Las semillas de Au en cristales se inyectan en la disolución de crecimiento, dando así el paso a la formación de nanocilindros de oro.

Primero, se obtuvieron semillas de oro recubiertas con CTAB. Para ello, se preparó una disolución de CTAB de 7.5 mL a 0.2 M que se mezcló suavemente con 250 µL de $HAuCl_4$ 0.01 M en un baño de agua a 28 °C. A continuación, se preparó una disolución de $NaBH_4$ 0.01 M en agua helada. Esta disolución se dejó reposar durante 2-3 minutos para asegurar una buena dispersión del agente reductor (ver **Figura 2.2**).

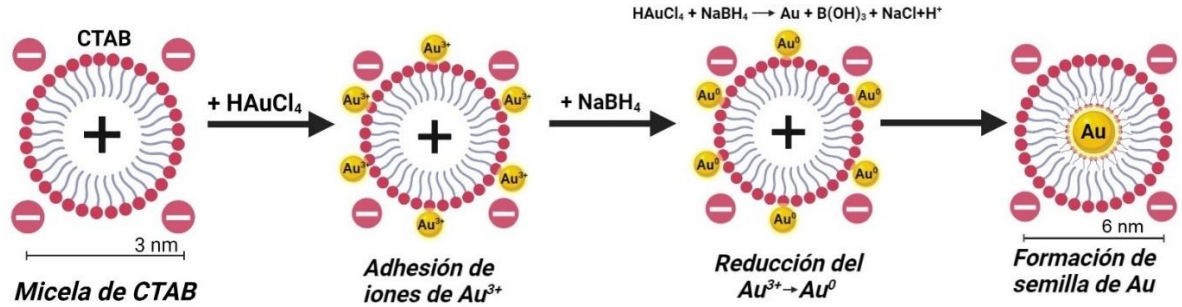


Figura 2.2 Modelo propuesto para la formación de las semillas.

Después, a la disolución de Au-CTAB se añadieron 600 µL de la disolución de $NaBH_4$, adquiriendo la disolución resultante un color amarillo-café. Esta se mezcló suavemente a mano durante 2 minutos y, luego, se dejó sin agitación en el baño de agua a 28 °C durante 1 hora para permitir la descomposición del exceso de borohidruro de sodio. Para sintetizar los AuNRs se añadieron 850 µL 0.01 M a 20 mL de CTAB a 0.2 M en un baño de agua a 28 °C.

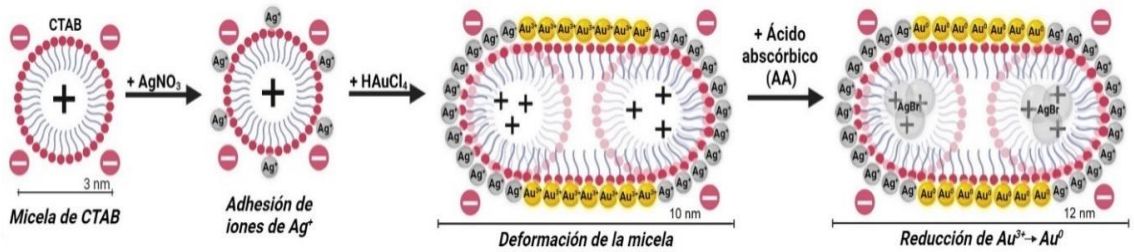


Figura 2.3 Modelo propuesto para la obtención de AuNRs.

La disolución se volvió amarillo brillante a medida que se agitaba manualmente de manera ligera A continuación, se preparó una disolución de $AgNO_3$ a 0.01 M en la oscuridad, y se añadieron 246 µL de esta a la disolución de crecimiento de Au bajo agitación a 500 rpm. A continuación, se añadieron 136 µL de una disolución de ácido ascórbico (AA) a 0.1 M bajo agitación a 500 rpm durante 4 min (ver **Figura 2.3**), dando lugar a una disolución incolora a la que

posteriormente se añadieron 220 µL de la disolución de semillas de Au bajo agitación durante 2 min más.

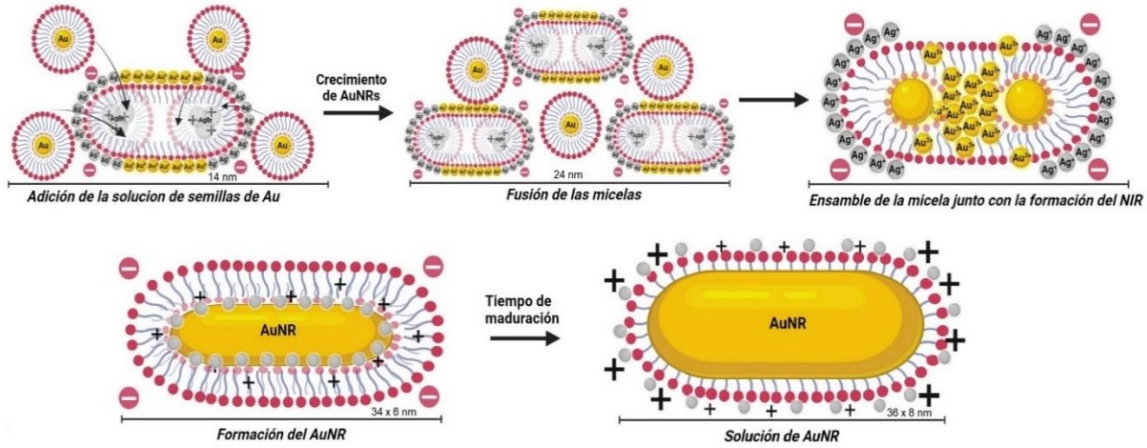


Figura 2.4 Modelo propuesto para la obtención de AuNRs.

La disolución resultante se dejó en un baño de agua durante 12 h a 28° C, adquiriendo un color rosa rojizo (ver **Figura 2.4**). Los AuNRs formados se centrifugaron al menos dos veces (14800 rpm) a 28 °C por 30 min. En un primer lavado se retira el exceso de CTAB, posteriormente se añade H_2O MiliQ y se vuelven a centrifugar, retirando el sobrenadante, quedando solamente el pellet. Se agregan 2 mL de H_2O MQ en cada eppendorft y se juntan para llegar a un volumen final de 20 mL. Los espectros de absorción UV-visible de las AuNR obtenidos se midieron usando un espectrofotómetro UV-Vis Cary Bio 100 (Varian, USA).

2.3.2 Funcionalización de los AuNRs con polielectrolitos

La funcionalización de los AuNRs con polielectrolitos, PE, se realizó usando la metodología capa por capa (LbL), en la que se añadieron las capas PE en el orden necesario en función de la carga: PSS (aniónico), PLL (catiónico) y HA (aniónico) para obtener AuNRs/PSS/PLL/HA tal y como muestra la **Figura 2.5**, cabe mencionar que la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

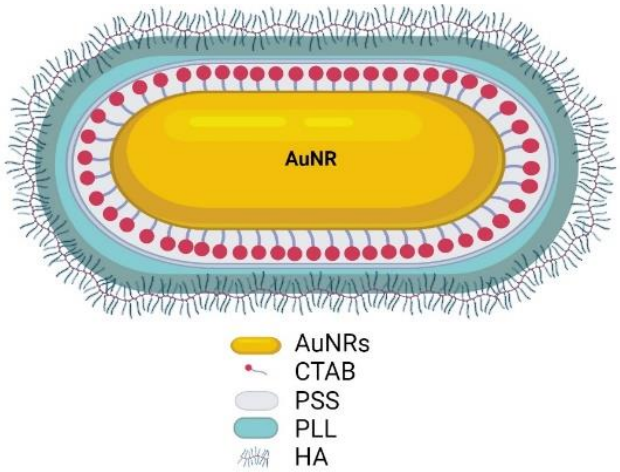


Figura 2.5 Representación esquemática de los AuNRs recubiertos con PSS/PLL/HA.

Para el recubrimiento de PSS, se preparó una disolución de PSS (10 mg/mL) en NaCl (12 mM, 100 mL). Cuando el PE se disolvió por completo, se mezcló 1 mL de esta disolución de PE con 1 mL de disolución de NaCl (12 mM), y la mezcla resultante se agitó a 500 rpm. Posteriormente, se añadió 1 mL de la disolución de AuNRs/CTAB (densidad óptica, OD≈1) gota a gota mientras se agitaba. Después de 1 h de adsorción, la mezcla se centrifugó dos veces a 14800 rpm durante 20 minutos y se resuspendió en 1 mL de agua MilliQ. Para obtener la capa de PLL se añadieron 100 µL de una disolución de PLL (5 mg/mL) a 1 mL de H_2O MiliQ y se agitó durante 5 minutos a 500 rpm. Posteriormente, se añadieron gota a gota 1 mL de AuNRs recubiertos con PSS. Después de 1 h, la disolución mixta se centrifugó una vez a 14800 rpm durante 20 min y se redispersó en 1 mL de agua MilliQ. Finalmente, la deposición de la capa final de HA se realizó preparando 60 µL de una disolución concentrada de HA (1 mg/mL), que se mezcló con 1 mL de agua MilliQ y se agitó a 500 rpm durante 5-10 min. Los AuNRs obtenidos recubiertos con PSS/PLL se añadieron gota a gota a la solución en agitación de HA. Después de 20 min, el nanosistema de AuNRs/PSS/PLL/HA se centrifugaron a 10000 rpm durante 7 minutos y se dispersaron en 1 mL de agua desionizada MilliQ.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.3.3 Funcionalización de AuNRs con polielectrolitos y DOXO

La funcionalización superficial de los AuNRs con los PE y DOXO se realizó mediante el método de capa por capa siguiendo el orden que se puede

observar en la **Figura 2.6**. El recubrimiento con la capa PSS se realizó según el protocolo previamente comentado.

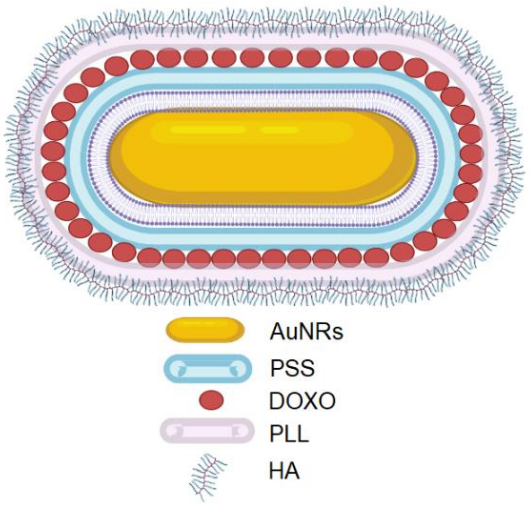


Figura 2.6 Representación esquemática de los AuNRs recubiertos con PSS/DOXO/PLL/HA.

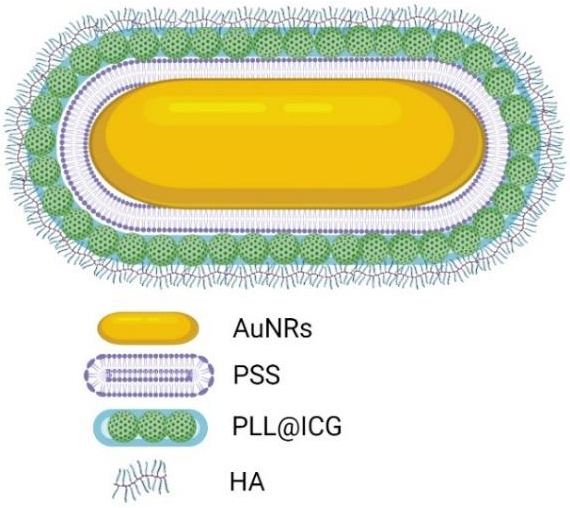
Para que la nanoplataforma pueda usarse para terapia química se añadió en la siguiente capa el fármaco partiendo de una disolución stock de DOXO (1 mM) en donde se busca encapsular 100 µg por lo que se preparó una solución con una concentración de 1 mM, agregando en una disolución tampón de KOH a pH 4.1 con un volumen de 700 µL por 1 mL de AuNRs/PSS. Se mantiene una agitación a 500 rpm durante 60 minutos.

La mezcla se centrifugó una vez a 13000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 mL de H_2O MQ. Como los AuNRs/PSS/DOXO tienen todavía una carga superficial negativa, el siguiente paso consistió en añadir una capa de PLL para que la plataforma adquiera una ligera carga positiva al mismo tiempo que se posibilite una dosificación del fármaco por medio de degradación enzimática y finalmente se añadió la capa de HA para dotar a la nanoplataforma de direccionamiento. Estos dos últimos procesos se realizaron siguiendo el protocolo mencionado al inicio de esta Sección.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.3.4 Funcionalización de AuNRs con polielectrolitos e ICG

La funcionalización superficial de los AuNRs con los PE e ICG se realizó mediante el método de capa por capa siguiendo el orden que se puede observar en la **Figura 2.7.** El recubrimiento con la capa PSS se realizó según el protocolo previamente comentado. En la siguiente capa se agregó la capa catiónica PLL@ICG sobre la de PSS. Para ello, previamente se hizo la conjugación PLL@ICG por la química carbodiimida. Se preparó una disolución madre de ICG-Sulfo-NHS éster (0.02 mg de ICG, obteniendo una concentración de 0.05 mg/mL en H_2O MQ). 1 mL de esta disolución madre de ICG (0.05 mg/mL) se añadió a un volumen de 0.25 mL de la disolución de PLL (5 mg/mL) y 1.25 mL de H_2O MQ agitándose la mezcla a 500 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad, obteniéndose el complejo PLL@ICG. Para eliminar la ICG no unida, la mezcla se dializó frente a agua con una membrana de diálisis de peso molecular 3500 Da durante 24 h. Posterior a esto, se añadieron gota a gota los AuNRs con la capa de PSS con una concentración de $1x10^{11}$AuNRs/mL, dejando la reacción protegida de la luz con una agitación de 500 rpm un tiempo de 1 h. Después de la adsorción de esta capa, los AuNRs recubiertos se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 min y se añadieron 10 mL de H_2OMiliQ. Finalmente, se añadió la capa de HA tal y como se describió en la metodología general.



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 2.7 Representación esquemática de los AuNRs recubiertos con PSS/PLL@ICG/HA.

2.3.5 Funcionalización de AuNRs con polielectrolitos y DOXO, ICG y siRNA

La nanoplataforma completa para terapia multimodal, química, fototérmica, fotodinámica y génica, AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA se construyó aunando los protocolos previamente descritos, al que se incorporó el RNA tal y como muestra la **Figura 2.8**. De este modo, el proceso se inició con la capa negativa PSS, se añadió el fármaco y posteriormente el complejo PLL@ICG. En este paso, a diferencia de los protocolos anteriores, en el último paso el lavado de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG se redispersaron en 1 mL de agua libre de nucleasas para, a continuación, añadir la capa de siRNA. La adsorción de esta capa se realizó a 37 ºC, en una campana estéril libre de nucleasas y protegida de la luz. Típicamente 0.5 nmol de siRNA se diluyeron en 1 mL de agua libre de RNA y se agitaron a 500 rpm durante 30 min. Posteriormente se agregó 1 mL de nanoplataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG gota a gota. Después de 2 h de incubación a 37 ºC, la mezcla se centrifugó una vez a 12000 rpm durante 10 minutos y se redispersó en 1 mL de agua libre de RNA. Finalmente se añadió la capa de direccionamiento de HA según protocolo previo.

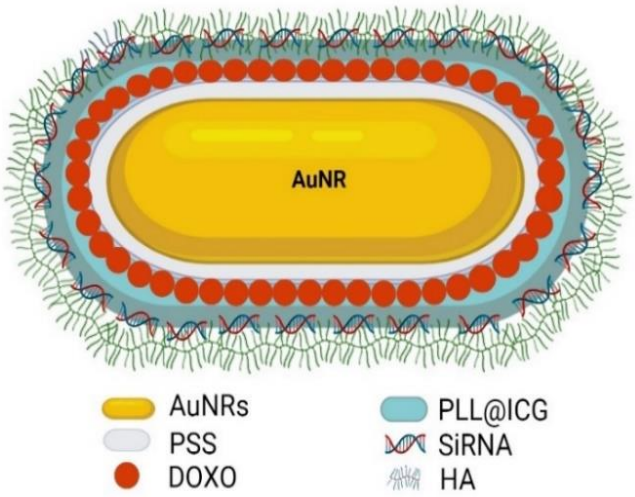


Figura 2.8 Representación esquemática de los AuNRs recubiertos con PSS/DOXO/PLL-ICG/siRNA/HA.

2.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS NANOPLATAFORMAS

2.4.1 Dispersión dinámica de luz, DLS

Las medidas de DLS se realizaron utilizando un sistema de correlador digital ALV-5000 (ALV5000/E, ALV GmbH, Alemania) equipado con un controlador de temperaturas 25 ºC±0.1 ºC. La luz dispersada se polarizó verticalmente con un láser de estado sólido a 532 nm (2 W). El radio hidrodinámico, R_h, se obtuvo a partir de medidas de DLS de disoluciones diluidas medidas a un ángulo incidente de 90º y analizadas con el algoritmo CONTIN desarrollado por Provencher [2] y la ecuación de Stokes-Einstein

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \text{ (ecuación 1)}$$

donde k_B es la constante de Boltzman, T la temperatura, η es la viscosidad y D el coeficiente de difusión de las partículas. Las medidas se hicieron por triplicado a tiempos de medida de 60s.

2.4.2 Espectrometría masas por plasma acoplado inductivamente, ICP-MS

La concentración de Au en disolución o en las células se determinó por ICP-MS en un equipo Varian 820-MS (Agilent Technologies, USA). 1 mL de $1{\cdot}10^{11}$AuNRs/mL (o 100000 células con Nps, cuando corresponda) se disolvió en 0.3 mL HCl (37% v/v) y 0.1 mL HNO_3 (70% v/v). Las disoluciones se diluyeron con agua des ionizadla hasta llegar a un volumen final de 2 mL. La intensidad de la longitud de onda de emisión se midió y comparó con una disolución estándar.

2.4.3 Movilidad electroforética

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El potencial-ζ de los AuNRs básicos y los recubiertos con los polielectrolitos se midió usando un Nano ZS (Nanoseries, Malvern Instruments, UK) equipado con un láser de He-Ne de 633 nm trabajando a 4 W de potencia. El

equipo mide la movilidad electroforética de las Nps y las convierte en potencial-ζ utilizando la ecuación clásica de Smolchowski:

$$\alpha = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \text{ (ecuación 2)}$$

donde α, ε, ζ y η denotan la movilidad electroforética, permisividad del medio, potencial-ζ de las partículas y viscosidad, respectivamente. Cada muestra se introdujo en una cubeta desechable y las medidas se iniciaron en equilibrio térmico a 25 ºC. El número de repeticiones de cada experimento lo determinó automáticamente el software y las medidas se realizaron por triplicado. Los resultados se presentan como valor ± desviación estándar (SD). Se utilizaron concentraciones inferiores a 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$.

La estabilidad coloidal de los AuNRs recubiertos con las capas de PE se realizaron en muestras diluidas (1/50) a 37 ºC bajo agitación moderada a varios pHs entre 3.0 y 9.0 en ausencia y en presencia de 10% FBS o tripsina midiendo tamaños por DLS y potencial-ζ durante 7 días. Estos experimentos se realizaron por triplicado para tres lotes de Nps distintos.

2.4.4 Microscopía de transmisión electrónica, TEM

En el caso de los AuNRs, las imágenes de TEM se obtuvieron depositando una gota de 5 µl de muestra diluida en agua sobre una rejilla de cobre de 400 mesh recubierta de carbono y dejando secar para ser examinada en un microscopio de transmisión JEOL JEM 1011 con filamento de lantano operando a 120 kV. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software ImageJ.

2.4.5 Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La espectroscopía UV-Vis permite medir la absorbancia ultravioleta-visible de moléculas/Nps al ser irradiadas en el rango 160-780 nm. La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia de una disolución es directamente proporcional a las especies absorbentes de la disolución y al camino óptico recorrido:

$$\frac{I_1}{I_o} = 10^{-al} = 10^{-elc} = 10^{-A} \text{ (ecuación 3)}$$

En el caso I_1, I_o son las intensidades luminosas intensidades salientes, y entrante respectivamente, $A = al = elc$, es la absorbancia, puede calcularse también como: $A = -log_{10}\frac{I_1}{I_o}$, l, es la longitud atravesada por la luz en medio, c, la concentración del absorbente en el medio y α el coeficiente de absorción. Los espectros de absorción UV-Vis de los AuNRs y las distintas nanoplataformas se ha supuesto que, en base a su tamaño, la parte de luz dispersada por las Nps es despreciable y el coeficiente de extinción es igual al de absorbancia. Las medidas se realizaron con un espectrofotómetro Jasco V-750 con controlador de temperatura en un rango del espectro entre 400 nm y 900 nm, introduciendo 2 mL de muestra en una celda de cuarzo de camino óptico 10 mm.

2.4.6 Espectroscopía de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia para determinar la presencia de moléculas fluorescentes de las distintas nanoplataformas después del proceso sintético se realizaron con un fluorímetro Cary Eclipse Bio (Agilent Technologies, USA) con un rango continuo de longitudes de onda de excitación y emisión utilizando cubetas de cuarzo con las cuatro caras transparentes y un camino óptico de 10 mm. Las medidas biológicas de la presencia de moléculas fluorescentes en las células se realizaron con un lector de placas FluoStar Omega.

2.4.7 Efecto fototérmico inducido por los AuNRs bajo irradiación NIR

Los experimentos de incremento de temperatura se realizaron utilizando una fuente láser de diodo continúo acoplado a una fibra óptica a 808 nm de longitud de onda (50 W, Oclaro, Inc., San José, CA). La potencia de láser se obtiene por un controlador de diodo láser Newport 5700-80. Se utilizó una fibra óptica de 200 µ de núcleo para transferir la luz láser desde la unidad láser a la disolución en estudio y, además, un colimador permitió el ajuste fino del tamaño del punto láser en el rango de 0.1-10 mm. El tamaño del punto láser se midió con un perfilador de

haz láser (Newport LBP-1-USB) colocado a 8 cm entre la salida de la lente del telescopio y la cubeta (o placa de 6 pocillos en los experimentos *in vitro*), utilizando el software Newport LBP serie Measurement Systems v 3.11. De esta forma, la potencia por unidad de área se pudo obtener de forma sencilla. El tamaño final del punto láser se fijó en 1 cm. Se utilizó un potenciómetro (Newport Optical Power Meter modelo 1916c) para calibrar la potencia de salida con relación a la intensidad de señal emitida por el controlador láser. La temperatura de los AuNRs se midió con una sonda tipo J unida al termómetro. Las disoluciones de Nps se agitaron durante la iluminación láser para homogeneizar el calor producido y asegurar que las muestras se encontraban en equilibrio térmico durante el desarrollo de todo el experimento.

2.4.8 Análisis cuantitativo de la carga de DOXO

Para determinar la eficiencia de encapsulación (EE%) de DOXO dentro de las nanoplataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA, estas se centrifugaron a 15000 rpm a 20 ºC, durante 20 min después de la incubación de la plataforma AuNRs/PSS con el fármaco DOXO. El contenido de DOXO en el sobrenadante se midió a través de espectroscopía UV-Vis. Previamente, se obtuvo la curva de calibración de DOXO tal y como muestra la **Figura 2.9**. Los sobrenadantes de AuNRs sin DOXO se utilizaron como blancos. Las medidas UV-Vis se realizaron a 488 nm. El cálculo de EE% se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

$$EE\% = \frac{DOXO_{tot} - DOXO_{supernat}}{DOXO_{tot}} x100 \text{ (ecuación 4)}$$

donde $DOXO_{tot}$ es la concentración inicial total añadida en el proceso sintético de las nanoplataformas y $DOXO_{supernat}$ es la concentración de DOXO en el sobrenadante después de la centrifugación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

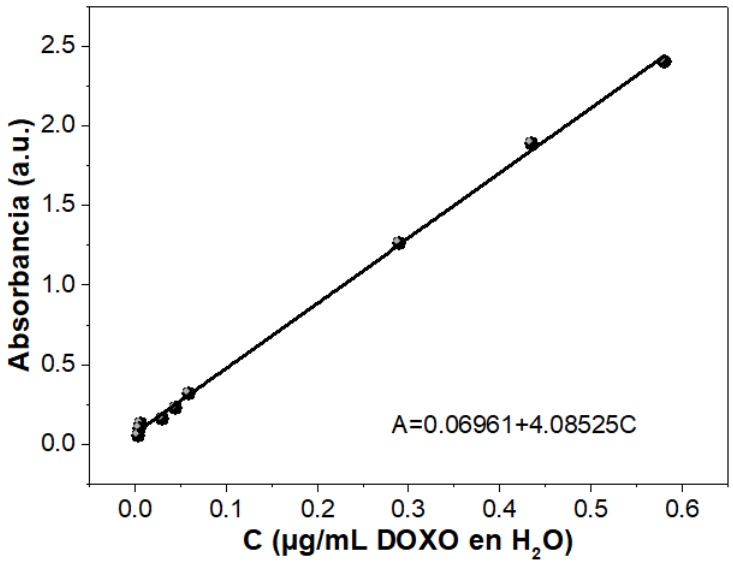


Figura 2.9 Curva de calibración obtenida por UV-Vis del fármaco DOXO medido a 480 nm.

2.4.9 Liberación de DOXO en experimentos in vitro

Los perfiles de liberación acumulativos de DOXO de las nanoplataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA (1 mL, $1 \cdot 10^{11}$Nps/mL) se midieron *in vitro* a una temperatura constante de 37 ºC bajo agitación magnética de 300 rpm durante varios días a pHs 7.4 y 5.5 en ausencia y en presencia de ácido acético etilenediaminetetra (EDTA)-tripsina (EDTA, 50µl por 40 mL de disolución tampón) y/o irradiación NIR a 1.0 W/cm^2 durante 5 min utilizando el láser de diodo de 808 nm descrito en el **apartado 2.4.7** de este Capítulo. Para obtener el perfil de liberación, se introdujeron 2 mL de las nanoplataformas en membranas de diálisis (SpectraPore, MWCO 3500 Da) sumergidas en 50 mL de disolución tampón suplementada con 10% v/v de suero bovino fetal al pH de interés.

La liberación de DOXO se determinó a diferentes intervalos de tiempo. A cada tiempo de medida, se retiraron ca. 0.5 mL del medio se reemplazaron por el mismo volumen de disolución tampón fresca para mantener las condiciones de diálisis adecuadas. El contenido de DOXO se obtuvo mediante medidas de UV-Vis (V-750, Jasco) a una longitud de onda de 488 nm usando las curvas de calibración

realizadas previamente para cada pH. La cantidad de DOXO liberada se obtuvo a partir del ajuste al modelo teórico de Korsmeyer-Peppas [3]:

$$\frac{DOXO_{lib}}{DOXO_{total}} = K_p t^n \text{(ecuación 5)}$$

donde $DOXO_{lib}$ es la cantidad de fármaco liberado en cada instante de tiempo medido, t, $DOXO_{total}$ es la concentración total de fármaco cargado, k_p es una constante de liberación y n es el coeficiente de liberación que da información sobre el mecanismo de liberación. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.4.10 Análisis cuantitativo de la carga de ICG

Para determinar la eficiencia de encapsulación (EE%) de ICG, dentro de las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA, estas se centrifugaron a 15000 rpm a 20 ºC durante 20 min después de la incubación de las plataformas AuNRs/PSS con la capa PLL@ICG.

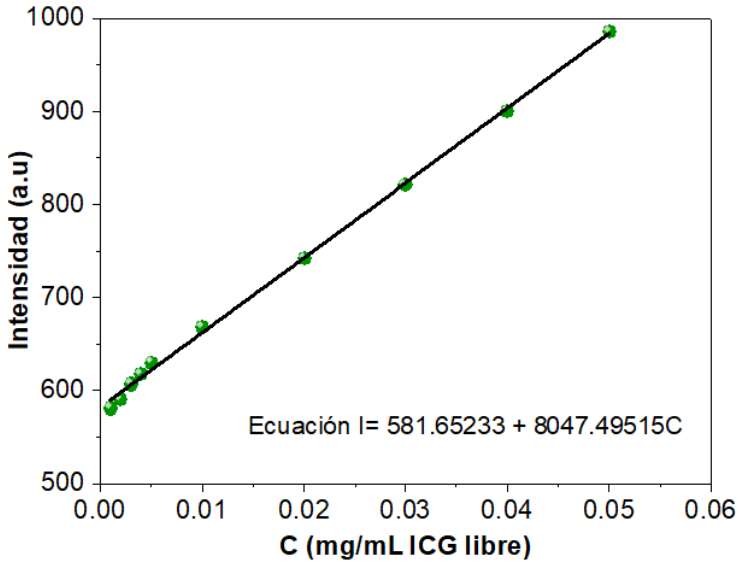


Figura 2.10 Curva de calibración obtenida por fluorescencia del marcador ICG libre medido a 810 nm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El contenido de ICG en el sobrenadante se midió a través espectroscopia de fluorescencia (FluorímetroCary 100, Agilent Technologies, USA) excitando la muestra a λ= 785 nm y con una emisión a λ= 810 nm. Previamente, se obtuvo una curva de calibración de ICG libre (ver **Figura 2.10**), dentro del rango de

concentraciones estudiado. La eficiencia de encapsulación (E.E.) se obtuvo mediante la ecuación:

$$EE\% = \frac{ICG_{tot} - ICG_{supernat}}{ICG_{tot}} x100 \text{ (ecuación 6)}$$

donde ICG_{tot} es la concentración inicial total añadida en el proceso sintético de las nanoplataformas y $ICG_{supernat}$ es la concentración de ICG en el sobrenadante después de la centrifugación.

2.4.11 Fotoestabilidad de las nanoplataformas AUNRs/PSS/ PLL@ICG/HA

La fotoestabilidad de la ICG libre (0.02 mg) y de las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA (1 mL, OD ~1, $1 \cdot 10^{11}$AuNRs/mL) en agua en ausencia y en presencia de estimulación externa con radiación NIR (808 nm, 15 min, 0.5 W/cm^2, 1.0 W/cm^2 y 3 W/cm^2), se monitorizó durante 13 días midiendo la disminución de la fluorescencia de la ICG (Fluorímetro Cary Eclipse bio, Agilent Technologies, USA) de los sistemas, excitando a una longitud de onda de 785 nm y emitiendo a una longitud de onda de 810 nm. Las muestras se agitaron magnéticamente durante la irradiación y los experimentos se realizaron por triplicado.

2.4.12 Liberación de ICG in vitro

Se realizaron estudios de estabilidad adicionales de la plataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA (1 mL, OD ~1, $1 \cdot 10^{11}$ AuNRs/mL) mediante el análisis de la liberación de ICG *in vitro* a temperatura constante de 37 ºC y 300 rpm durante 96 h en ausencia y en presencia de estímulos externos enzimáticos (50 µl por 25 mL de disolución tampón de EDTA-tripsina) o fototérmico (808 nm, 15 min, 1.0 W/cm^2 y 2 W/cm^2) a pHs 7.4 y 5.5. Para obtener los perfiles de liberación, se introdujeron 2 mL de las nanoplataformas en membranas de diálisis (SpectraPore, MWCO 3500 Da) sumergidas en 25 mL de agua o medio celular, ambos suplementados con 10% de suero bovino fetal al pH de interés. La liberación de ICG se determinó a diferentes intervalos de tiempo. A cada tiempo

de medida, se retiró ca. 1 mL del medio y se reemplazó por el mismo volumen de disolución tampón fresca para mantener las condiciones de diálisis adecuadas. El contenido de ICG se obtuvo a partir de medidas de Fluorescencia (Fluorímetro Cary Eclipse bio, Agilent Technologies, USA) de los sistemas, excitando a 785 nm y emitiendo a 810 nm, utilizando la curva de calibración de ICG libre medida previamente a 810 nm (**Figura 2.10**).

2.4.13 Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), con las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA in vitro

La comprobación de la generación ROS se llevó a cabo siguiendo la disminución del pico de absorbancia (UV-Vis Cary Bio,Agilent Technologies, USA) del compuesto DPIBF a 420 nm, que se degrada en presencia de oxígeno singlete [21]. Para ello, en una celda de cuarzo de camino óptico 10 mm con 2 mL de la muestra a medir (controles negativos: agua y AuNRs/PSS/PLL/HA y controles positivos: ICG libre y AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA) se añadieron 100 µL, 1mM de DPIBF en etanol. La concentración de ICG libre y encapsulada en la plataforma AuNRs/PSS/ PLL@ICG/HA (1 mL, OD ~1, $1{\cdot}10^{11}$AuNRs/mL) fue de ca. 22 µM. Como blanco en las medidas de UV-Vis, se tomaron los valores de absorbancia de las nanoplataformas completas con el DPIBF sin irradiar, considerándose como la absorbancia inicial (100%). Las muestras se agitaron magnéticamente y se iluminaron con el láser de diodo CW-808 nm, con las mismas características comentadas en la **sección 2.4.7** durante diferentes tiempos a tres potencias de láser 0.5, 1.0 y 3.0 W/cm^2, recogiéndose los espectros UV-Vis en cada caso.

2.4.14 Análisis cuantitativo de la carga de siRNA

Para determinar la eficiencia de encapsulación (EE%) y la capacidad de carga (LC) del inhibidor genético siRNA, dentro de las nanoplataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA, estas se centrifugaron a 10000 rpm a 20 ºC durante 20 min después de la incubación de la plataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG con el siRNA-FTIC. El contenido en siRNA en el sobrenadante se midió a través espectroscopía de fluorescencia (lector de placas

Omega Fluoro STAR) con longitudes de onda de excitación y emisión λ_{exc}= 494 nm y λ_{em}= 519 nm, respectivamente. Previamente, se obtuvo una curva de calibración de siRNA libre (ver **Figura 2.11**), dentro del rango de concentraciones estudiado. La eficiencia de encapsulación (E.E.) se obtuvo mediante la ecuación:

$$EE\% = \frac{SiRNA_{tot} - SiRNA_{supernat}}{SiRNA_{tot}} x100 \text{ (ecuación 7a)}$$

$$LC\% = \frac{SiRNA_{tot} - SiRNA_{supernat}}{peso\ de\ napartículas} x100 \text{ (ecuación 7b)}$$

donde $siRNA_{tot}$ es la concentración inicial total añadida en el proceso sintético de las nanoplataformas y $siRNA_{supernat}$ es la concentración de SiRNA en el sobrenadante después de la centrifugación.

La cuantificación de la concentración de siRNA cargada se determinó usando el kit de fluorescencia Qubit µRNA siguiendo las instrucciones del fabricante.

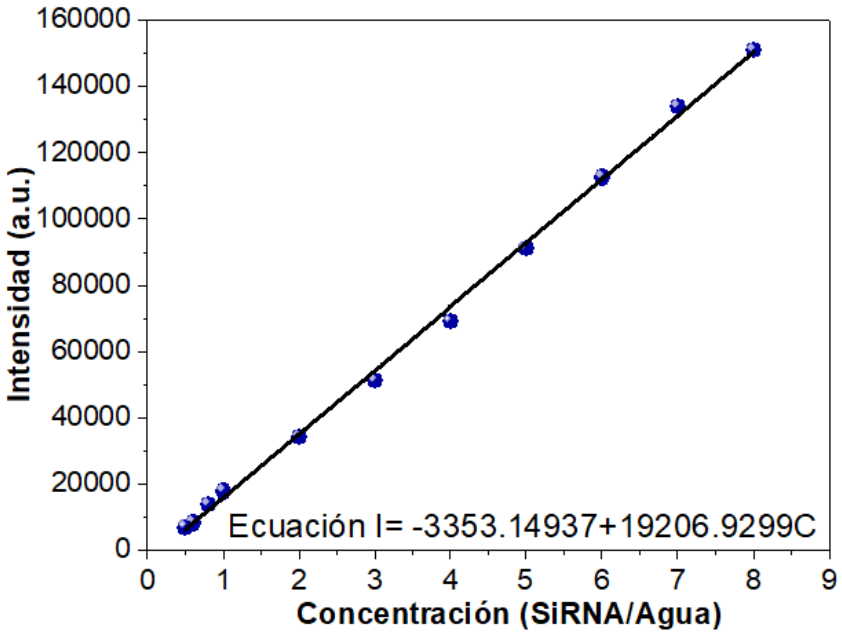


Figura 2.11 Curva de calibración obtenida por fluorescencia del inhibidor genético siRNA medido a λ_{exc}= 519 nm.

2.5 SIMULACIONES Y MODELIZACIONES

2.5.1 Modelización de un AuNR para conocer su campo de energía y la liberación de calor al sistema

Se utilizo un conjunto de herramientas de Python para simulaciones electrodinámicas de campo completo, llamada pyGDM el cual está basado en el método de Green Dynamic (GDM). Además, pyGDM incluye herramientas para derivar fácilmente varias cantidades físicas, como patrones de campo lejano, sección transversal de extinción y dispersión, el campo cercano eléctrico y magnético en la vecindad de la estructura, la tasa de decaimiento de los emisores cuánticos y el calor depositado dentro de una nanopartícula.

2.5.2 Eficiencia de conversión fototérmica, η

La eficiencia de conversión fototérmica fue determinada por el método reportado de Roper *et. al.* [4]. El incremento de temperatura de la disolución puede ser determinando por un balance entre, por un lado, el calor suministrado por la irradiación láser de los AuNRs (Q_I), el sistema (celda de cuarzo y agua (Q_0)), y, por otro lado, la dispersión de calor al ambiente externo por convección (Q_{ext}) esto puede ser expresado por:

$$\sum_i m_i C_i \frac{dT}{dt} = Q_I + Q_0 - Q_{ext} \text{ (ecuación 8)}$$

donde m_i y C_i son la masa y la capacidad calorífica de los componentes i del sistema (la celda de cuarzo 6.9 g, 0.89 $Jg^{-1}K^{-1}$, el agua utilizada 2 g, 4.20 $Jg^{-1}K^{-1}$, etc.), T es la temperatura y t es el tiempo. El término Q_I corresponde al calor producido por los AuNRs después de la irradiación y puede ser expresado por la siguiente ecuación:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$$Q_I = I\left(1 - 10^{-A\lambda}\right)\eta \text{ (ecuación 9)}$$

donde I es la potencia del láser, η representa la eficiencia para convertir la luz incidente en energía térmica (es decir, la porción de la luz que es absorbida por las nanopartículas) y A_λ es la absorbancia de los AuNRs a la longitud de onda del láser

utilizado, en este caso 808 nm. El calor disipado al ambiente externo (Q_{ext}) está dado por:

$$Q_{ext} = hA(T - T_{amb}) \text{ (ecuación 10)}$$

donde h es coeficiente convectivo de transferencia de calor y A (8.4cm^3) es el área superficial de la celda de cuarzo. De este modo, la ecuación 1 se puede reescribir como:

$$\sum_i m_i C_i \frac{dT}{dt} = I\left(1 - 10^{-A\lambda}\right)\eta + Q_0 - hA(T - T_{amb} \text{ (ecuación 11)}$$

En este modelo, se define un parámetro denominado constante de velocidad característica o constante del tiempo del sistema τ_s como:

$$\tau_s = \frac{\sum_i m_i C_i}{hA} \text{ (ecuación 12)}$$

Por lo tanto, tomando en cuenta las ecuaciones 11 y 12, considerando $\Delta T = (T - T_{amb})$, se puede resolver la ecuación diferencial para obtener:

$$\Delta T(t) = \tau_s \left[\frac{I(1-10^{-A\lambda})\eta + Q_0}{\sum_i m_i C_i}\right](1 - e^{\frac{-t}{\tau_s}}) \text{ (ecuación 13)}$$

Esta ecuación es utilizada para obtener τ_s y η, simplemente, ajustando los datos experimentales obtenidos para calcular Q_0 el ajuste debe ser hecho en la curva de calentamiento del H_2O sin AuNRs, en este caso $Q_I = 0$ y la ecuación 13 se simplificaría a:

$$\Delta T(t) = \tau_s \left[\frac{Q_0}{\sum_i m_i C_i}\right](1 - e^{\frac{-t}{\tau_s}}) \text{ (ecuación 14)}$$

2.6 ESTUDIO BIOLÓGICO DE LAS NANOPLATAFORMAS EN CULTIVOS CELULARES

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

Los estudios biológicos de las nanoplataformas multimodales sintetizadas se realizaron en células de cáncer cervical, HeLa y células fibroblastos de embrión de ratón 3T3 Balb en condiciones de cultivo estándar: DMEM suplementado con 10% FBS, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA), 2 mM L-Glutamina, 1 mM de

piruvato sódico, y 1% de penicilina estreptomicina, en atmósfera húmeda, 5% CO_2 a 37 ºC.

En ambas líneas celulares, las células se mantuvieron en los contenedores celulares hasta alcanzar una confluencia óptica de ca. 75%-80%, momento en el que procedió a tripsinarlas con 4 mL de una disolución de tripsina-EDTA (3 min, 5% CO_2, 37 ºC). Una vez despegadas del fondo del contenedor, se centrifugaron durante 4 min a 1200 rpm y el sedimento se resuspendió en medio de cultivo que finalmente se volvió a depositar en un nuevo contenedor y/o placas de cultivo para los diferentes experimentos.

2.6.1 Ensayos de viabilidad celular de las nanoplataformas

La citotoxicidad de las diferentes nanoplataformas sintetizadas en ausencia de estímulos internos y externos se estudió *in vitro* con el kit de ensayos de proliferación CCK-8. Para ellos se sembraron las diferentes líneas celulares en placas de 96 pocillos (100 µL, $1.5 \cdot 10^4$ células/pocillo) cultivaron durante 24 h en condiciones de cultivo estándar. A continuación, se añadió una concentración de $2.5 \cdot 10^{10}$ NP/mL en medio de cultivo y se incubaron durante 24h y 48 h. En el caso de las nanoplataformas de AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA se usó DOXO libre a la misma concentración que la encapsulada como control positivo, en el caso de las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA, ICG libre a la misma concentración que la encapsulada se tomó como control positivo y en el caso de las AuNRs/PSS/DOXO/ PLL@ICG/siRNA/HA se usó siRNA/Lipofectamina2000™ como control positivo. Como controles negativos se tomaron las células sin nanoplataformas y las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL/HA. Después del período de incubación correspondiente, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células de cada pocillo con PBS (pH 7.1, 1x) y se añadieron 90 µL de DMEN con 10 µL del reactivo CCK-8. Después de 2 h de incubación, se midió la absorbancia de las muestras a 450 nm con un lector de microplacas Bio-Rad, modelo 689. La viabilidad celular se calculó mediante la expresión:

$$SR(\%) = \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{blanco}} x100 \text{ (ecuación 15)}$$

donde *SR* es la razón de supervivencia celular, $Abs_{muestra}$ es la absorbancia a 450 nm de la muestra y Abs_{blanco} es la absorbancia correspondiente a los controles negativos.

2.6.2 *Internalización celular de las nanoplataformas*

Las líneas celulares se sembraron sobre portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina (12x12 mm^2) colocados en placa de 6 pocillos (2 mL DMEM sin red fenol, $2 \cdot 10^5$ células por pocillo), en el caso de los experimentos de célula muerta y en Nunc Lab-TEC (2 mL DMEM sin rojo fenol, $2 \cdot 10^5$ células por pocillo) en el caso de célula viva, en ambos casos durante 24 h en condiciones de cultivo estándar. Posteriormente, se añadieron las nanoplataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA y AuNRs/PSS/ PLL@ICG/HA (250 µL, $2.5 \cdot 10^{10}$ Np/mL) y se incubaron durante 6 h para posteriormente lavar las células 3 veces con PBS (pH 7.1, 1x). En el caso de los experimentos de célula muerta, estas se fijaron con paraformaldehído (4% p/v) durante 10 min, se lavaron nuevamente con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 (0.2%) durante otros 10 min. Finalmente se lavaron nuevamente con PBS y se tiñeron los núcleos con ProLong Gold antifade DAPI cubriendo la porta muestra con un cubreobjeto y curando la muestra 24h a -20 ºC. En el caso de los experimentos en célula viva, después de las 6h de incubación y el lavado con PBS, las células se tiñeron con DAPI (1 gota) durante una hora y después se lavaron tres veces con PBS para finalmente añadir 200 µl de DMEM sin rojo fenol. Las muestras se visualizaron con un microscopio invertido de fluorescencia de campo amplio (Leica DMI6000B, Leica Microsystems) a un objetivo 63x, usando el canal azul para el DAPI (λ_{ex} = 350 nm) y el rojo para DOXO (λ_{ex}= 480 nm).

2.6.3 *Visualización de las nanoplataformas en las líneas celulares por TEM*

Las líneas celulares se sembraron en placa de 6 pocillos (2 mL DMEM sin red fenol, $5 \cdot 10^4$ células por pocillo) y crecieron durante 24 h en condiciones de cultivo estándar. Posteriormente, se añadieron las nanoplataformas AuNR/PSS/PLL//HA (250 µL, $2.5 \cdot 10^{10}$ Np/mL) y se incubaron durante 6 h para posteriormente lavar las células 3 veces con PBS (pH 7.1, 1x), tripsinizaron y

centrifugaron a 1200 rpm durante 4 min. Los sedimentos celulares se embebieron en una matriz de agar, se fotofijaron con tetraóxido de osmio en una disolución tampón cacodilato (1% w/v, 0.1 M) y finalmente se recubrieron con una resina de Eponate (Ted Pella Inc, Redding, CA, USA). Se realizaron cortes ultrafinos con un ultramicrotome (UltraCut S, Leica Microsystems GmbH, Alemania) y se analizaron por TEM (JEOL JEM 1011, Japón) operando a 120 kV.

La cuantificación de las nanopartículas en el interior celular se monitorizó mediante medidas de TEM e ICP-MS (ver **sección 2.4.2**).

2.6.4 Liberación medida en células mediante fluorescencia

Se utilizaron las dos líneas celulares HeLa y 3T3 Balb. Para ellos se sembraron las diferentes líneas celulares en placas de 96 pocillos negras, especiales para mediciones de fluorescencia (100 µL, $1.5 \cdot 10^4$ células/pocillo) y se cultivaron en distintas placas para cada medición realizada (cada hora hasta la hora 12, posteriormente se hizo la siguiente medición a las 24 h), para asegurar la supervivencia de las células, las irradiaciones fueron realizadas de la misma manera que se menciona en la S**ección 2.4.7**. Para experimentos *in vivo*, se realizó la irradiación a las 5, 8 y 12 h de incubación. Posterior a cada hora se midió con el lector de placas FLUOStar Omega, el cual cuenta con los siguientes métodos de medición, primero se realizaron los barridos de los blancos añadidos, los cuales son células solas que generaban una autofluorescencia en los rangos de medida (488, 810 y 519 longitud de onda) dando los siguientes valores: DOXO: 356.69, ICG 126.5 y siRNA 1458.2 para la HeLa, mientras que para 3T3 Balb: DOXO: 103.2, ICG: 52.3 y siRNA: 596.3 respectivamente. Por lo tanto, se midió cada placa para la fluorescencia descrita en la sección de curva de calibración para cada compuesto, y se restó la autofluorescencia de las células, obteniendo el porcentaje de liberación real de cada compuesto dentro de las células. El compuesto ICG fue el único que se midió en el fluorímetro con celda de cuarzo, ya que la longitud de onda del láser de excitación y emisión no de contaban con ellos en el FLUOStar Omega, por lo que cada medición se levantaban las células como se describe en la **Sección 2.6.4**, donde se menciona la tripsinación de las células en el kit de

Anexina, por lo que se utilizó una disolución de tripsina y medio libre de Red Fenol para eliminar su contribución en el espectro, y obtener la fluorescencia deseada de las ICG dentro de las células.

2.6.5 Liberación de DOXO y citotoxicidad

Siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 2.6** para el cultivo celular, la liberación del fármaco DOXO se realizó irradiando los pocillos de las placas de 96 que contenían células (100 µL, $1.5 \cdot 10^4$ células/pocillo) sin Nps (blanco), con nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL/HA (control negativo), DOXO y AuNR/PSS/DOXO ($2.5 \cdot 10^{10}$ NP/mL) (como controles positivos) y con nanoplataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA ($2.5 \cdot 10^{10}$ NP/mL) con un láser continuo de diodo de 808 nm a 1.0 y 2.0 W/cm^2 durante 5 min. Después de 18h y 48h, las células se lavaron con 100 PBS y se realizó la prueba de citotoxicidad CCK-8 tal y como se describe en el **apartado 2.6.1**. La viabilidad celular se calculó mediante la expresión (ecuación 15).

Por otro lado, también se utilizó el ensayo Anexina V para estudiar el mecanismo de muerte celular. En este caso, se plantaron $7.5 \cdot 10^4$ células/pocillo y se dejaron crecer durante 24 h hasta alcanzar una confluencia del 80-90% bajo condiciones estándar de cultivo en 100 µl de medio de cultivo y se usaron como controles negativos las células sin nanoplataformas y con nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL/HA ($1 \cdot 10^{10}$ NP/mL), como control positivo DOXO (2µg/mL) y las nanoplataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA ($1 \cdot 10^{10}$ NP/mL) con 75 y 100 mg de DOXO encapsulada. Después de las irradiaciones a las mismas potencias que las comentadas anteriormente y 48 h de incubación, las células se tripsinizaron, se redispersaron en 500 µl de medio fresco y se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 min. Posteriormente, 100 µl de las células se mezclaron con 200 µL de disolución tampón ,10 µL de reactivo de anexina V y 10 µL de propidio y se incubaron durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, fueron medidos en citometría de flujo (Luminex Guava easyCyte 12HT, Luminxe Corp, Texas, USA).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.6.6 Liberación de ICG y citotoxicidad

Siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 2.6** para el cultivo celular, la liberación de ICG se realizó irradiando los pocillos de las placas de 96 que contenían células (100 µL, $1.5 \cdot 10^4$ células/pocillo) sin Nps (blanco), con nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL/HA (control negativo), ICG (control positivo) y nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA ($2.5 \cdot 10^{10}$ NP/mL) con un láser continuo de diodo de 808 nm a 1.0 y 2.0 W/cm^2 durante 5 min. Después de 18h y 48h, las células se lavaron con 100 PBS y se realizó la prueba de citotoxicidad CCK-8 tal y como se describe en el **apartado 2.6.1** la viabilidad celular se calculó mediante la expresión (ecuación 15).

Por otro lado, también se utilizó el ensayo Anexina V para estudiar el mecanismo de muerte celular. En este caso, se plantaron $7.5 \cdot 10^4$ células/pocillo y se dejaron crecer durante 24 h hasta alcanzar una confluencia del 80-90% bajo condiciones estándar de cultivo en 100 µl de medio de cultivo y se usaron como controles negativos las células sin nanoplataformas y con nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL/HA y como control positivo ICG (0.02 mg/mL) a la misma concentración que la encapsulada en las nanoplataformas. Después de las irradiaciones a las mismas potencias que las comentadas anteriormente y 48 h de incubación, las células se tripsinizaron, se redispersaron en 500 µl de medio fresco y se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 min. Posteriormente, 100 µl de las células se mezclaron con 200 µL de disolución tampón ,10 µL de reactivo de Anexina V y 10 µL de propidio y se incubaron durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, fueron medidos en citometría de flujo (Luminex Guava easyCyte 12HT, Luminxe Corp, Texas, USA).

2.6.7 Ensayo ROS por microscopía de fluorescencia en células tumorales

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Se usó el ensayo ROS intracelular fluorimétrico (Sigma-Aldrich, USA) para detectar las especies reactivas de oxígeno ($_1O^2$) siguiendo el protocolo del fabricante. Para ello, se sembraron 10000 células/pocillo (100 µl DMEM si rojo

fenol) en placas de 96 pocillos de la línea celular HeLa y crecieron durante 24 h en condiciones estándar de cultivo. Posteriormente, se añadieron las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA (50 µl, $2.5 \cdot 10^{11}$ AuNRs/mL) y se incubaron durante 6 horas. Pasado ese tiempo, se descartó el medio, se lavaron las células tres veces con PBS (pH 7.1, 1x) y se añadió medio fresco sin rojo fenol. A continuación, se añadieron 100 µl de reactivo de detección ROS a cada pocillo y se incubaron a 37 ºC durante 1 h. Después, las células se irradiaron con un láser continuo de diodo a 808 nm y a una potencia de 1 W/cm^2 durante 5 y 10 min. Como control negativo se utilizaron células sin incubar con las nanoplataformas y como control positivo se indujeron ROS al 100% agregando H_2O_2 (800 µM, 33% w/v). Finalmente, las células se dejaron en el interior del incubador durante 30 min. Las placas con las muestras y los controles se midieron en un lector de placas (Omega FluoroSTAR) excitando a λ_{ex} = 488 nm y emitiendo a λ_{em} = 535 nm.

2.6.8 Inhibición de PD-L1 por PCR

Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR): para determinar la diferencia de expresión de PD-L1 antes y después del tratamiento celular con la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA, se extrajo el ARN total de las células HeLa utilizado el reactivo trizol (Invitrogen USA) según instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa para PD-L1 se realizó utilizando Maxima SYBR Green qPCR Máster MIx (Fermetas).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2.1 Los cebadores.

PD-L1 Directo	GCG AAT TAC TGT GAA AGT CAA TGCC
PD-L1 Inverso	TGG TCA CAT TGA AAA GCT TCT CCTC
GAPDH Directo	GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G
GAPDH Inverso	ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA A

La expresión del ARN diana en relación con el gen de limpieza GAPDH se calculó en función del ciclo umbral (Ct) como R = 2-Δ(ΔCt), donde ΔCt = Ct de gen diana – Ct de GADPH y Δ(ΔCt) = ΔCt células tratadas con siRNA -ΔCt células no tratas. Los valores de Ct (ciclo umbral) se determinaron con el sistema de PCR en tiempo real [5].

2.b NANOPARTÍCULAS SOBRECONVERSORAS

2.7 MATERIALES PARA EL PROCESO SINTÉTICO

1-octadeceno (ODE, 90 %), ácido oleico (OA, 90 %), etanol (EtOH) y metanol (MeOH), ciclohexano, agua milli-Q, cloruro de itrio (III) anhidro ($YCl_3 \cdot 6H_2O$, 99,9%), cloruro de iterbio (III) anhidro ($YbCl_3 \cdot 6H_2O$, 99,9 %), cloruro de erbio (III) anhidro ($ErCl_3 \cdot 6H_2O$, 99,9 %), cloruro de tulio ($TmCl_3 \cdot 6H_2O$, 99.9%), cloruro de neodimio ($NdCl_3 \cdot 6H_2O$, 99.9%), cloruro de gadolinio (III) anhidro ($GdCl_3 \cdot 6H_2O$, 99.9%), fluoruro de amonio (NH_4F, 96 %), hidróxido de sodio (NaOH, 96 %), trifluoroacetato de sodio (Na-TFA, 98 %), PEG fosfato 5000 Da, poli(isobutileno-alt-maleico anhidrido) (PMA) y dodecilamina (DDA), ácido meso-2,3 dimercaptosucinina (DMSA, 98%) y 2-aminoetil dihidrógeno fosfato

(AET, 99%) todos ellos adquiridos de Sigma-Aldrich y utilizados en las condiciones de recepción.

2.8 MATERIALES PARA LOS ESTUDIOS BIOLÓGICOS

Los estudios celulares se realizaron en fibroblastos de embrión de ratón (3T3 Balb), y las células de cáncer cérvico-uterino HeLa suministradas por Sigma Aldrich. El suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, la tripsina al 0.25% con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el PBS pH 7.4 (10X) fueron suministrados por Hyclone (ThermoScientific, USA). El medio de cultivo celular compuesto por DMEM suplementado con 10% FBS, 0.1 mM aminoácidos no esenciales (NEAA), 2 mM L-Glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y un 1% de penicilina estreptomicina fue suministrado por ThermoScientific. Colorantes celulares DAPI con (antifade Pro Long Gold) y Bodipy Phalloidin (Invitrogen). El kit de citotoxicidad CCK-8 fue de la casa Gerbu Biotechnik GMbH (Alemania). Agua grado Milli-Q. Los reactivos y disolventes fueron de grado analítico.

2.9 MÉTODO SINTÉTICO

2.9.1 Síntesis de las nanopartículas sobreconversoras

Para la síntesis de nanopartículas sobreconversoras, UpCvs, altamente monodisperasas de matrices cerámicas $\beta-NaYF_4$ o $\beta-NaGaF_4$ dopadas con Yb:Er, Yb:Tm ó Yb:Nd:Er se siguió el protocolo típico descrito por Li *et al.* [6, 7] con las modificaciones adecuadas para las razones molares buscadas entre los precursores de tierras raras, $LnCl_3$ y el estabilizante OA (ver **Tabla 2.2**). Este método se basa en la descomposición térmica de los precursores. Brevemente, el proceso sintético típico se detalla a continuación en un ejemplo concreto y extrapolable al resto.

Se mezclaron los precursores en las proporciones adecuadas 80% $YCl_3 \cdot 6H_2O$ *(1.60mmol; 485.38mg)*, 18 %: $YbCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0.36mmol; 139.50mg)* y 2 %: $ErCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0.04mmol; 15.27mg)* o 2% $TmCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0.01mmol; 2.75mg)* en un matraz redondo de tres bocas de 250 mL con 1 mL agua mili Q, 30 mL de ODE y 12 mL de OA. Esta disolución se deshidrató por evaporación (con reactor abierto)

calentando hasta 150 °C a 3°C/min y manteniendo esa temperatura durante 45 min para que se formasen los oleatos de ytrio. Posteriormente, se bajó la temperatura de la reacción a 110 °C durante 5 min y se cerró el reactor haciendo vació en la reacción para evitar la oxidación del ácido oleico. Finalmente se dejó enfriar hasta 50 ºC (manteniendo el vacío en la reacción). A la mezcla anterior se le añadió una disolución de NH_4F (8mmol, 296.5 mg) y NaOH (5mmol, 200 mg) en metanol (10mLMeOH) obteniéndose una disolución amarilla blanquecina. Se evaporó el exceso de metanol (con reactor abierto) calentando a 60 °C a un ritmo de 3 °C/min, y manteniendo dicha temperatura durante 30 min. Para asegurar la eliminación de todo el MeOH se elevó la temperatura hasta 80 °C en vacío y se mantuvo durante 20 min. Para la formación de las nanopartículas la disolución precursora se calentó hasta 300 °C a ritmo de 7 °C/min y se mantuvo durante 1h (en reflujo y bajo flujo de N_2) para romper los enlaces iónicos de NaOH y NH_4F y, junto con los núcleos de oleato, dar lugar a la formación de UpCvs de $NaYF_4$: Yb: Er/Tm. La mezcla se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Las UpCvs obtenidas en la mezcla fueron precipitadas con etanol (20mL) y separadas mediante centrifugación a 3500 rpm durante 10 min. El precipitado fue lavado varias veces (2 o 3) redispersado con ciclohexano (5mL), ayudándonos de un baño de ultrasonidos, y volviéndose a precipitar con etanol (15mL). Finalmente, las UpCvs se redispersaron en 5 mL de ciclohexano. La caracterización de las UpCvs se realizó por medidas de microscopía electrónica e ICP-MS. La concentración final de la disolución se determinó por la combinación de los resultados de TEM e ICP-MS.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2.2 Razones molares buscadas entre los precursores de tierras raras, LnCl3 y el estabilizante OA.

Np β−$NaYF_4$	Razón molar *r*	Forma	Concentraciones
Sin dopaje	1: 16.96	Varilla	$YCl_3 \cdot 6H_2O$ *(1.60mmol),*
Yb (18%), Er (2%)	1:18	Esfera	$YCl_3 \cdot 6H_2O$ *(1.60mmol),* $YbCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0.36mmol),* $ErCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0. 04mmol)*
Yb (18%), Er (2%)	1:16.96	Esfera	$YCl_3 \cdot 6H_2O$ *(1.63mmol),* $YbCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0.36mmol),* $ErCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0.01mmol)*
Yb (18%), Er (2%)	1:14.85	Nanocilindro	$YCl_3 \cdot 6H_2O$ *(1.60mmol),* $YbCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0.36mmol),* $ErCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0. 04mmol)*
Yb (18%), Er (2%)	1:16.96	Nanocilindro corto	$YCl_3 \cdot 6H_2O$ *(1.60mmol),* $YbCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0.36mmol),* $ErCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0. 04mmol)*
Yb (18%), Tm (0.5%)	1:16.92 1:18	Esfera	$YCl_3 \cdot 6H_2O$ *(1.63mmol),* $YbCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0.36mmol),* $TmCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0.01mmol)*
$NaGdF_4$: Yb (18%): Er (2%)	1:18	Esfera	$GdCl_3 \cdot 6H_2O$ *(1.85mmol),* $YbCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0.36mmol),* $ErCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0. 04mmol)*
$NaGdF_4$: Yb (18%): Er (0.5%)	1:14.96	Hexágono	$GdCl_3 \cdot 6H_2O$ *(1.85mmol),* $YbCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0.36mmol),* $ErCl_3 \cdot 6H_2O$ *(0. 09mmol)*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.9.2 Modificación de la superficie de las nanopartículas sobreconversoras con AET, DMSA y PEG

20 mg de nanopartículas UpCvs β-$NaYF_4$:$Yb_{0.18}Er_{0.02}$ estabilizadas con OA secas se disuelven en 5 mL de HCl (pH 3, 1.0 mM). La disolución se agita al menos durante 3 horas a 30 ºC. Después, para eliminar las moléculas libres de OA que permanecen en la disolución, se añaden 5 mL de dietil éter (tres veces). A continuación, las nanopartículas se precipitan con un exceso de acetona y se centrifugan a 1000 G durante 15 min. El sedimento se redispersa poco a poco en 5 mL de agua que contiene 5 mg/mL (1 mL) del ligando escogido (AET, DMSA o PEG) y se sonican para obtener UpCvs@AET, UpCvs@DMSA y UpCvs@PEG. Las nanopartículas modificadas superficialmente se centrifugaron a 2500 G durante 30 min tres veces para eliminar el exceso de ligando en su superficie. La dispersión final se hizo en agua mili Q y se almacenó en la nevera a 4 ºC.

Por otro lado, para el recubrimiento con PMA de UpCvs β-$NaYF_4$:$Yb_{0.18}Er_{0.02}$, el polímero primeramente se modificó con dodecilamina siguiendo un protocolo previo [8]. Para el recubrimiento, se mezclaron ~ 300 nM, 100 µL de UpCvs en cloroformo con 0.25 M (en concentración monomérica), 150 µL de PMA en cloroformo. Después, el disolvente se evaporó bajo vacío en un rotavapor donde el baño se colocó a la temperatura de 50ºC y velocidad de rotación 100 rpm, el tiempo se ajustó hasta que se dejara secar la muestra, después se añadieron 2 mL de disolución tampón de borato de sodio (SBB, 0.1 M, pH 12). Las muestras se sonicaron hasta que se consiguió una disolución transparente. Las nanopartículas modificadas superficialmente con PMA, UpCvs@PMA, se centrifugaron a 21000 G durante 30 min tres veces para eliminar el exceso de ligando en su superficie. La dispersión final se hizo en agua milli Q y se almacenó en la nevera a 4 ºC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.10 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS NANOPARTÍCULAS SOBRECONVERSORAS

2.10.1 Microscopía de transmisión electrónica, TEM, y de barrido de emisión de campo, FEI-SEM

Las imágenes de TEM y FESEM se obtuvieron depositando una gota de 5 µl de muestra diluida en el disolvente de suspensión (ciclohexano o agua milli Q) de la nanopartícula en rejillas de cobre (400 mesh). Las medidas de TEM se llevaron a cabo con un microscopio de transmisión (JEOL JEM 1011, Japón) con filamento de lantano operando a 120 kV. El equipo empleado en el análisis de las muestras por microscopía de barrido es un FEI-SEM (Ultra plus de ZEISS, Alemania) operando a 20 Kv. Los mapas de superficie de las muestras se obtuvieron usando un detector SE/InLens (detector de electrones secundarios) y/o un EsB/AsB (detector de electrones retrodispersados), en función de la naturaleza de la muestra y de la información que deseamos obtener. El equipo trabaja en ultra alto vacío por lo que las muestras se metalizaron con una capa Ir (Iridio) de espesor 10 nm.

2.10.2 Dispersión dinámica de luz, DLS

Las medidas de DLS se realizaron utilizando un sistema de correlador digital ALV-5000 (ALV5000/E, ALV GmbH, Alemania) equipado con un controlador de temperaturas 25 ºC±0.1 ºC. La luz dispersada se polarizó verticalmente con un láser de estado sólido a 532 nm (2 W). El radio hidrodinámico, R_h, se obtuvo a partir de medidas de DLS de disoluciones diluidas medidas a un ángulo incidente de 90º y analizadas con el algoritmo CONTIN desarrollado por Provencher [2] y la ecuación de Stokes-Einstein mostrada en la ecuación 1 de este Capítulo.

2.10.3 Movilidad electroforética

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El potencial-ζ de las nanopartículas UpCvs se midió usando un Nano ZS (Nanoseries, Malvern Instruments, UK) equipado con un láser de He-Ne de 633 nm trabajando a 4 W de potencia. El equipo mide la movilidad electroforética de las

Nps y las convierte en potencial-ζ utilizando la ecuación clásica de Smolchowski descrita en la ecuación 2 del presente Capítulo.

La estabilidad coloidal de las nanopartículas sobreconversoras β-$NaYF_4$:$Yb_{0.18}Er_{0.02}/Tm_{0.02}$ con las diferentes capas estabilizantes (UpCvs@AET, UpCvs@DMSA, UpCvs@PEG y UpCvs@PMA) se dispersaron en medio que imitaba el fagolisosomal (PSF)+10% suero bovino fetal. Las medidas de tamaño por DLS y el potencial-ζ se tomaron durante 4 días. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.10.4 Espectrometría masas por plasma acoplado inductivamente, ICP-MS

La concentración final y la composición de las nanopartículas sobreconversoras se realizó a través de medidas de ICP-MS (Varían 820-MS, Agilent Technologies, USA). Para la calibración se utilizó una disolución estándar de rodio de Perkin Elmer (10000ppb con varias diluciones en el rango de 200 a 1 ppb en 5% HNO_3). Para ello, 100 µL de muestra disuelta en ciclohexano se evaporaron con una corriente de N_2. Posteriormente se hizo una digestión acida en 4.5 HCl a 2 % v/v. Se midió la concentración en ppb (µg/L) de Y, Yb, Tm y Er. Utilizando la fórmula molecular de la matriz (1 mol Na: 1 mol Y: 4 mol F) y corrigiendo el factor de dilución se determinó la masa total de cada muestra. Posteriormente se determinó la masa de una nanopartícula (Ecuación 16 a, b), el peso molecular de las UpCvs, el número de nanopartículas por litro y su molaridad. Para ello, las Np se consideraron 100% esféricas, y se aplicaron las densidades aparentes para todos los materiales (**Tabla 2.3**):

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2.3 Concentración final y la composición de las nanopartículas sobreconversoras se realizó a través de medidas de ICP-MS

Dopante	ρ_{NaYF4} (g/cm^3)	ρ_{Yb} (g/cm^3)	ρ (g/cm^3)	ρ_{UPCVS}(g/m^3)
Er	4.21	6.98	9.05	4.91E^{06}
Tm	4.21	6.98	9.33	4.95E^{06}

$$m_{Np} = V_{Np} \cdot \rho_{Np} \text{ (ecuación 16a)}$$

$$m_{Np} = \left[\frac{4}{3}\pi \frac{d^2}{2}\right] \cdot [\rho\,(Yb) \cdot Yb\,\% + \rho\,(Dopante) \cdot Dopante\,\% + \rho\,(NaYF_4) \cdot Y\,\%)]$$

(ecuación 16 b)

2.10.5 Difracción de Rayos X, XRD

El estudio de la cristalinidad de las nanopartículas sobreconversoras se llevó a cabo a través de medidas de difracción de Rayos X del polvo cristalino en un difractómetro Philips con una unidad de control modelo PW1710, un goniómetro vertical modelo PW1820/00 y un generador Enraf Nonius Fr590 operando a 40 kV y 30 mA. Los Rayos X se obtuvieron a través de un tubo de cobre sellado y la radiación fue monocromatizada con un monocromador de cobre (λ ($K_{\alpha 1}$= la emisión de rayos X correspondiente a la transición entre el estado fundamental y el primer excitado del blanco que se emplea para generar los rayos $_X$) = 1, 5406 Å). Los difractogramas se obtuvieron en el rango 2θ entre 2º y 75º en pasos de 0.02º cada 2s. Para conseguir los polvos analizados por Rayos X, las muestras se dejaron precipitar para después evaporar en una estufa a 60 °C durante 48 h, obteniendo una película fina de nanopartículas, las cuales fueron molidas en un mortero de ágata para obtener los polvos finos para analizar. Para semicuantificar las fases cristalinas presentes se empleó el método RIR 18, basado en la comparación del difractograma obtenido con difractogramas de materiales estándar de referencia, en cuanto a posición de pico e intensidad.

2.10.6 Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia de las nanopartículas UpCvs se obtuvieron a partir de un espectro de luminiscencia en un espectrofotómetro Mightex (Mightex, Canadá) equipado con un módulo láser externo (10 W) de onda continua (980 nm) de Apollo Instrumets (USA). Las disoluciones de las nanopartículas sobreconversoras a diferentes concentraciones en presencia de 1 mM KF se depositaron dentro de un juego de cubetas de cuarzo dentro de un soporte de portacubetas equipado con entrada de fibra óptica para irradiar directamente la muestra. La luz emitida se filtró con un colimador y se detectó en el espectrofotómetro. Todos los espectros de fluorescencia se midieron a temperatura ambiente.

2.10.7 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y reflectancia total atenuada, ATR-FTIR

Las medidas de ATR-FTIR se realizaron con espectrofotómetro Varian FT-IR 670 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) acoplado a un microscopio de mapeo (Varian 610-IR, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) y a un accesorio de diamante ATR. Las muestras se analizaron en el intervalo entre 400 y 4000 cm^{-1} con una resolución espectral de 4 cm^{-1} y 64 escaneos/min para un total de 100 escaneos por espectro.

2.11 ESTUDIO BIOLÓGICO DE LAS NANOPARTÍCULAS SOBRECONVERSORAS EN CULTIVOS CELULARES

Los estudios biológicos de las nanopartículas sobreconversoras sintetizadas se realizaron en células de cáncer cervical, HeLa y células fibroblastos de embrión de ratón 3T3 Balb en condiciones de cultivo estándar: DMEN suplementado con 10% FBS, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (NEAA), 2 mM L-Glutamina, 1 mM de piruvato sódico, y 1% de penicilina estreptomicina, en atmósfera húmeda, 5% CO_2 a 37 ºC.

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

En ambas líneas celulares, las células se mantuvieron en los contenedores celulares hasta alcanzar una confluencia óptica de ca. 75%-80%, momento en el que procedió a tripsinarlas con 4 mL de una disolución de tripsina-EDTA (3 min, 5% CO_2, 37 ºC). Una vez despegadas del fondo del contenedor, se centrifugaron durante 4 min a 1200 rpm y el sedimento se resuspendió en medio de cultivo que finalmente se volvió a depositar en un nuevo contenedor y/o placas de cultivo para los diferentes experimentos.

2.11.1 Ensayos de viabilidad celular de las nanoplataformas

La citotoxicidad de las diferentes nanopartículas UpCvs sintetizadas, UpCvs@AET, UpCvs@DMSA, UpCvs@PEG yUpCvs@PMA se estudió *in vitro* con el kit de ensayos de citotoxicidad CCK-8. Para ellos se sembraron las diferentes líneas celulares en placas de 96 pocillos (100 µL, $1.0 \cdot 10^4$ células/pocillo) y se cultivaron durante 24 h en condiciones de cultivo estándar. A continuación, se añadieron diferentes concentraciones de nanopartículas UpCvs en medio de cultivo y se incubaron durante 24h y 48 h. El control negativo (blanco) se consideró como pocillos con células, pero sin nanopartículas. Después del período de incubación correspondiente, se eliminó el medio de cultivo, se lavaron las células de cada pocillo con PBS (pH 7.4, 1x) y se añadieron 90 µL de DMEN con 10 µL del reactivo CCK-8. Después de 2 h de incubación, se midió la absorbancia de las muestras a 450 nm con un lector de microplacas Bio-Rad, modelo 689. La viabilidad celular se calculó a través de la ecuación 15 de este Capítulo.

2.11.2 Internalización celular de nanopartículas sobreconversoras

Las líneas celulares se sembraron sobre portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina (12x12 mm^2) colocados en placa de 6 pocillos (2 mL DMEM, $5 \cdot 10^5$ células por pocillo) durante 24 h en condiciones de cultivo estándar. Posteriormente, se añadieron las nanopartículas UpCvs con diferentes recubrimientos (250 µL, ~ 20µg/mL) y se incubaron durante diferentes tiempos para posteriormente lavar las células 3 veces con PBS (pH 7.4, 1x). Se fijaron con paraformaldehído 4% (w/v) durante 10 min, se lavaron otra vez con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100

al 0.2% (w/v), se volvieron a lavar con PBS, se añadió el Bodipy Phalloidin para teñir las membranas celulares con un posterior lavado con PBS y finalmente se tiñeron los núcleos con ProLong Gold antifade DAPI cubriendo las muestras con un cubreobjeto y curándolas 24h a -20 ºC. Las muestras se visualizaron con un microscopio confocal Leica SP5 (Leica Microsystems GmBH, Heidelberg Mannheim, Alemania) con un objetivo 63x, usando el canal azul para el DAPI (λ_{ex} = 350 nm) y el rojo para para el Bodipy Phalloidin (λ_{ex}= 480 nm) y el verde para la emisión de fluorescencia de las nanopartículas (λ_{ex}= 980 nm con una laser de diodo externo acoplado al microscopio).

Además, se estudió la influencia de las distintas capas estabilizantes en el proceso de internalización y eliminación de las nanopartículas UpCvs en las células por medidas de ICP-MS. De forma general, se plantaron 250000 células/pocillo en una placa de 6 pocillos con 2 mL de medio de cultivo. Después de 24 h, el medio se eliminó y se añadieron 50 µg/mL de nanopartículas disueltas en medio. Después de diferentes tiempos de incubación de las nanopartículas, se retiró el medio y las células se lavaron tres veces con PBS (pH 7.4, 1x). Se añadieron 200 µl de tripsina durante 3 min, las muestras se centrifugaron a 5000 G durante 6 min y el sedimento se recolectó en 1 mL de DMEN y se contaron las células. Posteriormente, las células se destruyeron con 200 µL de agua regia durante una noche. Finalmente, las muestras se diluyeron con 2 mL de HCl 2% (v/v) para el análisis de ICP-MS. El equipo utilizado fue un ICP-MS 7700x (Agilent Techologies, USA). Para experimentos de exocitosis, las nanopartículas no internalizadas se eliminaron después de 24 horas de incubación lavando tres veces con PBS y la cantidad de nanopartículas liberadas al medio después de diferentes tiempos se midió por ICP-MS tal y como se describió anteriormente.

2.11.3 Visualización de las nanopartículas sobreconversoras en las líneas celulares por TEM

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las líneas celulares se sembraron en placa de 6 pocillos (2 mL DMEM sin red fenol, $5 \cdot 10^4$ células por pocillo) y crecieron durante 24 h en condiciones de cultivo estándar. Posteriormente, se añadieron las nanopartículas UpCvs (200 µL,

20 µg/mL) y se incubaron durante 6 h para posteriormente lavar las células 3 veces con PBS (pH 7.1, 1x), tripsinizaron y centrifugaron a 1200 rpm durante 4 min. Los sedimentos celulares se embebieron en una matriz de agar, se fotofijaron con tetraóxido de osmio en una disolución tampón cacodilato (1% w/v, 0.1 M) y finalmente se recubrieron con una resina de Eponato (Ted Pella Inc, Redding, CA, USA). Se realizaron cortes ultrafinos con un ultramicrotomo (UltraCut S, Leica Microsystems GmbH, Alemania) y se analizaron por TEM (JEOL JEM 1011, Japón) operando a 120 kV

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.12 REFERENCIAS

[1] V. Á. E. María, DESIGN OF POLYMERIC AND HYBRID NANOSTRUCTURES FOR DRUG DELIVERY AND THERANOSTIC APPLICATIONS, Santiago de Compostela: Universidade de Santiago de Compostela, 2018.

[2] J. M. S. A. &. P. T. R. Stetefeld, «Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences,» *Biophysical Reviews,* vol. 8, nº 4, pp. 409-427, 2016.

[3] D. K. A. W. &. H. M. Roper, «Microscale Heat Transfer Transduced by Surface Plasmon Resonant Gold Nanoparticles,» *J Phys Chem C Nanomater Interfaces,* vol. 111, nº 9, pp. 3636-3641, 2007.

[4] W. A. a. M. H. D. Keith Roper, «Microscale Heat Transfer Transduced by Surface Plasmon Resonant Gold Nanoparticles,» *J. Phys. Chem. C,* vol. 111, nº 9, p. 3636–3641, 2007.

[5] R. P. J. K. R. R. W. A. D. D. B. V. F. G. R. L. K. D. &. M. M. D. Tobin, «argeting myeloid-derived suppressor cells using all-trans retinoic acid in melanoma patients treated with Ipilimumab.,» *International immunopharmacology*, vol. 63, pp. 282-291, 2018.

[6] Z. &. Z. Y. Li, «An efficient and user-friendly method for the synthesis of hexagonal-phase NaYF(4):Yb, Er/Tm nanocrystals with controllable shape and upconversion

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fluorescence.,» *Nanotechnology,* vol. 19, nº 34, p. 345606, 2008.

[7] H. S. &. Z. Y. Qian, «Synthesis of hexagonal-phase core-shell NaYF4 nanocrystals with tunable upconversion fluorescence,» *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids,* vol. 24, nº 21, pp. 12123-12125, 2008.

[8] C. A. S. R. A. L. J. K. Y. T. Y. L. P. Y. Z. M. C. W. H. &. P. W. J. Lin, «Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization,» *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany),* vol. 4, nº 3, pp. 334-341, 2008.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 3

"Trata de no convertirte en un hombre de éxito, sino en un hombre de valor"

Albert Einstein

NANOPLATAFORMA MULTIMODAL BASADA EN AUNRS CON CAPACIDAD FOTOTÉRMICA Y QUIMIOTERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

3.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la administración sistémica de fármacos para el tratamiento de procesos tumorales cancerosos (quimioterapia) [1] es una de las terapias más utilizadas en la práctica clínica [2]. Sin embargo, tal y como se comentó en el Capítulo introductorio de esta Tesis, debido a las altas dosis de fármaco utilizadas y a la duración de los tratamientos, se producen efectos secundarios adversos importantes como: la citotoxicidad en los tejidos sanos como consecuencia de la no especificidad del tratamientos aplicado; la posibilidad de desarrollar resistencia farmacológica; o el no alcanzar la dosi terapéuticas adecuada debido a la pobre difusión y acumulación del fármaco en las zonas tumorales, que presentan una estructura y vascularización característica [1-5].

Además, la imposibilidad, en muchas ocasiones, de realizar una detección temprana de los tumores en sus primeros estadios o de células malignas circulantes en el torrente sanguíneo también contribuye a una importante disminución de la probabilidad de éxito de los tratamientos farmacológicos actuales para los tratamientos contra el cáncer [3], de ahí la necesidad de buscar y desarrollar terapias alternativas novedosas y eficaces.

En este sentido, una estrategia para superar las desventajas anteriormente mencionadas es el uso de nanopartículas metálicas de oro que, de forma simultánea, puedan ser utilizadas como nanotransportadores de fármacos [3,6,7], fotosensibilizadores [4], pequeñas moléculas [5] y/o material genético [6], y como agentes fototérmicos [7] gracias a la posibilidad de controlar su tamaño y morfología y, con ello, sus propiedades ópticas. De este modo, la irradiación lumínica de estas nanopartículas a la longitud de onda en la que se produce su plasmón superficial localizado (LPSR, de sus siglas en inglés) permite la transformación de luz absorbida en calor [8]. Entre los diferentes tipos de nanopartículas (Nps) metálicas, los nanocilindros de oro (gold nanorods en inglés, AuNRs) presentan una estructura anisótropa que favorece su internalización en las estructuras celulares [9], y unas propiedades ópticas características con dos plasmones superficiales localizados, el transversal en la zona del espectro visible y el longitudinal en la región del infrarrojo cercano (NIR), esto es, dentro de la primera ventana biológica. Esto los hace buenos candidatos para ser empleados en terapia fototérmica (PPTT) [10] ya que su elevada sección eficaz de absorción permite reducir tanto la energía necesaria para su estimulación lumínica para el tratamiento fototérmico (tanto para fotoablación cuando la temperatura, T, > 45 ºC, como para la sensibilización térmica del tumor cuando T < 45 ºC) y, por otro, disminuye la acción negativa sobre células sanas que rodean la zona tumoral, tal y como se comentó en el **Capítulo 1**.

Para que los AuNRs puedan ser utilizados en sistemas biológicos y sean potenciales agentes terapéuticos, es necesario, por un lado, hacerlos biocompatibles de modo que se evite la naturaleza tóxica de la capa estabilizante del surfactante CTAB utilizado en su proceso sintético [11] y, por otro, limitar la liberación no específica de los compuestos bioactivos que transporten, así como su eliminación prematura del cuerpo humano por el sistema inmune. Para superar estas limitaciones y, además, conseguir un direccionamiento activo de la nanopartícula hacia las células/tejido tumoral, tal y como se comentó en la **Sección 1.6** del **Capítulo 1,** existen diferentes estrategias para modificar la superficie de la partícula como, por ejemplo, el intercambio de ligandos [12], la adsorción de carácter hidrófobo/electrostático [13, 14], el ensamblaje capa por capa (LbL) [4, 15], el recubrimiento de sílice [16], o recubrimientos poliméricos [17]; de este modo, se

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

permite eliminar y/o enmascarar la capa de CTAB de los AuNRs y, por otro, se pueda alcanzar un direccionamiento específico a través de la funcionalización con de ligandos que se unan a receptores sobreexpresados en las células tumorales, o la liberación controlada del fármaco encapsulado ya sea por estímulos internos (pH, enzimas, temperatura ...) [9, 18] o externos (luz, ultrasonidos, campos eléctricos y magnéticos, etc.) [5, 19, 20] sin comprometer la estabilidad de la nanoplataforma en los fluidos biológicos.

De este modo, en este Capítulo se propone la obtención de un sistema terapéutico multimodal basado en el empleo de AuNRs que permita la combinación simultánea de agentes químicos con terapia fototérmica para el tratamiento de células tumorales con el fin de inducir la muerte celular de manera más efectiva, abriendo nuevos caminos para superar los problemas de quimio-resistencia a los fármacos. Para ello, se sintetizaron AuNRs siguiendo el protocolo descrito en el **Capítulo 2** con plasmones localizados superficiales en el NIR entre ca. 700 y 816 nm para PPTT y tamaños de longitud y ancho entre 32-36 y 8-12 nm (variación de la razón de aspecto, AR (de sus siglas en inglés, de ca. 2,5 a 4,1), respectivamente. Como era de esperar, la generación de calor por efecto fototérmico plasmónico de los diferentes tipos de AuNRs aumenta a medida que su LPSR se acerca a la longitud de onda con la que se irradia, mientras que la pérdida de eficiencia de generación de calor en longitudes de onda fuera de resonancia con el LPSR presenta un decaimiento exponencial, con una pérdida de calor generado del 25% en el caso de un rango fuera de resonancia de 70 nm respecto a la radiación NIR incidente. Por otra parte, los AuNRs se dotaron de estabilidad coloidal y biocompatibilidad funcionalizando su superficie por la técnica de LbL con deposición de capas alternas de los polielectrolitos poli(sulfonato de estireno), PSS, cargado negativamente, y la poli(lisina), PLL, cargado positivamente, y con una capa final de ácido hialurónico (HA) que le confiere a la nanoplataforma capacidades de direccionamiento hacia determinadas células cancerígenas que sobre-expresan el receptor CD44, como las células HeLa de cáncer uterino [21, 22]. Antes de la deposición de la capa de PLL, se incorporó el fármaco anticancerígeno doxorrubicina, DOXO, generando la siguiente nanoplataforma: AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA. La concentración de DOXO encapsulada fue de hasta 350 µg/mL con una eficiencia de encapsulación

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(EE%) del 70% en una única capa. Además, la liberación de la DOXO se observó que es despreciable en los primeros estadios de incubación gracias al empaquetamiento compacto de la capa polimérica que rodea a las nanopartículas, y que se pudo modular a través de dos mecanismos: i) la degradación enzimática de la capa de PLL, y ii) las interacciones entre la capas poliméricas a través de la aplicación externa de luz NIR dando lugar a un perfil característico en forma de escalera que confirma el buen control sobre la difusión del antineoplásico desde la nanoplataforma. El efecto terapéutico bimodal químico y fototérmico fue analizado mediante estudios *in vitro* utilizando células HeLa humanas y células de fibroblastos de ratón 3T3-Balb, confirmándose la selectividad de la nanoplataforma hacia las células cancerígenas debido a la afinidad entre el HA y los receptores CD44 sobreexpresados en las células cancerígenas. Además, se procedió a la elucidación de la ruta de internalización de la nanoplataforma en las dos líneas celulares mencionadas anteriormente, así como el mecanismo de muerte celular inducido en función del tipo de terapia utilizado.

3.2 OBJETIVOS

- Desarrollar nanoplataformas basadas en AuNRs biocompatibles a través de una estrategia de funcionalización de la superficie de estas Nps mediante el uso de polímeros biocompatibles ensamblados por la técnica de LbL.
- Proporcionar a la nanoplataforma una capacidad de direccionamiento activo mediante la incorporación de una capa final de HA que le permita unirse a los receptores CD44 sobre-expresados en la línea celular HeLa de cáncer cervical.
- Estudiar la internalización y la citotoxicidad celular inducida por las plataformas AuNRs/PSS/PLL/HA y AuNRs/PSS/DOXO/PLL en dos líneas celulares: HeLa y 3T3-Balb, determinando la selectividad de la nanoplataforma hacia las células que sobre-expresan los receptores CD44.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Establecer y optimizar los mecanismos de activación que permiten regular los perfiles de liberación del fármaco DOXO en diferentes condiciones fisiológicas y, en particular, mediante activación enzimática y lumínica empleando luz NIR.
- Analizar el efecto combinado de la PPTT y la quimioterapia empleando las plataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA desarrolladas, y evaluando el mecanismo de internalización y muerte celular.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Caracterización de la plataforma metálica

Siguiendo la metodología descrita en el **Capítulo 2** basada en el crecimiento de semillas de 2-3 nm estabilizadas con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y asistido por plata [23], se obtuvieron AuNRs con diferentes relaciones de aspecto, AR, dentro de un rango de tamaño muy pequeño gracias, exclusivamente, a la modificación de las cantidades de iones de plata añadidos a las disoluciones de crecimiento. De este modo, se obtuvieron AuNRs con relaciones de aspecto entre 2,5 y 4,1, tal y como se puede observar en la **Figura 3.1 a-d y Figura 3.3 a-f,** y que son el resultado de ligeros cambios en la longitud y el ancho de las nanopartículas comprendidos entre 32 y 36 nm, y 8 y 12 nm, respectivamente. La **Figura 3.1 g** muestra las frecuencias acumulativas de longitud, ancho y relaciones de aspecto para los diferentes AuNRs obtenidas a partir de medidas de TEM. Por otra parte, el radio hidrodinámico de los AuNRs fue medido a través de DLS obteniéndose valores entre 14.4 ± 0.5 nm y 17.1 ± 0.4 nm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

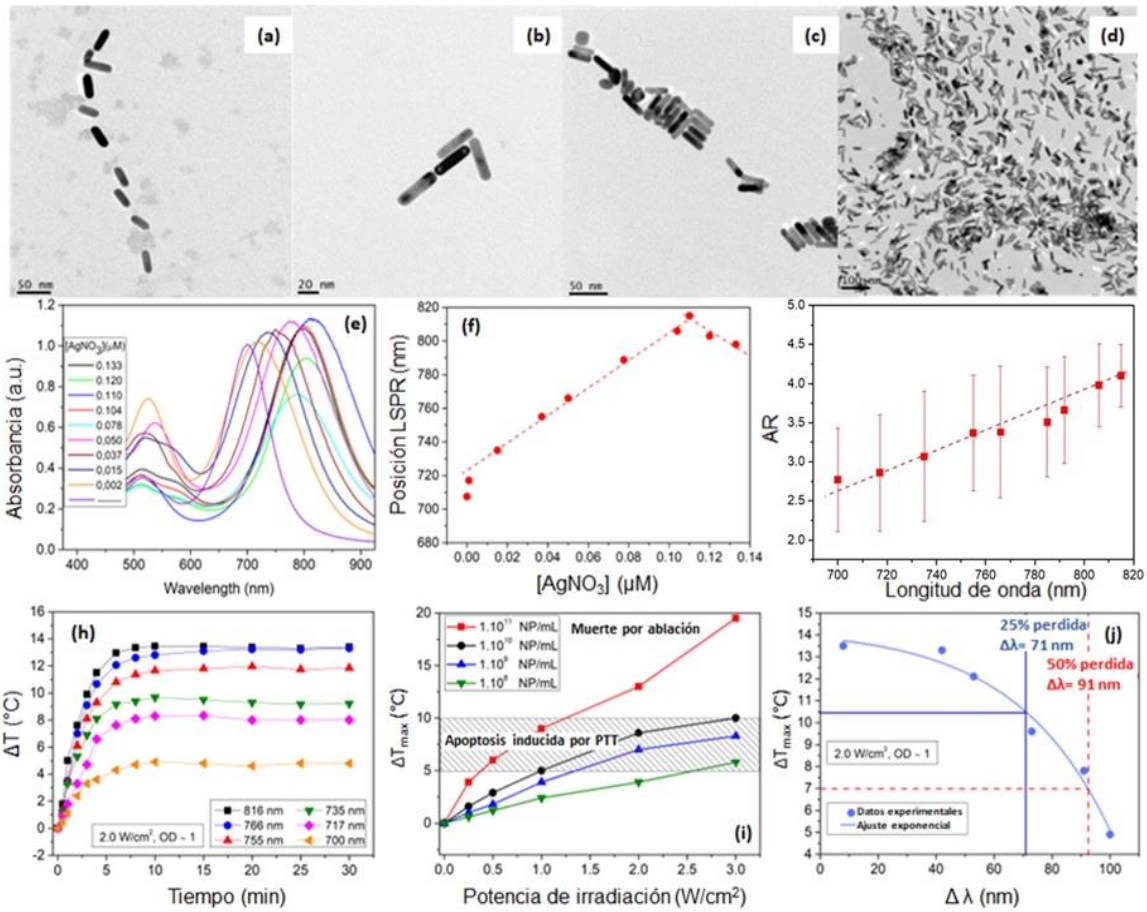


Figura 3.1 Imágenes de TEM de AuNRs con dimensiones: a) 34 × 12, b) 33 × 11, c) 35 × 10, d) 32 × 8 nm, obtenidos después de la adición de 0.015, 0.037, 0.050 y 0.104 μM de $AgNO_3$ al complejo Au-CTAB, respectivamente. Cambios en: e) Espectro de absorción, f) máximo de LSPR y, g) AR de AuNRs después de cambios en la concentración de $AgNO_3$. Las líneas discontinuas son solo guías. En e) se observan los picos típicos de extinción: la banda LSPR transversal muestra ligeros cambios con el AR de los AuNRs (ca. 510 nm), mientras que la longitudinal está desplazada hacia el rojo a medida que aumenta el AR (de 700 a 816 nm). h) Dependencia de la temperatura de la disolución AuNRs@CTAB con la banda LSPR centrada a 816 nm para diferentes concentraciones de nanopartículas bajo iluminación NIR (808 nm, 30 min) a diferentes intensidades. i) Incrementos de temperatura (ΔT) para AuNRs con LSPRs localizados a (■) 816 nm, [33.1 × 8.1 nm], (●) 766 nm [36.6 × 11.1 nm], (▲) 755 nm [34.0 × 10.2 nm], (▼) 735 nm 33.2 × 10.1 nm], (◆) 717 nm [33.5 × 11.9 nm] y (◀) 700 nm [34.4 × 12.4 nm] usando una fuente de láser continua a 808 nm y 2,0 W/cm². J) Pérdida de eficiencia de los AuNRs en función del desplazamiento de la banda LSPR. Este desplazamiento se calcula como $\Delta\lambda = |\lambda_{láser} - \lambda_{SPRL}|$.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En este sentido, es necesario recordar que el análisis de dispersión de luz basado en la relación de Stokes-Einstein y presentado en el **Capítulo 2**, asume que las Nps son esféricas, por lo que los tamaños obtenidos por DLS no se pueden tomar

como reales si no como un promedio entre los anchos y longitudes en todas las posibles orientaciones de las partículas en la disolución [24].

Los rendimientos de las reacciones de las Nps, tomados estos como el número de nanopartículas con AR >1,9 dividido por el número total de nanopartículas medido, fueron del 67%, 64%, 70%, 53%, 89%, 90%, 95% y 96% para los AuNRs con la banda plasmónica longitudinal centrada en 700, 717, 735, 755, 766, 785, 792, 802 y 816 nm, respectivamente (ver **Figura 3.1 e**). Se observa que el incremento en la concentración de iones de oro provoca una mayor anisotropía en las Nps, lo que afecta ligeramente a la longitud de los AuNRs, pero en mayor medida al ancho, lo que lleva a un desplazamiento lineal del LSPR hacia el rojo de hasta ca. 120 nm cuando el AR de los AuNRs varía de 2,5 a 4,1 (**Figura 3.1 f-g**) [25].

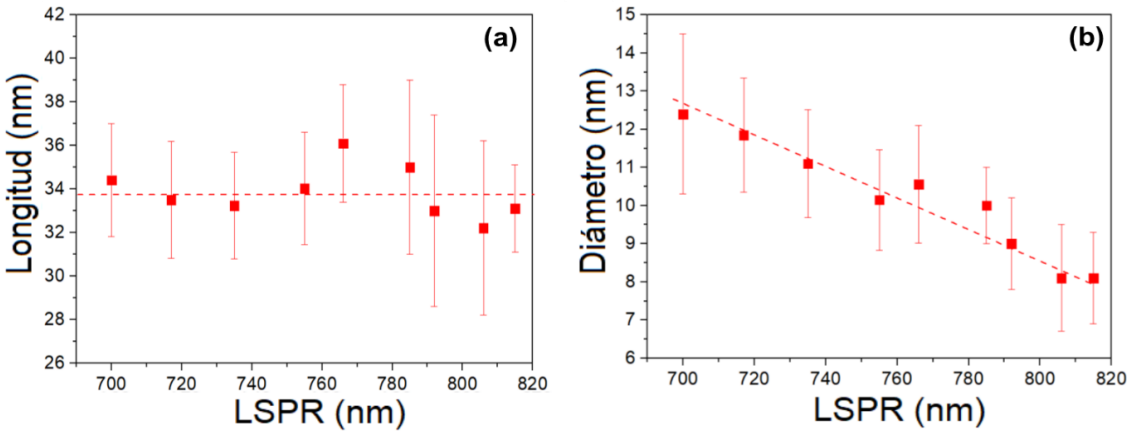


Figura 3.2 Cambios en a) la longitud y b) el ancho de los AuNRs tras variaciones en la concentración de $AgNO_3$ durante la síntesis de los AuNRs.

Burrows *et al.* [26] previamente mostraron que la concentración del nitrato de plata parece tener solo influencia en la longitud de los AuNRs, pero no en su ancho. En nuestros resultados, se observa (**Figura 3.2 a**) por el contrario que la longitud de los AuNRs apenas varía, pero no así el ancho (ver **Figura 3.2 b**) lo que puede ser debido a las micelas de CTAB que rodean los AuNRs, cuya forma y tamaño se ve afectado por diferentes factores como la concentración, la presencia de sales, la temperatura, etc. En este caso, se han empleado concentraciones de surfactante y temperaturas de síntesis superiores a las de estudios previos, lo que es decisivo para las dimensiones finales obtenidas de las Nps [27].

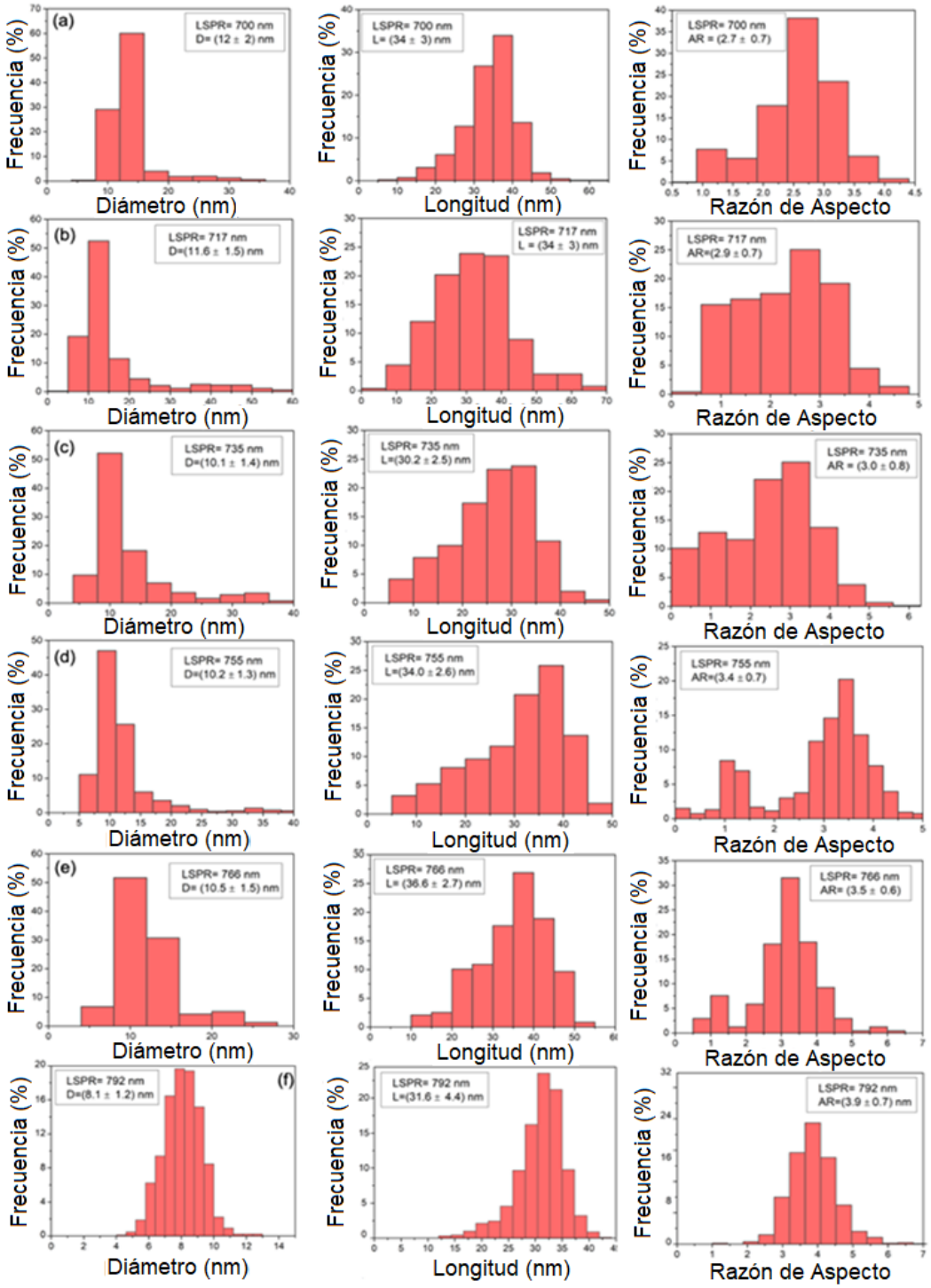


Figura 3.3 Distribuciones de frecuencia de longitud, ancho y AR (de izquierda a derecha) derivadas de mediciones de imágenes de TEM para varios tipos de AuNR obtenidos. Cada fila muestra el LSPR centrado a (a) 700 nm, (b) 717 nm, (c) 735 nm, (d) 755 nm, (e) 766 nm y (f) 792 nm (N = 800). Las mediciones se realizaron utilizando el software ImageJ.

Por otro lado, el incremento de temperatura observado cuando se irradiaron los AuNRs con luz NIR dependió de la concentración y la fluencia de irradiación con variaciones de ca. 0.8 y 5.6 ºC, y 3.2 y 16.0 ºC a 0,25 y 3,0 W/cm^2 a concentraciones de $1 \cdot 10^8$ y $1 \cdot 10^{11}$ Nps/mL, respectivamente (ver **Figura 3.4 a-d**) permitiendo, de este modo, definir las condiciones necesarias para inducir l muerte celular *vía* apoptosis o necrosis a través del efecto fototérmico (**Figura 3.1 h**).

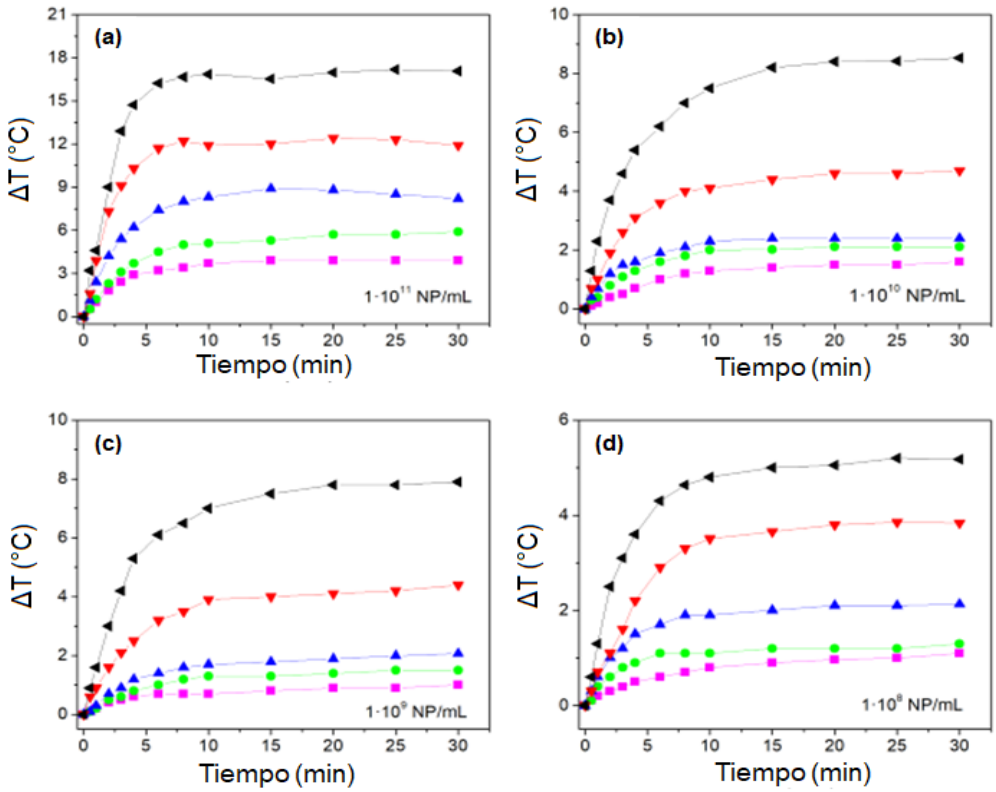


Figura 3.4 Aumentos de temperatura (ΔT) para AuNRs que poseen una banda LSPR centrada en 816 nm en función del tiempo bajo irradiación de luz NIR (808 nm) de intensidades (■) 0.25, (■) 0.5, (▲) 1.0, (▼) 2.0 y (◀) 3,0 W/cm2 para concentraciones de partículas de (a) $1 \cdot 10^{11}$, (b) $1 \cdot 10^{10}$, (c) $1 \cdot 10^9$, (d) $1 \cdot 10^8$ AuNRs/mL. Las líneas son sólo de guía.

También se observó que cuanto más alejados estaban los LSPR de la longitud de onda de excitación en el NIR (808 nm) menor era el incremento de temperatura obtenido (**Figura 3.1 i**). Esto se confirma para los AuNRs con LPSR máximo por debajo de 760 nm; sin embargo, la temperatura macroscópica final para aquellos con el plasmón longitudinal en 766 nm fue similar que para los que la presentan a 816 nm. La pérdida de eficiencia en la generación de calor para los AuNRs fuera de resonancia fue cuantificada mediante la correlación de los incrementos de

temperatura, ΔT, y los desplazamientos de la banda LPSR no resonantes, $\Delta\lambda = |\lambda_{láser} - \lambda_{LSPR}|$.

En la **Figura 3.1 j** se observa un decaimiento exponencial de ΔT a medida que la banda LSPR se desplaza hacia el azul respecto a la longitud de onda de la radiación incidente. De forma sorprendente, aún en el caso de un desplazamiento hacia el azul de la banda LSPR respecto a la radiación incidente de 70 nm, únicamente se observó una diferencia de temperatura de 3 ºC lográndose, por ello, una muy buena actividad fototérmica fuera de la resonancia de los AuNRs en este rango. Para obtener valores de variaciones de temperatura similares utilizando AuNRs con menor LSPR máximo ($\Delta\lambda > 70$ nm), se necesitaron grandes incrementos en la concentración de Nps o en la fluencia de la irradiación, lo que puede impedir su uso en aplicaciones terapéuticas fototérmicas [28].

Para analizar en mayor detalle el calor fototérmico generado por los AuNRs, se desarrolló una simulación computacional de los perfiles de distribución de calor debido a la excitación de un AuNR con LPSR centrado en 802 nm y dimensiones 33 × 9 nm bajo una fluencia de irradiación de 1,0 W/cm^2 en NIR a 808 nm. Para la simulación, inicialmente el AuNR se irradió con luz de diferentes polarizaciones y se recogieron los espectros de la eficacia de absorción y la correspondiente energía emitida, tal y como muestra la **Figura 3.5 a-b**.

Ambos espectros muestran un máximo en la longitud de onda del NIR cuando la polarización de la luz coincide con la dirección longitudinal de las Nps, y que decrece progresivamente a medida que la polarización cambia. Esto también se refleja en el mapa de liberación de energía, que muestra que la energía calorífica se libera al medio circundante del AuNR cuando este es iluminado longitudinalmente a lo largo de su eje mayor, en contraste con lo que sucede cuando este se irradia transversalmente. Además, en el primer caso la energía se libera a lo largo de toda la Np, pero ligeramente más concentrada en el medio de esta mientras que, en el último caso, la energía que se difunde fuera de la partícula sólo se observa en el centro del AuNR, pero no en sus bordes como se muestra en la **Figura 3.6 a-b**.

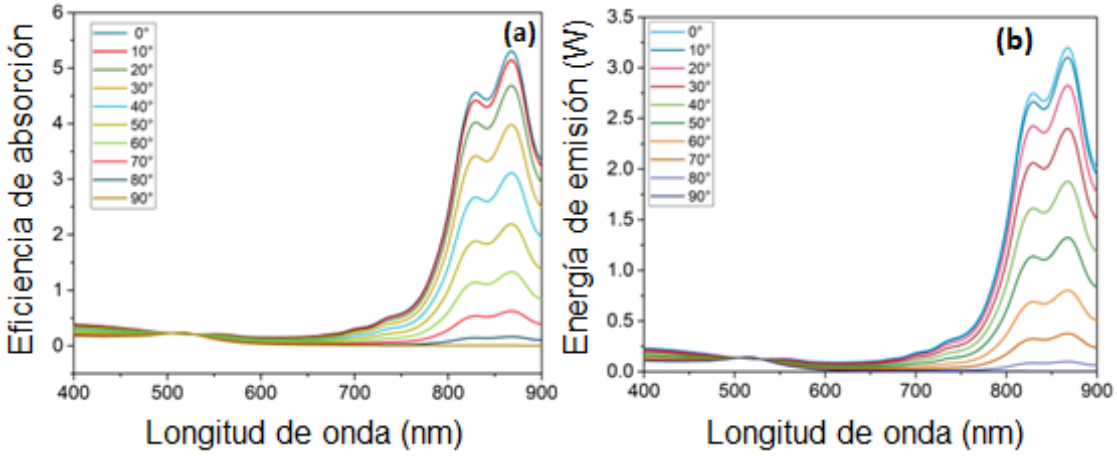


Figura 3.5 Eficiencia de absorción (calculada como la razón entre la sección transversal de absorción y la sección transversal geométrica), y b) emisión de energía bajo irradiación láser en el NIR (1,0 W/cm^2 a 808 nm, 5 min).

Esto también se puede confirmar con los mapas de difusión de calor obtenidos a 5 y 25 nm de la Np. En la **Figura 3.6 c** se observa que el incremento de temperatura en los alrededores de los AuNRs aumenta hasta 60 ºC cuando la partícula se irradia longitudinalmente a una distancia de 5 nm, y el mapa de calor muestra un perfil elongado similar al de la Np. Además, el incremento de temperatura es más uniforme en los bordes de la partícula que en su centro, probablemente como consecuencia de la energía proveniente de las vibraciones de la red cristalina desde el centro hasta los extremos de la Np donde hay una tensión de red más grande [29, 30], lo que lleva a una liberación de calor ligeramente mayor. Por el contrario, cuando la partícula se irradia transversalmente, el mapa de calor es casi esférico y con aumentos máximos de temperatura hasta ca. 0.03 ºC (**Figura 3.6 d**). En el caso de una distancia a la Np de 25 nm, se observa un comportamiento/perfil similar, pero alcanzando temperaturas menores (**Figura 3.6 e-f**).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

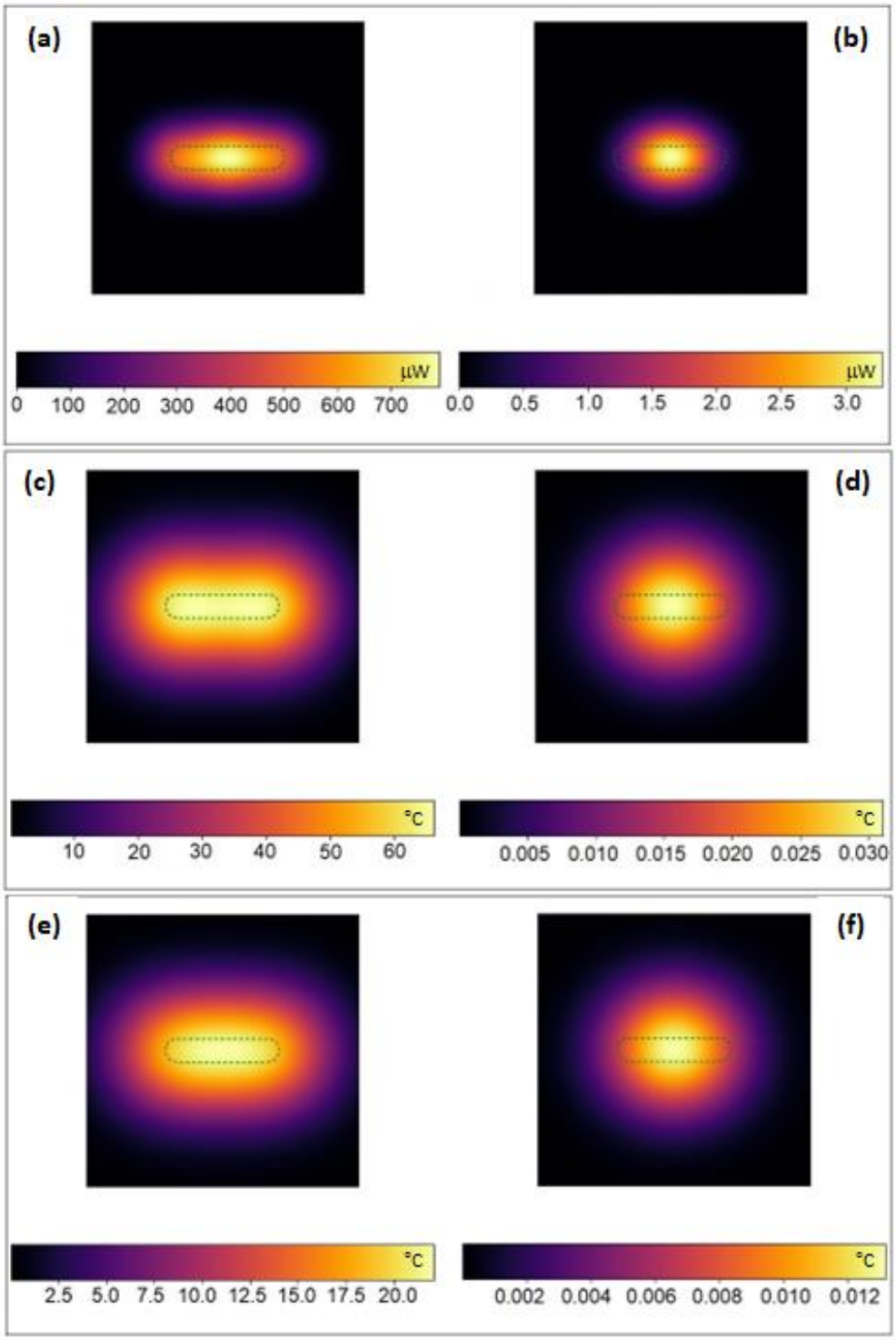


Figura 3.6 Mapa de liberación de energía para un AuNR iluminado con luz láser a 808 nm a 1,0 W/cm² durante 5 min con polarización a a) 0º y b) 90º. Mapas de calor para un AuNR iluminado a 808 nm a 1,0 W/cm² durante 5 min con polarización a c, e) 0º y d, f) 90º a una distancia de la partícula de c, d) 5 nm y e, f) 25 nm a lo largo del plano perpendicular de la Np.

3.3.2 Funcionalización, estabilidad coloidal y conversión fototérmica de las plataformas metálicas

Para conseguir una conversión fototérmica óptima pero dentro de los límites de concentración y fluencia tolerables y biocompatibles, se escogieron los AuNRs con LPSR centrado en 802 nm y dimensiones 32 × 8 nm para continuar con el trabajo, ya que se esperaba un desplazamiento hacia el rojo de la banda LPSR después de la funcionalización de las Nps, y que debería ser próxima a la longitud de onda del láser continuo (808 nm) que se utilizó en los diferentes experimentos mientras se mantiene la sección transversal de absorción.

Siguiendo el protocolo descrito en la sección **1.3.2** del **Capítulo 2**, la funcionalización de los AuNRs se realizó a través del método de capa a capa (LbL) usando la deposición secuencial de las capas de polielectrolito (PE) por interacciones electrostáticas: aniónica PSS, catiónica DOXO, catiónica PLL y aniónica HA, obteniéndose, así, AuNRs recubiertos por PSS/DOXO/PLL/HA, AuNrs/PSS/DOXO/PLL/HA.

La confirmación de la correcta formación de las diferentes capas se obtuvo a partir de medidas de espectroscopía UV-Vis en las que se observan pequeños desplazamientos de la banda LPSR hacia el rojo (**Figura 3.7 a-b**) y cambios en los potenciales ξ de positivo a negativo y viceversa en función de la capa depositada (**Figura 3.7 c**).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

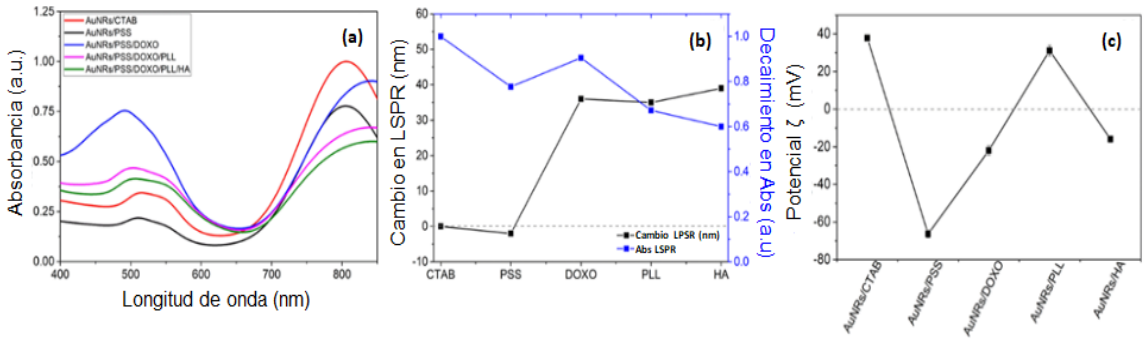


Figura 3.7 Espectro UV-Vis de la nanoplataforma basada en AuNRs tras la adición de las distintas capas por el método LbL; (b) desplazamientos del LSPR y el decaimiento de la absorbancia tras cada capa depositada; (c) valores del potencial ζ tras cada capa añadida.

Los espectros de FTIR también confirmaron el recubrimiento adecuado de los AuNRs con las capas poliméricas, tal y como se puede observar en **la Figura 3.8**. En ella, se recogen los modos vibracionales característicos de la DOXO libre, los AuNRs estabilizados con CTAB y la nanoplataforma completa con los AuNRs estabilizados con las capas alternas de PSS/DOXO/PLL/HA. La DOXO libre presenta modos vibracionales característicos en: 584 cm^{-1} (grupos alquino), 1016 cm^{-1} (grupo aromático C-H), 1047 cm^{-1} (grupos carboxilo C=O), 1548 cm^{-1} (grupos alquileno C=C); 1712 cm^{-1} (grupos carbonilos C=O), 2024 cm^{-1} (grupos amino NH_3), 1643 cm^{-1} y 2925 cm^{-1} (aminas y aminas cargadas $C=NH^+$) y a 3559 cm^{-1} (estiramientos de grupos hidroxilo OH-H).

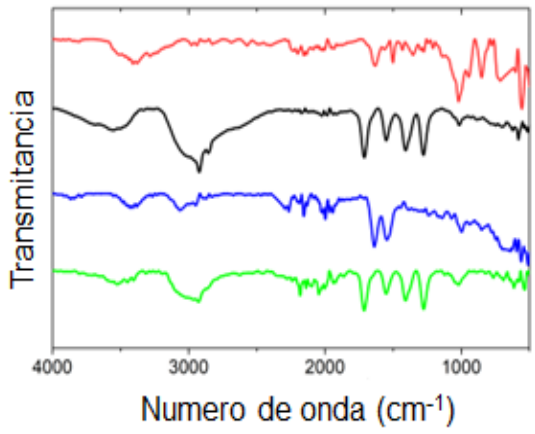


Figura 3.8 Espectros FTIR de (–) DOXO libre y AuNRs recubiertos con (–) CTAB; (–) PSS/PLL y (–) PSS/DOXO/PLL/HA.

Por el contrario, el espectro de FTIR de la nanoplataforma completa presenta los modos vibracionales característicos de la DOXO, pero ligeramente desplazados respecto al espectro de la DOXO libre (a 1407, 1550, 1712, 2867 y 2929 cm^{-1}) [31].

Para conseguir un tamaño y estabilidad coloidal adecuados, así como un aumento y optimización de la carga de DOXO durante el proceso de síntesis, se añadieron las capas de polielectrolito en presencia de diferentes concentraciones de sal entre 0 y 12 mM NaCl a pH 4.1 con el fin de controlar la fuerza iónica. Una vez establecida la fuerza iónica adecuada, se modificó ligeramente la composición de la disolución ácida en diferentes disoluciones tampón: ácido acético, ácido acético/KOH y KOH equilibrado con HCl (**Figura 3.9 a-h**). En artículos previos [32], únicamente se logró encapsular un máximo de 300 µg de DOXO sin comprometer la estabilidad de los AuNRs, alcanzando una eficiencia de encapsulación (EE%) de ca. 25% en varias deposiciones sucesivas. En este caso, la presencia de KOH en condiciones ácidas (pH 4.1) favoreció la estabilidad de la nanoplataforma y permitió la incorporación de hasta 350 µg, con una EE% de ca. 70% en un único paso.

En estas condiciones, la deposición secuencial de las distintas capas poliméricas y el fármaco provoca ligeros incrementos de tamaño, pero sin signos de agregación (**Figura 3.10 a-c**). Para las disoluciones tampón de ácido acético y ácido acético/KOH a pH 4.1, las cargas de fármaco fueron de ca. 298 y 309 µg con EE% de 60 y 62%, respectivamente. Por su parte, la disolución acuosa con KOH a pH 4.1 mantuvo la estabilidad del fármaco encapsulado en la nanoplataforma, tal y como muestra el valor constante de la carga superficial y absorbancia óptica de la DOXO a ca. 480-485 nm con el tiempo. En el caso de las otras disoluciones tampón se observaron importantes cambios ópticos y eléctricos, tal y como muestran las **Figuras 3.9 c-h**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

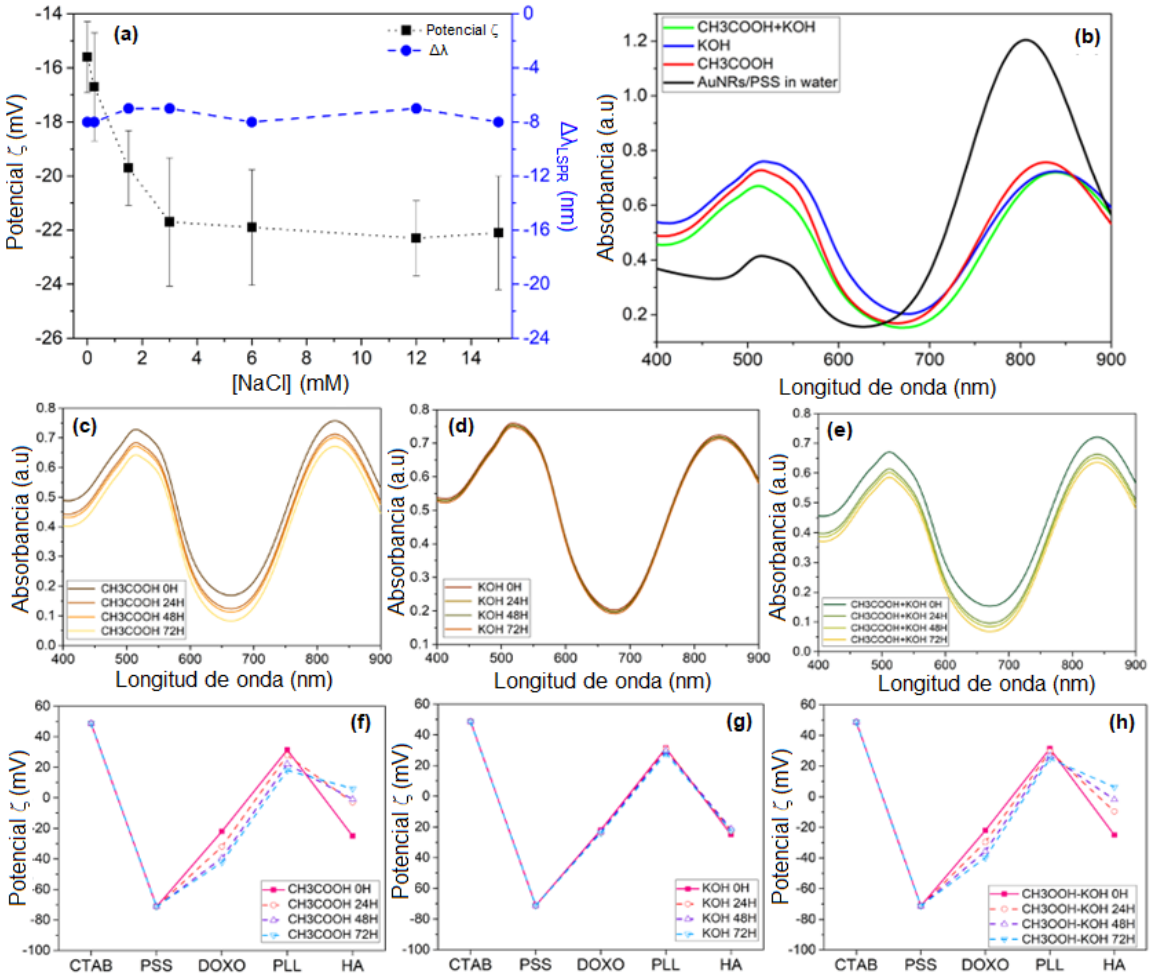


Figura 3.9 Potenciales ζ (■) y cambios del LSPR (●) de AuNRs/PSS a diferentes concentraciones de NaCl. Las líneas punteadas y discontinuas son solo para guiar el ojo. (b) Espectros UV-Vis de AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA a diferentes condiciones de disolución para la encapsulación/recubrimiento con el fármaco. Estabilidad temporal del recubrimiento de DOXO en AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA a diferentes condiciones de la disolución para la carga de fármaco y tiempos de incubación según se determina por (c-e) UV-Vis y (f-h) potencial ζ.

Las nanoplataformas basadas en AuNRs fueron coloidalmente estables a largos tiempos de incubación a pH básico y fisiológico, 9.0 y 7.4, respectivamente, siendo ligeramente más inestables bajo condiciones ácidas como muestra el progresivo incremento de su tamaño (**Figura 3.10 d**) y las variaciones observadas en los valores del potencial ζ (**Figura 3.11 a, b)** dentro de las primeras 48 h de incubación. Este comportamiento puede ser debido a la reducida ionización de los grupos carboxilos cargados negativamente del PSS y HA, de forma que se disminuyen las interacciones electrostáticas atractivas con la capa positiva de PLL.

La presencia de proteínas séricas también provocó ciertos incrementos en el tamaño de las nanoplataformas como consecuencia de la formación de una corona proteica en los primeros momentos del proceso de incubación, lo que pudo dar lugar a la formación de algunos clústeres de nanoplataformas, como se observa en la distribución de tamaños obtenida por DLS (**Figura 3.10 a, f**). Por otro lado, la incubación con una proteasa como la tripsina debería degradar progresivamente la capa de PLL, permitiendo la liberación activada del fármaco de forma endógena. Sin embargo, para que este mecanismo de liberación sea realmente efectivo la estabilidad de la nanoplataforma se debería mantener. La **Figura 3.10 f** y la **Figura 3.11 c** muestran que cuando se añade la proteasa a la disolución de las nanoplataformas no se producen cambios importantes en cuanto a su tamaño y sí pequeñas variaciones del potencial ζ después de los primeros días de incubación, si se compara con los resultados en ausencia de la proteasa. Este comportamiento confirma el papel protector que juega la capa externa de HA que impide el contacto directo de la enzima con la capa de PLL y que se mantiene durante las primeras 96 h de incubación, en las cuales se produce una estabilización de la superficie de las nanoplataformas mediante la adsorción adicional de proteínas del suero suplementado. Sin embargo, a mayores tiempos de incubación (> 4 días), la biodegradación de la capa polimérica de PLL podría ser importante, dando lugar a una desestabilización completa de esta capa generando, pues, la formación de clústeres de partículas, como muestran los cambios en el tamaño de las nanoplataformas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

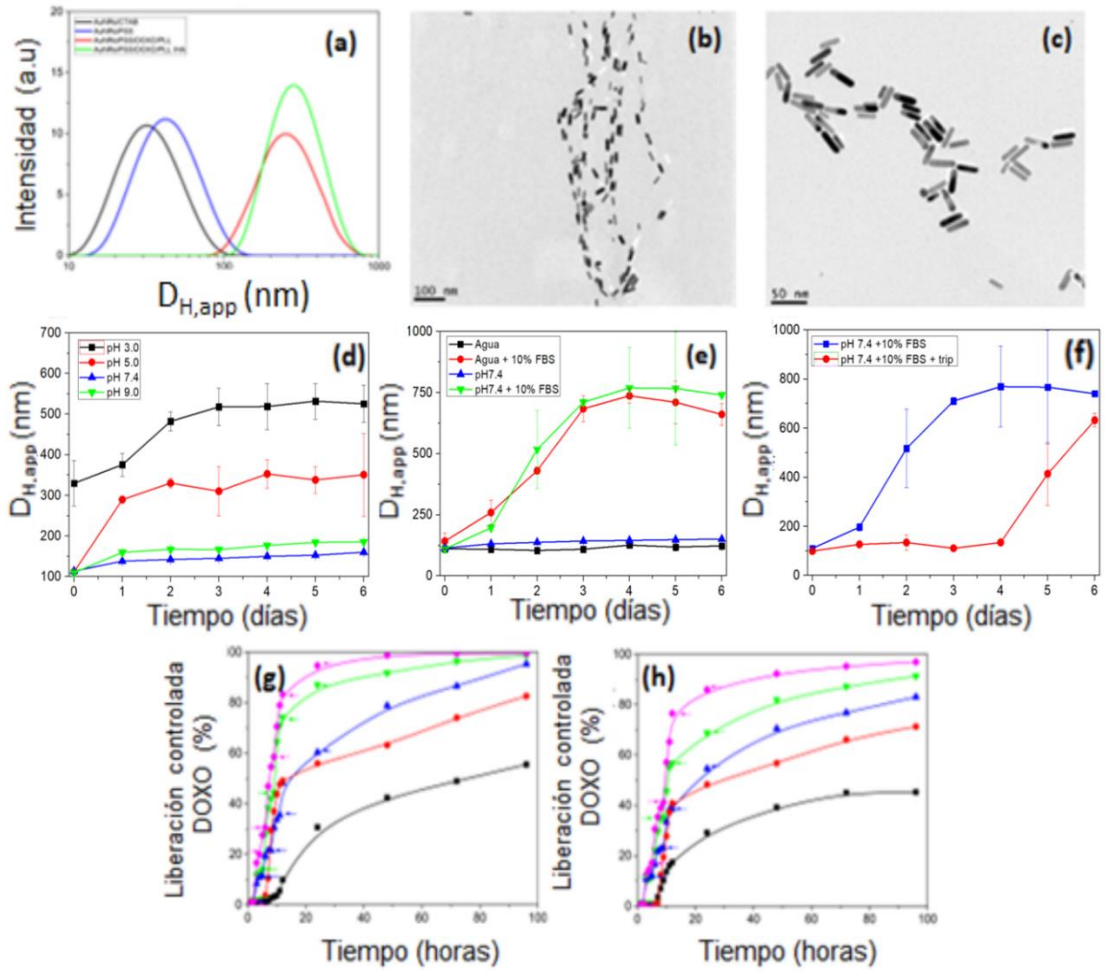


Figura 3.10 a) Cambios en las distribuciones de tamaño de población de AuNRs después de los diferentes pasos del recubrimiento polimérico. Imágenes TEM de b) AuNRs recubiertos con CTAB y c) PSS/DOXO/PLL/HA. Estabilidad coloidal de AuNRs recubiertos con PSS/PLL/HA mediante la monitorización de la evolución temporal de sus tamaños hidrodinámicos a (d) pH diferente, (e) en ausencia y presencia de suero fetal, y (e) en ausencia y presencia de tripsina a 37ºC. Las muestras se diluyeron en tampones de pH 3,0 (■), 5,0 (●), 7,4 (▲) y 9,0 (▼). Perfiles de liberación de DOXO desde AuNRs recubiertos con PSS/DOXO/PLL/HA a (g) pH 5,0 y (h) 7,4 en ausencia (■), o en presencia de tripsina (●), luz NIR de 808 nm (1,0 W/cm^2, 5 min, a las 2, 5, 9, 12 y 24 h (▲), tripsina + luz NIR de 1,0 W/cm^2 (tiempos similares (▼) y 2,0 W/cm^2 (puntos similares de tiempo). Las barras de errores en los gráficos de liberación no se muestran para mayor claridad, pero las incertidumbres están por debajo del 15 %. Las flechas indican el punto de tiempo de la aplicación de la luz NIR.

A continuación, se evaluó la eficiencia de conversión fototérmica de las plataformas. Para ello, se realizaron tres ciclos consecutivos de calentamiento-enfriamiento con una disolución de AuNRs de concentración 1.0 10^{11} Nps/mL a diferentes fluencias (1,0; 2,0 y 3,0 W/cm^2) durante varios minutos (ver **Figura 3.12**

a). Así, se observó que después de sucesivos ciclos de irradiación la nanoplataforma no experimentó cambios en sus bandas plasmónicas transversal y longitudinal (**Figura 3.12 b**), lo que se correlaciona con la ausencia de cambios morfológicos importantes en las partículas (**Figura 3.12 c**).

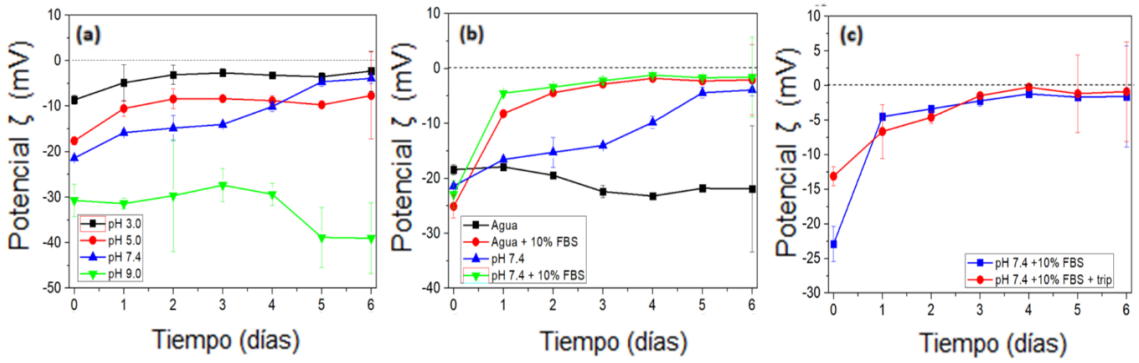


Figura 3.11 Estabilidad coloidal de AuNRs recubiertos con PSS/PLL/HA mediante la monitorización de la evolución temporal de su carga superficial a: (a) pH diferente, (b) en ausencia y presencia de suero fetal, y (c) en ausencia y presencia de tripsina a 37 ºC. Las muestras se diluyeron en disoluciones tampón de pH 3,0 (■), 5,0 (●), 7,4 (▲) y 9,0 (▼).

Los perfiles de calentamiento mostraron un pronunciado incremento de la temperatura de la disolución durante los primeros minutos de irradiación, seguidos de una fase casi constante cuando el calor generado por la luz irradiada y la energía disipada en los alrededores de la nanoplataforma alcanzan el equilibrio. A la mayor fluencia aplicada (3,0 W/cm^2) se observó que la máxima temperatura alcanzada durante el tercer ciclo es ligeramente inferior al obtenido con las fluencias más pequeñas, probablemente debido a una posible modificación de la forma y/o la desestabilización de la capa polimérica [33] de la Np. Además, el perfil de calentamiento pareció mostrar un hombro a tiempos cortos de incubación, probablemente causado por la liberación de calor inicial que satura la disolución y que promueve cierta evaporación dentro del tubo de ensayo.

Por otro lado, después de apagar la luz de láser, la temperatura de la disolución decrece exponencialmente hasta alcanzar el valor inicial. La eficiencia de la conversión fototérmica, η, y la razón característica de la velocidad de calor, τ_s, después de los ciclos de irradiación se determinó usando el modelo de transferencia de calor desarrollado por Roper *et al.* [34].

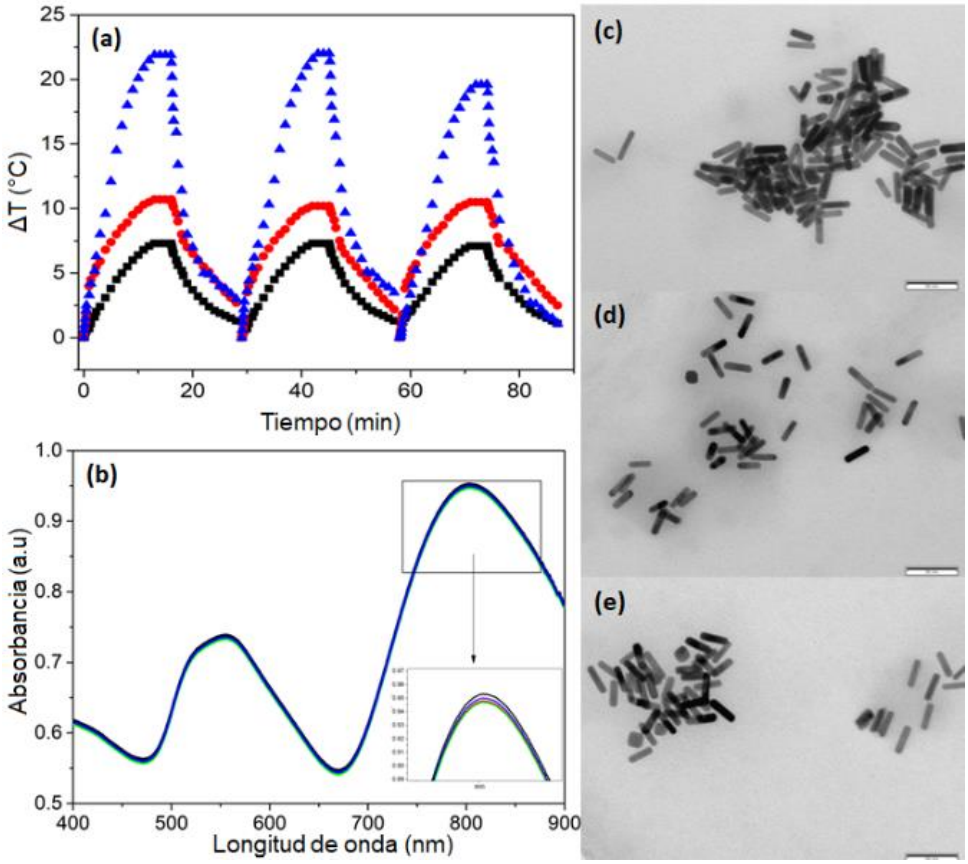


Figura 3.12 (a) Incrementos de temperatura después de ciclos de irradiación sucesivos a (■), 1,0 (●), 2,0 (▲) y 3,0 W/cm^2 usando una luz láser NIR de 808 nm. (b) Espectros UV-Vis de AuNRs recubiertos con PSS/PLL/HA después de (–) 0, (–) 1, (–) 2 y (–) 3 ciclos de irradiación con una fluencia de 2,0 W/cm^2. Imágenes TEM de AuNRs recubiertos con PSS/PLL/HA después de (c) 1, (d) 2 y (e) 3 ciclos de irradiación. La barra de la escala es de 50 nm.

Cabe mencionar que η es una propiedad intrínseca de la Np, es decir, depende tanto de su morfología como de su composición, mientras que τ_s depende de la configuración experimental, esto es, de las dimensiones de la celda de medida y del volumen de la disolución [35]. Los valores de η obtenidos se encuentran en el rango de 0,41-0,45, 0,60-0,71 y 0,40-0,55 a 1,0, 2,0 y 3,0 W/cm^2 para los diferentes ciclos de irradiación, y se encuentran en consonancia con resultados previos publicados, como, por ejemplo, Pattani *et al.* [36] and Cole *et al.* [35] quienes han publicado eficiencias de conversión fototérmica de ca. 0.50 y 0.55 para AuNRs con dimensiones de 26 × 7 nm y 44 × 13 nm con máximos de la banda plasmónica longitudinal localizadas a 770 nm y 780 nm, respectivamente (ver **Tabla 3.1**). Además, cabe comentar que los valores de η disminuyeron progresivamente con el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

número de ciclos de irradiación aplicados a una fluencia de 3,0 W/cm^2, lo que está de acuerdo con el perfil de calentamiento observado y la existencia de cierta fusión de las bordes de los AuNRs (**Figura 3.12 e**).

Tabla 3.1 Eficiencia de conversión fototérmica, η, y razón característica de velocidad del calor, τ_s, de disoluciones de AuNRs a diferentes fluencias y ciclos de calentamiento-enfriamiento.

Fluencia (W/cm^2)		η	τ_s (seg)
1.0	Ciclo 1	0.45±0.01	9.01±0.58
	Ciclo 2	0.46±0.02	8.95±0.55
	Ciclo 3	0.44±0.02	9.23±0.62
2.0	Ciclo 1	0.67±0.04	3.90±0.28
	Ciclo 2	0.65±0.03	4.05±0.29
	Ciclo 3	0.68±0.09	3.80±0.28
3.0	Ciclo 1	0.55±0.03	7.84±0.61
	Ciclo 2	0.56±0.04	8.01±0.91
	Ciclo 3	0.49±0.03	7.19±0.80

3.3.3 Perfiles de liberación de la DOXO

Posteriormente, se estudió la cinética de liberación de la DOXO incorporada en las nanoplataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA en un medio que imitaba el fisiológico con un 50% (v/v) de FBS a pHs 7,4 y 5,0 en presencia de estímulos simultáneos, uno interno de carácter enzimático y otro externo de carácter lumínico. Los perfiles obtenidos mostrando una forma de escalera, particularmente, a tiempos de incubación inferiores a 15 h (**Figuras 3.10 g, h**). Este comportamiento es consecuencia del desarrollo de pequeñas liberaciones de fármaco después de la aplicación de los estímulos de luz NIR a 1,0 y 2,0 W/cm^2 durante 5 minutos tras 2, 5, 9, 12 y 24 h de incubación. A tiempos largos de incubación (> 15 h), los perfiles

de liberación se estabilizan progresivamente hasta llegar a una fase de liberación más sostenida, ya que la mayor parte del fármaco ya se liberó de la nanoplataforma como consecuencia de la alteración del recubrimiento polimérico por degradación térmica y enzimática. Se observó también que la combinación de la proteasa y el estímulo de luz genera una cinética de liberación más rápida comparada con la obtenida tras la aplicación individual de los estímulos realizada como control. Esta liberación combinada se caracteriza por una mayor liberación del fármaco dentro del intervalo de tiempo entre 5 y 24 h de incubación, en el cual se obtuvo una liberación de ca. 83% y 71% bajo irradiación NIR de 1,0 W/cm^2 a pH 7.4 y 5.0, respectivamente y de ca. 100% y 96% tras irradiaciones de 2,0 W/cm^2 a pHs 7.4 y 5.0, respectivamente. Estos valores contrastan con los valores de DOXO liberada de ca. 46% y 53%, y 55% y 60% obtenidos en presencia exclusiva de tripsina o radiación NIR (1,0 W/cm^2) a ambos pH, respectivamente. Además, la presencia del estímulo externo de luz hace desaparecer la fase inicial de retardo que se observa en el perfil de liberación a tiempos de incubación cortos, permitiendo un control sobre la concentración de fármaco liberada en los estadios iniciales (hasta ca. 12 h), y que puede ser muy útil para alcanzar la concentración terapéutica a demanda. Desafortunadamente, ese control no se puede mantener de manera tan exacta a tiempos mayores debido a la progresiva desestabilización de la cubierta polimérica de la nanoplataforma. En este sentido, la radiación de luz sirve para generar calor localizado que ayuda a modificar en gran medida las interacciones PE-fármaco, lo que facilita la liberación de la DOXO [37]. Y esa modificación es más efectiva cuando se combina con la acción de la tripsina, que ataca los enlaces peptídicos y, así, progresivamente degrada la capa de PLL (**Figura 3.10 g, h**).

3.3.4 Evaluación biológica in vitro

A pesar de que los AuNRs recubiertos con CTAB son tóxicos para las células en todo el rango de concentraciones, los recubiertos con las capas de PSS/PLL/HA presentan un viabilidad celular dependiente de la concentración, tal y como se comprobó en células de cáncer cervical HeLa y células fibroblastos de ratón no cancerígenas 3T3-Balb, obteniéndose una supervivencia celular del alrededor del 60% y 75% para concentraciones por debajo de $5 \cdot 10^{10}$ Nps/ml después de 24 y 48

h de incubación, como demuestran los experimentos con el kit de citotoxicidad CCK-8 que se muestran en la **Figura 3.13** y que están de acuerdo con resultados previos [32]. Por lo tanto, la estrategia del recubrimiento polimérico de los AuNRs les confiere estabilidad y biocompatibilidad evitando la desorción del posible CTAB que pudiese permanecer en la superficie de la Np.

El siguiente paso fue comprobar la nanoplataforma completa, AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA como posible nanosistema susceptible de ser empleado para terapia combinada química y fototérmica con el objetivo discernir, por un lado, la contribución de cada tratamiento de forma individual a la actividad terapéutica y el mecanismo de muerte celular de cada uno de ellos y, por otro, comprobar el carácter aditivo o sinérgico de la terapia bimodal aplicada.

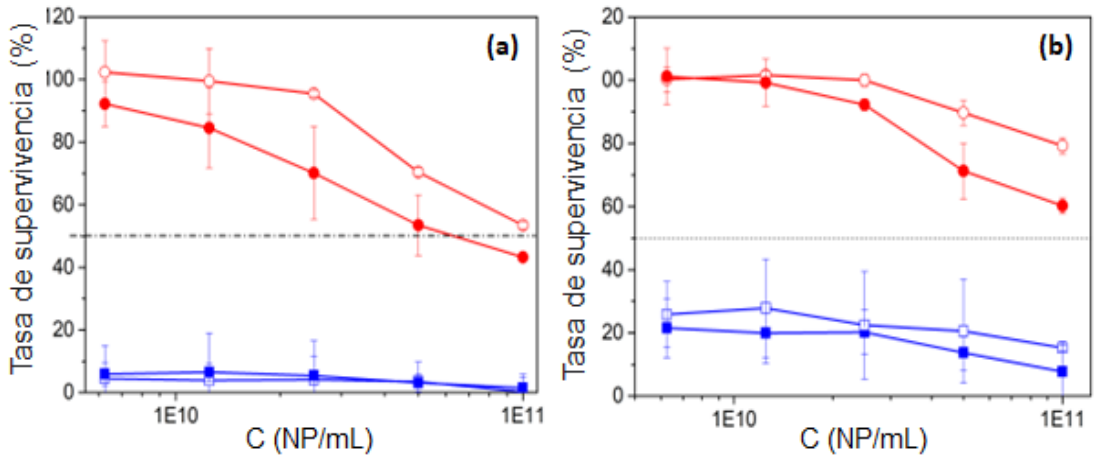


Figura 3.13 Toxicidad celular expresada en función de razón de supervivencia para AuNRs recubiertos con (■, □) CTAB y (●, ○) PSS/PLL/HA a) células de tumor cervical HeLa, y b) fibroblastos murinos 3T3-Balb después de 24 (símbolos abiertos) y 48 h (símbolos cerrados) de incubación, respectivamente.

Para ello, se realizaron experimentos de citotoxicidad con el kit de CCK-8 a dos tiempos de incubación (24 y 48 h) y diferentes temperaturas (4, 25 y 37 ºC), con el fin de desacoplar el efecto de la terapia química con la DOXO y el efecto macroscópico fototérmico consecuencia de la irradiación de las nanoplataformas con luz NIR de 808 nm (5 min, 1,0 ó 2,0 W/cm^2) [38].También es interesante comentar que las células HeLa presentan en la superficie de su membrana una gran sobreexpresión de receptores CD44 que interaccionan de forma específica con él HA [39-41] a diferencia de los fibroblastos, que no expresan este tipo de receptores

en su superficie, resaltando de este modo el papel del direccionamiento activo en la actividad terapéutica inducida.

Las **Figura 3.14 a, b** presentan los experimentos de citotoxicidad de: i) DOXO libre como control positivo; ii) las Nps sin carga de fármaco, AuNRs/PSS/PLL/HA, y AuNRs/PSS/DOXO para la inhibición del crecimiento celular con el fármaco expuesto directamente al medio fisiológico, como controles adicionales; y iii) la plataforma completa AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA a dos concentraciones de DOXO, 75 y 100 μg, en ausencia y presencia de luz NIR en ambas líneas celulares, respectivamente. En las **Figuras 3.14 a, b y 3.15 a-h** se observa (ya sea en ausencia o presencia de irradiación) que la DOXO libre indujo una toxicidad mayor en la línea HeLa que en la 3T3 Balb debido a la mayor actividad metabólica de las primeras, y estas toxicidades fueron más importantes tras 48 h de incubación como consecuencia de la saturación de la actividad citostática del fármaco.

Además, la mortalidad celular también aumentó, en el caso de las células HeLa, con el tiempo de incubación hasta ca. 12-18% después de 48 h en ausencia de irradiación a 37 º C (**Figura 3.15**). Por el contrario, la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL/HA fue no tóxica en ambas líneas celulares (viabilidad > 90%), excepto para la línea HeLa en presencia de irradiación NIR a una fluencia 2.0 W/cm^2 para la que se observó una reducción de la viabilidad celular hasta un 80% y un 70 % a 24 y 48 h de incubación, respectivamente consecuencia de la generación del efecto fototérmico plasmónico.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

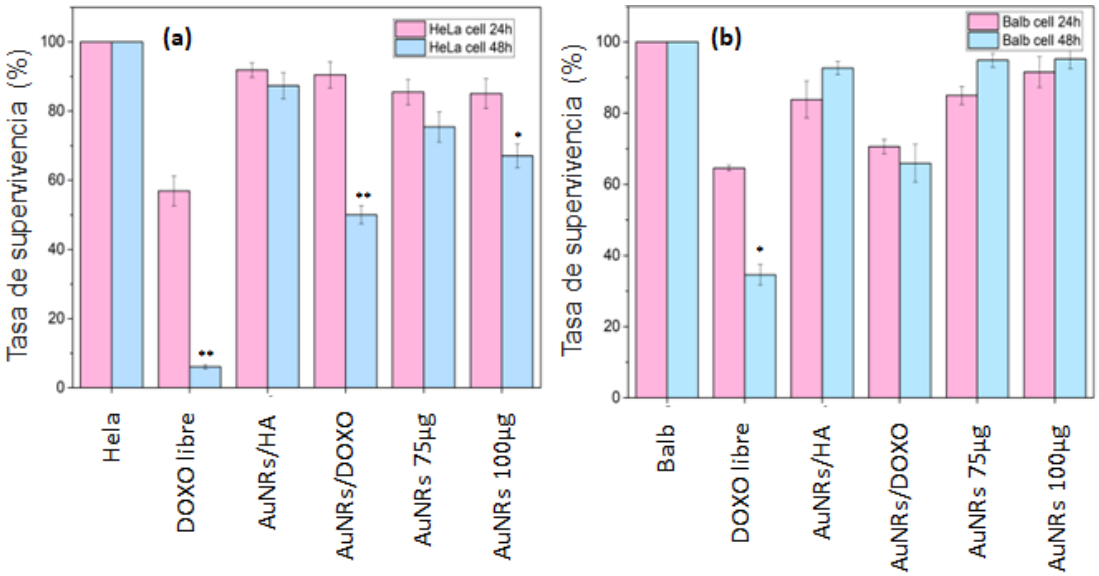


Figura 3.14 Citotoxicidad celular expresada como tasa de supervivencia para las líneas celulares a) HeLa y b) 3T3 Balb a diferentes tiempos de incubación a 37 ºC en ausencia de iluminación NIR. AuNRs/HA indica las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL/HA; AuNRs/DOXO se corresponde con la plataforma AuNRs/PSS/DOXO; y AuNRs 75µg y AuNRs 100 µg corresponden a las plataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA conteniendo 75 y 100 µg del fármaco, respectivamente. Significado estadístico comparado a 4 ºC para cada grupo: * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.005.

Estas disminuciones de la viabilidad celular son menos importantes que en estudios previos [42, 43], probablemente debido a la relativa baja concentración de Nps utilizada en los experimentos ($1.0 \cdot 10^{10}$ Np/mL). Por ello, únicamente en las condiciones más elevadas de irradiación de las células tumorales se producen efectos fototérmicos tóxicos dependientes de la temperatura.

Por otro lado, cuando se incorpora el fármaco DOXO en la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA a dos concentraciones diferentes de DOXO, 75 y 100 µg, el efecto combinado de la actividad química y fototérmica genera importantes reducciones en la supervivencia de las células HeLa, si se compara con los tratamientos individuales químico o fototérmico. Esta mortalidad se observa que es dependiente tanto de la concentración del fármaco como de la fluencia de irradiación de luz. Además, la temperatura de incubación también juega un papel importante para alcanzar el efecto citotóxico en la terapia combinada.

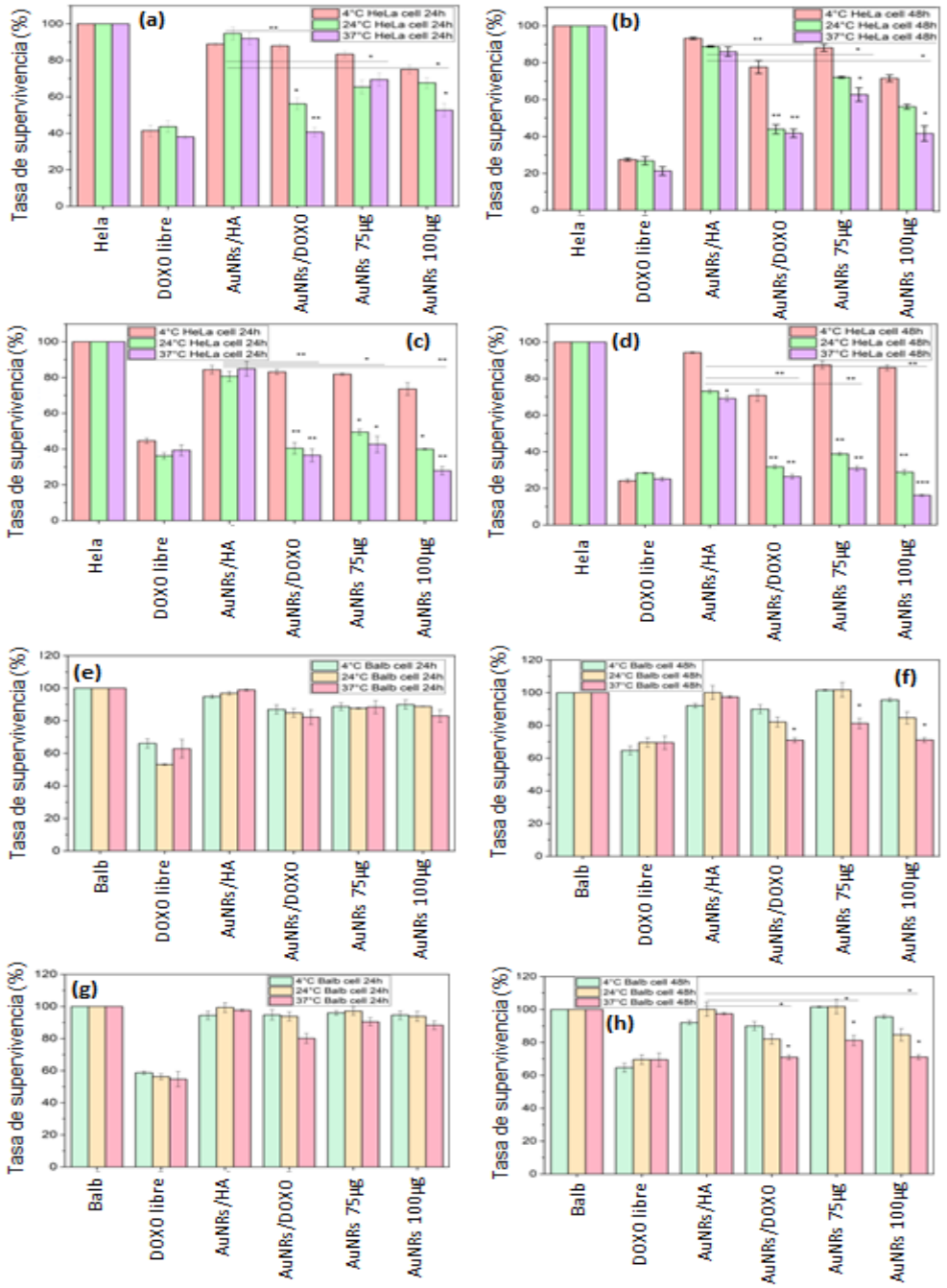


Figura 3.15 Citotoxicidad celular expresada como tasa de supervivencia para las líneas celulares a-d) HeLa y e-h) 3T3-Balb a (a, c, e, g) 24 y (b, d, f, h) 48 h de incubación y diferentes temperaturas en presencia de iluminación NIR de 808 nm de (a, b, e, f) 1,0 W/cm^2 y (b, d, g, h) 2,0 W/cm^2. AuNRs/HA indica la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL/HA, AuNRs/DOXO se corresponde con AuNRs/PSS/DOXO, y AuNRs 75 µg y AuNRs 100 µg corresponden a las plataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA conteniendo 75 y 100 µg del fármaco, respectivamente. Significado estadístico comparado a 4 ºC para cada grupo: * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.005$.

De este modo, a 4 ºC, la citotoxicidad celular es ca. 15-22% a ambas fluencias y concentraciones de DOXO encapsuladas tras 24 h de incubación, y se va incrementando a medida que lo hace la temperatura hasta los 37 ºC, alcanzando entonces ca. 31% y 48% a 1,0 W/cm^2 y 71% y 84% a 2,0 W/cm^2 a la concentración mayor de DOXO a 37 ºC después de 24 y 48 h de incubación, respectivamente (**Figuras 3.15 a-d**). Por lo tanto, a medida que la temperatura de incubación aumenta y, en concreto, alcanza los 37 ºC, la aplicación simultánea de las terapias química y fototérmica genera un efecto sinérgico tóxico que se beneficia, por un lado, de la mayor sensibilidad de las células a la actividad terapéutica de la DOXO, el incremento de la permeabilidad célula/tejido, y la mayor difusión del fármaco a mayores temperaturas [44] y, por otro, de la hipertermia derivada de la fotoestimulación de la nanoplataforma que involucra tanto la fotosensibilización de las células o la ablación térmica dependiendo de la temperatura macroscópica alcanzada en el medio. En este sentido, partiendo de una temperatura de incubación de 25 ºC la máxima temperatura alcanzada fue de 31 ºC y 43 ºC a fluencias de 1,0 W/cm^2 y 2,0 W/cm^2, respectivamente, y de 39 ºC y 46 ºC partiendo de 37 ºC en las mismas condiciones de fluencia. Además, la nanoplataforma cargada con la mayor concentración de DOXO y sometida a la mayor fluencia de irradiación da lugar a las mayores citotoxicidades. Por otro lado, los resultados obtenidos confirman que, a temperaturas bajas de incubación, el efecto fototérmico no genera efectos tóxicos adicionales importantes respecto a la actividad química del fármaco, como muestran los datos a 4 ºC, confirmando que bajo iluminación láser continua los incrementos macroscópicos de la temperatura son el principal factor responsable de inducir muerte celular adicional, en vez de los nano/microscópicos. Esto es debido a los procesos de relajación rápidos que liberan energía en forma de calor desde la célula al medio circundante, que proporcionan incrementos de temperatura por debajo del umbral terapéutico (desde ca. 41 ºC).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente, es importante también mencionar que la presencia de las capas de PLL/HA juegan un papel esencial en la respuesta terapéutica. Como se observa en la **Figura 3.15**, en ausencia de esta capa externa la capa de DOXO genera grandes efectos tóxicos, con toxicidades celulares en células HeLa de ca. 60 % a 37 ºC bajo irradiación NIR de 1,0 W/cm^2, mayor si se compara con la obtenida en

la plataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA. Este comportamiento confirma que las capas PLL/HA, además de proteger y otorgar propiedades de direccionamiento también sirven para disminuir la velocidad de difusión del fármaco DOXO desde la nanoplataforma.

Cuando se comparan las viabilidades a 4 ºC y 37 ºC que la toxicidad en células HeLa es realmente diferente (ver, por ejemplo**, Figuras 3.15 a-b**) ya que la capa de recubrimiento está profundamente alterada a temperaturas elevadas favoreciendo la liberación del fármaco. Esto se debe a que la DOXO necesitaría más tiempo para lograr su difusión completa desde las plataformas cuando la temperatura macroscópica es más baja, ya que se necesita más tiempo para lograr la energía requerida para desestabilizar las interacciones entre las cadenas poliméricas del recubrimiento de las Nps [45, 46].

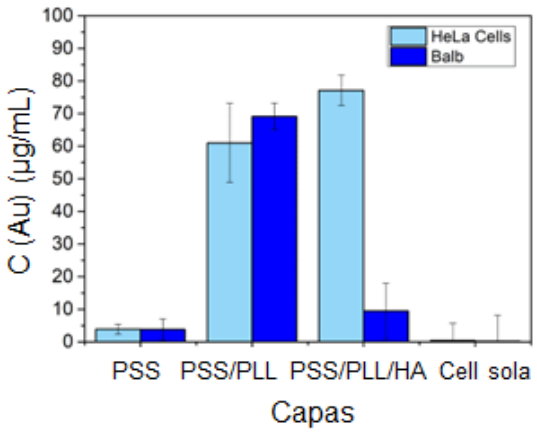


Figura 3.16 Internalización celular de la nanoplataforma obtenida a través de medidas de ICP-MS en células 3T3 Balb y HeLa tras la deposición de cada capa: AuNRs/PSS, AuNRs/PSS/PLL, AuNRs/PSS/PLL/HA y célula sola.

Por el contrario, en las células 3T3 Balb, tras la administración de las plataformas AuNRs/PSS/DOXO y AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA no se observan efectos tóxicos relevantes después de 24 h de incubación en ausencia y presencia de iluminación NIR, **Figura 3.14 b** y **Figura 3.15 e-h**. Únicamente tras 48 h de incubación se observan citotoxicidades en el rango del 20-25%, posiblemente debidas a cierta difusión del fármaco a través de la membrana celular, pero con una

evidente disminución de la internalización de la nanoplataforma en el interior celular, como se confirma por medidas de ICP-MS (**Figura 3.16**).

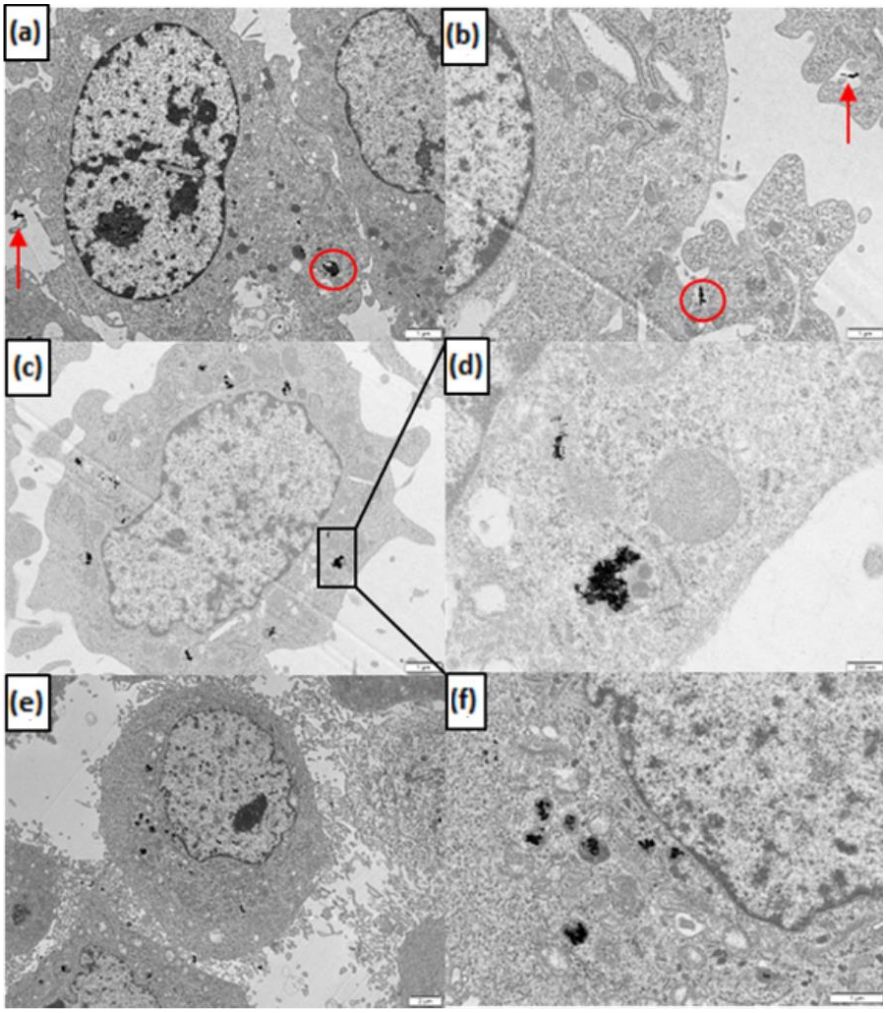


Figura 3.17 Imágenes de TEM de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA dentro de a-b) células 3T3 Balb en ausencia de irradiación NIR, c-d) células HeLa en ausencia de irradiación NIR, y e-f) células HeLa en presencia de irradiación NIR (808 nm, 1,0 W/cm^2). d) muestra una vesícula conteniendo numerosas nanoplataformas. En a-b) los círculos rojos denotan partículas dentro de las células, mientras que las flechas las muestran fuera.

Esta reducida internalización celular también se confirma tanto por el pequeño número de Nps dentro de las células Balb como se observa por TEM (Figuras 3.17 a-b) como por la baja fluorescencia dentro del citoplasma y núcleo celular obtenida por medias de microscopía de fluorescencia (Figuras 3.18 a), incluso en presencia de irradiación NIR (Figura 3.19 a). De hecho, solamente después de 12 h de incubación y bajo irradiación de 2,0 W/cm2, una pequeña

cantidad de DOXO se localiza dentro del núcleo celular y algunos AuNRs se pueden discernir fuera de la célula sin haber sido internalizados. Este comportamiento puede ser consecuencia de la ausencia de receptores CD44 en la superficie de la membrana de este tipo de células, lo que impide en gran medida la captación celular.

Además, se observa que las células 3T3 Balb tratadas con la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA muestran una morfología inalterada, mientras que las que están sujetas a la administración directa de DOXO libre presentan una morfología más esférica denotando muerte celular, lo que confirma adicionalmente la falta de internalización de la plataforma (**Figura 3.19 a**) [47].

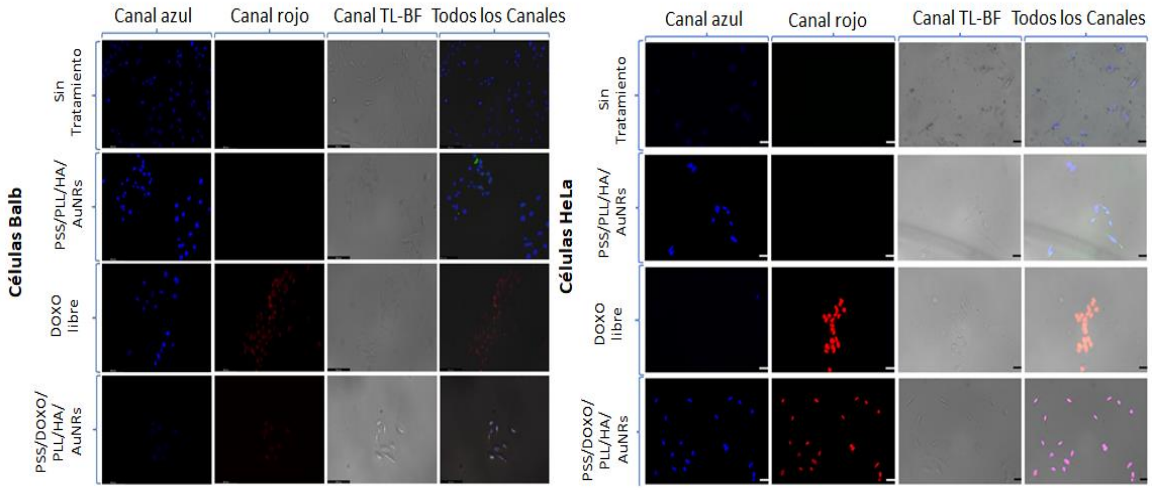


Figura 3.18 Imágenes de microscopía de fluorescencia de la internalización celular de AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA y la posterior liberación de la DOXO encapsulada tras 24 h de incubación en las líneas celulares a) Balb 3T3 y b) HeLa. Las imágenes que se muestran son las correspondientes a cada canal de fluorescencia más la combinación de los tres canales empleados: el canal azul recoge la fluorescencia de los núcleos celulares teñidos con DAPI (λ_{ex} = 355 nm); el canal rojo la fluorescencia de la DOXO (λ_{ex} = 488 nm); y el canal de campo claro muestra la imagen óptica directa. Las barras de la escala corresponden a 10 µm.

Estos resultados contrastan con la importante captación e internalización de la nanoplataforma observada en las células HeLa a través de medidas de microscopía de fluorescencia y TEM. Las imágenes de TEM que se muestran en la **Figura 3.17 c** demuestran que las nanoplataformas están dentro del citoplasma de las células HeLa después de 6 h de incubación. Por otro lado, después de la irradiación con luz NIR de las células se pueden observar cierta deshidratación

celular y algunos cuerpos apoptóticos y vesículas dentro y alrededor de la membrana celular (**Figura 3.17 e**), que se pueden corresponder tanto al efecto químico de la DOXO como a la fototermia plasmónica, según los resultados obtenidos mediante el ensayo anexina V-ioduro de propidio (ver más abajo, **Figura 3.20**).

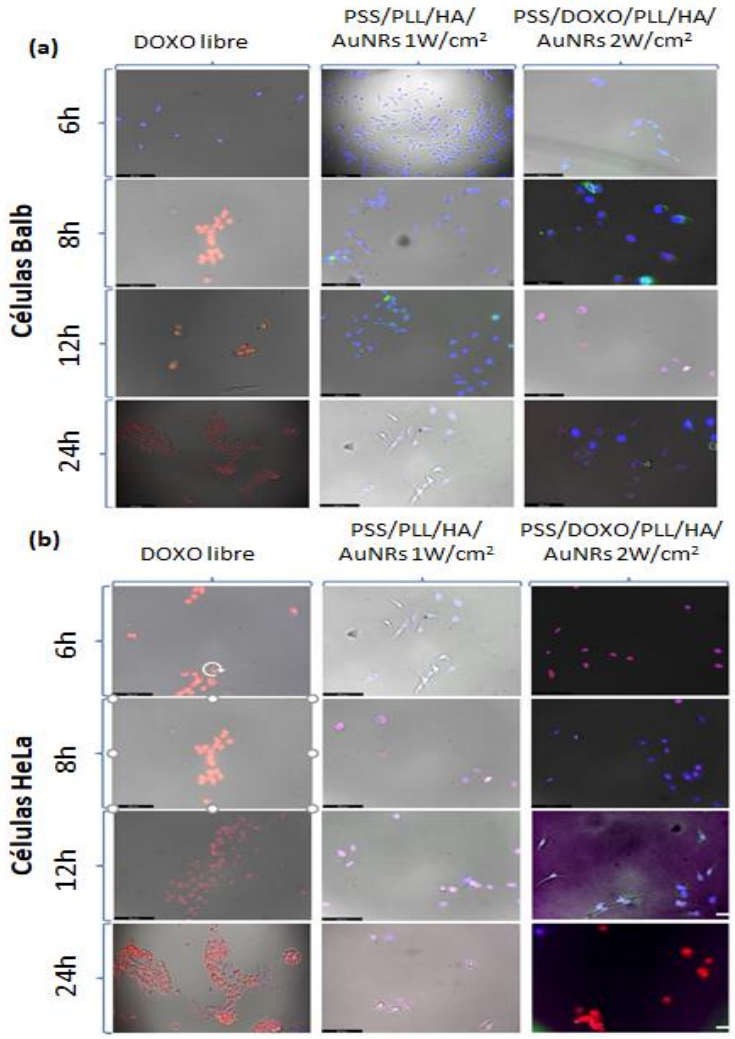


Figura 3.19 Imágenes de microscopía de fluorescencia combinadas de AuNRs recubiertos con PSS/DOXO y PSS/DOXO/PLL/HA dentro de a) células 3T3 Balb y b) HeLa a diferentes tiempos de incubación y condiciones de irradiación de luz NIR. El azul corresponde a los núcleos celulares teñidos con DAPI (λ_{ex} = 355 nm) y el rojo a la fluorescencia DOXO (λ_{ex} = 488 nm). Las barras de escala son de 10 µm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una parte de las vesículas que contienen Nps se muestran en una imagen ampliada en la **Figura 3.18 d**, donde algunos AuNRs experimentan cierta fusión en el interior después de la aplicación de la iluminación NIR (**Figura 3.18 f**).

Además, las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran que la DOXO liberada desde la plataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA se encuentra dentro del núcleo y en el citoplasma después de 24 h de incubación, en concordancia con un proceso de internalización endocítico y con una liberación prolongada y sostenida del fármaco (**Figura 3.19 b**). Este comportamiento es opuesto al observada para la DOXO administrada de forma libre, que se incorpora más rápido a la célula por simple difusión a través de la membrana y migra rápidamente a los núcleos celulares, lo que concuerda con los datos de citotoxicidad obtenidos (**Figura 3.19 b**). Además, se observa que la liberación de la DOXO se realiza progresivamente dentro de la célula a medida que transcurre la incubación en presencia de irradiación de luz NIR, siendo aquella particularmente rápida a la fluencia más elevada como consecuencia de la mayor desestabilización de la capa polimérica que rodea las nanoplataformas (**Figura 3.19 b**). Este hecho, confirma el control de la cinética de liberación a través de la luz aplicada.

Finalmente, los mecanismos que llevan a la muerte celular inducida por la aplicación del tratamiento bimodal químico y fototérmico, combinando el fármaco antineoplásico DOXO y la terapia fototérmica, se desacoplaron y elucidaron con el ensayo Anexina V-yoduro de propidio mediante medidas de citometría de flujo después de 48 h de incubación a diferentes temperaturas (4, 25 y 37 ºC) y condiciones de irradiación de luz NIR (1,0 W/cm^2 y 2,0 W/cm^2 a 808 nm durante 5 min) (ver **Figura 3.20)**. Las células HeLa sin nanoplataformas administradas se utilizaron como control negativo y las plataformas AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA y la DOXO administrada de forma libre se usaron como controles positivos. Adicionalmente, los ensayos se llevaron a cabo también en células 3T3 Balb como control adicional.

La administración de la DOXO libre dio lugar a una muerte celular por apoptosis en el rango de 70-90% y 60-80% para las líneas celulares 3T3 Balb y HeLa, respectivamente, dependiendo de las condiciones de incubación.

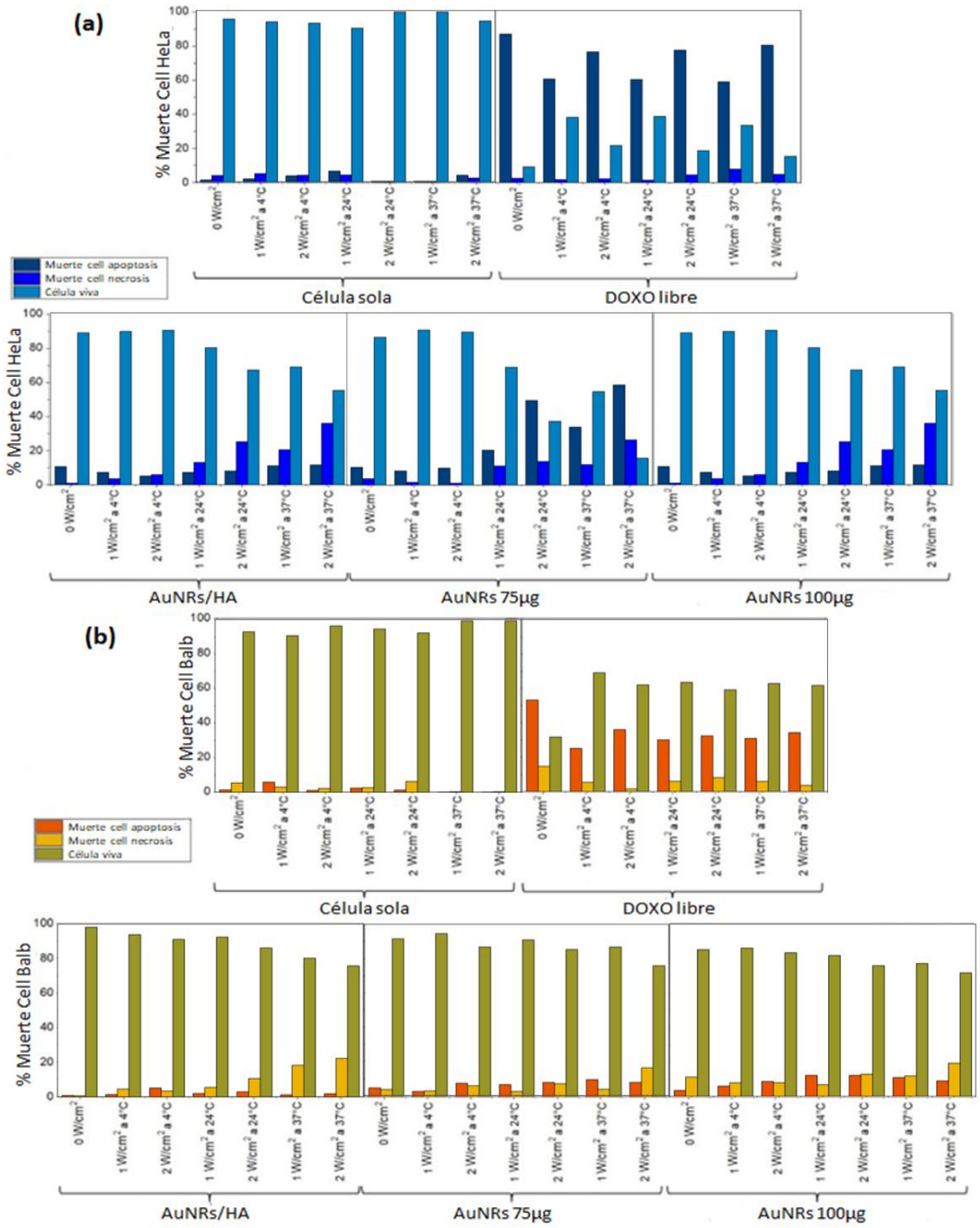


Figura 3.20 Principales mecanismos de muerte celular después de la administración de DOXO libre, AuNRs/PSS/PLL/HA y AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA cargados con 75 µg y 100 µg de DOXO en las líneas celulares a) HeLa y b) 3T3 Balb a diferentes temperaturas y fluencias de luz NIR aplicadas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para ambos tipos de células, la apoptosis se incrementa ligeramente con la fluencia de la luz láser aplicada y la temperatura de incubación como consecuencia de una cierta dependencia de la actividad química de la DOXO con la temperatura,

relacionada esta con una mejor difusión del fármaco a temperaturas más elevadas como se comenta más adelante (**Figura 3.20 a**).

Además, la proporción de células vivas es mucho más pequeña en las células HeLa como consecuencia de su metabolismo acelerado, de acuerdo con los datos de toxicidad. En particular, se observó una razón elevada de células vivas 3T3 Balb a 4 ºC ya que en esas condiciones la difusión del fármaco en el interior de las células disminuye al ser un proceso energéticamente dependiente [48]. Por otro lado, para el caso de la plataforma AuNRs/PSS/PLL/HA administrada a células HeLa, la muerte celular se debe principalmente a necrosis a temperaturas de incubación a 25 ºC y 37 ºC debido a la ruptura de la membrana celular después del incremento de temperatura producido por el tratamiento fototérmico, y a apoptosis a 4 ºC (**Figura 3.20 a**). De este modo, la irradiación juega un papel crucial en el incremento de la temperatura macroscópica cerca del régimen de ablación (> 44-45 ºC), particularmente a 37 ºC. Por el contrario, las células 3T3 Balb permanecen casi todas vivas a las mismas condiciones de temperatura e irradiación (**Figura 3.20 b**), de acuerdo con la baja concentración de nanoplataformas internalizadas lo que adicionalmente confirma la importancia del direccionamiento activo para conseguir, en este caso, la actividad citotóxica óptima.

De forma sorprendente, la plataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA internalizadas en células HeLa inducen la muerte celular principalmente por vía apoptótica, incluso en presencia de irradiación NIR, en contraste con los resultados de la plataforma AuNRs/PSS/PLL/HA (**Figura 3.20 a**). Esto podría indicar que la actividad química de la DOXO predomina sobre el efecto fototérmico para inducir la muerte celular, favoreciendo el camino de apoptosis sobre el de necrosis. De hecho, a temperaturas de incubación de 4 ºC y 25 ºC la proporción de células apoptóticas es mayor a 2,0 W/cm^2 que a 1,0 W/cm^2, de acuerdo con el efecto sensibilizador que la irradiación de mayor fluencia podría ejercer al alcanzarse temperaturas macroscópicas relativamente bajas, es decir, con la temperatura del medio por debajo del régimen de ablación (<45 ºC) favoreciéndose, así, la acción farmacológica de la DOXO a través de su intercalación con el ADN celular que bloquea la acción de la topoisomerasa II y evita los procesos de replicación del ADN,

lo que causa que las células tumorales entren en el proceso apoptótico. Sin embargo, a 37 ºC el incremento macroscópico de la temperatura por el efecto plasmónico podría explicar el incremento de la necrosis frente a la apoptosis, particularmente a la fluencia de 2.0 W/cm^2.

Por el contrario, en las células 3T3 Balb los niveles de necrosis y apoptosis están por debajo del 10-15 % en promedio, de acuerdo con los datos de citotoxicidad, y son independientes de la temperatura de incubación o los niveles de irradiación aplicados, exceptuando a 37 ºC y 2.0 W/cm^2 para la que los niveles de necrosis se incrementan ligeramente (**Figura 3.20 b**). Este comportamiento estaría en concordancia con la deficiente internalización de las plataformas AuNRs/DOXO/PLL/HA que se observan en esta línea celular.

3.4 CONCLUSIÓN

Como conclusión a este trabajo, se han conseguido sintetizar AuNRs con LPSR máximo modificable entre los 700 y 816 nm, y longitud y ancho de Np en el rango de 33-36 nm y 8-12 nm (variación del AR de ca. 2.5 a 4.1), respectivamente. De forma sorprendente, no existe una elevada pérdida de eficiencia en la generación de calor fototérmico cuando se producen desplazamientos del LPSR de los AuNRs hacia el azul de hasta 70 nm respecto a la longitud de onda de la fuente CW de luz láser incidente (808 nm). De este modo, los AuNRs obtenidos presentan una respuesta fototérmica tanto a bajas como moderadas concentraciones de partícula y fluencias de luz aplicadas. Para conseguir la biocompatibilidad además de estabilidad coloidal de AuNRs con LPSR localizado en 802 nm empleados como "cores" de la plataforma híbrida, se funcionalizó su superficie secuencialmente con capas poliméricas de PSS, DOXO, PLL y HA siguiendo la técnica de LbL, siendo la última capa la que le otorga a las plataformas con capacidad de direccionamiento activo hacia los receptores CD44 sobreexpresados en diferentes células tumorales. Antes de la deposición de la capa de PLL, se incorporó el fármaco químico DOXO hasta una concentración de ca. 350 µg/ml. Se observó que la liberación de DOXO es despreciable en los estadios iniciales de incubación gracias al empaquetamiento compacto de la capa polimérica superficial. Además, la DOXO se libera

simultáneamente gracias a la degradación enzimática de la capa de PLL a través de las proteasas fisiológicas y de la irradiación externa con luz NIR aplicada, dando lugar a perfiles de liberación en forma de escalera que permiten un excelente control sobre la difusión/liberación del fármaco desde la nanoplataforma. Finalmente, el análisis de la capacidad terapéutica multimodal de las nanoplataformas desarrolladas demuestra que la combinación de las terapias química y fototérmica genera una toxicidad dirigida importante hacia las células malignas gracias a la eficiencia de su internalización debido a la afinidad por los receptores de membrana CD44 sobreexpresados en este tipo de células tumorales. Contrariamente, este efecto tóxico no se observa en las células 3T3 Balb. Además, se observó que la muerte celular originada por la combinación de ambas terapias es principalmente por apoptosis, lo que sugiere que el inicio de a la muerte celular se debe al efecto tóxico predominante del fármaco soportado adicionalmente por la fototermia localizada, como se observó en los experimentos realizados a diferentes temperaturas del medio. Estos resultados también están de acuerdo con proceso de necrosis inducido cuando la única terapia utilizada para el tratamiento de las células tumorales es la fototermia plasmónica.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.5 REFERENCIAS

[1] A. Baeza, D. Ruiz-Molina y M. Vallet-Regí, «Recent advances in porous nanoparticles for drug delivery in antitumoral applications: inorganic nanoparticles and nanoscale metal-organic frameworks,» *Expert Opinion on Drug Delivery,* vol. 14, nº 6, pp. 783-796, 2017.

[2] D. Banerjee y S. Sengupta, «Nanoparticles in cancer chemotherapy,» *Progress in Molecular Biology and Translational Science,* vol. 104, pp. 489-507, 2011.

[3] A. C. Society, «Cancer Facts & Figures 2019,» American Cancer Society, Inc., 2019.

[4] S. Bamrungsap, A. Treetong, C. Apiwat, T. Wuttikhun y T. Dharakul, «SERS-fluorescence dual mode nanotags for cervical cancer detection using aptamers conjugated to gold-silver nanorods,» *Microchimica Acta,* vol. 183, nº 1, pp. 249-256, 2016.

[5] N. S. Awad, P. Vinod, N. M. AlSawaftah, G. Ter Haar, T. M Allen, W. G Pitt y G. A Husseini, «Ultrasound-Responsive Nanocarriers in Cancer Treatment: A Review,» *ACS Pharmacology & Translational Science,* vol. 4, nº 2, pp. 589-612, 2021.

[6] S. K. Lee, M. S. Han, S. Asokan y C.-H. Tung, «Effective gene silencing by multilayered siRNA-coated gold nanoparticles,» *Small,* vol. 7, nº 3, pp. 364-370, 2011.

[7] L. Al-Sagheer, A. Alshahrie y W. Mahmoud, «Facile approach for developing gold nanorods with various aspect ratios for an

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

efficient photothermal treatment of cancer,» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* vol. 618, nº 126394, 2021.

[8] M. R. Gonçalves, H. Minassian y A. Melikyan, «Plasmonic resonators: Fundamental properties and applications,» *Journal of Physics D: Applied Physics,* vol. 53, nº 44, pp. 2-48, 2020.

[9] N. S. Abadeer y C. J. Murphy, «Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles,» *The Journal of Physical Chemistry C,* vol. 120, nº 9, p. 4691–4716, 2016.

[10] S. Manrique-Bedoya, M. Abdul-Moqueet, P. Lopez, T. Gray, M. Disiena, A. Locker, S. Kwee, L. Tang, R. Hood, Y. Feng, N. Large y K. Mayer, «Multiphysics Modeling of Plasmonic Photothermal Heating Effects in Gold Nanoparticles and Nanoparticle Arrays,» *Journal of Physical Chemistry C,* vol. 124, nº 31, pp. 17172-17182, 2020.

[11] J. Wang, X. Wu, P. Shen, J. Wang, Y. Shen, Y. Shen, T. Webster y J. Deng, «Applications of inorganic nanomaterials in photothermal therapy based on combinational cancer treatment,» *International Journal of Nanomedicine,* vol. 15, pp. 1903-1914, 2020.

[12] C.-H. Chan, F. Poignant, M. Beuve, E. Dumont y D. Loffreda, «Effect of the Ligand Binding Strength on the Morphology of Functionalized Gold Nanoparticles,» *Journal of Physical Chemistry Letters,* vol. 11, nº 7, pp. 2717-2723, 2020.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[13] Q. Tian, F. Jiang, R. Zou, Q. Liu, Z. Chen, M. Zhu, S. Yang, J. Wang, J. Wang y J. Hu, «Hydrophilic Cu 9S 5 nanocrystals: A

photothermal agent with a 25.7% heat conversion efficiency for photothermal ablation of cancer cells in vivo,» *ACS Nano,* vol. 5, nº 12, pp. 9761-9771, 2011.

[14] F. Demir Duman, F. Demir Duman, M. Sebek, M. Sebek, N. Thanh, N. Thanh, M. Loizidou, K. Shakib y A. MacRobert, «Enhanced photodynamic therapy and fluorescence imaging using gold nanorods for porphyrin delivery in a novel: In vitro squamous cell carcinoma 3D model,» *Journal of Materials Chemistry B,* vol. 8, nº 23, pp. 5131-5142, 2020.

[15] L. Lu, J. Yu, X. Liu, X. Yang, Z. Zhou, Q. Jin, R. Xiao y C. Wang, «Rapid, quantitative and ultra-sensitive detection of cancer biomarker by a SERRS-based lateral flow immunoassay using bovine serum albumin coated Au nanorods,» *RSC Advances,* vol. 10, nº 1, pp. 271-281, 2019.

[16] S. Shen, H. Tang, X. Zhang, J. Ren, Z. Pang, D. Wang, H. Gao, Y. Qian, X. Jiang y W. Yang, «Targeting mesoporous silica-encapsulated gold nanorods for chemo-photothermal therapy with near-infrared radiation,» *Biomaterials,* vol. 34, nº 12, pp. 3150-3158, 2013.

[17] J. Vines, D.-J. Lim y H. Park, «Contemporary polymer-based nanoparticle systems for photothermal therapy,» *Polymers,* vol. 10, nº 12, p. 1357, 2018.

[18] L. M. Bareford y P. W. Swaan, «Endocytic mechanisms for targeted drug delivery,» *Advanced Drug Delivery Reviews,* vol. 59, nº 8, pp. 748-758, 2007.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[19] X. Ding, D. Li y J. Jiang, «Gold-based inorganic nanohybrids for nanomedicine applications,» *Theranostics,* vol. 10, nº 18, pp. 8061-8079, 2020.

[20] H. Gomari, M. F. Moghadam, M. Soleimani, M. Ghavami y S. Khodashenas, «Targeted delivery of doxorubicin to HER2 positive tumor models,» *Int J Nanomedicine,* vol. 24, pp. 5679-5690, 2019.

[21] A. Berlin, R. Joswik y V. Ivanovich, «The Chemistry and Physics of Engineering Materials, Volume Two (Limitations, Properties, and Models) || A Review on Hyaluronan Biopolymer: Properties and Pharmaceutical Applications,» *The Chemistry and Physics of Engineering Materials,* vol. 2, pp. 338-353, 2015.

[22] G. Dai, C. Choi, Y. Zhou, Q. Bai, Y. Xiao, C. Yang, C. Choi, D. Ng y D. Ng, «Immobilising hairpin DNA-conjugated distyryl boron dipyrromethene on gold@polydopamine core-shell nanorods for microRNA detection and microRNA-mediated photodynamic therapy,» *Nanoscale,* vol. 13, nº 13, pp. 6499-6512, 2021.

[23] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian y M. A. El-Sayed, «Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 128, nº 6, p. 2115–2120, 2006.

[24] P. R. S. &. V. G. Hassan, «Making sense of Brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering.,» *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids,* vol. 31, nº 1, pp. 3-12, 2015.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[25] H. Ding, K.-T. Yong, I. Roy, H. E. Pudavar, W. C. Law, E. J. Bergey y P. N. Prasad, «Gold Nanorods Coated with Multilayer Polyelectrolyte as Contrast Agents for Multimodal Imaging,» *J. Phys. Chem. C,* vol. 111, nº 34, pp. 12552-12557, 2007.

[26] N. D. H. S. I. F. A. &. M. C. J. Burrows, «Understanding the Seed-Mediated Growth of Gold Nanorods through a Fractional Factorial Design of Experiments,» *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids,* vol. 33, nº 8, pp. 1891-1907, 2017.

[27] V. Aswal, P. Goyal y P. Thiyagarajan, «Small-angle neutron-scattering and viscosity studies of CTAB/NaSal viscoelastic micellar solutions,» *The Journal of Physical Chemistry B,* vol. 102, nº 14, pp. 2469-2473, 1998.

[28] D. X. W. L. J. Y. Y. C. Yinan Zhang, «Effect of Size, Shape, and Surface Modification on Cytotoxicity of Gold Nanoparticles to Human HEp-2 and Canine MDCK Cells,» *Journal of Nanomaterials,* vol. 2012, p. 375496, 2012.

[29] S. Y. W. C. S. T. Q. L. W. H. L. Q. T. &. L. J. Liao, «Liao, S., Yue, W., Cai, S., Tang, Q., Lu, W., Huang, L., Qi, T., & Liao, J. (2021). Improvement of Gold Nanorods in Photothermal Therapy: Recent Progress and Perspective. Frontiers in pharmacology, 12, 664123. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.664123,» *Frontiers in pharmacology,* vol. 12, p. 664123, 2021.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[30] S. D. M. S. Ghamsari, Nanorods and Nanocomposites., London, United Kingdom: IntechOpen, 2020.

[31] Z. Hami, S. M. Rezayat, K. Gilani y M. Ghazi-Khansari, «In-vitro cytotoxicity and combination effects of the docetaxel-conjugated and doxorubicin-conjugated poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-folate-based polymeric micelles in human ovarian cancer cells,» *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 69, nº 2, pp. 1-10, 2016.

[32] E. Villar-Alvarez, A. Cambón, A. Pardo, V. X. Mosquera, A. Bouzas-Mosquera, A. Topete, S. Barbosa, P. Taboada y V. Mosquera, «Gold Nanorod-Based Nanohybrids for Combinatorial Therapeutics,» *ACS Omega.*, vol. 10, nº 3, p. 12633–12647, 2018.

[33] M. Almada, B. Leal-Martínez, N. Hassan, M. Kogan, M. Burboa, A. Topete, M. Valdez y J. Juárez, «Photothermal conversion efficiency and cytotoxic effect of gold nanorods stabilized with chitosan, alginate and poly (vinyl alcohol),» *Materials Science and Engineering C*, vol. 77, pp. 583-593, 2017.

[34] D. K. A. W. &. H. M. Roper, «Microscale Heat Transfer Transduced by Surface Plasmon Resonant Gold Nanoparticles,» *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, vol. 111, nº 9, pp. 3636-3641, 2007.

[35] N. A. M. M. W. K. G. P. G. a. N. J. H. Joseph R. Cole, «Photothermal Efficiencies of Nanoshells and Nanorods for Clinical Therapeutic Applications,» *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, nº 28, pp. 12090-12094, 2009.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[36] V. P. P. a. J. W. Tunnell, «Physiological Fluid Specific Agglomeration Patterns Diminish Gold Nanorod Photothermal

Characteristics,» *Advances in Nanoparticles,* vol. 44, nº 8, pp. 675-684, 2013.

[37] R. Huschka, J. Zuloaga, M. W. Knight, L. V. Brown, P. Nordlander y N. J. Halas, «Light-Induced Release of DNA from Gold Nanoparticles: Nanoshells and Nanorods,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 133, nº 31, p. 12247–12255, 2011.

[38] S. Wang, E. A. Konorev, S. Kotamraju, J. Joseph, S. Kalivendi y B. Kalyanaraman, «Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways,» *J Biol Chem.,* vol. 279, nº 24, pp. 25535-25543, 2004.

[39] S. H. W. N. L. T. J. J. H. N. J. P. J. C. H. P. H. S. S. Y. E. H. S. K. K. B. S. &. K. S. Bhang, «Hyaluronic acid-quantum dot conjugates for in vivo lymphatic vessel imaging,» *ACS Nano,* vol. 23, nº 6, pp. 1389-1398, 2009.

[40] N. Y. M. N. C. K. V. M. Y. P. R. S. T. L. K. F. K. H. W. &. M. K. Okamoto, «Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin.,» *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 108, pp. 20388-20393, 2011.

[41] H. S. S. Qhattal y X. Liu, «Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes,» *Mol. Pharmaceutics,* vol. 8, nº 4, pp. 1233-1246, 2011.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[42] F. Hellmers, P. Ferguson, J. Koropatnick, R. Krull y A. Magaritis, «Characterization and in vitro cytotoxicity of doxorubicin-loaded γ-polyglutamic acid-chitosan composite nanoparticles,» *Biochemical Engineering Journal,* vol. 75, pp. 72-78, 2013.

[43] J. Chen, X. Li, X. Zhao, Q. Wu, H. Zhu, Z. Mao y C. Gao, «Doxorubicin-conjugated pH-responsive gold nanorods for combined photothermal therapy and chemotherapy of cancer,» *Bioactive Materials,* vol. 3, nº 3, pp. 347-354, 2018.

[44] R. Rowe Horwege, «Systemic Hyperthermia,» de *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation,* New York, USA, John G. Webster, 2006, pp. 42-62.

[45] F. Emami, S. Pathak, T. Nguyen, P. Shrestha, S. Maharjan, J. Kim, J.-H. Jeong y S. Yook, «Photoimmunotherapy with cetuximab-conjugated gold nanorods reduces drug resistance in triple negative breast cancer spheroids with enhanced infiltration of tumor-associated macrophages,» *Journal of Controlled Release,* vol. 329, pp. 645-664, 2021.

[46] A. Haine y T. Niidome, «Gold nanorods as nanodevices for bioimaging, photothermal therapeutics, and drug delivery,» *Chemical and Pharmaceutical Bulletin,* vol. 65, nº 7, pp. 625-628, 2017.

[47] S. Yin, J. Huai, X. Chen, Y. Yang, X. Zhang, Y. Gan, G. Wang, X. Gu y J. Li, «Intracellular delivery and antitumor effects of a redox-responsive polymeric paclitaxel conjugate based on hyaluronic acid,» *Acta Biomaterialia,* vol. 26, pp. 274-285, 2015.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[48] W. H. &. B. P. J. De Jong, «Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards,» *Int J Nanomedicine.*, vol. 3, nº 2, pp. 133-149, 2008.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 4

"Quien no añade nada a sus conocimientos, los disminuye"

El Talmud

NANOPLATAFORMA HÍBRIDA FOTO EXCITABLE BASADA EN NANOCILINDROS DE ORO PARA FOTOTERAPIAS BIMODALES SIMULTÁNEAS: PPTT Y PDT

4.1 INTRODUCCIÓN.

Aunque la terapia fototérmica (PPTT) basada en el uso de nanoplataformas metálicas con propiedades ópticas características, y comentada previamente en los **Capítulos 1** y **3,** se presenta como una nueva herramienta para la lucha contra enfermedades como el cáncer, no hay evidencias completas de que únicamente con el incremento local de temperatura bajo irradiación de luz NIR a las longitudes de onda que coincidan con el LPSR de las nanopartículas sea suficiente para la erradicación de las células malignas [1, 2]. Por ello, en los últimos años se está trabajando en el desarrollo de nuevas nanoplataformas capaces de aumentar la eficacia de los tratamientos contra el cáncer con la combinación simultánea de diferentes aproximaciones terapéuticas y, de este modo, potenciar efectos citotóxicos sinérgicos [3, 4, 5].

Como se introdujo en el **Capítulo 1**, la terapia fotodinámica (PDT) es un tipo de terapia contra el cáncer en la que las células malignas se destruyen de forma selectiva por la actividad biológica de fármacos sensibles a la luz conocidos como fotosensibilizadores (PSs) [6]. En concreto, cuando estos PSs son expuestos a una luz incidente de una longitud de onda apropiada se energizan y generan especies reactivas de oxígeno, ROS, incluyendo oxígeno singlete ($^1O_2$), que provocan la muerte celular al dañar la estructura de la célula y/o alterar su metabolismo, como,

por ejemplo, alterando la estructura/conformación de los ácidos grasos de la membrana lipídica o de proteínas esenciales [7, 8, 9, 10]. Las ROS se generan como resultado de la reducción del oxígeno molecular durante la respiración aeróbica y por varias enzimas dentro de las células. A niveles fisiológicos, las ROS contribuyen a la señalización celular y a los mecanismos de defensa de los sistemas biológicos [11, 12]. Sin embargo, muchos de los PSs utilizados en la actualidad presentan varias desventajas como su naturaleza hidrófoba, los largos tiempos de retención o su pobre afinidad por células y tejidos enfermos. Es, por ello, que se están realizando esfuerzos importantes para desarrollar nuevos PSs que superen estas limitaciones.

De este modo, la PPTT y la PDT se presentan como dos métodos terapéuticos mediados por fotones que podrían combinarse a partir de una única nanoplataforma para poder realizar una terapia multimodal eficiente y lograr daño celular simultáneo por ROS e hipertermia [4, 13, 14, 15, 16].

En este Capítulo, se desarrolló y analizó una nueva nanoplataforma capaz de combinar simultáneamente su potencial como agente terapéutico fotodinámico y fototérmico plasmónico [17, 18] para el tratamiento de células malignas y ofrecer, así, una nueva terapia contra el cáncer. Esta nanoplataforma se basó en la obtenida en el **Capítulo 3** por la técnica de ensamblaje LbL pero, en este caso, en vez de la capa de doxorrubicina se incorporó el fotosensibilizador verde de indocianina (ICG), tal y como se detalla el **Capítulo 2,** de modo que se le proporcionó al nanosistema capacidad de PDT [19, 20].

La ICG es un compuesto de tricarbocianina que con capacidad de absorción lumínica en el NIR, y está aprobado por Agencia Americana de Alimentos y Fármacos (FDA, de sus siglas en inglés) para su uso en diagnóstico médico como agente de contraste para la determinación del volumen de sangre y función hepática, entre otros [21, 22], así como potencial agente PDT para el tratamiento contra el cáncer [23, 24]. Así, la nanoplataforma propuesta, AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA, permite aplicar simultáneamente la actividad terapéutica por PDT a través del colorante ICG y las propiedades fototérmicas de los AuNRs logrando, así, una mejora en el diagnóstico y el tratamiento específico contra el cáncer. El desarrollo

de estas nanoplataformas híbridas se presenta como una alternativa que, por un lado, permite liberar calor y ROS localizados de forma simultánea y, por otro, proteger las moléculas de ICG y evitar su eliminación temprana del cuerpo.

Hasta la actualidad, no se ha prestado demasiada atención a identificar las condiciones adecuadas de irradiación para lograr una mayor eficacia terapéutica PDT-PPTT tanto simple como dual y la descripción del mecanismo de muerte celular predominante implicado en ambas terapias (juntas o por separado). Por ello, este Capítulo se centra en el análisis de la fotoestabilidad del PSs ICG encapsulado en la capa de PLL de la nanoplataforma y el efecto de las condiciones de iluminación en el NIR tanto en los perfiles de incremento de temperatura debido a la presencia de los AuNRs como "core" del nanossitema como a la generación de ROS dentro de las células tumorales. Así, la combinación de PDT y la PPTT provoca una muerte celular más eficiente que los tratamientos de PDT y PPTT individuales, mientras que la predominancia de la terapia simple o dual es dependiente de la iluminación y de las condiciones del medio, y se refleja tanto en la respuesta citotóxica como en los mecanismos de muerte celular.

4.2 OBJETIVOS.

- Desarrollar una nanoplataforma basada en AuNRs biocompatible a través de una estrategia de funcionalización de la superficie de estas Nps mediante el uso de polímeros biocompatibles ensamblados por la técnica LbL, proporcionándoles capacidad de direccionamiento activo mediante la incorporación de una capa final de HA que se una de forma específica a los receptores CD44 sobreexpresados en determinados tipos de células tumorales. Además, esta nanoplataforma tendrá el fotosensibilizador ICG incorporado, lo que permitirá su uso en PDT.
- Estudiar la internalización y la citotoxicidad celular inducida por la plataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA.
- Estudiar la fotoestabilidad de las moléculas de ICG en función de su pH y medio circundante en presencia y ausencia de iluminación NIR.

- Estudiar el efecto de las condiciones de iluminación sobre los perfiles de incremento de temperatura y la generación de ROS.
- Evaluación de la capacidad citotóxica de la terapia bimodal PDT-PPTT.
- Elucidación del mecanismo predominante de muerte celular en función de la terapia PDT y/o PPTT generada.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.3.1 Síntesis y caracterización de las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA

Siguiendo el protocolo descrito en el **Capítulo 2**, se obtuvieron AuNRs (33 nm × 9 nm) recubiertos con capas alternantes de PSS, PLL conjugado con ICG y HA, este último para dotar al nanosistema con capacidad de direccionamiento específico hacia los receptores CD44 de determinadas células cancerígenas [25, 26]. La capa de PLL conjugada con moléculas de ICG mediante química carbodiimida le confiere a la nanoplataforma capacidad para terapia fotodinámica e imagen óptica. La eficiencia en la reacción de complejación de la ICG con la PLL fue del 94%. El grado de sustitución de los grupos amino disponibles de PLL con ICG fue del 0.1%, lo que no interfiere con la carga positiva del PLL.

La **Figuras 4.1 a-b** muestran las principales características fisicoquímicas obtenidas de la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA. La banda plasmónica transversal de los AuNRs se localiza en ca. 510 ± 5 nm y permanece casi invariable con las distintas capas recubriendo su superficie. Por el contrario, la banda plasmónica superficial longitudinal varía en función de la naturaleza de los PE como consecuencia de la sensibilidad de las partículas metálicas a las propiedades dieléctricas del medio que las rodea [27, 28], lo que permite confirmar que la adsorción polimérica se realizó de forma adecuada. El desplazamiento inicial hacia el azul de la banda longitudinal después de la deposición de la capa de PSS podría estar relacionado con el menor índice de refracción (RI) de esta capa poliectrolitica comparado con el del CTAB (1.380 del PSS *vs* 1.435 del CTAB). [29] Por el contrario, se observa el comportamiento

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

opuesto, es decir, un desplazamiento hacia el rojo del plasmón longitudinal cuando se deposita la siguiente capa polimérica, esto es, se confirma la adecuada adsorción de la capa formada por el complejo PLL@ICG (RI del PLL=1.520). Finalmente, se observa un ensanchamiento del plasmón superficial longitudinal después de la deposición de la última capa de HA debido, probablemente, a la formación de algunos clústeres de partículas tras el proceso de deposición, tal y como se puede observar en las imágenes de TEM (**Figuras 4.1 f-g**). La presencia de ICG dentro de las capas poliméricas se confirma adicionalmente por la presencia de dos picos característicos de la absorción lumínica del tinte localizados en la ventana del NIR: uno a 708 nm (forma oligomérica) y otro a 780 nm (monómeros) [30].

Como podemos visualizar en la **Figura 4.1c**, se observa el patrón característico de una funcionalización realizada por la técnica capa por capa, ya que la inversión total de la carga nos demuestra que la capa polimérica fue satisfactoriamente adherida. El cambio de la carga superficial después del recubrimiento de los AuNRs con la capa de PSS y del complejo PLL@ICG es consecuencia de su carga eléctrica de diferente signo. Por otra parte, la deposición de la capa de HA no generó una inversión en el signo de la carga eléctrica superficial de los AuNRs, pero sí una disminución de cara a favorecer una captación celular más efectiva, pero manteniendo la citocompatibilidad [31].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

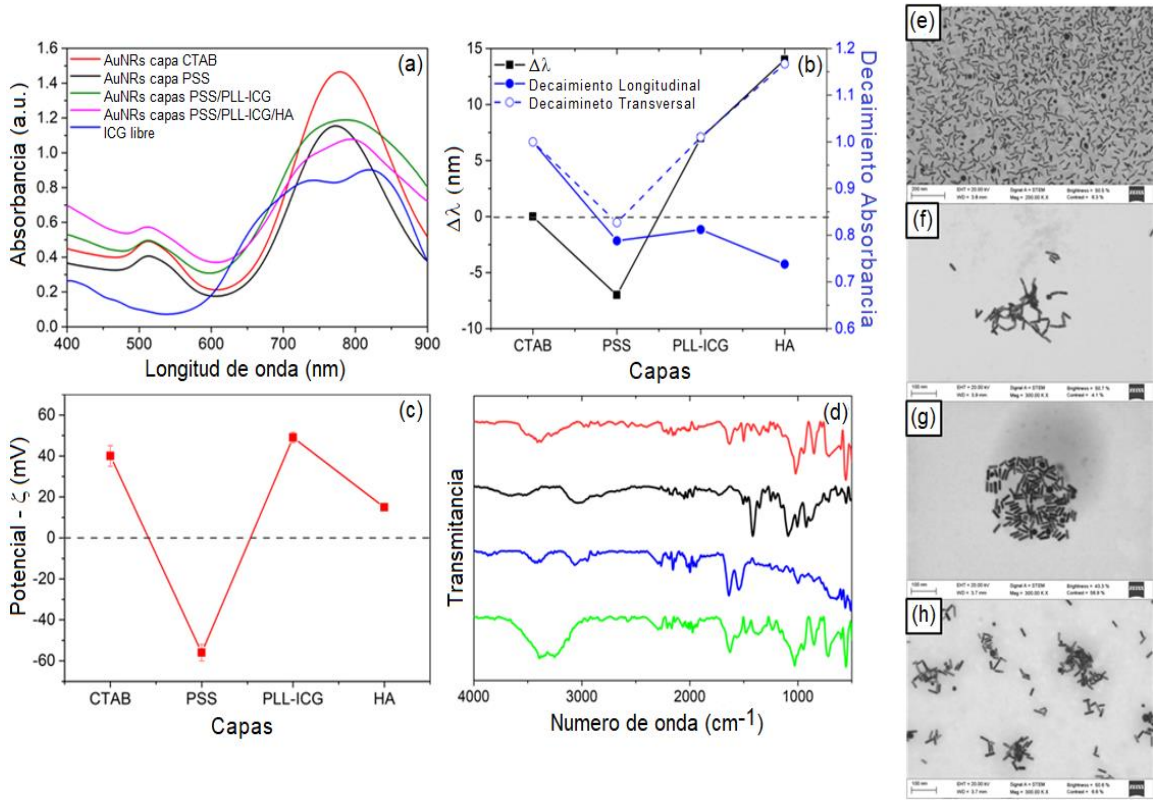


Figura 4.1 Espectro de absorción UV-Vis para la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA después de la deposición de cada capa en la superficie de la Np metálica. Se muestran algunas propiedades físicas del sistema: b) Desplazamiento de la banda plasmónica longitudinal (■) y disminución de la absorbancia de las bandas plasmónicas longitudinal (●) y transversal (○), y c) valores de potencial-ζ después de cada capa polimérica depositada. Las líneas sólidas y punteadas únicamente son guías visuales. d) Espectros FTIR de AuNRs/CTAB (—), ICG libre (—), AuNRs/PSS/PLL (—) y AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA (—). Imágenes TEM de e) AuNRs/CTAB; f) AuNRs/PSS; g) AuNRs/PSS/PLL@ICG; y h) AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA.

Para poder asegurar de manera precisa la presencia de las capas depositadas en los AuNRs es necesaria la caracterización de las muestras por espectroscopía FTIR. En la **Figura 4.1 d** se puede observar el espectro FTIR de la ICG libre en donde se presentan los modos vibracionales característicos del PS a: 921cm^{-1} correspondiente a la torsión del enlace N-H, a 1091, 1251, 1415 cm^{-1} correspondientes a los modos de estiramiento de los grupos C-O, C-N and C = C, respectivamente; a 2910 cm^{-1} correspondiente a la flexión del grupo N-H y, finalmente, a 3461 cm^{-1} correspondiente al estiramiento simétrico de los enlaces N-H. Se observa también el espectro FTIR de las plataformas AuNRs/PSS/PLL, con

bandas características a 1236 cm^{-1} correspondiente al modo vibracional de estiramiento del grupo C-N; a 1542 y 1635 cm^{-1} correspondientes al modo de torsión del NH_2 y el estiramiento del grupo C=O del PSS; a 2952 cm^{1} debido al estiramiento asimétrico de los C-H y, finalmente, a 3411 cm^{-1} se localizan los estiramientos simétricos de los grupos NH_2 y O-H. Así, la presencia de ICG en la plataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA se confirma por la reducción del pico correspondiente a la torsión de los grupos NH_2 a ca. 1540 cm^{-1} como consecuencia de la conjugación de la ICG, junto con el desarrollo del pico a ca. 1482 cm^{-1} correspondiente a los modos vibracionales C=C de los anillos aromáticos del PSs. Finalmente, la adsorción de la capa de HA se confirma por la presencia de las bandas a 555 cm^{-1} y 847 cm^{-1} asignadas al modo vibracional de estiramiento del grupo C-O y a los enlaces β-glucosídicos y extensiones O-H, respectivamente.

4.3.2 Estabilidad fotoquímica de las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA

Como se comentó previamente, la ICG es un tinte tricarbocianina soluble en agua que absorbe y emite luz en la región NIR. Sin embargo, para aplicaciones biomédicas es necesario controlar cuidadosamente la dosis de luz NIR aplicada para maximizar la generación de ROS y/o calor mientras se evita la fotodegradación del fotosensibilizador y su descomposición térmica como consecuencia del incremento de temperatura debido a decaimientos térmicos no radiativos [32, 33, 34]. De este modo, se estudió y se comparó la fotoestabilidad de la ICG libre y de la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL-ICG/HA durante 20 días en ausencia y en presencia de iluminación NIR. La **Figura 4.2 a-d** muestra que la estabilidad de la señal de fluorescencia de la ICG complejada con AuNRs es mucho mayor que la obtenida para la ICG libre a concentraciones similares (22 µM, 84% de encapsulación dentro de las nanoplataformas) en ausencia de irradiación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

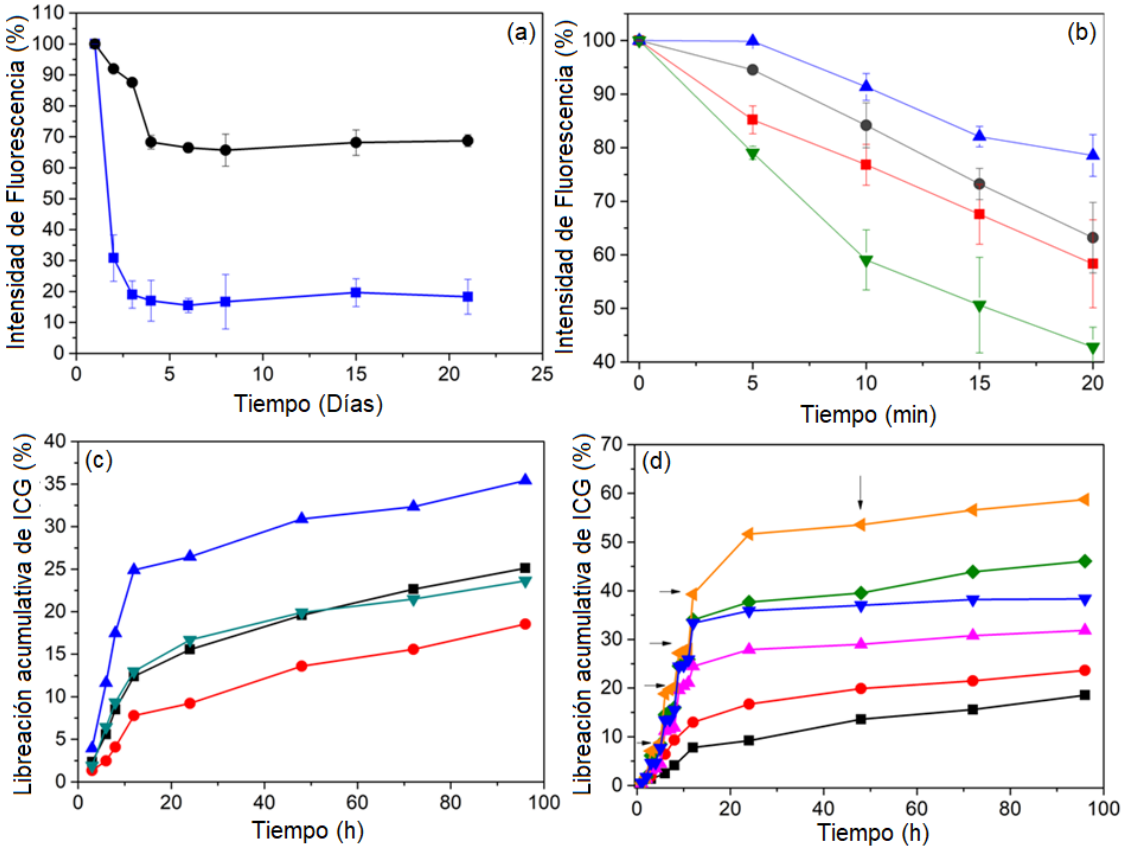


Figura 4.2 a) Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia de ICG libre (■) y AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA (●). b) Fotoestabilidad de la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA después de la iluminación continua con luz NIR de 3,0 (■); 1,0 (●) y (▲) 0,5 W/cm^2. La ICG libre a la máxima fluencia se muestra por comparación (▼). Las líneas son únicamente guías visuales. c) Liberación acumulativa de ICG desde AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA en ausencia (●, ▼) y presencia (■, ▲) de tripsina a pH 5,0 (●,■) y 7.4 (▼, ▲). d) Liberación acumulativa de ICG desde AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA a pH 5,0 en ausencia de tripsina y luz NIR (■), en presencia de tripsina (●), en presencia de iluminación NIR de 1,0 (▲) y 2,0 (◆) W/cm^2, y de la presencia simultánea de tripsina y radiación NIR a 1.0 (▼) y 2.0 (◀) W/cm^2 con una fuente de luz láser de 808 nm (5 min), respectivamente. Las líneas son únicamente guías visuales. Las flechas denotan los tiempos a los que se hicieron las irradiaciones: 2, 5, 9, 12 y 48 h. En (c) y (d) las barras de errores se omiten por claridad, pero las incertidumbres se encuentran dentro del ±15%.

Por otro lado, se puede observar para la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA un decaimiento inicial de la intensidad de fluorescencia de ca. 15% después de 2 días de incubación, muy inferior al 70% detectado para la ICG libre. Después de una semana, se observaron disminuciones de intensidad de fluorescencia adicionales de ca. 20% y 15%, respectivamente [35].

Por el contrario, la fotoestabilidad tanto de la ICG libre como de la plataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA se reduce bajo excitación NIR, y esta desestabilización es más importante a medida que la fluencia aumenta, es decir, para AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA fue de ca. 28%, 25% y 15% después de 15 min de iluminación NIR a 3,0; 1,0 y 0,5 W/cm^2, respectivamente. Sin embargo, se observa claramente que la conjugación de la molécula fotoexcitable con el polímero PLL y su consiguiente integración en la superficie de la nanoplataforma aumenta la protección fotoquímica de la ICG, como se confirma de la fuerte pérdida señal de fluorescencia de la ICG libre (ca. 44%) después de 15 min de irradiación NIR a 3,0 W/cm^2 (**Figura 4.2 b**). En resumen, los resultados presentados evidencian que la nanoplataforma híbrida con el fotosensibilizador conjugado es relativamente estable bajo irradiación con láser NIR continuo a diferentes fluencias y tiempos de irradiación.

Para analizar la protección que otorga la nanoplataforma al ICG conjugado bajo diferentes condiciones fisiológicas, se estudiaron los perfiles de liberación del PS desde la nanoestructura mediante experimentos de diálisis *in vitro* en presencia de FBS al 10% (v/v) a pH fisiológico (7,4) y ácido (5,0), este último mimetizando el microambiente ácido de los lisosomas. Estos experimentos se realizaron en presencia de estímulos externos (irradiación NIR) y endógenos (tripsina) durante 96 h de incubación a 37 ºC. La tripsina es una proteasa sérica capaz de escindir las cadenas peptídicas, principalmente de los grupos carboxilo de los aminoácidos lisina o arginina [36] [37] y permite una degradación lenta y controlada de la capa de PLL dentro de las células, por lo que sería esperable un mecanismo controlado endógenamente de entrega de la carga terapéutica desencadenado a partir de biodegradación controlada de la capa de PLL que provocase la ruptura/desmantelamiento del recubrimiento polimérico liberando el PS [38].

Los perfiles de liberación *in vitro* de la ICG a ambos pH mostraron una fase de liberación rápida durante las primeras horas seguida de un patrón de difusión mucho más lento posteriormente. En general, las cinéticas de liberación fueron ligeramente más rápidas y la cantidad de PS liberado mayore en presencia de la enzima, como cabría esperar por la inducción de la degradación de la capa de PLL,

alcanzando un 26% y un 40% a pH 5,0 y 7.4, respectivamente, si se compara con el 20% y el 32% en ausencia de tripsina después de 96 h de incubación (**Figura 4.2 c**). Sin embargo, las proporciones de liberación fueron relativamente bajos ya que el enlace amida formado tras la conjugación de ICG con el polielectrolito PLL impide una difusión masiva de la sonda fluorescente a pesar de la degradación de la capa del polielectrolito. Este comportamiento se observó principalmente a pH ácido, en el que la capa de PLL (pK_a ~ 9-10) interacciona electrostáticamente con la capa más interna de PSS (pK_a ~ 1-2) incluso en presencia de la enzima, compactando el recubrimiento de polielectrolito y ofreciendo, de este modo, una mayor protección al fotosensibilizador.

Cuando se aplicó irradiación NIR con un láser continuo de 808 nm a 1,0 y 2,0 W/cm^2 durante 5 min después de 2, 6, 9, 12 y 48 h de incubación, el grado de liberación de la ICG observado fue de ca. 32 y 38%, respectivamente, a pH 5,0 después de 96 h, ligeramente superior que en presencia de la enzima (**Figura 4.2 d**). Es importante resaltar que la liberación inducida por la irradiación NIR presenta un perfil característico en forma de escalera, de acuerdo con la liberación abrupta que se produce justo después de la aplicación del estímulo externo y que se suaviza progresivamente con el tiempo. Este hecho permite obtener un control excelente de la cinética de liberación a demanda. Además, la combinación de ambos estímulos, interno (enzimático) y externo (luz), aumentó la velocidad de liberación si se compara con la obtenida tras la aplicación individual de los estímulos, con hasta ca. el 46% y 59% de ICG liberada bajo irradiación NIR de 1,0 y 2,0 W/cm^2+tripsina a pH 5,0, respectivamente, frente al 32 y 38% bajo irradiación NIR a las mismas fluencias y el 24% en presencia exclusivamente de tripsina.

4.3.3 Perfiles de temperatura inducidos por irradiación de luz NIR en la nanoplataforma AuNRs/PSSPLL@ICG/HA.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Como se observa en la **Figura 4.1** los espectros de absorción de la ICG cuando esta se encuentra unida a la nanoplataforma muestran una banda intensa a ca. 802 nm. Después de la absorción de luz, las moléculas de ICG puede seguir tres vías diferentes para desactivar su estado excitado [39]:

a) La energía que absorbe el tinte puede ser convertida en fluorescencia a una longitud de onda de ca. 830 nm [22].
b) Una parte de la luz absorbida es transferida al estado triplete T_1 de la ICG, el cual permite la generación de ROS cuando se produce la relajación al estado singlete prohibido [40].
c) La energía absorbida puede convertirse en calor mediante mecanismos de conversión internos, de hecho, ca. el 80-85% de la luz absorbida se transforma efectivamente en calor [8].

Por lo tanto, la generación de calor es también un proceso principal después de la absorción lumínica por las moléculas de ICG (coeficiente de extinción ε_{ICG} = $1.1 \cdot 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$ a 778 nm), que se sumaría a la conversión de luz en calor proporcionada por los AuNRs, como se vio en Capítulos anteriores ($\varepsilon_{AuNR} = 2.0 \cdot 10^9 \pm 0.1 \cdot 10^9$ $M^{-1}cm^{-1}$). Por ello, parece interesante analizar la naturaleza de la conversión de luz en calor acoplada proveniente de las Nps metálicas y las moléculas de ICG para elucidar si pueden existir efectos competitivos o sinérgicos en la plataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA.

La generación de incrementos de temperatura bajo irradiación NIR a 808 nm se evaluó a tres fluencias (0,5; 1,0; 2,0 W/cm^2), y dos concentraciones de nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL-ICG/HA ($1 \cdot 10^{10}$ y $1 \cdot 10^{11}$ AuNRs/mL.) Se utilizaron como controles la ICG libre a concentraciones de 22 y 2.2 µM, similares a las presentes en las concentraciones de la nanoplataforma, y la plataforma AuNRs/PSS/PLL/HA y una disolución acuosa pura como contrales adicionales (ver **Figura 4.3**).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

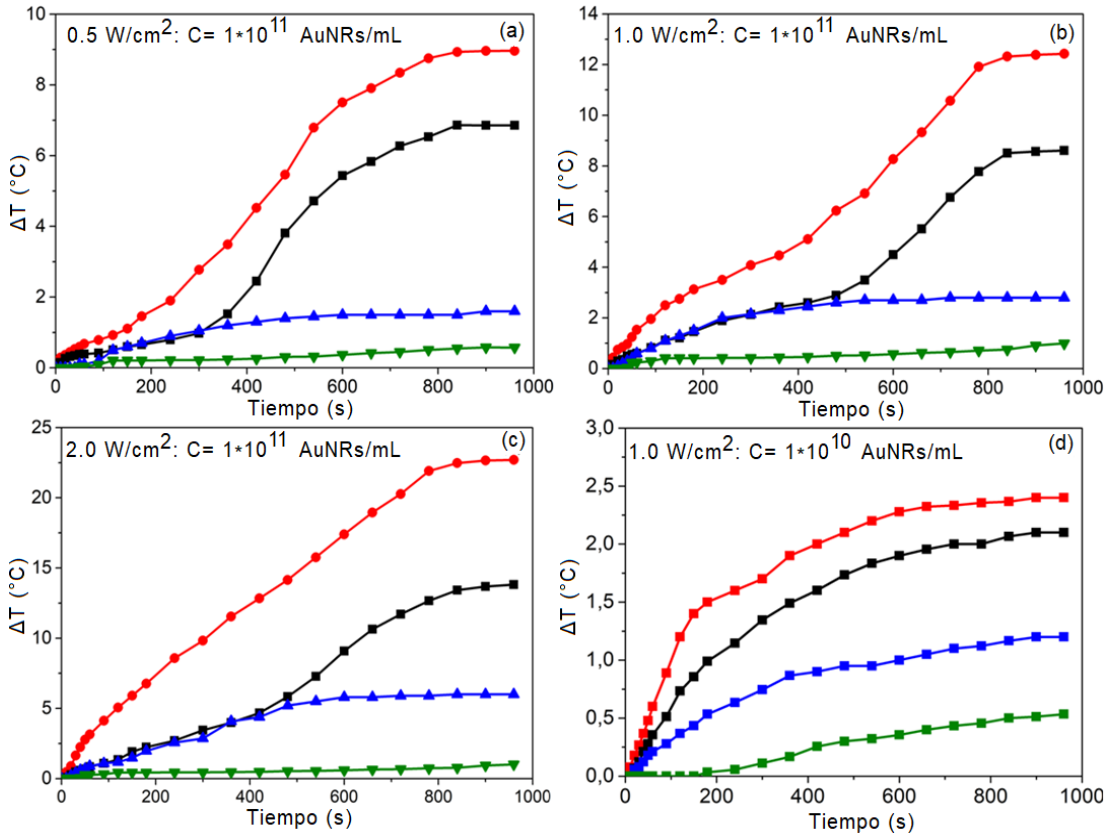


Figura 4.3 Incrementos de temperatura con el tiempo bajo irradiación de luz NIR (808 nm). Se probaron tres fluencias: 2,0 (a-b), 1,0 (c-d), y 0,5 W/cm^2 (e-f) a dos concentraciones diferentes, 1·10^{11} Np/mL (columna de la izquierda) y 1·10^{10} Np/mL (columna de la derecha) para (■) AuNRs/PSS/PLL-ICG/HA y (●) AuNRs/PSS/PLL/HA, (▲) ICG libre, y (▼) disolución acuosa pura.

Así, la disolución acuosa sólo presentó incrementos de temperatura de 1 ºC a todas las irradiaciones aplicadas. Sin embargo, los incrementos de temperatura a la concentración de ICG pura mayor (22 µM) fueron de 6,0; 2,8 y 1,6 ºC bajo fluencias aplicadas de 0,5, 1,0 y 2,0 W/cm^2, respectivamente, lo que confirma la efectividad de la ICG para convertir luz en calor [41]. Sin embargo, los incrementos de temperatura en las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL/HA y AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA sí presentaron una dependencia con la concentración de Nps y con la fluencia. En concreto se observó un incremento en la temperatura de hasta 22,6 y 13,8 ºC para AuNRs/PSS/PLL/HA y AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA, respectivamente, a una fluencia de 2,0 W/cm^2 y una concentración de 1.0·10^{11} Nps/mL, alcanzándose el máximo a los 15 min de iluminación. Cuando se disminuye la concentración de Nps a 1,0·10^{10} Nps/mL, el incremento de temperatura es mucho

menor, alcanzando 2,4 y 2,1 ºC, respectivamente, con un máximo a ca. 10-12 min. Además, es necesario hacer notar que se observan menores incrementos de temperatura para la plataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA que para la AuNRs/PSS/PLL/HA, y estas diferencias fueron generalmente mayores a medida que la fluencia aumentaba. Este comportamiento puede deberse a la capacidad de la ICG para absorber luz NIR, como se ha explicado anteriormente, por lo que se genera un fenómeno de competencia con la conversión de luz en calor por los AuNRs. En el primer caso, después de la absorción de luz, la ICG regresa a su estado fundamental a través de la emisión de fluorescencia, la producción de oxígeno singlete y la conversión interna (descomposición no radiativa) con emisión de calor. Estos mecanismos competitivos hacen que la ICG sea menos eficiente como agente fototérmico. Es conocido también que la sección transversal de absorción de los AuNRs es un orden de magnitud superior que la de las moléculas del marcador más absorbente [41]. En este caso, el coeficiente de extinción molar de los AuNRs es $\varepsilon = 2 \cdot 10^9 \pm 0.1 \cdot 10^9\ M^{-1}cm^{-1}$, de acuerdo con datos previos [42], y como se indicó anteriormente. Este valor es 5 órdenes de magnitud más grande que el coeficiente de extinción de la ICG ($\varepsilon = 1.08 \cdot 10^4\ M^{-1}cm^{-1}$ a 77 8nm), por lo que la energía absorbida por el PS no se convierte toda en calor como en el caso de las Nps metálicas [43]. Por lo tanto, los incrementos de temperatura observados en presencia de la molécula fotoexcitable en la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA son menores [15]. Por otro lado, parte de la energía incidente también puede ser transmitida a las capas de PE, disminuyendo la eficiencia de la conversión en calor. A pesar de que los PE utilizados en este trabajo no absorben en el espectro NIR, puede suceder que electrones calientes producidos por el decaimiento del plasmón longitudinal de las Nps metálicas se transfieran a los PEs del recubrimiento (ver **Figura 4.4**) [44].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

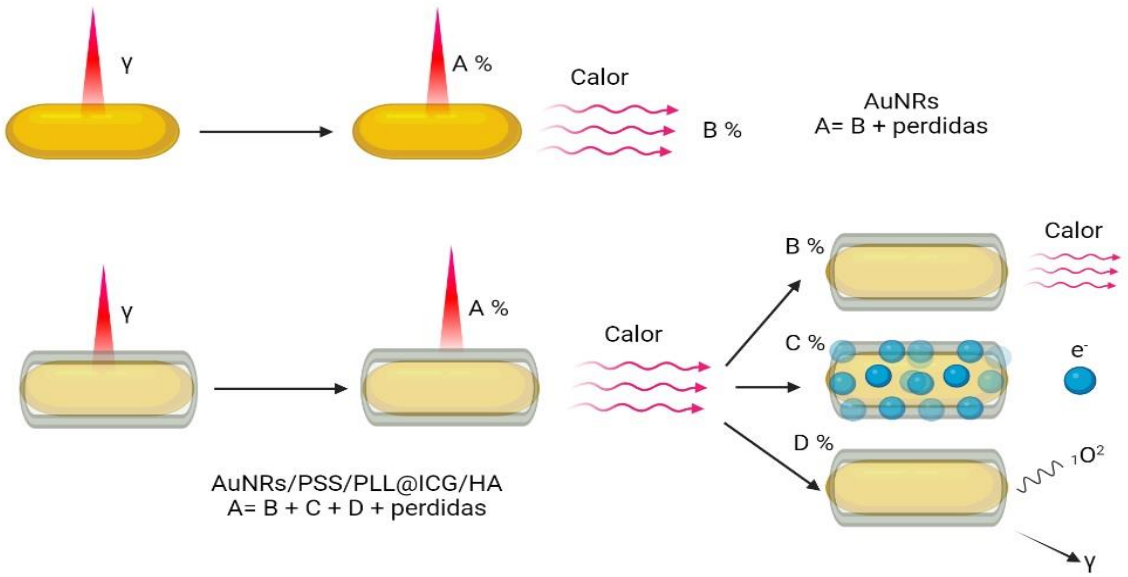


Figura 4.4 Representación esquemática de la distribución de la luz NIR absorbida por AuNRs recubiertos con las capas de PE + ICG. (A%) se corresponde con la energía de la luz incidente. (B%) es una contribución a la conversión de luz en calor. (C%) está relacionado con la energía de la carga inducida por electrones calientes de la superficie del metal a las capas poliméricas que modulan su interacción. (D%) es la contribución de la luz emitida por fluorescencia y la producción de ROS por la ICG.

4.3.4 Generación in vitro de ROS

La posibilidad de usar los AuNRs funcionalizados con PSS/PLL@ICG/HA para obtener un potencial agente PDT se comprobó midiendo su capacidad de generación de ROS, en particular, $_1O^2$ bajo irradiación de luz láser NIR a 808 nm. La generación de $_1O^2$ se determinó cuantitativamente siguiendo el decaimiento en la intensidad de la sonda DPIBF a 420 nm, que es una trampa de oxígeno singlete específica (ver **Figura 4.5**) [45].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

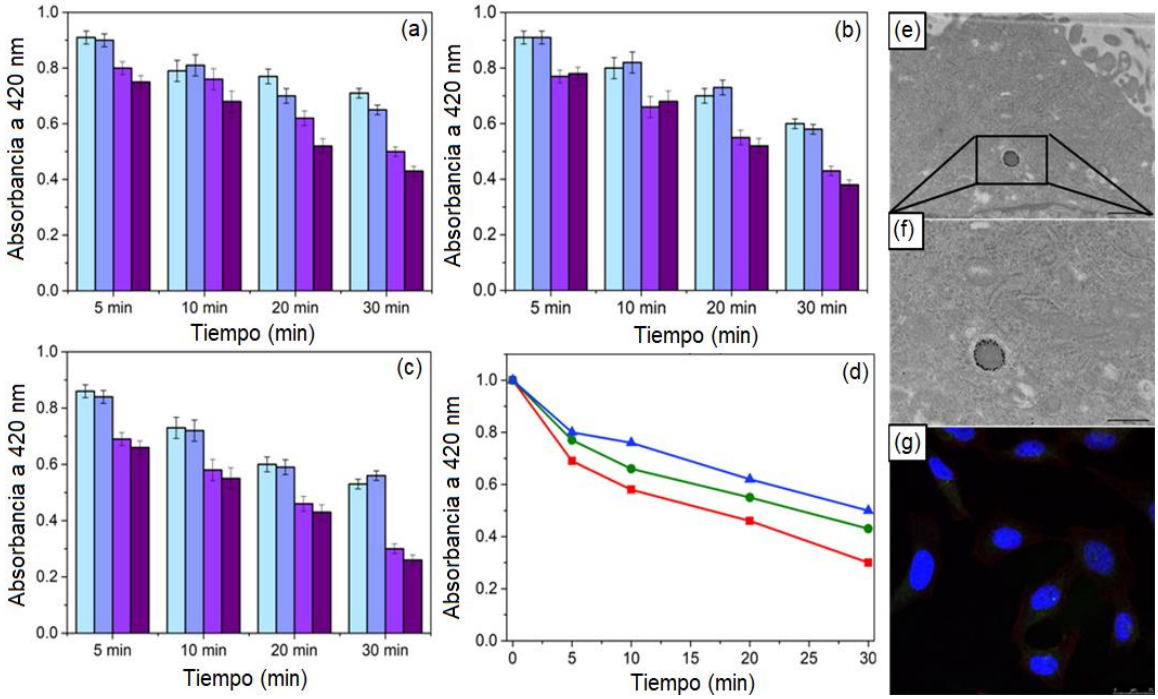


Figura 4.5 Decaimiento de la absorbancia de la sonda DPIBF a 420 nm inducida por la plataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA (—), AuNRs/PSS/PLL/HA (—), ICG libre (—) y disolución acuosa pura (—) a (a) 3,0, (b) 1,0, y (c) 0,5 W/cm². (d) AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA iluminados durante 30 min a 3,0 (■), 1.0 (●), y 0.5 (▲) W/cm² para comparación de la producción de $^1O_2$. e) Imágenes TEM de AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA internalizadas dentro de endosomas de células HeLa; f) imagen aumentada. g) Imágenes de microscopía confocal de AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA en modo reflexión dentro de células HeLa. Núcleo teñido con DAPI.

La reacción de especies de oxígeno individuales ($_1O^2$) con DPIBF conduce a productos de oxidación incoloros. Se observó que la producción de $_1O^2$ aumentaba conforme es irradiada la muestra (es decir, la absorbancia del DPIBF disminuía) hasta los 30 min de irradiación, y después parece alanzar una región relativamente cuasi-plana (**Figura 4.5 d**), lo que indica que a partir de ese tiempo se produce una disminución en la producción de $_1O^2$. Además, la producción de $_1O^2$ se mejoró a medida que aumentaba la entrada de energía de irradiación, como se puede observar en la **Figura 4.2 a-d.** Así, la producción de $_1O^2$ es ligeramente inferior en la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA que la obtenida con las moléculas de ICG libres a concentraciones similares, indicando que la energía efectiva del láser disponible para la producción de $_1O^2$ en la nanoplataforma híbrida fue absorbida simultáneamente por el tinte y el núcleo metálico de AuNRs [46, 4], generando las especies oxidativas y calor, de acuerdo con trabajos previos [45, 40, 47, 48].

Además, la accesibilidad de la ICG en la plataforma al oxígeno molecular disuelto en el medio también puede ser más reducida debido a encontrarse encapsulada en el recubrimiento polimérico [45,47].

También se debe mencionar que la disolución acuosa y la plataforma AuNRs/PSS/PLL/HA mostraron una pequeña disminución en la absorbancia de la sonda DPIBF. Esto puede ser debido a la naturaleza del producto de oxidación primario de la molécula de DIPBF, un ozónido inestable que se divide en dibencil-benceno, y la formación de algún producto oxigenado desconocido [49] bajo la irradiación en entorno acuoso [50]. Ambas muestras muestran el mismo decaimiento de la absorbancia ya que no generaron realmente $_1O^2$ por sí mismas, por lo que pueden usarse como referencias del proceso de degradación del DPIBF.

4.3.5 Generación in vitro de ROS en células tumorales

En esta sección se evaluó la capacidad de la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA como agente PDT en células HeLa. En un primer paso, se comprobó mediante imágenes de TEM y microscopía de epifluorescencia la correcta internalización de la nanoplataforma híbrida después de 6 h de incubación (**Figuras 4.5 e-g**). Las imágenes de TEM confirman la incorporación de las partículas dentro de las endosomas del citoplasma celular (**Figura 4.5 e-f**), con una localización en la zona de la perimembrana. Además, la luz reflejada por las partículas híbridas metálicas también demuestra que están presentes dentro de las células formando pequeños agregados.

Por otro lado, la producción *in vitro* de ROS en células cancerígenas HeLa por parte de la nanoplataforma en las condiciones antes mencionadas se evaluó a diferentes intervalos de tiempo mediante medidas de microscopía de epifluorescencia (λ_{ex}= 490 nm/λ_{em}= 520 nm) por medio de un ensayo fluorimétrico (ver **Capítulo 2**, **Sección 1.6.7** para más detalles). Las células HeLa sin tratar se usaron como control negativo y células suplementadas con H_2O_2 (800 µM) como control positivo.

USC DE COMPOSTELA

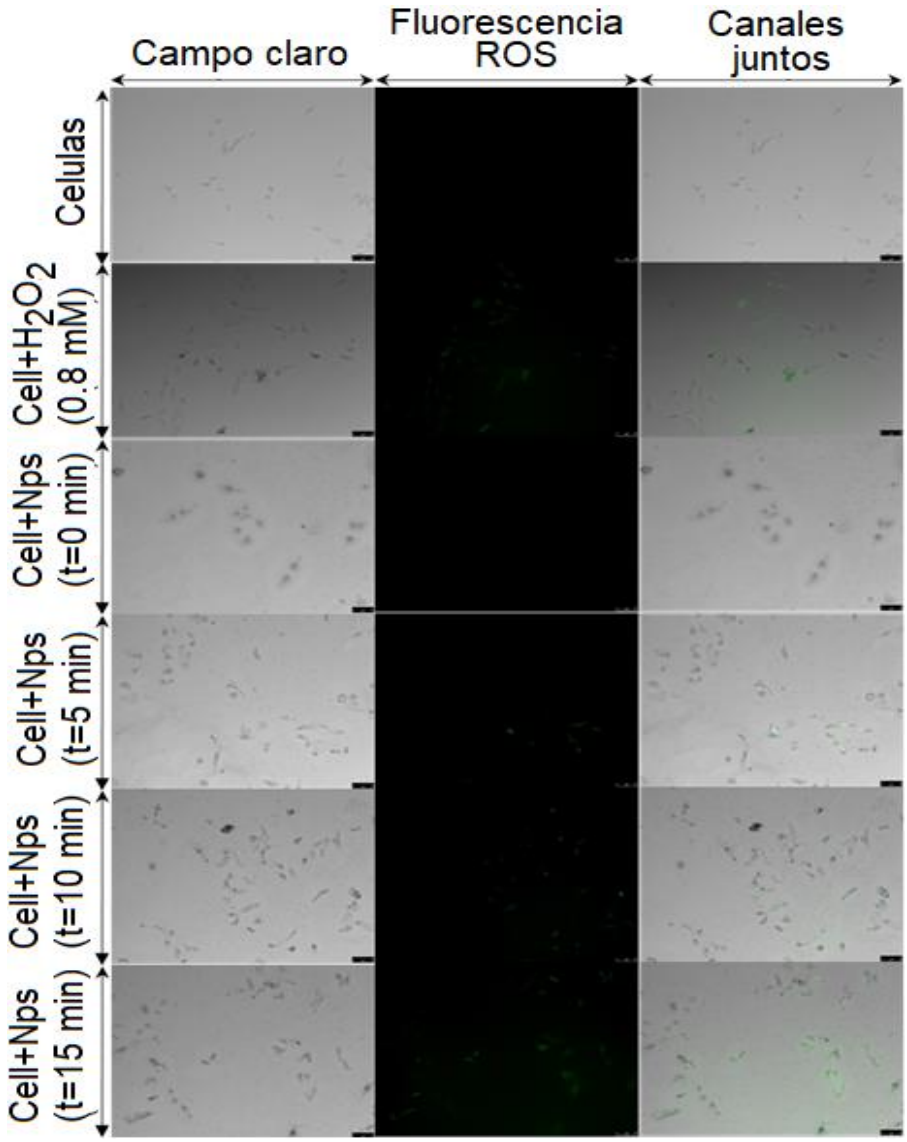


Figura 4.6 Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la producción de ROS por la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA dentro de células HeLa bajo irradiación NIR con una fuente de luz láser CW (1,0 W/cm^2) durante 15 min. Como control negativo se utilizaron células sin tratar, mientras que como control positivo se trataron con H_2O_2. En la imagen se muestra luz transmitida directamente (izquierda), el canal verde de fluorescencia (en el centro, λ_{em} = 520 nm para la detección del kit) e imágenes superpuestas (derecha). Escala = 75 µm.

La **Figura 4.6** muestra que la señal de fluorescencia verde y, por lo tanto, la producción de ROS aumenta a tiempos de irradiación más largos. Las células no tratadas no mostraron ninguna señal fluorescente, como era de esperar, mientras que también se detectó una leve señal de fondo cuando la nanoplataforma se internalizó en las células en ausencia de iluminación NIR debido a algún estrés metabólico

generado tras la captación celular (de acuerdo con los datos de citotoxicidad, ver más abajo) y/o proveniente del reflejo de la luz de las propias nanoplataformas.

La producción de $_1O^2$ por la nanoplataforma bajo una irradiación a 808 nm con un láser continuo NIR a tiempos constantes de 5 y 10 min y después de 6 h y 24 h de incubación, respectivamente, se evaluó a distintas temperaturas (4, 25 y 37 °C). El efecto de la dependencia de la generación de ROS con la temperatura se consideró con el fin de desacoplar las contribuciones de las respuestas fototérmicas y fotodinámicas de las nanoplataformas a la citotoxicidad celular (ver más abajo). Las células HeLa no tratadas se utilizaron como control negativo y las células suplementadas con H_2O_2 se usaron como control positivo. Adicionalmente, también se utilizó como control adicional la plataforma AuNRs/PSS/PLL/HA para la cual se observó una menor producción de ROS bajo las distintas condiciones ensayadas (< 40% de generación de ROS tras 5 min de irradiación y < 50% tras 10 min de irradiación, respectivamente).

La **Figura 4.7 a** muestra que los datos experimentales confirman que la presencia de ROS se incrementó bajo iluminación a 2,0 W/cm^2 respecto a 1,0 W/cm^2 alcanzándose ca. 78-80% y 57-59% después de 5 min de irradiación, respectivamente. No se observaron cambios significativos en la generación de ROS con la temperatura macroscópica de la disolución. Además, la producción de ROS fue superior para mayores tiempos de irradiación, esto es, hasta 10 min (**Figura 4.7 b**), con valores en el rango de ca. 69-71% y 82-84% a 1,0 y 2.0 W/cm^2, respectivamente, en función de la temperatura, -comparado con el control positivo H_2O_2 (100%). Finalmente, a partir de la **Figura 4.7** también se observa claramente que la generación de ROS disminuye con el tiempo de incubación lo cual es, por una parte, consecuencia de la muerte celular (ver abajo) por la exposición a la luz y, por otra, debido a la relajación de la molécula fotoexcitable al estado basal, lo que reduce la producción de ROS en el medio. Además, a esta disminución también podrían contribuir una posible disminución de la fotoestabilidad de la sonda en el medio celular y/o cierta expulsión de la nanoplataforma desde el interior celular.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

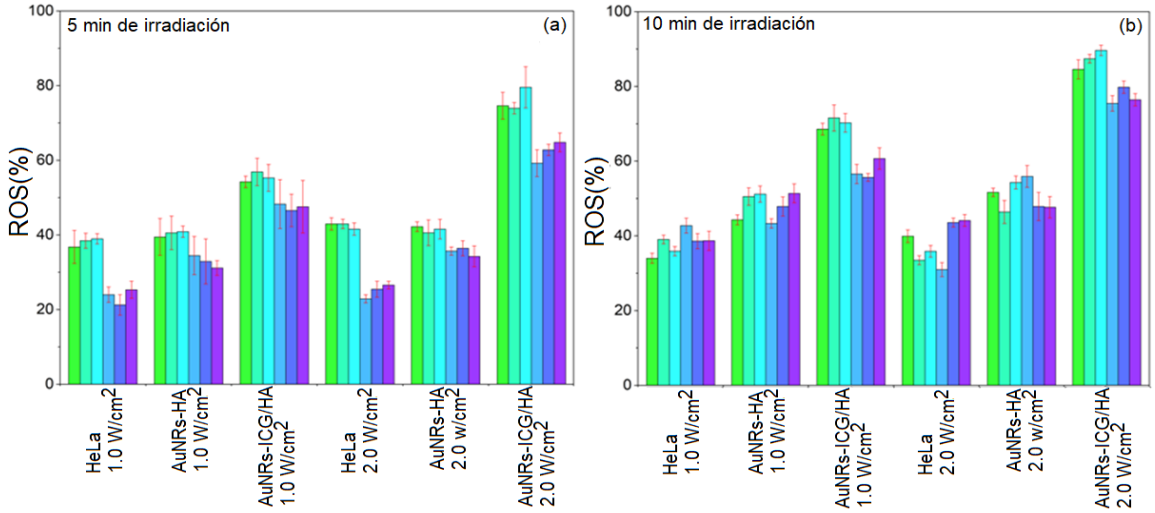


Figura 4.7 Detección de ROS generadas por las nanoplataformas AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA internalizadas en células HeLa bajo irradiación NIR de 1,0 y 2,0 W/cm^2 con un láser continuo a 808 nm por un período de (a) 5 min y (b) 10 min con un kit de detección de ROS por icroscopía de fluorescencia. Las barras de color corresponden a: 4ºC, 6 h de incubación; 25ºC, 6 h de incubación; 37 ºC, 6 h de incubación; 4ºC, 24 h de incubación; 25ºC, 24 h de incubación; 37ºC, 24 h de incubación. Las células sin tratar se utilizaron como control negativo, y las células tratadas con H_2O_2 como control positivo.

4.3.6 Actividad terapéutica in vitro en las células tumorales

4.3.6.1 Citotoxicidad e internalización de la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL-ICG/HA in vitro.

Finalmente, se determinó la actividad terapéutica de la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA se llevó a cabo mediante medidas de citotoxicidad celular mediante el ensayo de proliferación CCK-8 tras 6 y 24 h de incubación en células HeLa (**Ecuación 15**) a 4, 25 y 37 ºC y a fluencias de 1,0 y 2,0 W/cm^2 durante 5 min y 10 min de cara a identificar el origen de la respuesta citotóxica de las plataformas bajo excitación lumínica, la existencia o no de un potencial efecto sinérgico/aditivo, y la eficiencia en el direccionamiento activo de la nanoplataforma.

En la **Figura 4.8 a** se puede observar que bajo irradiación NIR de 1,0 W/cm^2 durante 5 min la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL/HA apenas presenta actividad terapéutica de carácter fototérmico excepto a 37 ºC, para la cual la toxicidad celular alcanza valores de ca. 18% ya que el incremento de temperatura producido de ca. 2-

3 ºC (ver **Figura 4.3**) es suficiente para alcanzar cierta sensibilización celular dando lugar, pues, al inicio del proceso de apoptosis, tal y como se comentó en el **Capítulo 3**. Este efecto se ve incrementado cuando el tiempo de incubación se alarga hasta las 24 h, alcanzándose ca. 35% de mortalidad celular.

Por el contrario, cuando se incorpora el fotosensibilizador ICG dentro de las nanoplataformas (AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA), la toxicidad celular se incrementa hasta un ca. 29-30% en el rango de temperaturas 4-25 ºC y hasta ca. el 35% a 37 ºC después de 6 h de incubación, con incrementos de hasta el 35-36% y ca. 43% después de 24 h de incubación, respectivamente. Estos datos confirman que la encapsulación de ICG promueve la generación de ROS bajo iluminación NIR, como se confirma por el aumento de la toxicidad celular a 4 y 25 ºC y con el tiempo de incubación para la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA en comparación con la AuNRs/PSS/PLL/HA. En este punto también es necesario recordar que los incrementos de temperatura macroscópica debidos a la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA son inferiores a los obtenidos con la de AuNRs/PSS/PLL/HA, de modo que los aumentos de toxicidad observados no responden a un origen térmico. Además, la ICG libre provoca una muerte celular comprendida en el rango entre el 30-35% y 45-50% tras 6 y 24 h de incubación, respectivamente, bastante similar a la obtenida con las plataformas de AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA. Es importante recalcar que la toxicidad generada por ROS por la adición de H_2O_2 a las células, y usado como control, es muy elevada y se encuentra comprendida en el rango del 64-68% según las condiciones aplicadas.

Por otro lado, cuando se incrementa la fluencia de la irradiación incidente hasta 2,0 W/cm^2 durante 5 min, se observa un incremento adicional de la toxicidad celular, mucho más claro tras 24 h de incubación y a la mayor temperatura de incubación (37 ºC, **Figura 4.8 b**). En este caso, la mortalidad celular es de ca. 23 y 50% y 42 y 61% para AuNRs/PSS/PLL/HA y AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA después de 6 y 24 h de incubación, respectivamente. De este modo, parece que a medida que se incrementa la fluencia la contribución del efecto fototérmico es mayor principalmente a 37 ºC, mientras que a 4 y 25 ºC parece que la generación de ROS, esto es, la PDT, es la contribución principal a la muerte celular, con toxicidades que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

alcanzan ca. 40-44% y 49-54% después de 6 y 24 h de incubación para la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA, respectivamente.

Finalmente, se observaron aumentos en la toxicidad celular adicionales cuando se incrementó el tiempo de irradiación hasta los 10 min a una fluencia de 2,0 W/cm^2 (**Figura 4.8 c**). Para la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL/HA la mortalidad celular aumentó de ca. 7, 15 y 23% tras 6 h de incubación a 47, 50 y 55% después de 24 h a 4, 25 y 37 ºC, respectivamente; mientras tanto, para la de AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA esos incrementos pasaron de 3, 16 y 39% a 58, 60 y 71% después de 6 y 24 h de incubación en el mismo rango de temperaturas, respectivamente. De este modo, el mayor tiempo de exposición a la luz NIR parece aumentar el efecto fototérmico mientras que la generación de ROS parece mantenerse después de comparar los datos experimentales correspondientes a las plataformas AuNRs/PSS/PLL/HA y AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA. Este comportamiento puede provenir del menor contacto del tinte con el oxígeno molecular del medio acuoso circundante, que es la clave para generar especies $^1O_2$ y OH^-, después de su encapsulación en el interior de la cubierta polimérica, y que además adicionalmente absorbe luz. El contacto directo de la ICG libre con el medio acuoso facilitaría tanto la generación de ROS como la difusión de calor a los alrededores de la nanoestructura viéndose reflejada, en general, una mayor toxicidad celular excepto a 37 ºC después de 24 h de incubación.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

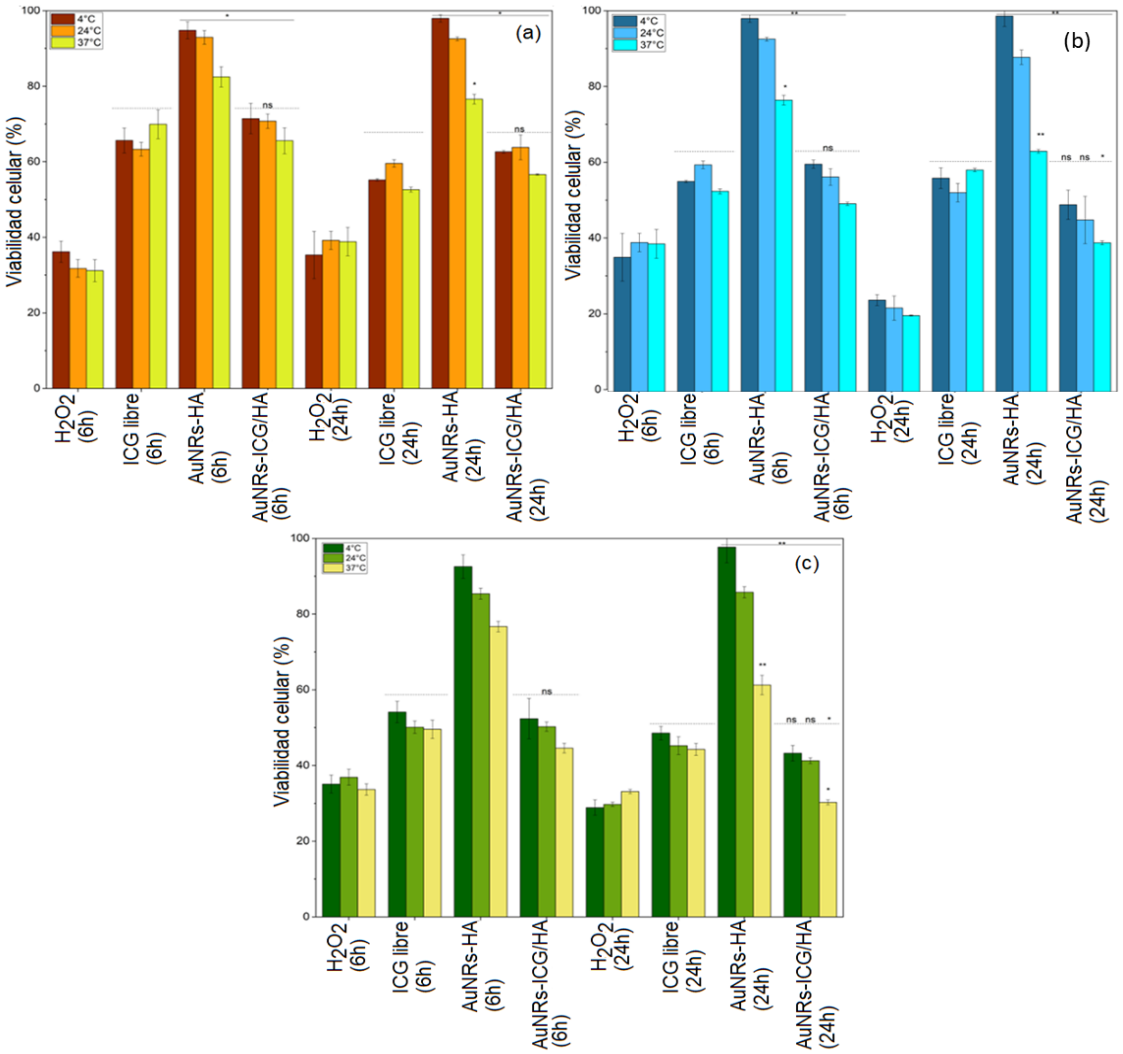


Figura 4.8 Citotoxicidad celular inducida por la plataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA tras 6 y 24 h de incubación a la fluencia de a) 1,0 y b) 2,0 W/cm^2 tras 5 min de exposición a la irradiación NIR, y a c) 2,0 W/cm^2 tras 10 min de exposición. Las etiquetas corresponden a: células HeLa a las que se le administró H_2O_2 (800 µM), ICG libre (20 µM) AuNRs/PSS/PLL/HA y AuNRs/PSS/PLL@ICG.

En resumen, la PPTT provoca muerte celular de forma más eficiente que la PDT a fluencias y tiempos de irradiación mayores y a temperaturas cercanas a la del cuerpo humano, mientras que la producción de ROS parece predominar a tiempos de irradiación más cortos y a menores temperaturas de la disolución. Por lo tanto, es necesario encontrar las condiciones óptimas de iluminación para activar los procesos de PPTT y de PDT la secuencia de activación adecuada para obtener una terapia multimodal eficiente contra el cáncer [15].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.4 CONCLUSIÓN

En este trabajo, se diseñó un nuevo sistema terapéutico multimodal basado en la funcionalización de AuNRs a través de la técnica LbL para funcionalizarlos con una capa superficial biocompatible polimérica que contenga el fotosensibilizador NIR ICG incorporado en su interior mediante la conjugación por química carbodiimida con el biopolímero catiónico PLL utilizado en el proceso de recubrimiento, dando lugar a la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA. Esta nanoplataforma híbrida podría ser capaz de generar terapia dual PDT y PPTT para el tratamiento de tumores sólidos. Se encontró que la fotoestabilidad del tinte aumenta cuando se encuentra protegido dentro de la capa polimérica en comparación a cuando se encuentra libre en disolución. Además, esta molécula fotoexcitable puede mantenerse estable dentro de la nanoplataforma y, en caso de que sea necesario, se puede controlar su velocidad y perfil de liberación desde aquella usando tanto estímulos internos (por ejemplo, enzimas como la tripsina, que degradan la capa de PLL) y externos (por ejemplo, luz NIR gracias a las propiedades ópticas del tinte en sí mismo y de las Nps metálicas). De forma sorprendente, la conversión de luz en calor localizado proporcionada por la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA fue menor en comparación con la de AuNRs/PSS/PLL/HA, en la que no se encapsuló ICG. Este comportamiento podría estar originado por la baja sección transversal de absorción de las moléculas fluorescentes comparada con la del núcleo metálico y a efectos competitivos entre la molécula orgánica y la Np metálica, lo que da lugar a esa disminución de la transformación de luz en calor. La plataforma híbrida fue capaz de producir ROS de forma eficiente en tubos de ensayo e intracelularmente gracias a la presencia del tinte. Esta producción de ROS dependió de la fluencia y del tiempo de irradiación, pero no de la temperatura del medio. Sin embargo, la protección del tinte dentro del recubrimiento polimérico de los AuNRs evita un contacto más directo con el oxígeno disuelto en el medio externo, lo que provoca una ligera disminución en la producción de ROS respecto a la obtenida con la ICG libre a la misma concentración y a condiciones similares de irradiación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente, se mostró que, bajo condiciones adecuadas de iluminación la aplicación de luz NIR provoca un aumento de la toxicidad celular gracias al efecto simultáneo de la generación de ROS y la producción de calor fototérmico, es decir, PDT y PPTT. Sin embargo, se observó que la PDT es predominante a bajas fluencias y temperaturas del medio externo, mientras que el efecto tóxico se ve bastante aumentado por el efecto de la PPTT a tiempos de irradiación más largos y a temperaturas por encima de 37 ºC, permitiendo alcanzar los umbrales de la temperatura de sensibilización o del régimen de ablación, según el caso, para provocar la muerte celular a través de las vías de muerte celular inducidas térmicamente bien por apoptosis o necrosis.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.5 REFERENCIAS

[1] J. He, X. Huang, Y.-C. Li, Y. Liu, T. Babu, M. A. Aronova, S. Wang, Z. Lu, X. Chen y Z. Nie, «Self-Assembly of Amphiphilic Plasmonic Micelle-Like Nanoparticles in Selective Solvents,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 21, nº 135, pp. 7974-7984, 2013.

[2] X. E.-S. I. H. Q. W. &. E.-S. M. A. Huang, «Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods.,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 128, nº 6, pp. 2115-2120, 2006.

[3] W.-S. Kuo, C.-N. Chang, Y.-T. Chang, M.-H. Yang, Y.-H. Chien, S.-J. Chen y C.-S. Yeh, «Gold Nanorods in Photodynamic Therapy, as Hyperthermia Agents, and in Near-Infrared Optical Imaging,» *Angewandte International Edition Chemie,* vol. 49, nº 15, pp. 2711-2715, 2010.

[4] B. P. J. Y. T. C. H. K. I. H. &. C. Y. Jang, «Gold nanorod-photosensitizer complex for near-infrared fluorescence imaging and photodynamic/photothermal therapy in vivo.,» *ACS nano,* vol. 5, nº 2, pp. 1086-1094, 2011.

[5] Y. L. X. Z. J. D. J. &. F. S. S. Mi, «Multimodality treatment of cancer with herceptin conjugated, thermomagnetic iron oxides and docetaxel loaded nanoparticles of biodegradable polymers,» *Biomaterials,* vol. 33, nº 30, pp. 7519-7529, 2012.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[6] T. J. G. C. J. H. B. W. J. G. K. D. K. M. M. J. &. P. Q. Dougherty, «Photodynamic therapy,» *Photodynamic therapy. Journal of the National Cancer Institute,* vol. 90, nº 12, pp. 889-905, 1998.

[7] J. F. L. T. W. C. J. &. Z. G. Lovell, «Activatable photosensitizers for imaging and therapy.,» *Chemical reviews,* vol. 110, nº 5, pp. 2839-2857, 2010.

[8] J. P. S. B. Q. R. I. E. C. L. S. K. S. V. S. P. B. W. &. H. T. Celli, «Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring and Optimization,» *Chem Rev.,* vol. 5, nº 110, pp. 2795-2838, 2010.

[9] K. Y. Choi, G. Liu, S. Lee y X. Chen, «Theranostic nanoplatforms for simultaneous cancer imaging and therapy: current approaches and future perspectives,» *Nanoscale,* vol. 4, pp. 330-342, 2012.

[10] G. S. B., «A matter of balance between life and death: targeting reactive oxygen species (ROS)-induced autophagy for cancer therapy,» *Autophagy,* vol. 6, nº 7, pp. 835-837, 2010.

[11] T. P. A. Devasagayam, J. C. Tilak, K. K. Boloor, K. S. Sane, S. S. Ghaskadbi y R. D. Lele, «Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects,» *J Assoc Physicians India,* vol. 52, pp. 794-804, 2004.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[12] A. Z. Pasha, S. A. Bukhari, H. A. El Enshasy, H. El Adawi y S. A. Obaid, «Compositional analysis and physicochemical evaluation of

date palm (Phoenix dactylifera L.) mucilage for medicinal purposes,» *Saudi J Biol Sci,* vol. 2, nº 29, pp. 774-780, 2022.

[13] W. S. H. P. W. Z. C. S. N. G. L. W. H. J. C. D. L. G. C. X. N. Z. Lin J, «Photosensitizer-loaded gold vesicles with strong plasmonic coupling effect for imaging-guided photothermal/photodynamic therapy.,» *ACS Nano,* vol. 7, nº 6, p. 5320–5329, 2013.

[14] J. Y. M. Z. G. S. M. I. C. Z. Z. Z. A. M. B. Y. Q. Z. Z. C. Y. H. C. Z. &. T. W. Wang, «Photosensitizer-gold nanorod composite for targeted multimodal therapy.,» *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany),* vol. 9, nº 21, pp. 3678-3684, 2013.

[15] J. Y. C. W. I. K. M. &. T. G. Kim, «Tumor-targeting nanogel that can function independently for both photodynamic and photothermal therapy and its synergy from the procedure of PDT followed by PTT,» *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society,* vol. 171, nº 2, pp. 113-121, 2013.

[16] M. D. H. Y. e. a. Wang L, «Gold nanostars mediated combined photothermal and photodynamic therapy and X-ray imaging for cancer theranostic applications.,» *Journal of Biomaterials Applications,* vol. 30, nº 5, pp. 547-557, 2015.

[17] R. R. Allison, «Photodynamic therapy: oncologic horizons,» *Future Oncol,* vol. 1, nº 10, pp. 123-124, 2014.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[18] N. Muhamad, T. Plengsuriyakarn y K. Na-Bangchang, «Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer

therapy: a systematic review,» *Int J Nanomedicine,* vol. 13, pp. 3921-3935, 2018.

[19] S. Bamrungsap, A. Treetong, C. Apiwat, T. Wuttikhun y T. Dharakul, «SERS-fluorescence dual mode nanotags for cervical cancer detection using aptamers conjugated to gold-silver nanorods,» *Microchimica Acta,* vol. 183, nº 1, pp. 249-256, 2016.

[20] L. Lu, J. Yu, X. Liu, X. Yang, Z. Zhou, Q. Jin, R. Xiao y C. Wang, «Rapid, quantitative and ultra-sensitive detection of cancer biomarker by a SERRS-based lateral flow immunoassay using bovine serum albumin coated Au nanorods,» *RSC Advances,* vol. 10, nº 1, pp. 271-281, 2019.

[21] Y. &. K. K. Watanabe, «Assessment by pulse dye-densitometry indocyanine green (ICG) clearance test of hepatic function of patients before cardiac surgery: its value as a predictor of serious postoperative liver dysfunction,» *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia,* vol. |13, nº 3, pp. 299-303, 1999.

[22] T. Desmettre, J. M. Devoisselle y S. Mordon, «Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography,» *Surv Ophthalmol,* vol. 1, nº 45, pp. 15-27, 2000.

[23] D. E. F. D. &. J. R. K. Dolmans, «Photodynamic therapy for cancer.,» *Nature reviews. Cancer,* vol. 3, nº 5, pp. 380-387, 2003.

[24] N. M. P. M. W. B. Jarvi MT, «Singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) for photodynamic therapy: current status, challenges

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

and future prospects.,» *Photochemistry and Photobiology,* vol. 82, nº 5, pp. 1198-1210, 2006.

[25] S. M. L. V. S. S. V. M. L. J. M. A. M. E. B. d. K. J. E. P. L. &. P. M. G. Ranuncolo, «CD44 expression in human gliomas,» *Journal of Surgical Oncology,* vol. 79, nº 1, pp. 30-36, 2002.

[26] H. S. S. Qhattal y X. Liu, «Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes,» *Molecular Pharmaceutics,* vol. 8, nº 4, pp. 1233-1246, 2011.

[27] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán y P. Mulvaney, «Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications,» *Coordination Chemistry Reviews,* vol. 249, nº 17-18, pp. 1870-1901, 2005.

[28] I. J. Yu C, «Quantitative evaluation of sensitivity and selectivity of multiplex nanoSPR biosensor assays,» *Biophysical Journal,* vol. 93, nº 10., pp. 3684-3692, 2007.

[29] Z. J. Hu, S. Hou, Y. L. Ji, T. Wen, W. Q. Liu, H. Zhang, X. W. Shi, J. Yan y X. C. Wu, «Fast characterization of gold nanorods ensemble by correlating its structure with optical extinction spectral features,» *AIP Advances,* vol. 4, p. 117137, 2014.

[30] E. D. Clutter, L. L. Chen y R. R. Wang, «Role of photobleaching process of indocyanine green for killing neuroblastoma cells,» *Biochemical and Biophysical Research Communications,* vol. 589, pp. 254-259, 2022.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[31] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier y J. M. DeSimone, «The effect of particle design on cellular internalization pathways,» *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 33, nº 105, pp. 11613-11618, 2008.

[32] W. E. FOX IJ, «Indocyanine green: physical and physiologic properties,» *Proceedings of the Staff meetings. Mayo Clinic,* vol. 35, pp. 732-744, 1960.

[33] D. D. Michie y Y. Villarreal, «A STUDY OF THE ABSORPTION AND STABILITY CHARACTERISTICS OF SODIUM AMAZOLENE (COOMASSIE BLUE) INDIVIDUALLY AND IN COMBINATION WITH INDOCYANINE GREEN (CARDIO GREEN),» *British Journal of Anaesthesia,* vol. 38, nº 12, pp. 923-928, 1966.

[34] J. Gathje, R. Steuer y K. Nicholes, «Stability studies on indocyanine green dye,» *Journal of Applied Physiology,* vol. 29, nº 2, pp. 181-185, 1970.

[35] O. M. R. C. V. &. B. S. Björnsson, «Physicochemical Studies on Indocyanine Green: Molar Lineic Absorbance, pH Tolerance, Activation Energy and Rate of Decay in Various Solvents,» *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.,* vol. 21, nº 7, pp. 453-458, 1983.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[36] H.-S. Lv, J. Liu, J. Zhao, B.-X. Zhao y J.-Y. Miao, «Highly selective and sensitive pH-responsive fluorescent probe in living Hela and HUVEC cells,» *Sensors and Actuators B: Chemical,* vol. 177, pp. 956-963, 2013.

[37] S. K. Lee, M. S. Han, S. Asokan y C.-H. Tung, «Effective gene silencing by multilayered siRNA-coated gold nanoparticles,» *Small,* vol. 7, nº 3, pp. 364-370, 2011.

[38] L. C. Smith, J. Duguid, M. S. Wadhwa, M. J. Logan, C.-H. Tung, V. Edwards y J. T. Sparrow, «Synthetic peptide-based DNA complexes for nonviral gene delivery,» *Advanced Drug Delivery Reviews,* vol. 30, pp. 115-131, 1998.

[39] G. B. W. H. L. J. S. E. R. F. R. M. M. A. W. J. J. C. &. G. R. J. Shafirstein, «Indocyanine green enhanced near-infrared laser treatment of murine mammary carcinoma,» *International Journal of Cancer,* vol. 5, nº 130, pp. 1208-1215, 2012.

[40] C. Enrico, «Chapter 2 - Nanotheranostics and theranostic nanomedicine for diseases and cancer treatment,» *Design of Nanostructures for Theranostics Applications,* pp. 41-68, 2018.

[41] X. Huang y M. A. El-Sayed, «Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT),» *Alexandria Journal of Medicine* , vol. 47, nº 1, pp. 1-9, 2011.

[42] A. M. Alkilany, L. B. Thompson, S. P. Boulos, P. N. Sisco y C. J. Murphy, «Gold nanorods: their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions,» *Adv Drug Deliv Rev,* vol. 2, nº 64, pp. 190-199, 2012.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[43] L. K. E.-S. I. E.-S. M. Jain PK, «Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and

composition: applications in biological imaging and biomedicine,» *J Phys Chem B,* vol. 14, nº 10, pp. 7238-7248, 2006.

[44] J. Z. M. W. K. L. V. B. P. N. a. N. J. H. Ryan Huschka, «Light-Induced Release of DNA from Gold Nanoparticles: Nanoshells and Nanorods,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 133, nº 31, pp. 12247-12255, 2011.

[45] K. Weishaupt, C. Gomer y T. Dougherty, «Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor.,» *Cancer Res,* vol. 36, nº 7, pp. 2326-2329, 1976.

[46] B. W. C. Z. S. F. L. &. L. Z. Tian, «Photothermally enhanced photodynamic therapy delivered by nano-graphene oxide.,» *ACS nano,* vol. 5, nº 9, pp. 7000-7009, 2011.

[47] M. A.-M. P. I. E. M. V.-A. S. B. J. A. C. P. T. a. V. M. Antonio Topete, «Fluorescent Drug-Loaded, Polymeric-Based, Branched Gold Nanoshells for Localized Multimodal Therapy and Imaging of Tumoral Cells,» *ACS Nano,* vol. 8, nº 3, pp. 2725-2738, 2014.

[48] S. H. P. N. L. X. R. L. D. W. Z. L. J. C. S. N. G. L. G. &. C. X. Wang, «Single continuous wave laser induced photodynamic/plasmonic photothermal therapy using photosensitizer-functionalized gold nanostars.,» *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.),* vol. 25, nº 22, pp. 3055-3061, 2013.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[49] J. &. M. G. Howard, «Autoxidation and Photooxidation of 1,3-Diphenylisobenzofuran: A Kinetic and Product Study,» *Canadian Journal of Chemistry,* vol. 53, pp. 2199-2201, 1975.

[50] A. Sivéry, F. Anquez, C. Pierlot, J. Aubry y E. Courtade, «Singlet oxygen (1O2) generation upon 1270 nm laser irradiation of ground state oxygen (3O2) dissolved in organic solvents: Simultaneous and independent determination of 1O2 production rate and reactivity with chemical traps,» *Chemical Physics Letters,* vol. 555, pp. 252-257, 2013.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 5

"Todos somos científicos cuando somos niños, pero al crecer, solo algunos conservan un poco de esa curiosidad que es la madre de la ciencia".

Juan Aguilar M.

NANOPLATAFORMA HÍBRIDA BASADA EN AuNRS PARA TERAPIA MULTIMODAL

5.1 INTRODUCCIÓN

Como finalización del trabajo desarrollado en nanoplataformas funcionales basadas en nanocilindros de oro (AuNRs) de complejidad progresiva, en este Capítulo se propone el desarrollo de una nanoplataforma teragnóstica multimodal incorporando a las capacidades terapéuticas previamente estudiadas en los **Capítulos 3 y 4** (quimioterapia, fototermia plasmónica, y terapia fotodinámica) la encapsulación y liberación controlada de material genético como un ARN de silenciamiento (siRNA). La posibilidad de encapsular material genético en nanovehículos/nanoplataformas basados en AuNRs aparece como una interesante alternativa gracias a sus potenciales efectos terapéuticos a través de la inhibición de la expresión de proteínas sobreexpresadas/genes mutados en las células cancerígenas [1]. El siRNA es una doble cadena de ARN generalmente compuesta de 21-23 pares de bases capaz de degradar secuencias de ARN mensajero complementario para la reducción de la expresión genética relacionada con una enfermedad y, en particular, en el cáncer [2]. Sin embargo, para ser una opción terapéutica real, las terapias basadas en siRNA deben de hacer frente a una serie de escollos como son: la pobre bioestabilidad de estas biomoléculas, su pobre biodistribución, su escasa captación celular, su veloz degradación por las nucleasas, y el desarrollo de potenciales reacciones inmunogénicas no específicas [3]. Por ello, la posibilidad de poder incorporar, proteger, estabilizar y liberar selectivamente biomoléculas de siRNA en

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

su sitio de acción -el citoplasma de la célula tumoral, empleando AuNRs como vehículos nanotransportadores capaces, a su vez, de proveer de capacidades de diagnóstico por imagen y/o terapéuticas adicionales (*e.g*, PPTT) es de potencial importancia para el ámbito biomédico.

Por lo tanto, en este Capítulo de Tesis se ha desarrollado un nanosistema teragnóstico basado en AuNRs obtenidos por el método de reducción química húmeda mediado por semillas como potenciales nanovehículos transportadores [4]. Los AuNRs resultantes se recubrieron por el método de LbL con las capas poliméricas de polielectrólitos: poli(sulfonato de estireno) aniónico, PSS, y poli-L-(lisina), PLL, cargado catiónicamente. Además de proveer de estabilidad coloidal, estos polímeros pasivan y ocultan las moléculas de cetiltrimetilammonio (CTAB) residuales, potencialmente citotóxicas, que pueden permanecer en su superficie después de los procesos de lavado tras el proceso sintético [5, 6]. Para dotar a la nanoplataforma con capacidad quimioterapéutica, se introdujo el antineoplásico DOXO en el recubrimiento de las Nps de oro entre el PSS y la PLL gracias a la interacción electrostática del fármaco con la capa del primer polielectrólito (ver **Capítulo 3**). Para que el nanosistema pudiese producir ROS para PDT, se procedió a la conjugación de la PLL con la ICG, un colorante de tricarbocianina con capacidad de absorción lumínica en el NIR (ver **Capítulo 4**), y aprobado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos americana (FDA, de sus siglas en inglés) como agente de contraste para la visualización de vasculaturas retinianas y coroideas [7, 8], y como generador de radicales de oxígeno para PDT [9, 10]. Finalmente, un siRNA para inhibir la sobreexpresión del ligando PD-L1 (siRNA-PDL1) del receptor de muerte celular programada-1, PD-1, en las células cancerígenas, punto de control inmunológico típicamente empleado por las células tumorales como "vía de escape" de la respuesta inmune del cuerpo humano, se incorporó a la nanoplataforma también mediante la metodología LbL mencionada anteriormente aprovechando, para ello, las potenciales interacciones electrostáticas de carácter atractivo entre la propia molécula de siRNA y el conjugado PLL@ICG. Finalmente, como capa externa de la nanoplataforma se incorporó HA gracias a su capacidad estabilizante tanto electrostática como estérica, así como por su potencial capacidad para dirigir el

nanosistema hacia células tumorales que sobreexpresan el receptor CD44 [11], como son las de tumor de cuello de útero o de mama [12, 13].

Así, siguiendo esta metodología se obtuvo la nanoplataforma teragnóstica AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/SiRNA/HA. Esta pudo activarse para liberar las moléculas bioactivas de forma controlada y a demanda gracias a la aplicación de estímulos internos, *e.g*. la degradación de la PLL por proteasas, o externos, *e.g*. estímulos lumínicos en el NIR de potencia y duración adecuados gracias a las propiedades ópticas de los AuNRs, lo que permite la modulación de la atracción entre las capas poliméricas en el recubrimiento superficial de las Nps metálicas. Por otra parte, se comprobó que la nanoplataforma era coloidalmente estable y no tóxica a las células *per se*. Además, se evaluó el potencial efecto terapéutico sinérgico cuando se combinan de forma simultánea los efectos de la PPTT y/o PDT inducida por la fotoexcitación NIR aplicada, la acción quimioterapéutica de la DOXO, y el efecto de silenciamiento génico del siRNA en dos líneas celulares, células humanas de tumor de cérvix (HeLa) que sobreexpresan los receptores CD44 [15], y fibroblastos murinos (3T3 Balb) utilizados como células control gracias a su sensibilidad ante agentes potencialmente citotóxicos y a la no expresión de receptores CD44 en su membrana celular, lo cual nos permitirá calibrar la capacidad de direccionamiento activo del nanosistema. Finalmente, la ruta de muerte celular inducida por la plataforma completa se evaluó mediante la determinación de las células que se encuentran en estado apoptótico y necrótico tras la administración de la plataforma a diferentes intervalos de tiempo.

5.2 OBJETIVOS

- Desarrollar una nanoplataforma teragnóstica biocompatible basada en AuNRs a través de una estrategia de funcionalización de su superficie con polielectrólitos biocompatibles mediante la metodología LbL, incorporando en la estructura del recubrimiento el fármaco antineoplásico DOXO, el fotosensibilizador ICG, y una biomolécula de siRNA.
- Proporcionar a la nanoplataforma una capacidad de direccionamiento activo mediante la incorporación de una capa final de HA en el recubrimiento de los

AuNRs, capaz de unirse selectivamente a los receptores CD44 sobreexpresados en diversas células tumorales.

- Establecer y optimizar los mecanismos de activación controlada que permitan regular los perfiles de liberación de los diferentes agentes bioactivos mediante la aplicación de estímulos internos (acción enzimática) y externos (excitación lumínica en el NIR).
- Estudiar los procesos de captación celular, internalización y la citotoxicidad inducida por la plataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA en dos líneas celulares, HeLa y 3T3 Balb, de cara a establecer y determinar su potencial terapéutico y su selectividad hacia las células que sobreexpresan los receptores CD44.
- Analizar el efecto terapéutico combinado de la PPTT, la quimioterapia, la PDT, y el silenciamiento génico empleando la plataforma AuNRs/PSS/DOXO/ PLL@ICG/siRNA/HA desarrollada, y evaluando el mecanismo de muerte celular inducido por ella.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Caracterización de la nanoplataforma de AuNRs/PSS/DOXO/ PLL@ICG/siRNA/HA

Como nanovehículo de partida, se emplearon AuNRs con un LPSR centrado en 792 nm y dimensiones 31 × 8 nm, de tal manera que tras su funcionalización con las capas poliméricas la banda LPSR se desplazó ligeramente hacia el rojo con un máximo próximo a los 808 nm, longitud de onda de la fuente lumínica NIR que se empleó en los estudios de fotoexcitación.

Para pasivar la capa de moléculas de CTAB residuales resultantes del proceso sintético que pueden estar presentes en la superficie de los AuNRs, además de proporcionar a la plataforma con una estabilidad coloidal adecuada, una liberación controlada de los principios bioactivos incorporados, y con una capacidad de direccionamiento activo, se construyó un recubrimiento polimérico alrededor de las Nps metálicas mediante la técnica de LbL incorporando las biomoléculas

seleccionadas por su interés terapéutico (DOXO, ICG y siRNA) gracias a su deposición controlada sobre la superficie de los AuNRs, tal y como se describió en el **Capítulo 2**, **Sección 2.3.5** para conseguir la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA.

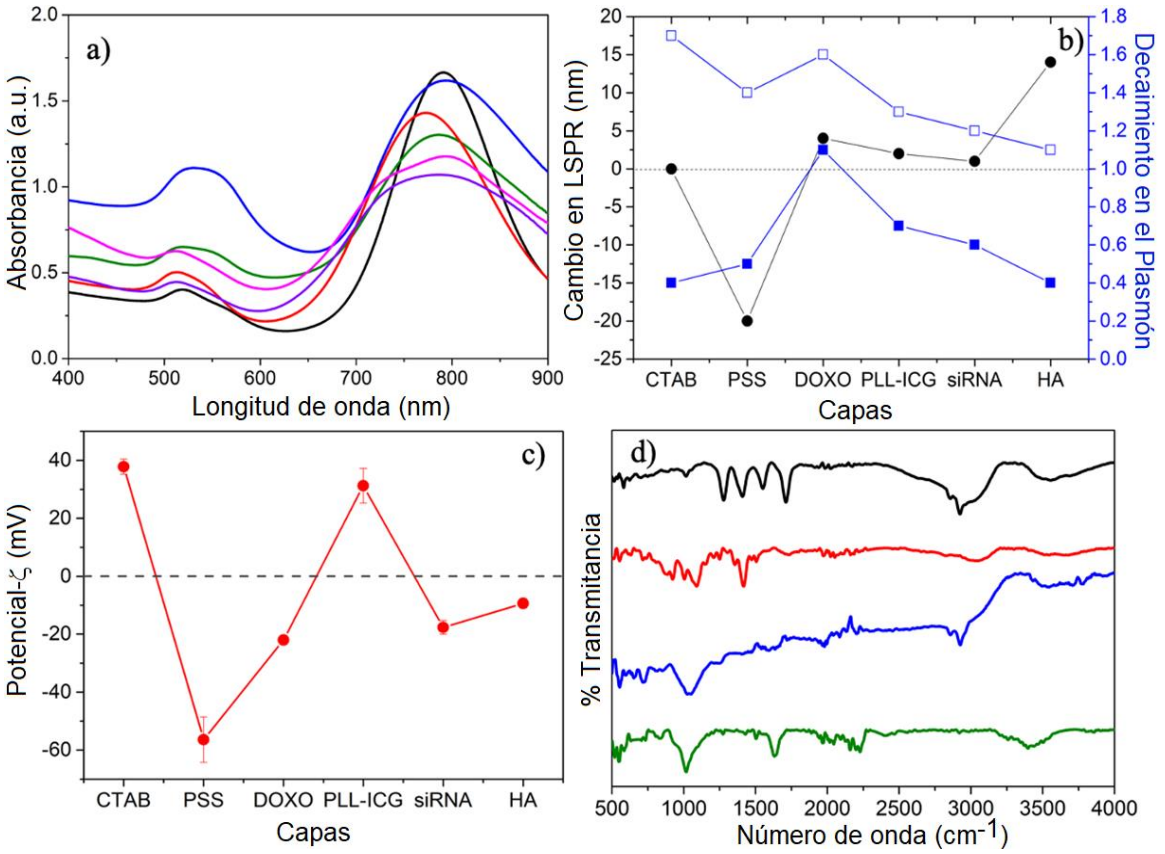


Figura 5.1 (a) Espectro UV-Vis de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA tras la adición de las distintas capas que forman el recubrimiento externo. (b) Desplazamientos de la banda LSPR (●) y decaimiento del LPSR (□) y del plasmón de resonancia superficial transversal, TSPR, (■) tras cada capa depositada. (c) Variación del potencial -ζ tras cada capa depositada. (d) Espectros FTIR de (—) DOXO libre, (—) ICG libre, (—) siRNA y (—) AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/SiRNA/HA.

La correcta formación/deposición de las diferentes capas sobre la superficie de los AuNRs se confirmó mediante espectrofotometría UV-Vis a través de: los progresivos desplazamientos de la banda del LPSR de las Nps metálicas hacia el rojo a medida que se iban incorporando las distintas capas del recubrimiento (**Figura 5.1 a-b**); y los cambios observados en los valores del potencial ζ de positivo a negativo (y viceversa) en función de la carga eléctrica de la capa depositada. En particular, de la **Figuras 5.1 a, b** y la **Tabla 5.1** se puede observar que el máximo

de la banda del LPSR, localizada inicialmente en ca. 792 nm, disminuyó inicialmente en intensidad y se desplazó hacia el azul tras la deposición de la capa de PSS para, posteriormente, correr sucesivamente hacia el rojo tras la adsorción de la DOXO, el conjugado PLL@ICG, el siRNA, y el HA. Estos cambios en la intensidad y posición del LPSR son consecuencia de la extrema sensibilidad de los AuNRs a las propiedades dieléctricas de su entorno circundante [16, 17], como se comentó en capítulos anteriores. En particular, el desplazamiento hacia el azul tras la deposición del PSS puede estar determinado por el mayor valor del índice de refracción (IR) del CTAB (IR = 1.435) si se compra con el del PSS (IR = 1.38) [18].

Tabla 5.1 Propiedades de los AuNRs tras cada capa depositada en su superficie. Los datos son el promedio de 3 lotes diferentes de AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/SiRNA/HA. El desplazamiento del LSPR de los AuNRs se calculó como $\Delta\lambda = \lambda$ (i)-λ(CTAB). Los decaimientos longitudinales y transversales se expresan como la relación entre la absorbancia de la luz de la capa i con respecto a la de la capa de CTAB.

Capas	Potencial ζ (mV)	LSPR Δλ (nm)	Dec. LSPR (a.u.)	Dec. TSPR (a.u.)
CTAB	37.8 ± 0.6	0	1.7	0.4
PSS	-56.4 ± 0.9	-20	1.4	0.5
DOXO	-22.0 ± 1.6	4	1.6	1.1
PLL@ICG	31.3 ± 6.0	2	1.3	0.7
SiRNA	-17.7 ± 0.4	1	1.2	0.6
HA	-9.3 ± 0.6	0	1.1	0.4

Además, cabe destacar: i) el fuerte corrimiento hacia el rojo de la banda del LPSR tras la deposición de la capa de PLL@ICG, que puede estar influenciado por los dos picos de absorción de la ICG localizados a 708 nm (oligómeros) y 780 nm (monómeros) [19] tras la deposición del conjugado; ii) a pesar de que la PLL posee un índice de refracción inferior al de la DOXO, en la **Figura 5.1 a** se observa que no existe un desplazamiento hacia el azul cuando se deposita el conjugado PLL@ICG. Este efecto podría surgir de la configuración espacial de la DOXO tras la adsorción sobre la superficie de la NP metálica, con un IR local más bajo que el de la molécula cristalina libre. Esta disposición del fármaco también explicaría los valores de potencial-ζ negativos observados después de su adsorción, y que podrían estar

relacionados con la exposición de los grupos fenólicos desprotonados de la molécula al entorno, con un IR de ca. 1.47-1.50 [20]. Por otro lado, en la **Figura 5.1 a** también se puede observar que tras la deposición de la capa de HA se produce un ensanchamiento de la banda del LPSR, que puede provenir de la formación de clústeres de Nps. Este hecho se confirma a través de las imágenes de TEM recogidas en la **Figura 5.2** en las que se observa que, particularmente, tras la deposición del HA se produce una cierta clusterización de la nanoplataforma. No obstante, la presencia de estos clústeres puede verse también influenciada por el proceso de secado previo a la realización de las imágenes.

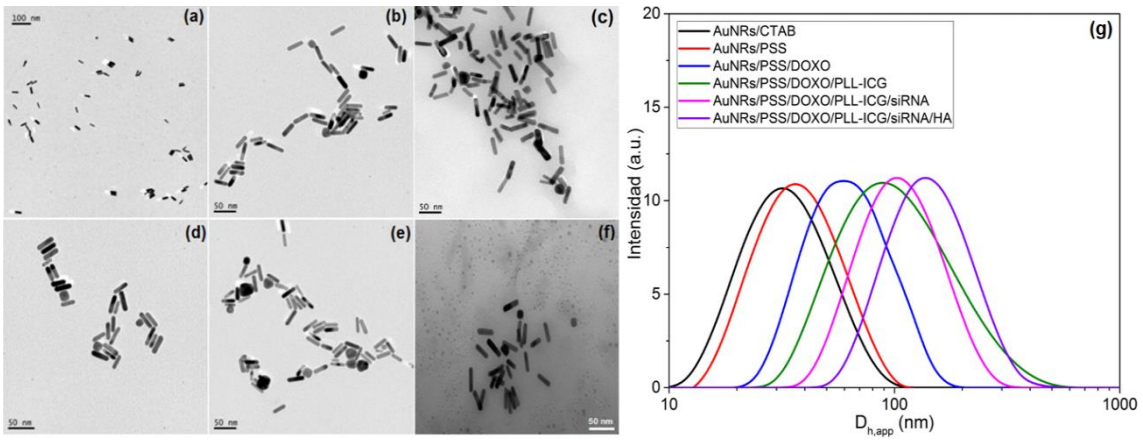


Figura 5.2 Imágenes TEM de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA tras la deposición de las distintas capas que forman el recubrimiento: (a) CTAB, (b) PSS, (c) DOXO, (d) PLL@ICG, (e) siRNA, y (f) HA. (g) Distribución de tamaños de la nanoestructura en cada paso de proceso de recubrimiento obtenida por DLS.

Las capas poliméricas apenas se observan en las imágenes TEM, pero las Nps aparecen relativamente bien dispersas sin signos de agregación durante la deposición de las primeras capas, en todo caso, formando algún pequeño clúster. Esta observación está también corroborada por las distribuciones de tamaño relativamente estrechas obtenidas por DLS, en donde no hay tampoco signos evidentes de la formación de agregados de gran tamaño, pero sí del fenómeno de formación de clústeres comentado previamente. En este sentido, cabe mencionar el aumento progresivo del tamaño de la nanoplataforma tras los diferentes pasos del proceso de recubrimiento. No obstante, es necesario considerar que para la obtención del tamaño de Np por DLS se supone que la nanoestructura presenta una simetría esférica; por otro lado, él HA presenta una gran capacidad para retener moléculas de agua [21, 22, 23] lo que hace que este polímero esté altamente hidratado y, por

consiguiente, muy extendido en disolución acuosa incrementando el tamaño hidrodinámico de la nanoestructura.

Los valores de potencial-ζ (**Figura 5.1 c**), por otro lado, mostraron una inversión completa de la carga superficial inicial después de recubrir los AuNRs con el polielectrólito negativo PSS, y el conjugado PLL@ICG (positivo). Tras la deposición de la DOXO, se observó únicamente un aumento (valor menos negativo) del potencial-ζ como consecuencia de la presencia de aminas cargadas en la estructura del fármaco [24], mientras que tras la deposición de la capa de siRNA se produjo una disminución del potencial-ζ a valores casi nulos. Finalmente, la incorporación del HA completó el proceso de inversión de la carga superficial a valores negativos de nuevo, aunque no demasiado elevados, a través de un control cuidadoso de la cantidad adsorbida para evitar una repulsión electrostática excesiva entre la nanoplataforma y la membrana celular que impida su interacción y posterior captación e internalización [25].

La exitosa formación de las distintas capas de la nanoplataforma se corroboró adicionalmente mediante FTIR. En la **Figura 5.1 d** se muestran los espectros con los modos vibracionales característicos de la DOXO, ICG y siRNA libres como controles, así como el de la plataforma completa AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/SiRNA/HA.

Tal y como se indicó en el **Capítulo 3**, la DOXO libre presenta los siguientes modos vibracionales característicos: 584 cm^{-1} (grupos alquino), 1016 cm^{-1} (grupo aromático C-H), 1047 cm^{-1} (grupos carboxilo C=O), 1548 cm^{-1} (grupos alquileno C=C); 1712 cm^{-1} (grupos carbonilos C=O), 2024 cm^{-1} (grupos amino NH_3), 1643 cm^{-1} y 2925 cm^{-1} (grupos aminas y aminas cargadas $C=NH^+$) y a 3559 cm^{-1} (estiramiento de los grupos hidroxilo -OH). Por su parte en el **Capítulo 4** también se indicó que la ICG presenta bandas características de estiramiento a 1091 cm^{-1} correspondiente al grupo C-N, a 1251 cm^{-1} para la amida, 1415 cm^{-1} a los anillos aromáticos (C=C); a 2910 cm^{-1} se encuentra el modo vibracional de la torsión de los enlaces C-H, y a 3461 cm^{-1} se encuentran los modos vibracionales del estiramiento de los enlaces N-H. En el caso del siRNA libre, esta molécula fue identificada a través de los modos vibracionales propios de la sonda fluorescente que incorpora en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

su estructura como elemento de marcaje (FTIC), y que se encuentran en 3423 cm^{-1} de los grupos hidroxilo, 2015 cm^{-1} del isotiocianato, un pico característico asignado al grupo carbonilo de la lactona alrededor de 1727 cm^{-1}, y las bandas características de la absorción vibracional del anillo de benceno a 1594, 1535 y 1458 cm^{-1}, respectivamente [26]. Finalmente, el espectro FTIR de la nanoplataforma completa presentó los modos vibracionales característicos de la DOXO a 1407, 1550, 1712, 2867 y 2929 cm^{-1}) [27]; de la ICG a 1398 cm^{-1}, 1631 cm^{-1}, 1481 cm^{-1}y 2813 cm^{-1} confirmándose, pues, la encapsulación de estos elementos biactivos en la nanoestructura [28], junto con los modos vibracionales del FTIC que marca el siRNA a 3434 cm^{-1}, 2086 cm^{-1}, 1637 cm^{-1} [29], todos ellos ligeramente desplazados respecto a los de las moléculas libres. Además, se puede observar que la capa de CTAB fue completamente pasivada y/o eliminada, ya que no hay trazas de los modos vibracionales característicos del surfactante.

5.3.2 Encapsulación de los principios activos y estabilidad de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA

En primer lugar, se determinó la cantidad de compuestos bioactivos encapsulados en la nanoplataforma, así como la eficiencia de su encapsulación. Por ejemplo, en trabajos previos [32] únicamente se logró encapsular un máximo de 300 µg de DOXO sin comprometer la estabilidad de los AuNRs, alcanzando una eficiencia de encapsulación (EE%) de ca. 25%. En este caso, la presencia de KOH en condiciones ácidas (pH 4.1) favoreció la estabilidad de la nanoplataforma y permitió la incorporación de hasta 350 µg del fármaco antineoplásico, con una EE% de ca. 70%, tal y como se comentó en el **Capítulo 3**. Mientras tanto, la EE% de la ICG fue del 84% (ca. 22 µM), mientras que la del siRNA fue del ca. 89%, con una incorporación máxima de 425 pmol del material genético.

A continuación, se determinó la estabilidad coloidal de la nanoplataforma bajo diversas condiciones, esto es, en disoluciones acuosas de distinto pH, en presencia y ausencia de proteínas séricas, y en presencia y ausencia de proteasas. La **Figura 5.3 a** muestra que la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA es completamente estable a pH básico y

fisiológico (9,0 y 7,4, respectivamente) de acuerdo con la invarianza de los tamaños de partícula a lo largo del período de incubación considerado. Sin embargo, a pH 5,0 y, sobre todo, ácido (pH 3,0), la plataforma incrementa progresivamente su tamaño y su carga superficial también varía de forma notoria a valores más positivos dentro de las primeras 48 h de incubación (ver **Figura 5.3 c**), principalmente como consecuencia de la formación de clústeres de Nps.

No obstante, no se observaron signos de precipitación en el intervalo temporal analizado. La formación de estos clústeres de Nps se debe a la reducción de la ionización de los grupos carboxilos cargados negativamente de las capas de PSS y, principalmente, del HA, lo que provoca tanto una disminución apreciable de la repulsión electrostática entre partículas además de una cierta condensación del biopolímero [24], lo que conlleva también una cierta reducción de la estabilidad estérica del nanosistema favoreciendo, pues, el establecimiento de interacciones atractivas entre Nps para minimizar la energía libre del sistema.

La presencia de proteínas séricas también provoca incrementos en el tamaño de la nanoplataforma como consecuencia de la formación de la corona proteica desde los primeros momentos del proceso de incubación (**Figura 5.3 b**), lo que da lugar también a la formación de algunos clústeres como se observa en la distribución de tamaños obtenida por DLS (**Figura 5.3 e**), y en los valores del potencial ζ mayores (menos negativos) en presencia de las proteínas séricas (**Figure 5.3 d**).

Finalmente, la incubación en presencia de una proteasa como la tripsina degrada progresivamente la capa de PLL, lo que debería permitir la liberación activa de las biomoléculas encapsuladas de forma endógena.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

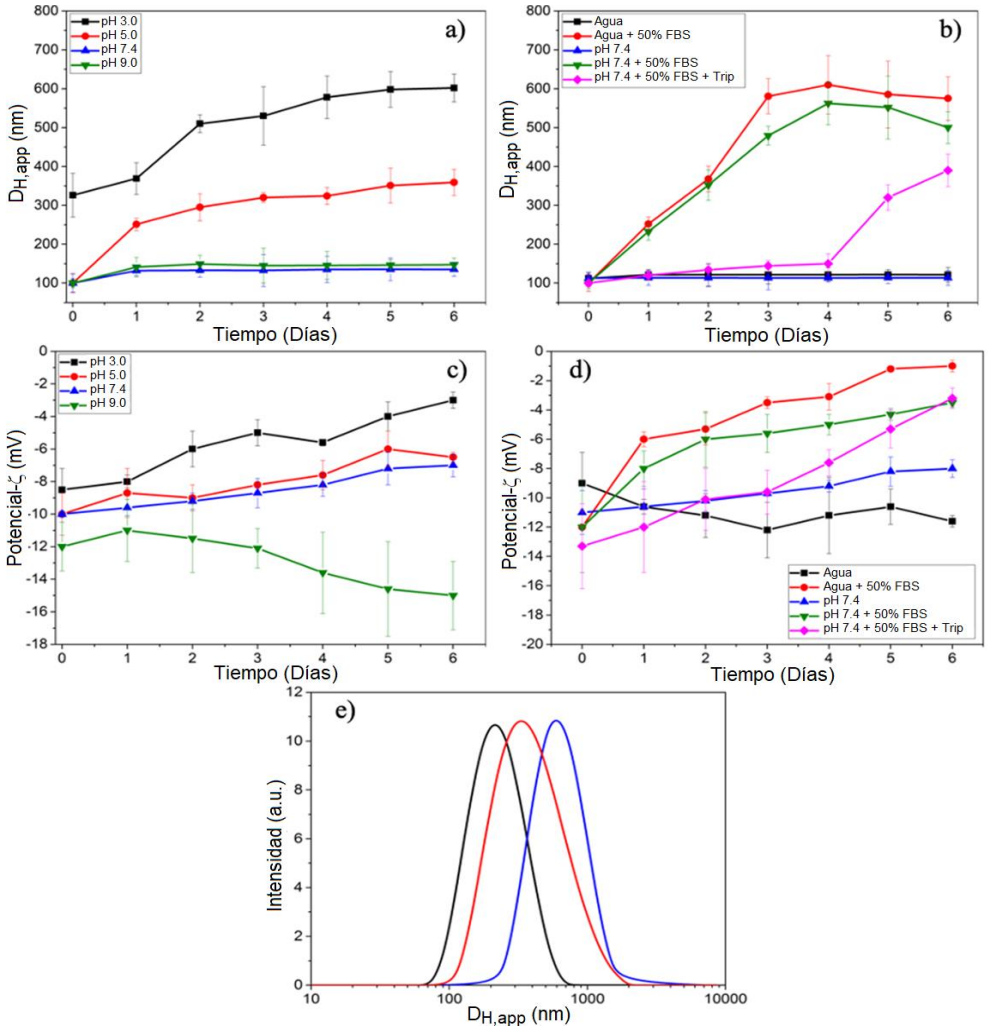


Figura 5.3 Determinación de la estabilidad coloidal de la nanoplataforma AuNR/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA mediante la monitorización de la evolución temporal de sus tamaños hidrodinámicos a (a) pH diferente, (b) en ausencia y presencia de FBS, y en presencia de tripsina, a 37ºC, y de las variaciones de potencial-ζ a (c) pH diferente, (d) en ausencia y presencia de FBS, y en presencia de tripsina, a 37ºC. (e) Distribución de población de tamaños de la nanoplataforma en agua + 50% (v/v) FBS tras 24 (—), 48 (—) y 72 h (—) de incubación.

Para que este mecanismo sea verdaderamente efectivo la estabilidad coloidal de la plataforma debe mantenerse, como así se confirma por los pequeños cambios de tamaño experimentados por aquella dentro de las primeras 96 h de incubación. Este comportamiento confirma el papel protector que juega la capa externa de HA que impide un contacto excesivo de la proteasa con la capa de PLL, que se mantiene razonablemente estable durante las primeras 96 h de incubación (ver más abajo, perfiles de liberación), y a lo que también puede contribuir la adsorción adicional de proteínas en la superficie de las Nps procedentes del suero suplementado. Por

otra parte, tras 96 h de incubación se produce un incremento súbito del tamaño de partícula que se puede asociar, como en los casos anteriores, a la formación de clústeres/agregados de Nps (**Figura 5.3 b**). En cuanto al potencial-ζ, este se incrementa de manera somera desde ca. -13.3 ± 2.9 a ca. -10.1 ± 2.5 mV dentro de las 72 h primeras de incubación para después experimentar un súbito aumento hasta los -3.2 ± 0.5 mV, que coincide con la formación de los agregados (**Figura 5.3 d**).

5.3.3 Liberación de las moléculas bioactivas desde la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA

Los perfiles de liberación de la DOXO, PLL@ICG y siRNA desde la plataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA en medios fisiológicos suplementados con 50% (v/v) de FBS a pH 7.4 y 5.0 en ausencia y presencia de estímulos endógenos (acción enzimática, presencia de una proteasa como la tripsina) y exógenos (luz NIR) se determinaron mediante experimentos de diálisis. En ausencia de estímulos, los perfiles de liberación muestran una fase de liberación muy lenta o fase de retardo dentro de las 2-3 primeras horas de incubación en el caso de la DOXO y el PLL@ICG, mientras que esta fase se extiende hasta las 6-8 h para el siRNA. A continuación, se produce una fase de liberación explosiva hasta, generalmente, las 12 h de incubación en todos los casos y condiciones, a partir de la cual tiene lugar una fase de liberación más lenta y sostenida (**Figuras 5.4 a, g**). Además, se observó que las proporciones de moléculas bioactivas liberadas son ligeramente superiores a pH ácido que a pH fisiológico de acuerdo a un mayor nivel de repulsión electrostática en condiciones ácidas entre: las propias moléculas de DOXO debido a su protonación y entre las cadenas de PLL cargadas eléctricamente, que puede conllevar a una cierta desestabilización de estas debido a la diferente conformación adoptada a pH ácido respecto a pH fisiológico [30], influenciando, por tanto, también las interacciones y entrecruzamientos con la capa subyacente de PSS y entre el PLL y la DOXO. En estas condiciones, se observa que la DOXO es el elemento bioactivo que más se libera a pesar de que se encuentra en una capa más interna del recubrimiento de la plataforma, seguido del siRNA y el conjugado PLL@ICG. La razón de esta mayor liberación del fármaco antineoplásico puede radicar en la progresiva desestabilización de la capa de PLL por repulsiones

electrostáticas, como se comentó anteriormente, lo que puede dar lugar a un incremento de la porosidad y/o pequeñas rupturas del recubrimiento que faciliten la liberación del fármaco gracias a su mayor difusión debido a su pequeño tamaño comparado con el del siRNA y el conjugado PLL@ICG [31]. Por otro lado, y a pesar de las interacciones repulsivas, la liberación del conjugado y, por tanto, de la ICG, es relativamente pequeña y lenta (ca. 20%) lo que indica que el recubrimiento de la plataforma sigue siendo bastante estable.

Cuando se realiza la liberación en presencia de tripsina se observa un incremento reseñable en las proporciones de elementos bioactivos liberados como consecuencia directa de la degradación enzimática de la capa de PLL@ICG, facilitando su difusión desde la plataforma (**Figura 5.4 b, h)**. Un efecto similar, esto es, un incremento en las cantidades liberadas de los principios bioactivos se produjo cuando se aplicó un estímulo externo como la radiación NIR a fluencias de 1,0 y 2,0 W/cm^2 durante 5 minutos tras 2, 5, 9, 12 y 48 h de incubación, si se compara con las liberaciones en ausencia del estímulo (**Figura 5.4 c, i**). La concentración de las moléculas bioactivas fue también superior a medida que la fluencia aplicada fue más elevada (**Figura 5.4 d, j**). Cabe destacar que la aplicación de la luz NIR en instantes concretos del proceso de liberación da lugar a una simetría del perfil en forma de escalera, esto es, se produce una liberación ultra-rápida justo después de la aplicación del estímulo externo para ralentizarse progresivamente y estabilizarse a tiempos más largos (ver, por ejemplo, las flechas en la **Figura 5.4 c**). Además, la presencia del estímulo externo hace que la liberación de los fármacos se controle de manera más eficaz ya que se suprime a demanda la fase de retardo inicial observada (hasta la tercera-cuarta hora de incubación) y se regula el propio perfil aumentando la cinética de liberación, evitando potencialmente la entrega de concentraciones sub-terapéuticas que no alcancen la actividad farmacológica deseada e impliquen, además, efectos fisiológicos adversos. Desafortunadamente, el excelente control inicial del perfil de liberación no se puede mantener totalmente a tiempos de incubación mayores debido a la progresiva desestabilización del recubrimiento de la nanoplataforma debido a las irradiaciones adicionales.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

En general, las cantidades liberadas en presencia de la radiación NIR son ligeramente superiores que en presencia de la enzima, lo que nos puede indicar que el incremento de temperatura localizado sobre la superficie de la nanoplataforma tras la irradiación provoca una modificación de las interacciones de los polielectrolitos y los agentes bioactivos a través de una mayor desestabilización del recubrimiento y/o una reducción de su compactación a través de la alteración de las interacciones de las distintas capas del recubrimiento que, en el caso de la degradación enzimática del biopolímero PLL cuando es "atacado" por la tripsina, favorece la difusión de la DOXO [37], el siRNA [28-29] y el conjugado PLL@ICG [32].

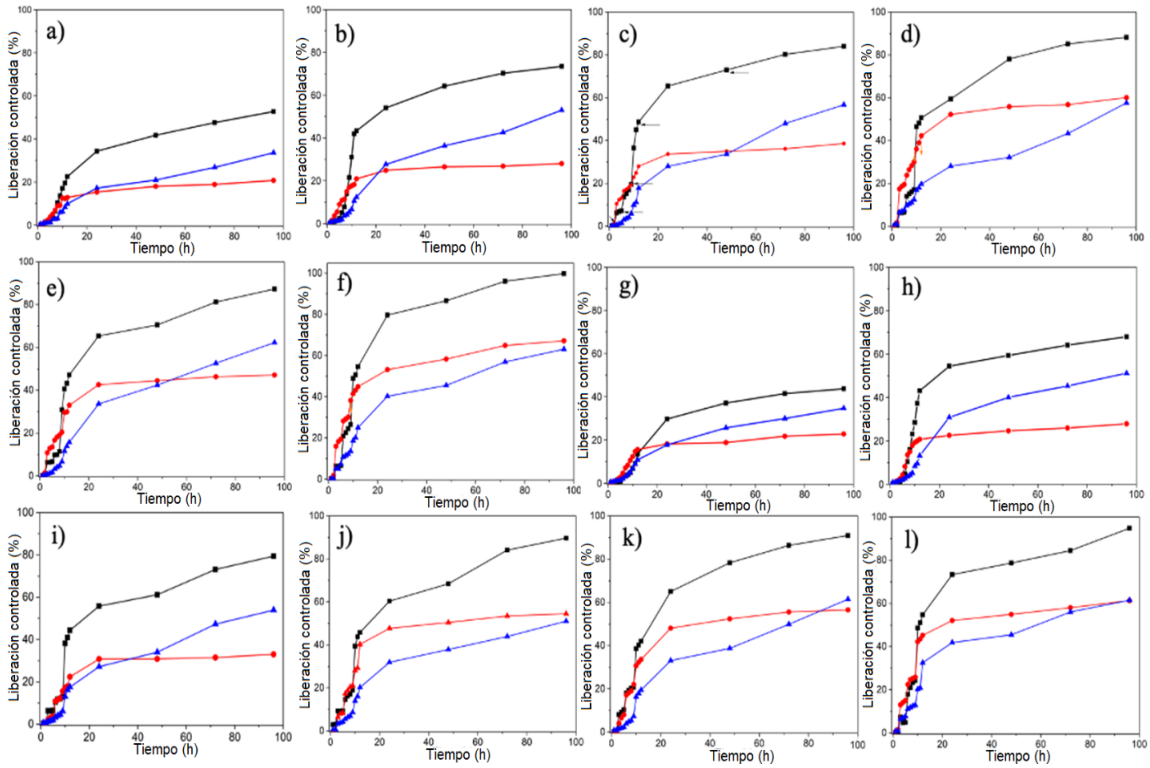


Figura 5.4 Perfiles de liberación de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA a (a-f) pH 5,0 y (g-l) pH 7,4 en (a, g) ausencia y (b, h) presencia de tripsina, en presencia de irradiación NIR de (c, i) 1,0 y (d, j) 2,0 W/cm^2, y en presencia de tripsina + irradiación NIR de (e, k) 1,0 y (f, l) 2,0 W/cm^2, respectivamente. (■) DOXO, (●) PLL-ICG, y (▲) SiRNA. Por claridad, no se muestran las barras de error, pero la incertidumbre de las medidas se encuentra dentro del ± 15%.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente, cuando se aplicaron de forma simultánea la acción enzimática y la irradiación NIR para modular el proceso de liberación, se observó que la combinación de ambos estímulos permitió la liberación prácticamente total de la

DOXO encapsulada, y una gran proporción del siRNA, esto es, las concentraciones liberadas desde la nanoplataforma al medio circundante fueron las más importantes de todas las condiciones estudiadas, y siendo ligeramente superior a pH ácido, tal y como se comentó anteriormente (**Figura 5.4 e, f, k, l).** Así, a la acción de la luz se suma el ataque de la tripsina a los enlaces peptídicos de la PLL, degradándola progresivamente. Además, se observó también que la combinación de la proteasa y el estímulo de luz genera una cinética de liberación más rápida comparada con las obtenidas cuando se aplican de manera individual los estímulos, pero manteniéndose el perfil de liberación en forma de escalera asociado al estímulo externo. En la **Tabla 5.1** se recogen los porcentajes de DOXO, siRNA y PLL@ICG liberados tras 96 h de incubación bajo las distintas condiciones aplicadas.

Tabla 5.2 Porcentajes de liberación DOXO, ICG y siRNA desde la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA tras 96 h de incubación a las distintas condiciones seleccionadas.

Condiciones	DOXO (% liberado)	ICG (% liberado)	siRNA (% liberado)
pH 5.5	53	21	34
pH 7.4	44	23	34
pH 5.5 + Trip	74	28	53
pH 7.4 + Trip	68	28	51
pH 5.5 –1 W/cm^2	84	39	57
pH 5.5 –1 W/cm^2 + Trip	87	47	62
pH 7.4 –1 W/cm^2	80	33	54
pH 7.4 –1 W/cm^2 + Trip	91	57	61
pH 5.5 –2 W/cm^2	88	60	58
pH 5.5 –2 W/cm^2 + Trip	100	67	63
pH 7.4 –2 W/cm^2	90	55	51
pH 7.4 –2 W/cm^2 + Trip	95	62	62

5.3.4 Citocompatibilidad e internalización celular de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA

En primer lugar, se llevó a cabo la evaluación de la potencial citotoxicidad inherente de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA mediante el ensayo de proliferación CCK-8 a 24 y 48 h de incubación en células de cáncer humano cervical HeLa y de fibroblastos de ratón 3T3 Balb en ausencia de cualquier tipo de estímulo endógeno o exógeno aplicado. La línea celular 3T3 Balb es comúnmente empleada para analizar los potenciales efectos tóxicos de compuestos bioactivos y nanomateriales debido a su extraordinaria sensibilidad a la presencia de agentes externos [33]. Por otra parte, se ha seleccionado la línea celular HeLa ya que sobreexpresa receptores CD44 [34] en su membrana, los cuales se asocian con gran especificidad al HA presente como capa externa del recubrimiento de la nanoplataforma. Esto permite analizar la influencia del direccionamiento activo en la actividad terapéutica del nanosistema, -la línea de fibroblastos de ratón no sobreexpresa este tipo de receptor en su membrana por lo que actúa como línea control, como ya se ha comentado en Capítulos anteriores. Como controles positivos de toxicidad se emplearon la DOXO libre, ICG libre y un complejo de Lipofectamina 2000® + siRNA, y como control negativo la nanoplataforma sin ninguna molécula bioactiva encapsulada.

La **Figura 5.5 a, b** muestra que la nanoplataforma sin principios activos encapsulados no presenta toxicidad alguna en ambas líneas celulares a una concentración de $2.5 \cdot 10^{10}$ Nps/mL, con viabilidades celulares de prácticamente el 100%. La plataforma completa, en cambio, presenta viabilidades celulares en la línea HeLa del 95 y el 81% tras 24 y 48 h de incubación, respectivamente, mientras que en 3T3 Balb aquella se incrementa prácticamente de nuevo al 100% (98 y 94%, respectivamente). Este hecho es un primer indicio del papel que juega la sobreexpresión de los receptores CD44 en la membrana de las células HeLa, permitiendo una mayor captación y acumulación de la nanoplataforma en su interior (ver más abajo). Por otra parte, la reducida toxicidad observada para la plataforma AuNRs/PSS/DOXO/ PLL@ICG/siRNA/HA confirma la estabilidad y biocompatibilidad del recubrimiento polimérico, evitando la liberación temprana de

una concentración de los principios activos encapsulados que comience una actividad citotóxica, logrando perfiles de liberación más sostenidos en el tiempo (ver **Figura 5.4**). Por el contrario, se puede observar que se producen toxicidades mucho más elevadas de la DOXO libre a concentración equivalente a la encapsulada en la plataforma (12.5 µM, con tasas de supervivencia de ca. 17 y 10%, y 45 y 29% después de 24 y 48 h de incubación en células HeLa y Balb 3T3, respectivamente) o, de igual manera, de la ICG libre (20 µM, ca. 74 y 70% y ca. 100% en HeLa y 3T3 Balb, respectivamente) administradas. Cabe mencionar que la toxicidad observada para el complejo Lipofectamina + siRNA (425 pmol siRNA) proviene principalmente del lípido catiónico empleado para formar el poliplejo [35].

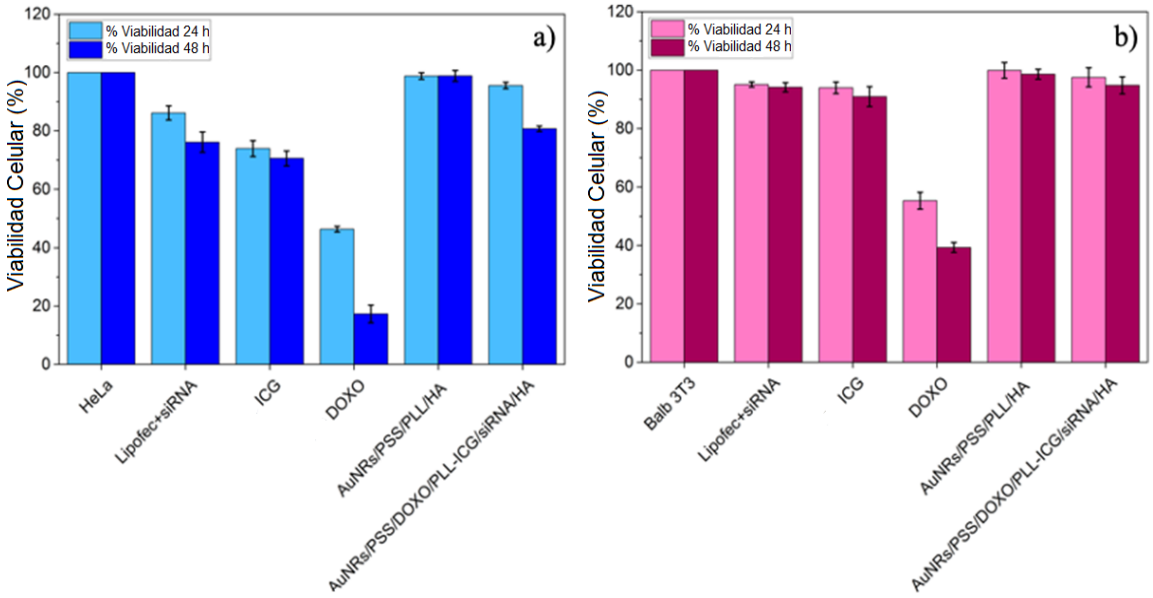


Figura 5.5 Viabilidad celular de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA en las líneas celulares a) HeLa y b) 3T3 Balb tras 24 y 48 h de incubación a 37 ºC.

Por otro lado, la captación e internalización de la nanoplataforma se evaluó en las mismas líneas celulares tras 12 y 24 h de incubación en las mismas líneas celulares HeLa y 3T3 Balb. La detección se realizó aprovechando la reflectancia de los AuNRs en la plataforma control AuNRs/PSS/PLL/HA, mientras que para la nanoplataforma completa AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA en el interior celular se realizó a través de la fluorescencia proveniente de la DOXO (canal rojo) y del siRNA de secuencia al azar marcado fluorescentemente (con FTIC, canal verde) presentes en la nanoestructura. **La Figura 5.6 a** muestra que la plataforma se

internaliza en el interior celular como se confirma a través de la reflectancia originada desde los AuNRs/PSS/PLL/HA y la fluorescencia de la DOXO liberada desde la AuNRs/PSS/ DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA. Se puede determinar también que el fármaco antineoplásico se encuentra en el citoplasma celular y, progresivamente, se incorpora al núcleo para realizar su bioactividad química. Por otra parte, se puede comprobar también que la presencia del siRNA liberado en el citoplasma celular no es muy elevada a 12 h tras la administración, pero se incrementa tras 24 h, lo que coincide con una liberación sostenida del material genético (ver **Figura 5.6a**). La internalización de la nanoplataforma tiene su origen en la afinidad del HA por los receptores CD44 sobreexpresados en la membrana de las células HeLa, junto con la mayor actividad metabólica que estas presentan [36]. Es necesario indicar también que tras 24 h de incubación se puede observar que las células presentan una geometría alterada con una morfología más redondeada, posiblemente fruto de la acción citotóxica del antineoplásico.

Por otro lado, en el caso de la administración de la nanoplataforma a las células 3T3 Balb se confirma que su captación e internalización es mucho más reducida que para las células HeLa, como se deduce de la escasa fluorescencia proveniente de la DOXO y el siRNA en el citoplasma celular (ver **Figura 5.6 b**). Estas observaciones están de acuerdo con la ausencia de toxicidad de la plataforma en esta línea celular, que tiene probablemente su origen en la ausencia de expresión de receptores CD44 en la superficie de su membrana, lo que dificulta la interacción y captación de la nanoestructura. Posiblemente, la carga negativa del nanosistema puede provocar interacciones de tipo electrostático repulsivo con la membrana celular que, en este caso, pueden dificultar la captación celular [37].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

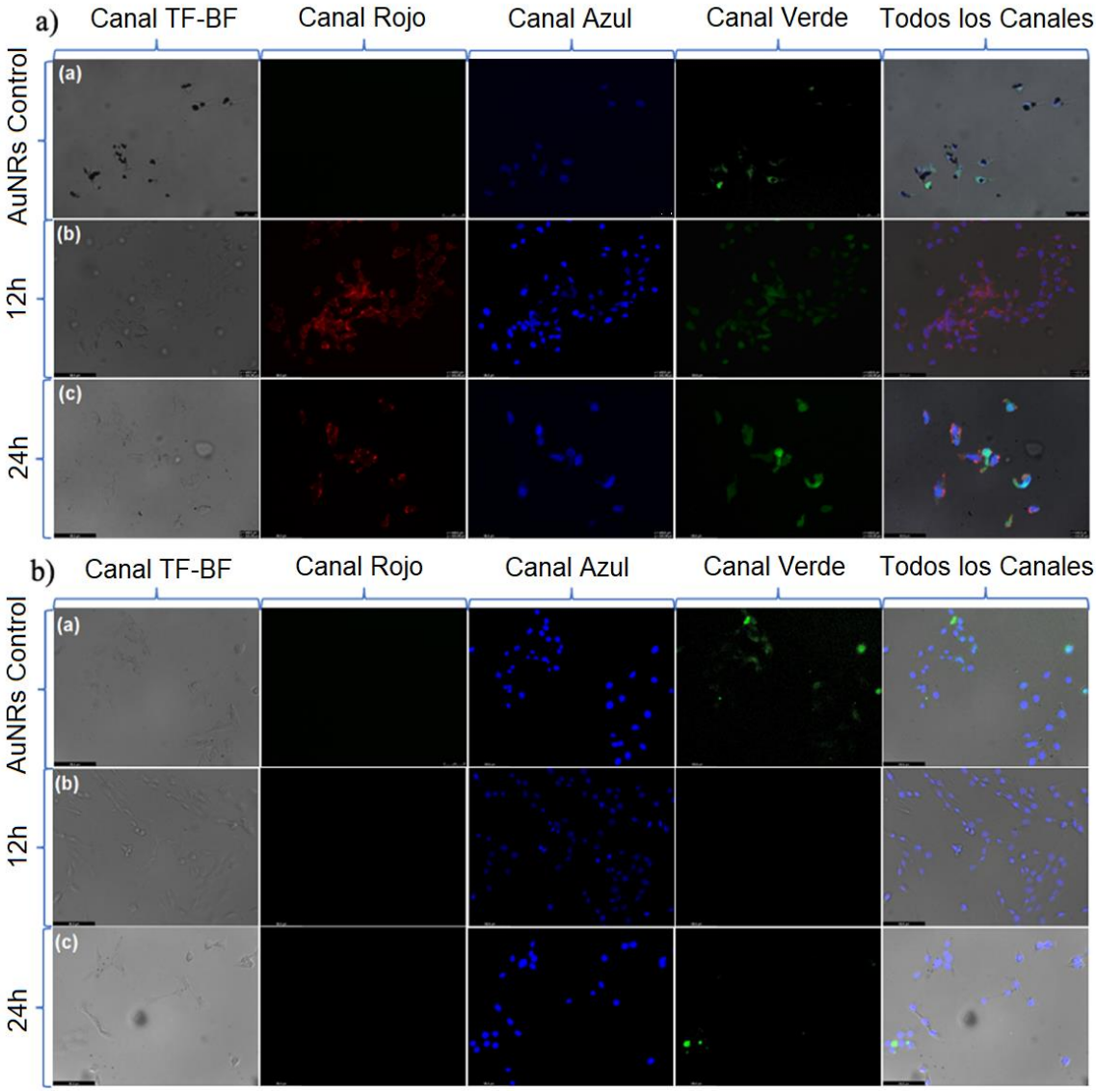


Figura 5.6 Internalización de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/ siRNA/ HA en células (a) HeLa y (b) 3T3 Balb tras 12 y 24 h de incubación. Se ha empleado el nanosistema AuNRs/PSS/PLL/HA como control. El canal rojo denota la fluorescencia de la DOXO (λ_{ex} = 488 nm), el canal azul corresponde a los núcleos celulares teñidos con DAPI (λ_{ex} = 355 nm), y el canal verde corresponde al siRNA-FITC (λ_{ex} = 530 nm).

Para corroborar adicionalmente la internalización de la nanoplataforma en el interior celular se realizaron imágenes de TEM. La **Figura 5.7 a-b** muestra que para la línea celular HeLa se produce una importante internalización de la nanoplataforma en el citoplasma celular, principalmente, en vesículas endosomiales, corroborando los datos de microscopía confocal. Contrariamente, en las células Balb 3T3 se observa una internalización de la nanoestructura mucho más reducida (**Figure 5.7 c-d)**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

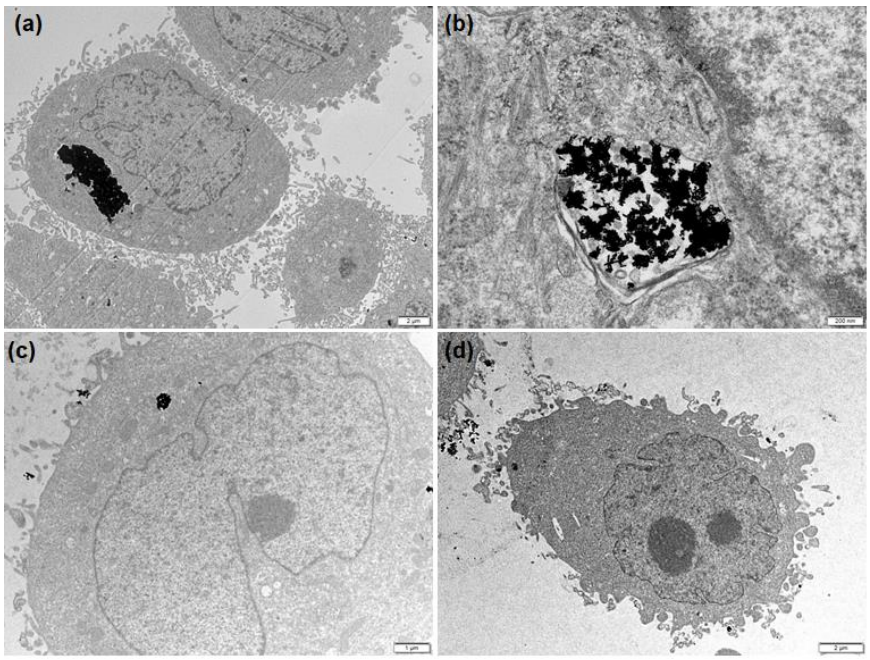


Figura 5.7 Imágenes de TEM de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA en a-b) células HeLa y c-d) células 3T3 Balb.

5.3.5 Influencia de la aplicación de un estímulo lumínico externo en la actividad terapéutica de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA: Generación de ROS in vitro

La producción de ROS por la nanoplataforma teragnóstica AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA se evaluó *in vitro* de nuevo sometiendo a la nanoestructura a una irradiación lumínica de longitud de onda de 808 nm con un láser NIR de estado sólido durante un tiempo de 5 o 10 min a fluencias de 1,0 o 2,0 W/cm^2 a distintas temperaturas: 4, 25 y 37 °C y distintos tiempos de incubación en células HeLa. Estos experimentos se llevaron a cabo puesto que al adicionar una nueva capa de siRNA sobre la del conjugado PLL@ICG, el nivel de accesibilidad del oxígeno molecular disuelto en el medio circundante necesario para la generación de ROS bajo iluminación NIR podría verse alterado. Como en el **Capítulo 4**, los experimentos se realizaron a distintas temperaturas para desacoplar las contribuciones de las respuestas fotodinámicas y fototérmicas de la nanoplataforma a la citotoxicidad celular (ver más abajo). Se emplearon células no tratadas y tratadas con H_2O_2 (800 µM) como controles negativo y positivo,

respectivamente. También se consideró como control adicional la plataforma sin ningún principio activo encapsulado, AuNRs/PSS/PLL/HA.

La **Figura 5.8 a-b** muestra que la producción de ROS tras 30 min de la excitación lumínica es mayor cuando se aplica una fluencia intensa, *e.g.* de 2,0 W/cm^2 en lugar de 1,0 W/cm^2. Así, por ejemplo, el porcentaje de generación de ROS en las células bajo una irradiación de 1,0 W/cm^2 durante 5 min tras 6 h de incubación fue del 54, 62 y 53% -en comparación con el control positivo de H_2O_2 (100 %), a las temperaturas de 4, 25 y 37 °C, respectivamente, e incrementándose al 70, 71 y 74 % al aumentar la fluencia a 2,0 W/cm^2. Además, la producción de ROS también fue más importante a medida que el tiempo de irradiación se extendió de 5 a 10 min (**Figura 5.8 a, c**) con valores, por ejemplo, de ca. 72, 74 y 83% tras 6 h de incubación a 2,0 W/cm^2 a las tres temperaturas ensayadas. Por el contrario, la generación de ROS disminuyó con el tiempo de incubación de la nanoplataforma en las células. Así, a 1,0 W/cm^2 de fluencia aplicada tras 6 h de incubación durante 5 min, los porcentajes de generación de ROS fueron del 54, 62 y 53% a las temperaturas de 4, 25 y 37 °C como se comentó anteriormente, mientras que a las 48 h estos disminuyeron a ca. 44, 49 y 45%, respectivamente. Este comportamiento observado puede ser debido a la inducción de la muerte celular producida por ROS a causa de la excitación de la ICG y el incremento de la temperatura (ver más abajo) consecuencia de la desexcitación plasmónica de la Nps metálicas tras irradiarlas con el láser NIR. No obstante, la progresiva pérdida de fotoestabilidad de la sonda fluorescente y de estabilidad coloidal de la propia nanoplataforma en el interior celular puede reducir la generación de ROS en el medio con el tiempo, como se comentó también en el **Capítulo 4**.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

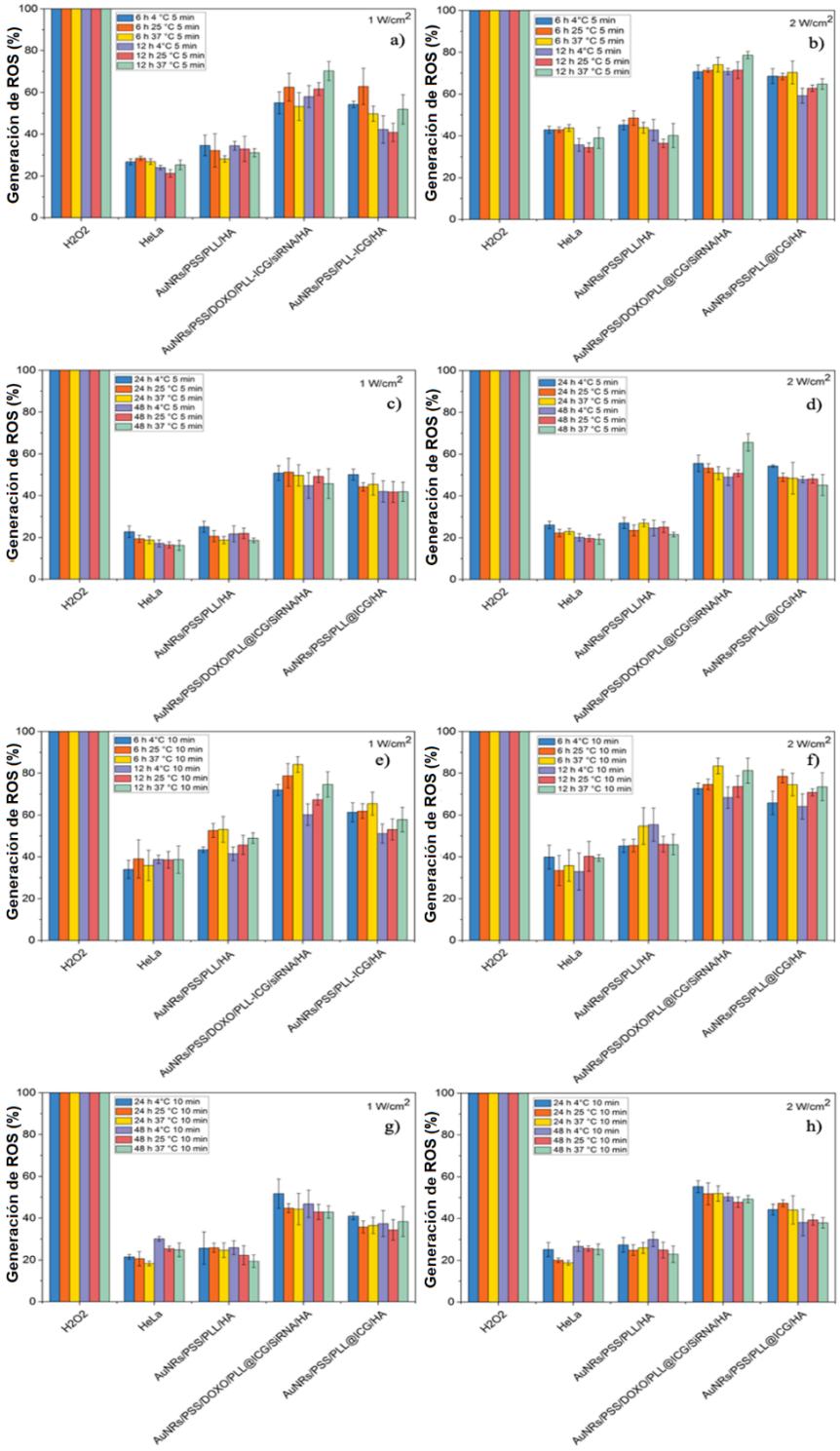


Figura 5.8 Generación de ROS por la plataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA después de 30 min de la irradiación tras incubación de 6, 12, 24 y 48 h en células HeLa bajo la aplicación de fluencias de 1,0 y 2,0 W/cm^2 con un láser continuo de 808 nm después de (a-d) 5 y 10 min (e-h) min de exposición lumínica. Como control positivo se empleó H_2O_2 (800 µM), y como negativo células HeLa sin tratar. La nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL/HA se empleó como control adicional.

Así, por ejemplo, en el intervalo de 6 a 12 h de incubación el porcentaje de ROS generado respecto al control positivo estuvo comprendido entre el 70-80% al aplicar una irradiación de 2,0 W/cm^2, mientras que en el intervalo de 24 a 48 h la producción disminuyó hasta encontrase comprendida en el intervalo del 45-55% aproximadamente. Finalmente, la temperatura del medio pareció no ser un parámetro que influyese de manera notable la capacidad de generación de ROS de la nanoplataforma. A este respecto, es necesario considerar que tanto a 25 y 37 °C la nanoplataforma es capaz de generar muerte celular mediante PPTT: por ejemplo, tras 5 min de irradiación a 37 ºC la temperatura del medio se incrementó a 39 y 44 °C a 1,0 y 2,0 W/cm^2, respectivamente, mientras que tras 10 min de irradiación aquella se incrementó a 41 y 48 °C, respectivamente (ver **Capítulo 4**) produciéndose, pues, muerte celular por sensibilización térmica o ablación según el caso [38].

5.3.6 Influencia de la aplicación de un estímulo lumínico externo en la actividad de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/ PLL@ICG/siRNA/HA: Actividad terapéutica multimodal

A continuación, la actividad terapéutica multimodal de la plataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA se evaluó mediante el ensayo de proliferación CCK-8 tras la administración de la nanoplataforma a las líneas celulares HeLa y 3T3 Balb en condiciones similares a los experimentos de ROS detallados en la sección anterior.

La **Figura 5.9 a** muestra que bajo una irradiación de luz NIR de fluencia 1,0 W/cm^2 aplicada durante 5 min tras 24 h de incubación en las células HeLa la viabilidad celular para el poliplejo de siRNA, la ICG libre y la DOXO libre es de ca. 87, 86 y 89%, 66, 64 y 58%, y 42, 39 y 41% a 4, 25 y 37ºC, respectivamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

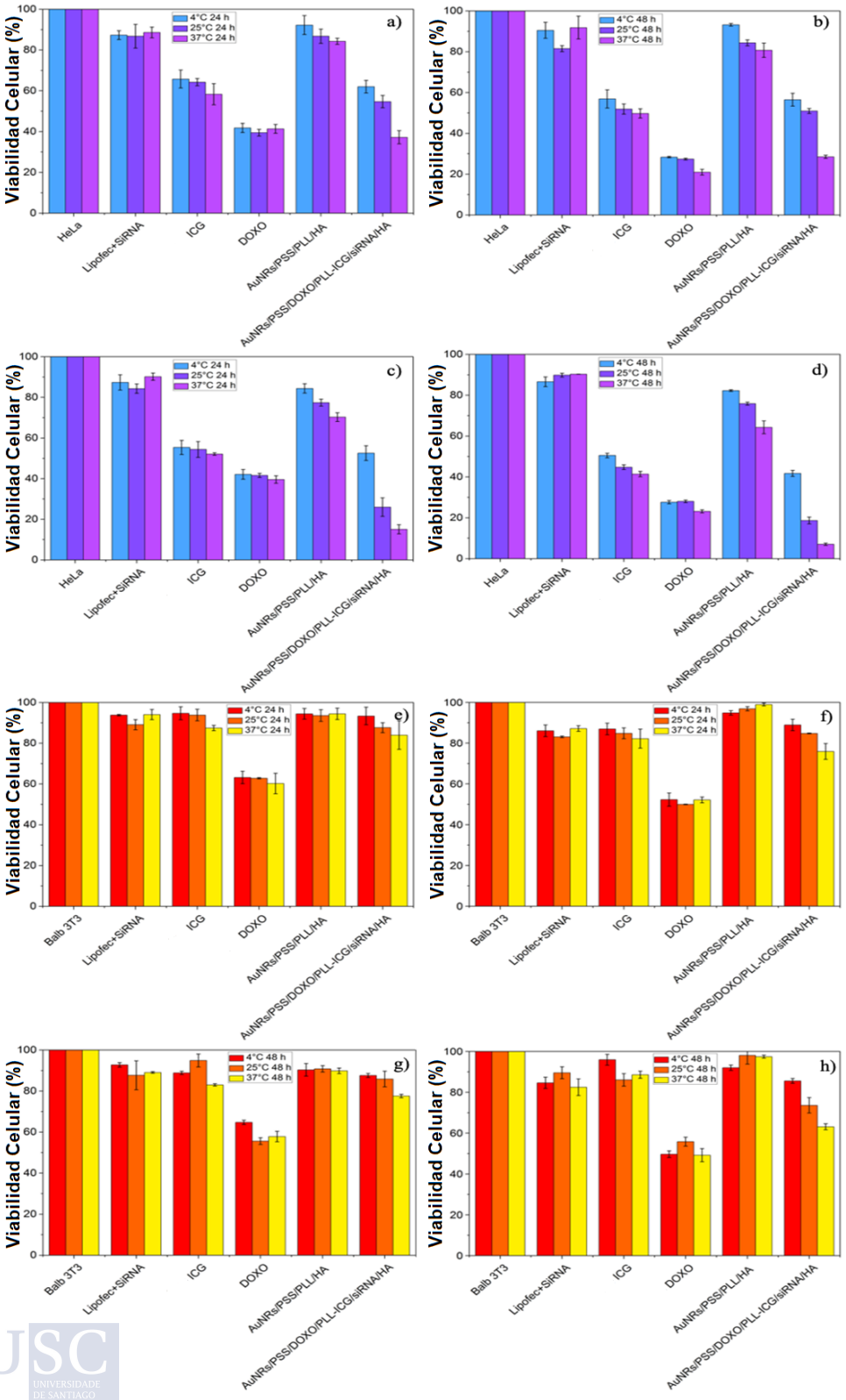


Figura 5.9 Viabilidad celular de células (a-d) HeLa y (e-h) 3T3 Balb a diferentes tiempos de incubación y temperaturas en presencia de iluminación NIR de (a, b, e, f) 1,0 W/cm^2 y (c, d, g, h) 2,0 W/cm^2 a (a, c, e, g) 24 y (b, d, f, h) 48 h de incubación.

El incremento de toxicidad observado respecto a la plataforma AuNRs/PSS/PLL/HA, AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA (ver **Capítulo 3**) o AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA (**Capítulo 4**) se debe a la actividad conjunta del ROS generado por la ICG encapsulada, el proceso de inhibición de PD-L1 propiciado por el siRNA liberado al citoplasma celular (ver más abajo), y la acción química de la DOXO. Además, los perfiles de liberación más sostenidos de las moléculas bioactivas desde la plataforma pueden provocar que la concentración terapéutica efectiva en el interior celular sea bastante inferior a la que se tiene cuando los compuestos se administran de forma libre. A este respecto, la **Figura 5.10 a** muestra la cuantificación de la fluorescencia de las diferentes moléculas bioactivas, PLL@ICG, DOXO y siRNA en el interior de las células HeLa después de 30 min tras irradiación a 1,0 W/cm^2 con luz NIR de 808 nm durante 5 min a distintos tiempos de incubación (6, 8, 12 y 24 h) tras la administración de la nanoplataforma. Así, se puede observar una acumulación creciente de los agentes bioactivos en el interior celular conforme se realizaron las irradiaciones en las períodos de tiempo indicados (flechas en la Figura) Estos datos confirman las observaciones realizadas a partir de las imágenes de microscopía confocal mostradas anteriormente en la **Figura 5.6**. No obstante, es necesario indicar que los perfiles de liberación y las cantidades registrados no son exactamente iguales a las obtenidas en los experimentos de diálisis, ya que las condiciones experimentales son sensiblemente diferentes.

Por otro lado, cuando se incrementa la fluencia de irradiación NIR se observa que, entre los distintos agentes terapéuticos administrados de forma libre, la ICG incrementa ligeramente la toxicidad celular como consecuencia de una mayor generación de ROS (así como por un mayor incremento de temperatura del medio) hasta viabilidades de ca. 55, 54 y 52% y 50, 45 y 41% a 4, 25 y 37ºC tras 24 h y 48 h de incubación, respectivamente. En el caso del nanosistema AuNRs/PSS/PLL/HA al incrementarse la fluencia de la irradiación la viabilidad celular disminuye de manera notable hasta el 84, 77 y 70% y el 82, 76 y 64%. En este sentido, partiendo de una temperatura de incubación de 25 ºC la máxima temperatura alcanzada fue de 33 ºC y 41 ºC para fluencias de 1,0 y 2,0 W/cm^2, respectivamente, mientras que para una temperatura del medio celular de 37 °C se alcanzaron temperaturas de 41 ºC y 48 ºC en similares condiciones de fluencia, respectivamente. Mientras tanto, en el caso de la nanoplataforma completa esta toxicidad alcanzó valores muy superiores,

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

con viabilidades celulares de 53, 25 y 15%, y 42, 19 y 7% a 4, 25 y 37ºC tras 24 h y 48 h de incubación, respectivamente, gracias al incremento de la liberación de la DOXO, el siRNA y el PLL@ICG en el interior celular (**Figura 5.10 b)**. Como era de esperar, el efecto combinado de la PPTT, PDT, silenciamiento génico y quimioterapia conlleva que la nanoplataforma sea capaz de erradicar de manera prácticamente completa las células tumorales a las condiciones estudiadas. Cabe mencionar también que el papel terapéutico del siRNA y el PDT se puede confirmar tras observar la mayor toxicidad celular alcanzada a 4ºC tras 24 y 48 h de incubación, si se compara con los valores obtenidos después de la administración del nanosistema AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA mostrados en el **Capítulo 3** para las mismas células HeLa; para esta plataforma la viabilidad celular alcanzó valores de ca. 75-85% bajo las mismas condiciones (ver **Figura 3.15, Capítulo 3**). Así, a temperaturas del medio bajas, el efecto fototérmico no genera toxicidad ni por PPTT ni por una liberación suficiente de la DOXO para ejercer su actividad química, por lo que la toxicidad asociada proviene del ROS generado por el conjugado PLL@ICG, como se ha mostrado en el apartado anterior, y el silenciamiento génico este último, sobre todo, a tiempos de incubación largos.

A este respecto, para comprobar que el siRNA también realizó su actividad terapéutica cuando se incorporó en la nanoplataforma y se liberó desde ella en el citoplasma celular, se realizó un análisis de cuantificación a tiempo real de la reacción de polimerasa en cadena (RT-PCR, de sus siglas en inglés). La **Figura 5.10 d** muestra que, en ausencia de iluminación, la inhibición de los niveles de expresión del mRNA es relativamente pequeña, de acuerdo con los datos de liberación obtenidos; no obstante, esta se incrementa de manera notable al aplicarse la iluminación NIR, siendo mayor a mayores fluencias y tiempos de incubación. Por el contrario, la administración libre del siRNA no da lugar a ningún efecto terapéutico debido a la degradación del material genético por las nucleasas, mientras que la transfección del siRNA mediante la formación de un poliplejo con la Lipofectamina conduce a niveles de expresión del PD-L1 relativamente similares a los obtenidos con la administración de la nanoplataforma en ausencia de iluminación NIR.

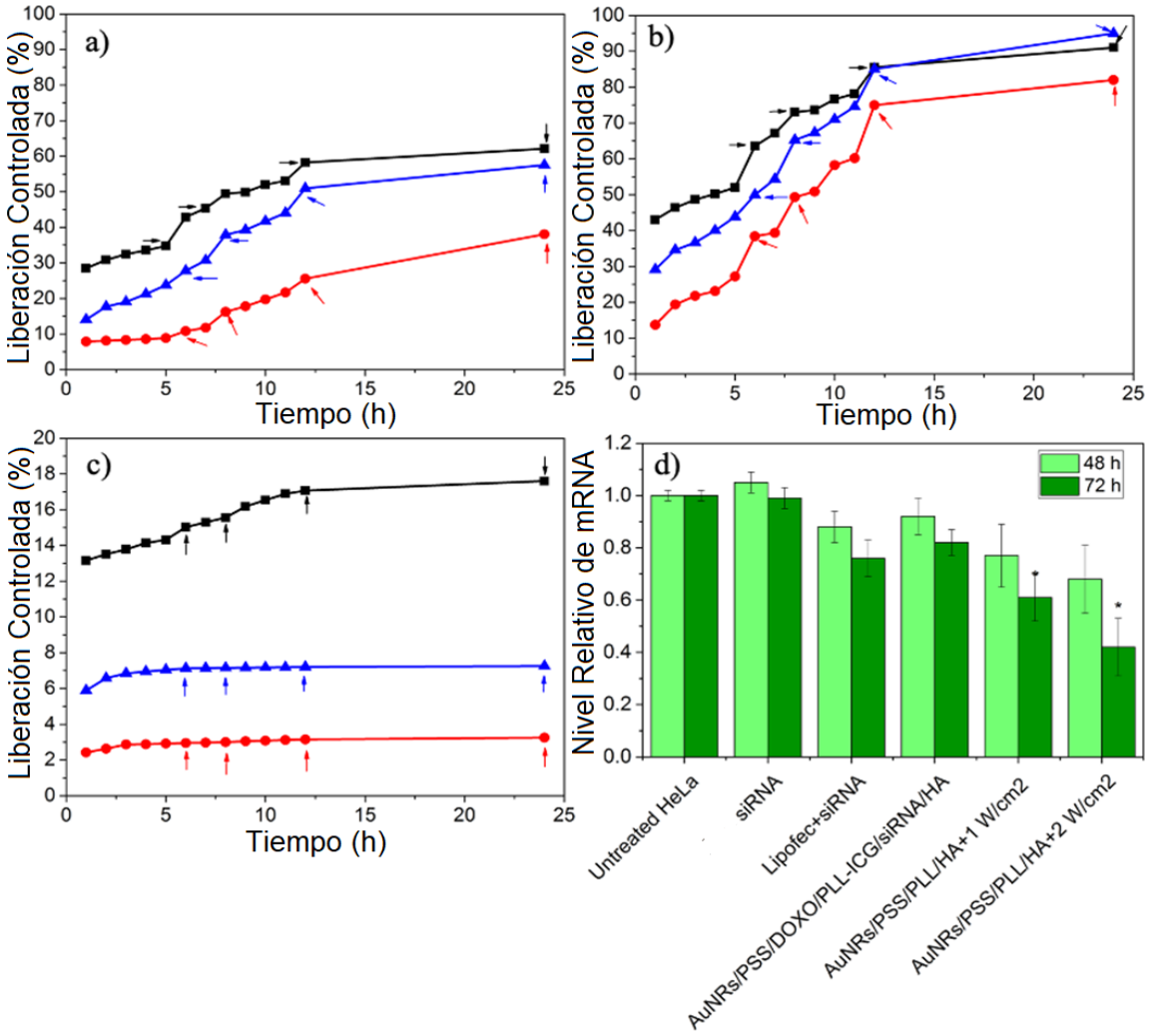


Figura 5.10 Perfiles de liberación de la (■) DOXO, (●) PLL-ICG y (▲) siRNA desde la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA en células HeLa a una fluencia de (a) 1,0 W/cm^2 y (b) 2,0 W/cm^2 y (c), en células Balb 3T3 a 1,0 W/cm^2. (d) Expresión relativa de mRNA de PD-L1 obtenida por qRT-PCR a distintos tiempos de incubación y fluencias (luz NIR de 808 nm durante 5 min).

Finalmente, en el caso de las células de fibroblastos murinos 3T3 Balb, ni la administración del lipoplejo con el siRNA ni la ICG libre dan lugar a una muerte celular relevante en cualquiera de las condiciones analizadas, alcanzando en el caso de la ICG valores de ca. 20% como máximo. Por el contrario, la administración de la DOXO libre conlleva importantes reducciones en la viabilidad celular, con valores comprendidos entre el 50-60% dependiendo de las condiciones de fluencia, temperatura e incubación aplicadas; no obstante, estos valores son sensiblemente inferiores a los alcanzados en las células cancerígenas, posiblemente como consecuencia del metabolismo acelerado de estas últimas y, por tanto, más sensibles

a la acción del fármaco antineoplásico. [39]Para la plataforma AuNRs/PSS/PLL/HA el efecto citotóxico es también prácticamente nulo como consecuencia de la reducida internalización de este nanosistema, como se comprobó mediante imágenes de TEM (**Figuras 5.7 c-d**) debido, principalmente, a la inexistencia de un direccionamiento activo de esta nanoplataforma debido a la ausencia de receptores CD44 en la superficie de la membrana de esta línea celular. En el caso de la plataforma completa AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA la toxicidad es ligeramente superior, alcanzándose valores de viabilidad de, por ejemplo, 89, 85 y 76% y 86, 74 y 63% a 4, 25 y 37ºC tras 24 h y 48 h de incubación, respectivamente, cuando se iluminan las células durante 5 min con luz NIR de 808 nm a una fluencia de 2 ,0 W/cm^2. Este incremento en la toxicidad puede provenir, principalmente, del efecto quimioterapéutico de la DOXO, que puede difundir a través de la membrana celular al citoplasma si es liberada en el entorno de la célula, así como por la generación de ROS, ya que la proporción de principios activos en el interior celular es bastante reducida (ver **Figura 5.10 c**).

5.3.7 Mecanismo de muerte celular inducido por la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA

Finalmente, los mecanismos de muerte celular inducidos por la acción terapéutica multimodal de la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/ siRNA/HA, esto es, quimioterapia, PPTT, PDT y silenciamiento génico fueron desacoplados y analizados mediante citometría de flujo empleando el ensayo de Anexina V-yoduro de propidio tras 48 h de incubación a diferentes temperaturas (4, 25 y 37 ºC) y condiciones de irradiación NIR (1,0 W/cm^2 y 2,0 W/cm^2 a 808 nm durante 5 min). Las células solas (HeLa y 3T3 Balb), DOXO e ICG libres, el lipoplejo Lipofectamina-siRNA, y la plataforma AuNRs/PSS/PLL//HA se emplearon como controles.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Así, la **Figura 5.11 a, f** muestra que la administración de DOXO (12.5 μM) condujo a la muerte celular por apoptosis, con valores en el rango de ca. 70-75 y 55-60% para las células HeLa y 3T3 Balb, respectivamente, tras 48 h de incubación dependiendo de las condiciones de temperatura e irradiación. Para ambos tipos de

células, estas se encuentran principalmente en el estado apoptótico temprano, en particular, más del doble de población que en el estado tardío. Además, la apoptosis celular aumenta ligeramente con la fluencia aplicada del láser y la temperatura de incubación como resultado de cierta sensibilidad a la temperatura de la quimio-actividad de la DOXO. Además, la proporción de células vivas es mucho menor en las células HeLa como resultado de su metabolismo acelerado, de acuerdo con los datos de toxicidad. En particular, se observan tasas de supervivencia más altas en células 3T3 Balb a 4 ºC, ya que la difusión del fármaco dentro de las células se ralentiza al ser un proceso dependiente de la energía. [40] Mientras tanto, para la ICG libre el porcentaje de células apoptóticas se encuentra entre un 50 y 60% para las células HeLa mientras que para las 3T3 Balb se reduce a ca. 20-35% (**Figura 5.11 b, g).** No obstante, en este caso predomina la apoptosis tardía sobre la temprana, probablemente por la distinta ruta de actuación del ROS respecto al fármaco anticancerígeno. Asimismo, en consonancia con los datos de toxicidad celular, el siRNA no induce apoptosis ni necrosis celular por sí mismo de manera apreciable (**Figura 5.11 c, h)**. Para la plataforma AuNRs/PSS/PLL/HA, la muerte celular en las células HeLa se induce principalmente por necrosis a temperaturas de incubación de 25 y 37 ºC, mientras que a 4 ºC predomina la apoptosis temprana (**Figura 5.11 d)**, aunque la supervivencia celular es relativamente elevada ya que la PPTT por sí sola no erradica de forma muy eficiente las células cancerígenas. En el primer caso, la ruptura de las membranas celulares con la temperatura debido al efecto fototérmico pueden ser la causa del primer mecanismo de muerte celular. La irradiación juega un papel clave en el aumento de la temperatura macroscópica cercana al régimen de ablación (> 44-45 ºC), particularmente a 37 ºC; por el contrario, a 4 ºC la temperatura no alcanza el umbral necesario, pero sí se incrementa lo suficiente para sensibilizar la célula y alterar su metabolismo [6].

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

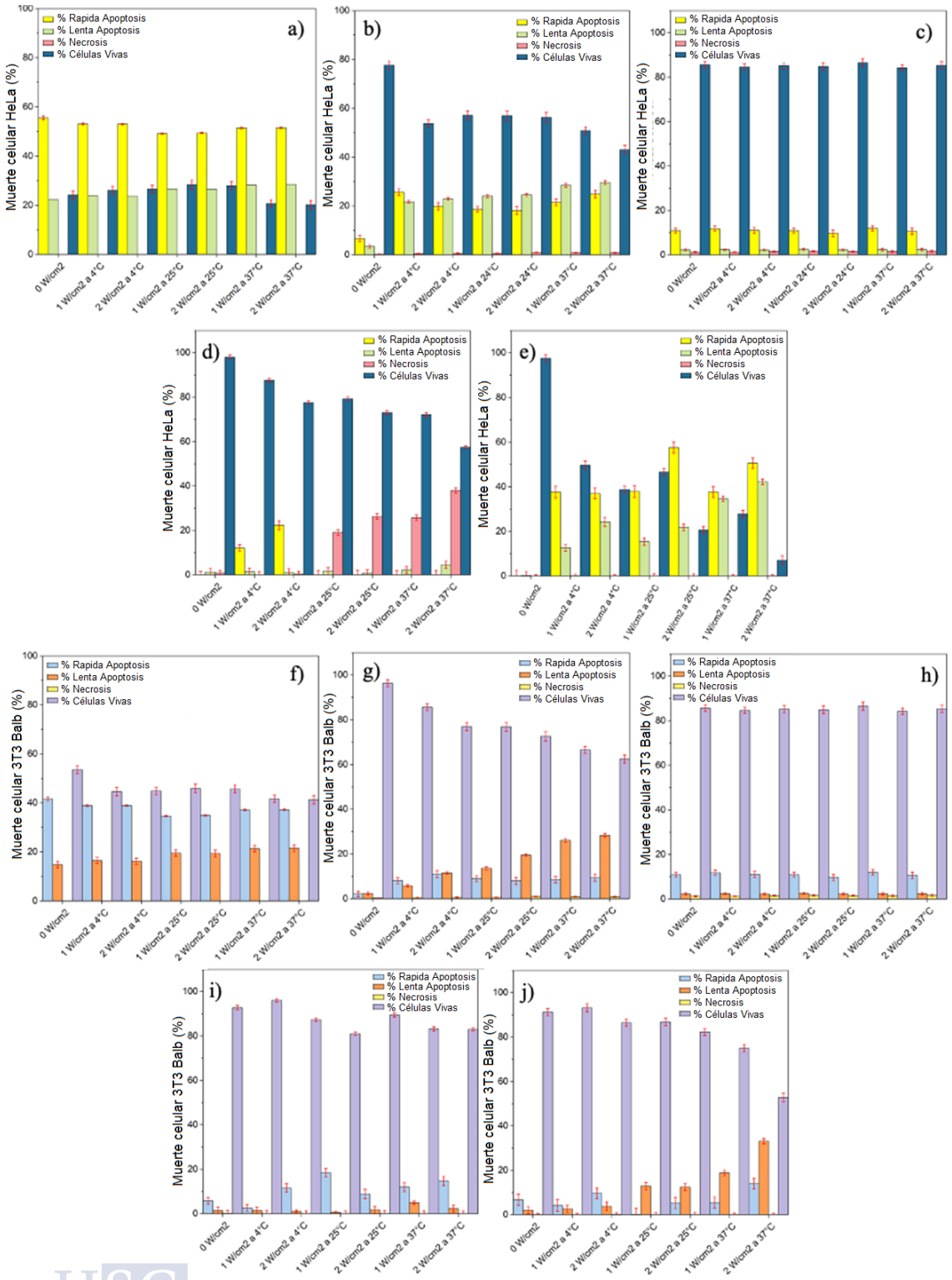


Figura 5.11 Análisis del mecanismo de muerte celular después de la administración de (a, f) DOXO libre, (b, g) ICG libre, (c, h) el poliplejo Lipofectamina + siRNA, (d, i) AuNRs/PSS/PLL/HA, (e, j) AuNRs/PSS/PLL@ICG/siRNA/HA, tras 48 h de incubación a distintas temperaturas y fluencias de irradiación NIR (808 nm, 5 min) en células (a-e) HeLa y (f-j) 3T3 Balb mediante el ensayo de Anexina V-yoduro de propidio.

En el caso de las células 3T3 Balb, estas permanecen vivas y sanas prácticamente a todas las temperaturas y condiciones de irradiación (**Figura 5.11 i)** de acuerdo con los bajos niveles de internalización observados en este tipo de células, lo que confirma la importancia del direccionamiento activo para lograr un efecto citotóxico óptimo.

Finalmente, y de manera sorprendente a pesar del efecto fototérmico producido, la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA indujo la mortalidad celular en células HeLa principalmente a través de una combinación de apoptosis temprana y tardía, siendo esta última más importante a la mayor fluencia de luz NIR aplicada (2,0 W/cm^2) y a medida que se incrementa la temperatura del medio (ver **Figura 5.11 e y 5.12).** Esto indicaría que las actividades terapéuticas de la DOXO y el siRNA (apoptosis temprana) y de la ICG (generación de ROS, apoptosis tardía) y sus consiguientes rutas de inducción de muerte celular asociadas predominarían sobre el efecto fototérmico plasmónico (necrosis) favoreciendo y reforzando, pues, la vía apoptótica sobre la necrótica, [41, 42] reduciéndose está a un ínfimo 2-3% del total de las células muertas como mucho.

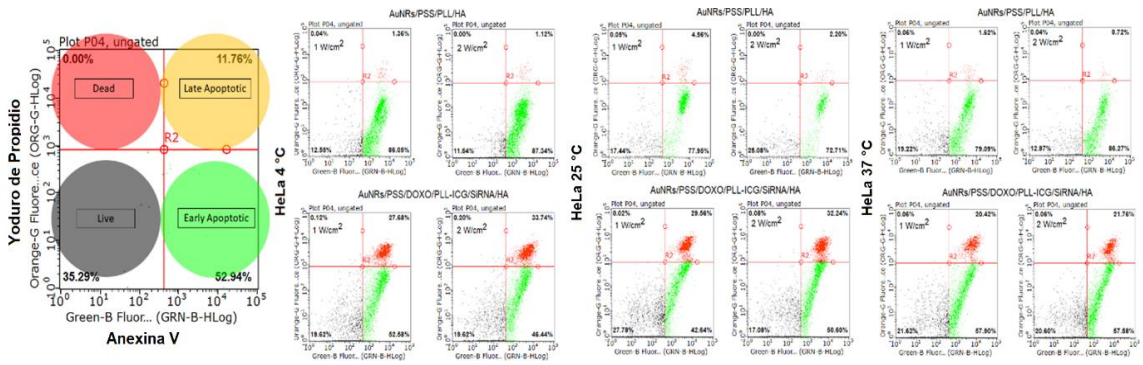


Figura 5.12 Mecanismos de muerte celular obtenidos por citometría de flujo para la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA tras 48 h de incubación en células HeLa, y comparación con el nanosistema AuNRs/PSS/PLL/HA.

Por el contrario, en las células 3T3 Balb los niveles de necrosis y apoptosis están por debajo del 10-20% de acuerdo con los datos de citotoxicidad, siendo aquellos independientes de la temperatura de incubación o del nivel de irradiación; solo a 37 ºC y 2,0 W/cm^2 los niveles de necrosis aumentan de manera relativamente importante (**Figura 5.11 j).** Este comportamiento estaría de acuerdo con la

internalización deficiente de la nanoplataforma en esta línea celular, como se ha comentado con anterioridad.

5.4 CONCLUSIÓN

En este Capítulo se han funcionalizado AuNRs con un LPSR centrado en ca. 792 nm mediante la técnica de capa por capa para dotarlos de un recubrimiento superficial biocompatible formado por polielectrolitos de distinta carga eléctrica (PSS, PLL y HA), el fármaco antineoplásico DOXO, la sonda NIR fluorescente ICG conjugada covalentemente al biopolímero PLL, y cadenas de SiRNA (PD-L1) intercaladas en las distintas capas para generar la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/ PLL@ICG/siRNA/HA. Esta demostró ser coloidalmente estable en una diversidad de medios acuosos de diferente pH, en medio de cultivo celular suplementado con proteínas séricas, y en presencia de enzimas, aunque en medios ácidos o en presencia de proteínas se observó la formación de clústeres de partículas sin precipitación aparente. Por otro lado, la velocidad y perfil de liberación de las diferentes biomoléculas activas pudo controlarse utilizando tanto estímulos internos (por ejemplo, proteasas como la tripsina gracias a la degradabilidad enzimática de la PLL) como externos (luz NIR gracias a las propiedades ópticas de la ICG y los AuNRs), lo que redundaría en una actividad terapéutica más eficaz tanto por la regulación de la concentración terapéutica liberada como por la secuenciación de su aplicación y actividad. Además, se comprobó que la plataforma fue capaz de generar ROS, silenciamiento génico y actividad quimioterapéutica, siendo la producción de ROS dependiente de la fluencia y el tiempo de irradiación, pero no de la temperatura del medio. Por otra parte, la nanoplataforma demostró ser biocompatible, y en presencia de las condiciones de iluminación NIR adecuadas, se obtuvo una importante mejora de la toxicidad celular gracias a la actividad simultánea proporcionadas por el ROS, el calor fototérmico, la acción química de la DOXO y la inhibición de PD-L1 proporcionada por el siRNA, alcanzándose prácticamente la inhibición total de la proliferación celular. Además, el análisis de la viabilidad celular a diferentes temperaturas permitió desacoplar los efectos tóxicos de la PPTT y la PDT. Así, se observó que la PDT predomina sobre la PPTT a fluencias y temperaturas del medio

más bajas, mientras que el efecto fototérmico aumenta a tiempos de irradiación más largos y por encima de 37 ºC al alcanzarse el régimen de ablación térmica.

Por otra parte, se comprobó también que la sobreexpresión de los receptores CD-44 en las células HeLa a los que se une con gran afinidad al HA de la capa externa de la nanoplataforma da lugar a un direccionamiento activo, que permite niveles importantes de internalización celular, permitiendo la liberación de las moléculas bioactivas en el citoplasma celular en contraposición a lo que sucede en las células 3T3 Balb, para las que el nivel de captación celular del nanosistema es muy reducido. Finalmente, se observó que el mecanismo de muerte celular inducido por la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA a través de la aplicación simultánea de la terapia multimodal: PDT, quimioterapia, PPTT y silenciamiento génico es mayoritariamente la apoptosis, lo que sugiere que el comienzo de la muerte celular está principalmente regulado por el efecto tóxico del fármaco combinado con la PDT y la acción de silenciamiento. En contraste, solo a la temperatura de 37ºC se aprecia una cierta predominancia de la PPTT con la aparición de células necróticas.

En resumen, esta nanoplataforma híbrida proporcionó, pues, una terapia multimodal efectiva simultánea: PDT, PPTT, silenciamiento génico y quimioterapia para el tratamiento de tumores sólidos, consiguiendo su práctica erradicación *in vitro*, dependiendo de las condiciones del medio y la presencia o no de un estímulo externo como la irradiación con luz NIR de 808 nm.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.5 BIBLIOGRAFIA

[1] R. T. M. G. P. K. K. D. A. &. T. R. K. Maheshwari, «Recent advances in exosome-based nanovehicles as RNA interference therapeutic carriers.,» *Nanomedicine (London, England),* vol. 12, nº 21, pp. 2653-2675, 2017.

[2] S. M. H. J. L. W. Y. A. W. K. &. T. T. Elbashir, «Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.,» *Nature,* vol. 411, nº 6836, pp. 494-498, 2001.

[3] M. M. M. A. &. E. M. Scherr, «Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells.,» *Current medicinal chemistry,* vol. 10, nº 3, pp. 245-256, 2003.

[4] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian y M. A. El-Sayed, «Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 128, nº 6, p. 2115–2120, 2006.

[5] X. Ding, D. Li y J. Jiang, «Gold-based inorganic nanohybrids for nanomedicine applications,» *Theranostics,* vol. 10, nº 18, pp. 8061-8079, 2020.

[6] A. Haine y T. Niidome, «Gold nanorods as nanodevices for bioimaging, photothermal therapeutics, and drug delivery,» *Chemical and Pharmaceutical Bulletin,* vol. 65, nº 7, pp. 625-628, 2017.

[7] R. Philip, A. Penzkofer, W. Bäumler, R. Szeimies y C. Abels, «Absorption and fluorescence spectroscopic investigation of

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

indocyanine green,» *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry,* vol. 96, nº 1-3, pp. 137-148, 1996.

[8] J.-B. Li, H.-W. Liu, T. Fu, R. Wang, X.-B. Zhang y W. Tan, «Recent Progress in Small-Molecule Near-IR Probes for Bioimaging,» *Trends in Chemistry,* vol. 1, nº 2, pp. 224-234, 2019.

[9] R. R. Allison, «Photodynamic therapy: oncologic horizons,» *Future Oncol,* vol. 1, nº 10, pp. 123-124, 2014.

[10] P. Harrod-Kim, «Tumor ablation with photodynamic therapy: introduction to mechanism and clinical applications,» *J Vasc Interv Radiol,* vol. 9, nº 17, pp. 1441-1448, 2006.

[11] A. Berlin, R. Joswik y V. Ivanovich, «The Chemistry and Physics of Engineering Materials, Volume Two (Limitations, Properties, and Models) || A Review on Hyaluronan Biopolymer: Properties and Pharmaceutical Applications,» *The Chemistry and Physics of Engineering Materials*, vol. 2, pp. 338-353, 2015.

[12] G. Dai, C. Choi, Y. Zhou, Q. Bai, Y. Xiao, C. Yang, C. Choi, D. Ng y D. Ng, «Immobilising hairpin DNA-conjugated distyryl boron dipyrromethene on gold@polydopamine core-shell nanorods for microRNA detection and microRNA-mediated photodynamic therapy,» *Nanoscale,* vol. 13, nº 13, pp. 6499-6512, 2021.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[13] H. Gomari, M. F. Moghadam, M. Soleimani, M. Ghavami y S. Khodashenas, «Targeted delivery of doxorubicin to HER2 positive tumor models,» *Int J Nanomedicine,* vol. 24, pp. 5679-5690, 2019.

[14] N. Wang, J. Shi, C. Wu, W. Chu, W. Tao, W. Li y X. Yuan, «Design of DOX-GNRs-PNIPAM@PEG-PLA Micelle With Temperature and Light Dual-Function for Potent Melanoma Therapy,» *Frontiers in Chemistry,* vol. 8, nº 599740, 2021.

[15] F. S. E. M. A. N. S. M. B. M. J. B. Z. A. A. S. M. A. M. A. &. B. B. Vahidian, «siRNA-mediated silencing of CD44 delivered by Jet Pei enhanced Doxorubicin chemo sensitivity and altered miRNA expression in human breast cancer cell line (MDA-MB468).,» *Molecular biology reports,* vol. 47, nº 12, pp. 9541-9551, 2020.

[16] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán y P. Mulvaney, «Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications,» *Coordination Chemistry Reviews,* vol. 249, nº 17-18, pp. 1870-1901, 2005.

[17] C. Yu y J. Irudayaraj, «Quantitative Evaluation of Sensitivity and Selectivity of Multiplex NanoSPR Biosensor Assays,» *Biophysical Journal,* vol. 93, nº 10, pp. 3684-3692, 2007.

[18] C. T. &. D. W. A. McKee, «Refractive index of thin, aqueous films between hydrophobic surfaces studied using evanescent wave atomic force microscopy.,» *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids,* vol. 21, nº 26, pp. 12153-12159, 2005.

[19] K. R.-D. B. M. Z. O. J. N.-S. P. &. S. G. Urbanska, «Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas.,» *Acta biochimica Polonica,* vol. 49, nº 2, pp. 387-391, 2002.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[20] J. F. Shackelford, INTRODUCCIÓN A LA CIENCIA DE MATERIALES PARA INGENIEROS, España: Pearson, 2010.

[21] M. S. P. T. J. F. M. D. S.-Q. a. M. A.-M. Eustolia Rodríguez-Velázquez, «Enhanced Cell Affinity of Chitosan Membranes Mediated by Superficial Cross-Linking: A Straightforward Method Attainable by Standard Laboratory Procedures,» *Biomacromolecules,* vol. 15, nº 1, pp. 291-301, 2014.

[22] A. L. P. B. V. M. P. &. E. J. H. Singh, «A hyaluronic acid-binding contact lens with enhanced water retention.,» *Contact lens & anterior eye : the journal of the British Contact Lens Association,* vol. 38, nº 2, pp. 79-84, 2015.

[23] E. R. M. &. K. G. Papakonstantinou, «Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging.,» *Dermato-endocrinology,* vol. 4, nº 3, pp. 253-258, 2012.

[24] A. M. Bhavik Manocha, «Controlled Release of Doxorubicin from Doxorubicin/Y-Polyglutamic Acid Ionic Complex,» *Journal of Nanomaterials,* vol. 2010, pp. 780171, 9, 2010.

[25] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier y J. M. DeSimone, «The effect of particle design on cellular internalization pathways,» *Proc Natl Acad Sci U S A,* vol. 33, nº 105, pp. 11613-11618, 2008.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[26] L. L. X. L. L. &. Z. Q. Jiang, «Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified pullulan nanoparticles.,» *International journal of nanomedicine,* vol. 8, pp. 1825-1834, 2013.

[27] Z. Hami, S. M. Rezayat, K. Gilani y M. Ghazi-Khansari, «In-vitro cytotoxicity and combination effects of the docetaxel-conjugated and doxorubicin-conjugated poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-folate-based polymeric micelles in human ovarian cancer cells,» *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* vol. 69, nº 2, pp. 1-10, 2016.

[28] Z. Gao, X. Liu, Y. Wang, G. Deng, F. Zhou, Q. Wang, L. Zhang y J. Lu, «Facile and One-pot Synthesis of Fe3O4@chitosan Nanospheres for MRI and Fluorescence Imaging Guided Chemo-photothermal Combinational Therapy of Cancer,» *Dalton Transactions,* vol. 45, pp. 19519-19528, 2016.

[29] N. P. M. G. O. T. C. L. Y. D. R. L. A. &. S. S. A. Dim, «Novel targeted siRNA-loaded hybrid nanoparticles: preparation, characterization and in vitro evaluation.,» *Journal of nanobiotechnology,* vol. 13, nº 61, 2015.

[30] B. Lu, D. Luo, A. Zhao, H. Wang, Y. Zhao, M. F. Maitz, P. Yang y N. Huang, «pH responsive chitosan and hyaluronic acid layer by layer film for drug delivery applications,» *Progress in Organic Coatings,* vol. 135, pp. 240-247, 2019.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[31] A. L. M. R. R. J. M. &. H. F. Villela Zumaya, «Nanocluster-Based Drug Delivery and Theranostic Systems: Towards Cancer Therapy.,» *Polymers,* vol. 14, nº 6, p. 1188, 2022.

[32] R. Z. J. K. M. W. B. L. V. N. P. &. H. N. J. Huschka, «Light-induced release of DNA from gold nanoparticles: nanoshells and nanorods.,» *Journal of the American Chemical Society,* vol. 133, nº 31, pp. 12247-12255, 2011.

[33] L. K. A. D. S. P. J. T. E. C. P. E. R. &. R. F. Ceriotti, «Online monitoring of BALB/3T3 metabolism and adhesion with multiparametric chip-based system.,» *Analytical biochemistry,* vol. 371, nº 1, pp. 92-104, 2007.

[34] G. G. Y. C. Y. Z. T. C. R. J. Y. &. S. J. Li, «Overexpression of CD44 is associated with the occurrence and migration of non-small cell lung cancer.,» *Molecular medicine reports,* vol. 14, nº 4, pp. 3159-3167, 2016.

[35] H. &. B. Y. H. Chang Kang, «Co-delivery of small interfering RNA and plasmid DNA using a polymeric vector incorporating endosomolytic oligomeric sulfonamide.,» *Biomaterials,* vol. 32, nº 21, pp. 4914-4924, 2011.

[36] M. K. P. J. &. J. S. Yu, «Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy.,» *Theranostics,* vol. 2, nº 1, pp. 3-44, 2012.

[37] G. C. &. D. P. Thurner, «Molecular imaging with nanoparticles: the dwarf actors revisited 10 years later,» *Histochem Cell Biol.,* vol. 150, nº 6, pp. 733-794, 2018.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[38] K. D. D. Chu, «Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy.,» *Nat Rev Cancer,* vol. 14, pp. 199-208, 2014.

[39] D. L. W. Z. V. D. G. T. W. L. X. C. A. X. M. J. N. M. H. K. V. S. J. W. G. T. G. &. H. J. A. Li, «Doxorubicin Blocks Cardiomyocyte Autophagic Flux by Inhibiting Lysosome Acidification.,» *Circulation,* vol. 133, nº 17, pp. 1668-1687, 2016.

[40] H. Mizobuchi, W. Fujii, K. Ishizuka, Y. Wang, S. Watanabe, C. Sanjoba, Y. Matsumoto y Y. Goto, «MRP14 is dispensable for LPS-induced shock in BALB/c mice,» *Immunology Letters,* vol. 194, pp. 13-20, 2018.

[41] S. C. K., «The general case for redox control of wound repair,» *Wound Repair Regen,* vol. 11, nº 6, pp. 431-438, 2003.

[42] T. J. K. R. &. A.-G. T. Guzik, «Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation.,» *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society,* vol. 54, nº 4, pp. 469-487, 2003.

[43] M.-F. P. S. N. C. L. S. R. B. P. T. W. D. A. K. G. M. G. P. a. Z. M. B. Zhihang Chen, «PSMA-Targeted Theranostic Nanoplex for Prostate Cancer Therap,» *ACS Nano,* vol. 6, nº 9, p. 7752–7762, 2012.

[44] W. T. H. C. X. L. T. T. G. W. T. C. X. C. a. J. X. Zipeng Zhen, «RGD-Modified Apoferritin Nanoparticles for Efficient Drug Delivery to Tumors,» *ACS Nano,* vol. 7, nº 6, p. 4830–4837, 2013.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[45] A. C. R. G. N. M. S. J. R. R. J. H. M. R. &. S. A. M. Tan, «Nanotechnology and regenerative therapeutics in plastic surgery: The next frontier,» *J Plast Reconstr Aesthet Surg,* vol. 69, nº 1, pp. 1-13, 2016.

[46] Z. W. L. W. J. J. X. L. X. H. Z. J. Y. W. X. &. C. C. Zhang, «Mesoporous silica-coated gold nanorods as a light-mediated multifunctional theranostic platform for cancer treatment.,» *Adv. Mater,* vol. 24, nº 11, pp. 1418-1423, 2012.

[47] K. L. J. P. B. L. S.-S. F. Yutao Liu, «Folic acid conjugated nanoparticles of mixed lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for targeted delivery of Docetaxel,» *Biomaterials,* vol. 31, nº 2, pp. 330-338, 2010-2011.

[48] K. V. S. a. B. A. K. Michael R. Rasch, «Limitations on the Optical Tunability of Small Diameter Gold Nanoshells,» *Langmuir,* vol. 25, nº 19, pp. 11777-11785, 2009.

[49] Z. J. Hu, S. Hou, Y. L. Ji, T. Wen, W. Q. Liu, H. Zhang, X. W. Shi, J. Yan y X. C. Wu, «Fast characterization of gold nanorods ensemble by correlating its structure with optical extinction spectral features,» *AIP Advances,* vol. 4, p. 117137, 2014.

[50] E. D. Clutter, L. L. Chen y R. R. Wang, «Role of photobleaching process of indocyanine green for killing neuroblastoma cells,» *Biochemical and Biophysical Research Communications,* vol. 589, pp. 254-259, 2022.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[51] S. H. W. N. L. T. J. J. H. N. J. P. J. C. H. P. H. S. S. Y. E. H. S. K. K. B. S. &. K. S. Bhang, «Hyaluronic acid-quantum dot conjugates for in vivo lymphatic vessel imaging,» *ACS Nano,* vol. 23, nº 6, pp. 1389-1398, 2009.

[52] N. Y. M. N. C. K. V. M. Y. P. R. S. T. L. K. F. K. H. W. &. M. K. Okamoto, «Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin.,» *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 108, pp. 20388-20393, 2011.

[53] H. S. S. Qhattal y X. Liu, «Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes,» *Mol. Pharmaceutics,* vol. 8, nº 4, pp. 1233-1246, 2011.

[54] W. H. &. B. P. J. De Jong, «Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards,» *Int J Nanomedicine.,* vol. 3, nº 2, pp. 133-149, 2008.

[55] K. Y. Choi, G. Liu, S. Lee y X. Chen, «Theranostic nanoplatforms for simultaneous cancer imaging and therapy: current approaches and future perspectives,» *Nanoscale,* vol. 4, pp. 330-342, 2012.

[56] K. D. S. G. W. J. S. K. N. A. H. Z. &. G. R. J. Barnes, «Hyperthermia-enhanced indocyanine green delivery for laser-induced thermal ablation of carcinomas.,» *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group,* vol. 29, nº 5, pp. 474-479, 2013.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[57] Y.-K. Oh y T. G. Park, «siRNA delivery systems for cancer treatment,» *Advanced Drug Delivery Reviews,* vol. 61, nº 10, pp. 850-862, 2009.

[58] Q. Chang, «Polyethylenimine Functionalized Ultrasmall Mesoporous Silica Nanoparticles for siRNA Delivery,» *Chemnanomat Chemistry Of Nanomaterials For Energy, Biology,* vol. 8, nº 2, p. e202100453, 2022.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 6

"El gran libro siempre abierto y que hay que hacer el esfuerzo de leer es el de la Naturaleza; los otros libros han sido extraídos de éste, y además contienen las equivocaciones y las interpretaciones de los hombres."

Antoni Gaudí

EVALUACIÓN DE NANOPARTÍCULAS CERÁMICAS SOBRECONVERSORAS PARA POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS

6.1 INTRODUCCIÓN

La tomografía óptica de fluorescencia es una importante técnica de diagnóstico tanto para estudios biológicos como aplicaciones clínicas *in vitro* e *in vivo* por su elevada resolución temporal y espacial. Por ello, la búsqueda de nuevos fluoróforos que superen las limitaciones de los actuales continúa presentado mucho interés. En este sentido, las nanopartículas sobreconversoras, UpCvs, presentan unas propiedades ópticas y químicas mejores que los tintes orgánicos y los puntos cuánticos semiconductores (QDs). En concreto, tal y como se comentó en el Capítulo 1, muestran un desplazamiento anti-Stokes entre las longitudes de onda incidente y de emisión [1]; un largo tiempo de vida luminiscente; y una alta resistencia al fotoblanqueo [2] . Estas propiedades mejoradas son el resultado de la presencia de materiales inorgánicos cristalinos dopados con iones lantánidos [3] (como, por ejemplo, Er^{3+} y Tm^{3+}). Estos iones activadores generan emisión luminiscente de sobreconversión efectiva por la absorción secuencial selectiva de múltiples fotones de baja energía que provocan múltiples estados excitados en los niveles *4f* en forma de escalera de su estructura electrónica [4].

A pesar de su uso en los últimos años en diferentes campos como la biodetección [5, 6, 7], bioimagen [8], terapia fotodinámica [9] o liberación

farmacológica [10] gracias a su capacidad para absorber energía lumínica en el infrarrojo cercano, NIR, (dentro de la ventana biológica) permitiendo, así, una penetración más profunda y focalizada de la energía al mismo tiempo que pudiendo reemitirla en el espectro ultravioleta-visible, -dependiendo del tipo de activador lantánido), estas nanopartículas pueden llevar a un aumento de los potenciales efectos tóxicos. En este sentido, su composición, morfología y química superficial son factores determinantes en sus interacciones biológicas que determinan su biodistribución, tiempo de residencia e internalización en las células. A pesar de que existen muchos estudios realizados hasta la fecha que confirman que este tipo de Nps son seguras y biocompatibles [11], por ejemplo, 1000 veces menos tóxicas que los QDs, y sin reacciones adversas importantes cuando se han administrado a diferentes organismos como *Caenorhabditis elegans* [12], peces cebra [13] y roedores [14], debería tenerse en cuenta que diferentes factores como su fase cristalográfica, tamaño y superficie química pueden afectar a su estabilidad coloidal en diferentes medios y, por lo tanto, a su citotoxicidad. En revisiones bibliográficas recientes, se han expuesto una serie amplia de experimentos *in vitro* e *in vivo* que indican información relevante a este respecto a diferentes condiciones experimentales de tiempos de incubación, metodologías de dosificación, concentración de UpCvs y técnicas de análisis [15, 16].

Por otro lado, es bien conocida la existencia de enfermedades de pulmón por causa de la exposición de mineros a tierras raras (RE) durante su proceso de extracción [17], o el desarrollo de fibrosis sistémica nefrogénica en pacientes con fallo renal después de una exposición prolongada a agentes de contraste de Gd empleados para el diagnóstico y monitorización mediante imágenes de resonancia magnética, MRI [18]. Por ejemplo, Li *et al.* [11] demostraron que las nanopartículas basadas en óxidos de tierras raras son inestables en entornos celulares ácidos tales como los lisosomas, en los que la liberación de iones de tierras raras genera la complejación de fosfatos que precipitan como $REPO_4$ insolubles sobre la superficie de la partícula. Esto da lugar a transformaciones morfológicas de las partículas en nanoestructuras con forma de erizo que pueden eliminar los grupos fosfatos de lípidos y proteínas estructuralmente importantes, lo que conlleva daño de la membrana lisosomal, la liberación de catepsina B, y el inicio de efectos pro-

inflamatorios severos [11]. Por otro lado, Lisjak *et al.* mostraron no sólo una fuerte degradación de la estructura de las UpCvs con la liberación de iones flúor, F^-, sino también de Y^{3+} y Yb^{3+}, dando lugar a la presencia de sales insolubles de fosfatos lantánidos cuando la incubación se realiza en disoluciones de tampón fosfato [19]. Este comportamiento se sustenta en la hipótesis de que la degradación de las UpCvs sigue una ley cinética exponencial, alcanzando un límite que es dependiente de la concentración de saturación de los iones en base al valor de la constante del producto de solubilidad, K_{sp} [19], que parece depender de diferentes factores tales como la concentración de las UpCvs en la disolución, la fase cristalográfica de las nanopartículas, su tamaño y el tipo de agente estabilizante [16].

En este sentido y como se introdujo en el **Capítulo 1**, con el fin de controlar las interacciones de las UpCvs con el medio biológico que las rodea a la vez que se prolonga su estabilidad y biocompatibilidad se han probado diferentes tipos de ligandos y estabilizantes tales como moléculas pequeñas y surfactantes (por ejemplo, citrato, succinato glicol polietileno tocoferol, etc.) [20, 11], polímeros (polivinilpirrolidona, PVP, ácido poliacrílico, PAA, polietileno glicol, PEG, etc.) [21, 22, 23], o cubiertas inorgánicas de sílice o CaF_2 [23, 24]. Sin embargo, la funcionalización clásica de UpCvs dopadas con lantánidos del tipo $NaYF_4$: Er, Yb con moléculas como el citrato, el ácido oleico o el PVP, que les confieren solubilidad acuosa, no pueden evitar la degradación de las UpCvs bajo diferentes condiciones fisiológicas (condiciones que imitan la acidez lisosomal o medios fisiológicos que contienen fosfatos), lo que puede comprometer la viabilidad celular. En base a esto, a continuación, se enumeran los objetivos propuestos en este Capítulo.

6.2 OBJETIVOS

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas sobreconversoras con estructura cristalina hexagonal de diferente naturaleza y diferentes morfologías y/o dopajes, pero con tamaño semejante a través de la variación de la razón molar entre la concentración de los precursores y del agente estabilizante (ácido oleico) mediante el método de descomposición térmica asistida por metanol.
- Modificar la superficie de las UpCvs por degradación del ácido oleico en

condiciones ácidas, y su sustitución por diferentes agentes estabilizantes como el ácido dimercaptosucínico, DMSA, polietileno glicol, PEG, 2-aminoetil dihidrógeno fosfato, AET, y poli (isobutileno-alt-maleico anhidro), PMA, de cara a mantener las propiedades ópticas, la estabilidad, biocompatibilidad y la integridad de las UpCvs para su posible aplicación futura como elementos de contraste en bioimagen.

- Estudiar la biocompatibilidad, internalización celular y procesos de excreción celular de las diferentes UpCvs obtenidas.

6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1 Síntesis y caracterización física de las UpCvs

A partir de la técnica de descomposición térmica asistida por metanol [25, 26], se sintetizaron UpCvs con matriz cristalina de $NaYF_4$ y razones de dopantes del 18% de Yb^{3+} y 2% de Er^{3+} ó 0,5% de Tm^{3+}; ó 30% de Yb^{3+}, 1% de Nd y 0,5% de Er^{3+} ($NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ y $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Tm_{0.005}$; $NaYF_4$: $Yb_{0.3}$: $Nd_{0.01}$: $Er_{0.005}$, respectivamente), o de $NaGdF_4$ dopadas con 18% de Yb^{3+} y 2% de Er^{3+}; ($NaGdF_4$:$Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$) con emisión en el verde y el violeta. Durante los procesos sintéticos se usaron diferentes razones molares del precursor lantánido (Ln^{3+}): ácido oleico (OA). En el caso de las UpCvs dopadas con Er^{3+} se obtuvieron diferentes morfologías en función de las razones molares utilizadas, 1:16,5, 1:19, 1:20 and 1:21,5, obteniéndose cubos, nanocilindros, nanocilindros muy cortos, y esferas (**Figura 6.1 a-d**) con tamaños de ca. 38,1± 3,2 nm, 33,1 ± 1,9 nm de longitud y 23,5 ± 1,5 nm de ancho, 30,8 ± 5,2 nm y 31,6 ± 2,8 nm, respectivamente (ver **Figura 6.1 e-h** para la distribución de tamaños). Respecto a la matriz hexagonal $NaYF_4$, el área de la cara $(10\bar{1}0)$ excede a la de la cara (0001) la cual presenta una mayor energía superficial y, por lo tanto, una mayor velocidad de crecimiento. Como consecuencia, cuando la razón molar Ln^{3+}: OA es pequeña, las moléculas de OA se adsorben preferiblemente en la cara (0001) generando nanocilindros uniformes (**Figura 6.1 b**). A medida que la razón molar Ln^{3+}: OA aumenta el número de moléculas de OA satura la cara (0001) haciendo que el OA aumente en la (1010) a pesar de su mayor área superficial. Así, las UpCvs crecerán simultáneamente a lo largo de las

direcciones (0001) y $(10\bar{1}0)$ para dar lugar primero a nanocilindros cortos (**Figura 1c**) y, posteriormente, a esferas (**Figura 6.1 d**) [27]. Por el contrario, en el caso de las UpCvs dopadas con Tm^{3+}, $NaYF_4$: $Yb_{0.195}$: $Tm_{0.005}$ únicamente se obtuvieron esferas de tamaños entre 30,0 ± 3,0 nm y 39,3 ± 5,5 nm para las razones molares 1:18 y 1:20, respectivamente, como se pueden observar en las imágenes TEM y en la distribución de tamaños (**Figura 6.1 i, m; j, n**). A pesar de que la razón Ln^{3+}: OA es similar a la utilizada en las UpCvs de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$, es conocido que el tipo de activador, la concentración de dopante y su distribución sobre la matriz cristalina influencian en gran medida la forma de las Nps resultantes [28] mostrando, en este caso, un crecimiento uniforme a lo largo de todas las caras cristalinas. Además, la pequeña diferencia de la razón Ln^{3+}: F^- puede también jugar un papel adicional [29].

Por otro lado, las Nps de $NaGdF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ y $NaYF_4$: $Yb_{0.3}$: $Nd_{0.01}$: $Er_{0.005}$ a la razón molar Ln^{3+}: OA de 1:19 presentaron forma esférica y hexagonal, respectivamente, con tamaños de ca. 20,7 ± 2,4 and 37,2 ± 3,6 nm (**Figura 6.1 k, o; l, p**). El primer tipo de nanopartícula se sintetizó con el objetivo futuro de su potencial uso como agente de contraste bimodal para para tomografía óptica NIR e imágenes de resonancia magnética (MRI). El segundo tipo de nanopartícula se configuró para permitir su excitación óptica con luz NIR en el rango de 800 nm en vez de a 980 nm, como suele suceder en la mayoría de las Nps sobreconversoras y, de este modo, evitar la absorción de luz por las moléculas de agua y, con ello, un calentamiento no deseado de la célula/tejido [29].

La razón de dopado de los iones lantánido en los diferentes tipos de Nps obtenidas coincide con la razón de los respectivos cloruros de lantánidos usados en los procesos sintéticos, como se confirma por las medidas de espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (**Tabla 6.1**). Los análisis de EDX realizados a la Np $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ también confirmaron la presencia de los diferentes elementos (**Figura 6.2**).

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

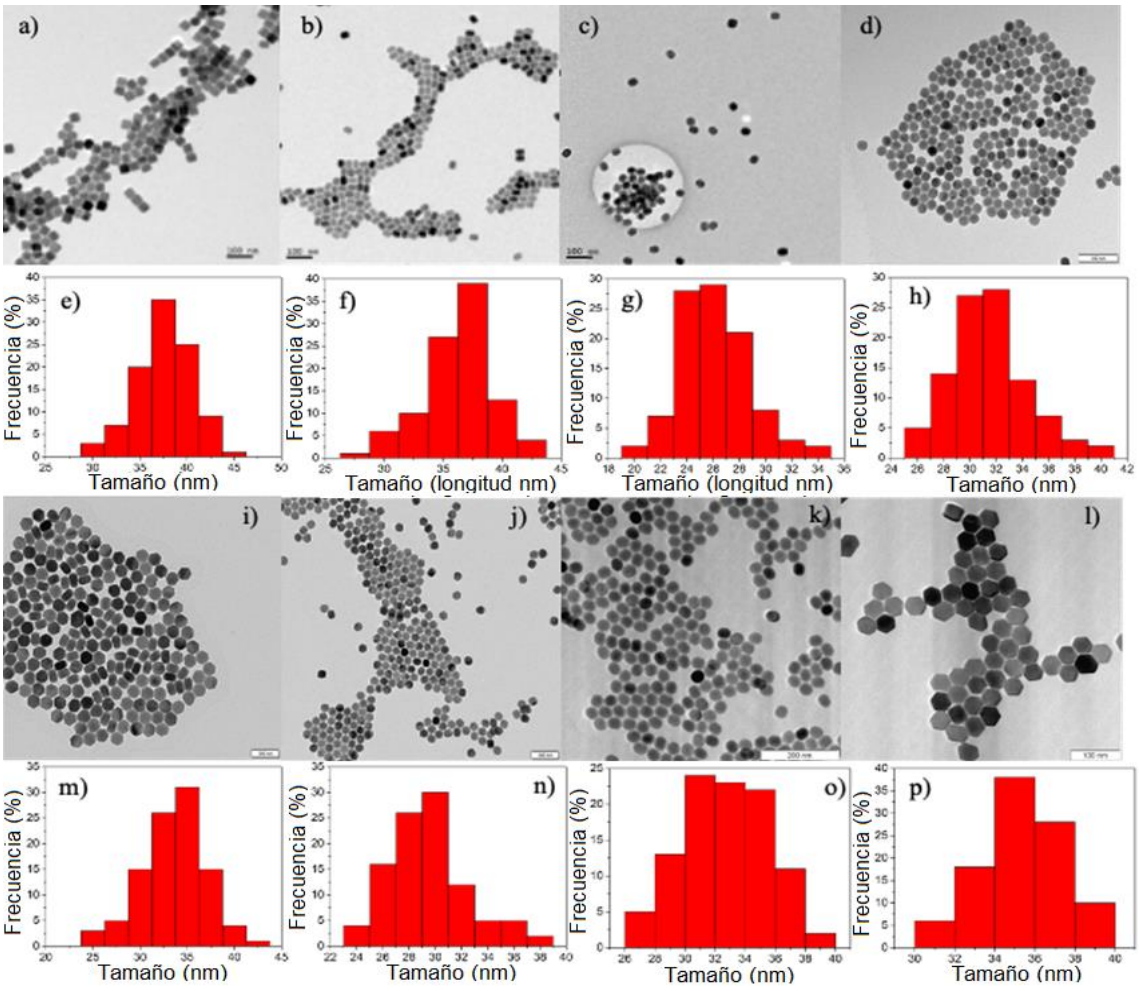


Figura 6.1 Imágenes de TEM de nanopartículas UpCvs $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ y su correspondiente distribución de tamaños para diferentes razones molares Ln^{3+}: OA de 1:16,5, 1:19, 1:20 and 1:21,5: cubos (a, e), nanocilindros (b, f), nanocilindros cortos (c, g) y esferas (d, h), respectivamente. Imágenes de TEM de nanopartículas UpCvs esféricas de composición $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Tm_{0.005}$ y su correspondiente distribución de tamaños para razones molares Ln^{3+}: OA de 1:18 (i, m) y 1:20 (j, n) y nanopartículas UpCvs esféricas de $NaGdF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ (k, o) y hexagonales de $NaYF_4$: $Yb_{0.3}$: $Nd_{0.01}$: $Er_{0.005}$ (l, p) obtenidas a una razón molar de Ln^{3+}: OA de 1:19.

Todas las nanopartículas UpCvs presentan una red cristalina β-hexagonal (**Figura 6.3 a**) que concuerda con sus excelentes capacidades de emisión de fluorescencia. Sin embargo, algunos picos menores residuales correspondientes a la fase α-cúbica pueden estar presentes en el espectro de rayos X (marcado con * en la **Figura 6.3 a**) además de un pico a ca 32º que podría provenir de la presencia de OA en la muestra analizada debido a un proceso de lavado insuficiente. Las UpCvs de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ muestran emisiones de fluorescencia principales a 524 nm

($^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$, verde), 540 nm ($^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$, verde) y 654 nm ($^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$; rojo), mientras que las de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Tm_{0.005}$ muestran emisiones a 360 nm ($^1D_2 \rightarrow {}^3H_6$, UV), 451 nm ($^1D_2 \rightarrow {}^3F_4$, violeta), 476 nm ($^1G_4 \rightarrow {}^3H_6$; azul) y 840 nm ($^3H_4 \rightarrow {}^3H_6$, NIR), respectivamente, bajo excitación con luz láser de 980 nm (Figura 3b).

Tabla 6.1 Composición elemental obtenida experimentalmente obtenidas por ICP-MS de las nanopartículas UpCvs (en mol%).

UpCvs	^{89}Y	^{146}Nd	^{157}Gd	^{166}Er	^{69}Tm	^{72}Yb
$NaYF_4$:$Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ (cubo)	80,2±0,3	-	-	2,2±0,1	-	17,6±0,3
$NaYF_4$:$Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ (nanocilindros)	79,9±0,4	-	-	2,0±0,1	-	18,1±0,3
$NaYF_4$:$Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ (nanocilindro corto)	79,7±0,5	-	-	1,9±0,2	-	18,4±0,2
$NaYF_4$:$Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ (esfera)	80,1±0,3	-	-	2,1±0,1	-	17,8±0,2
$NaYF_4$:$Yb_{0.195}$: $Tm_{0.005}$ (esfera)	80,4±0,2	-	-	-	0.5±0.1	19,1±0,3
$NaYF_4$:$Yb_{0.195}$: $Tm_{0.005}$ (esfera)	79,9±0,1	-	-	-	0.5±0.1	19,6±0,3
$NaGdF_4$:$Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ (esfera)	-	-	80,3± 0,3	1,8±0,1	-	17,9±0,3
$NaYF_4$:$Yb_{0.3}$: $Nd_{0.01}$:$Er_{0.005}$ (hexágono)	67,5±0,3	1,2± 0,1	-	0,6±0,1	-	29,7±0,3

Por otra parte, no se observaron desplazamientos en las longitudes de onda de emisión de fluorescencia en función de la morfologías de las Nps, y las fluctuaciones de intensidad detectadas se podrían asociar a mínimas variaciones en la estructura cristalina β-hexagonal, que está presente en un rango del 88% en las partículas cúbicas hasta el 97% en las esféricas de composición $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02,}$ y del 92%, 81% y 100% para las nanopartículas de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Tm_{0.005,}$ $NaGdF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ y $NaYF_4$: $Yb_{0.3}$: $Nd_{0.01}$: $Er_{0.005}$ tal y como se obtuvo a partir

de los datos de XRD, respectivamente. Además, las nanopartículas UpCvs de $NaYF_4$:$Yb_{0.3}$: $Nd_{0.01}$: $Er_{0.005}$ presentaron emisiones a ca. 262, 285 y 1080 nm correspondientes a las transiciones $^4D_{7/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ y $^4G_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$ del Er^{3+} [2], y las transiciones $^2F_{7/2} \rightarrow {}^2F_{5/2}$ del Yb^{3+} [30], respectivamente (**Figura 6.4 a-c**).

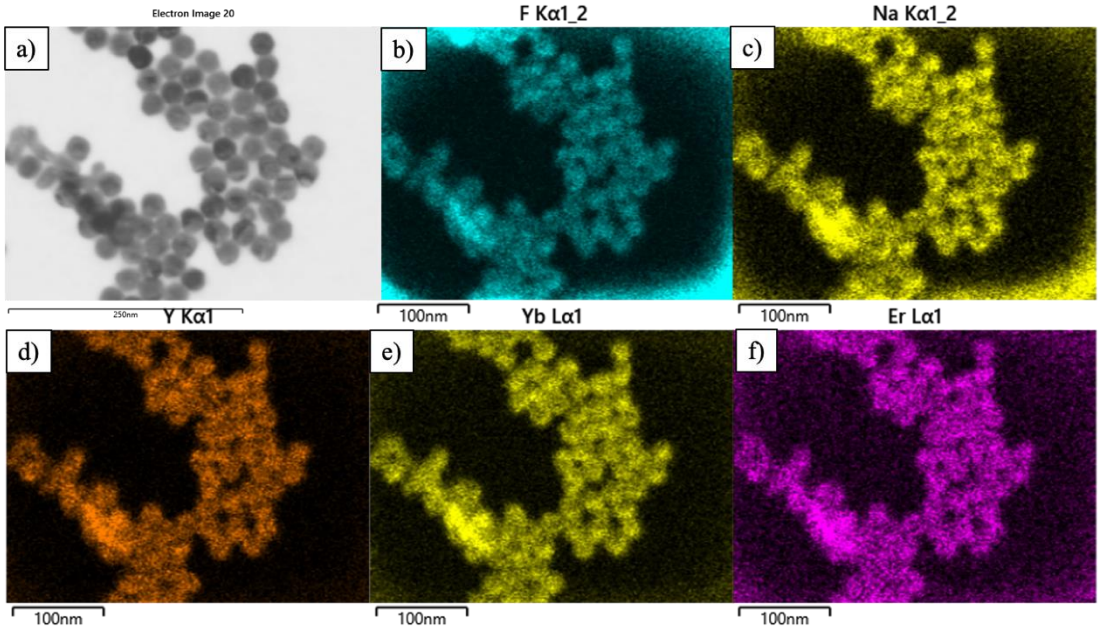


Figura 6.2 Análisis EDX de nanopartículas UpCvs de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ de simetría esférica obtenidas a una razón molar Ln^{3+}: OA de 1:20.

Es importante también mencionar que en estas Nps la emisión de los iones Er^{3+} está completamente apantallada: Los niveles de dopaje de Nd por encima del 0.5% acortan en gran medida la distancia entre los iones adyacentes lo que produce una transferencia de energía de los iones de Er^{3+} a los de Nd^{3+} volviéndose la relajación cruzada no radiativa (CR) entre los iones Nd^{3+} particularmente activa [31, 32], lo que provoca una disminución en la intensidad de sobreconversión de los iones Er^{3+} en sus bandas típicas de emisión a 524 nm, 540 nm y 645 nm. Por otro lado, las nanopartículas UpCvs de $NaGdF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ mostraron líneas de emisión similares a las de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ de acuerdo con la composición de su ion activador (**Figura 6.4 d**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

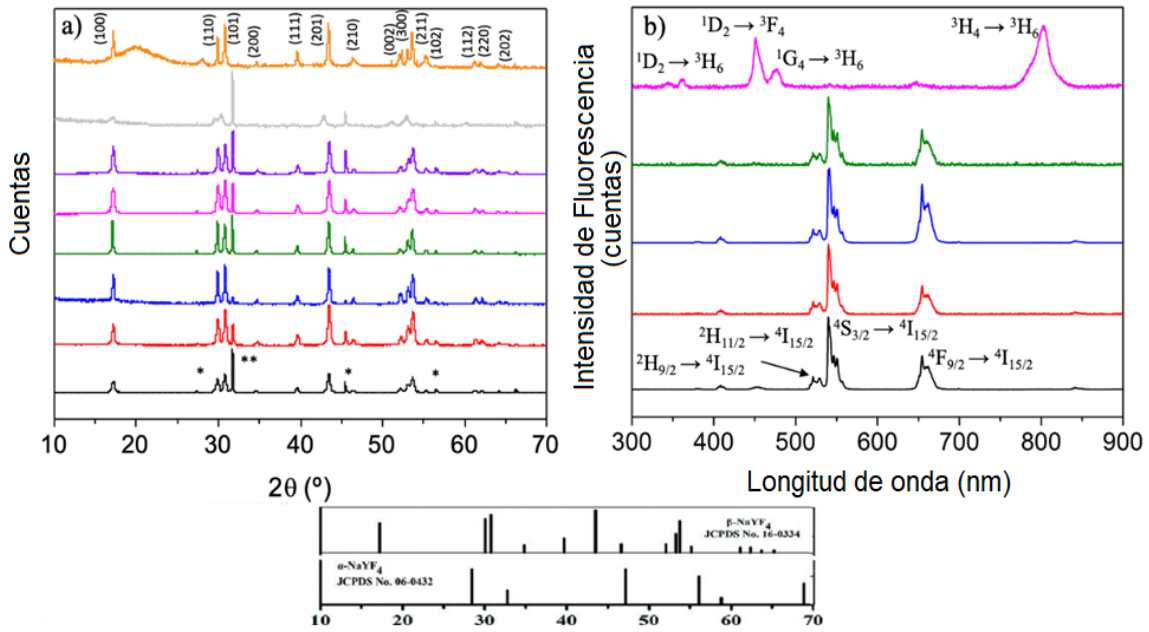


Figura 6.3 Patrones de difracción de XRD de las nanopartículas UpCvs de composición $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ con morfología: cúbica (—), nanocilindro (—), nanocilindro corto (—), y esférica (—); de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Tm_{0.005}$ con morfología esférica a la razón molar de Ln^{3+}: OA de 1:18 (—) y1:20 (—); de $NaGdF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ de simetría esférica (—); y de $NaYF_4$: $Yb_{0.3}$: $Nd_{0.01}$: $Er_{0.005}$ de morfología hexagonal (—). Debajo se muestran los picos de difracción de las estructuras cristalinas α-cúbica y β-hexagonal de la matriz de $NaYF_4$. b) Espectros de fluorescencia de las nanopartículas UpCvs de composición NaYF4: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ con morfología cúbica (—), nanocilindro (—), nanocilindro corto (—), y esférica (—); y de NaYF4: $Yb_{0.18}$: $Tm_{0.005}$ con morfología esférica obtenidas a la razón molar de Ln^{3+}: OA de 1:18 (—) bajo excitación con una fuente de luz láser de 980 nm.

6.3.2 Estabilidad estructural y coloidal de las nanopartículas UpCvs funcionalizadas

Con el objetivo de un potencial uso en aplicaciones biológicas, es necesario otorgar a las nanopartículas de solubilidad acuosa además de estabilidad coloidal para evitar su aglomeración y, por lo tanto, una eliminación temprana del cuerpo humano debido a su reconocimiento por el sistema reticuloendotelial y su consiguiente degradación y excreción. Todo este proceso, además, puede modificar en gran medida las propiedades físico-químicas de las Nps y producir, como consecuencia, importantes efectos tóxicos debido a su potencial disolución y la consecuente liberación, por ejemplo, de los potencialmente tóxicos iones de F^-.

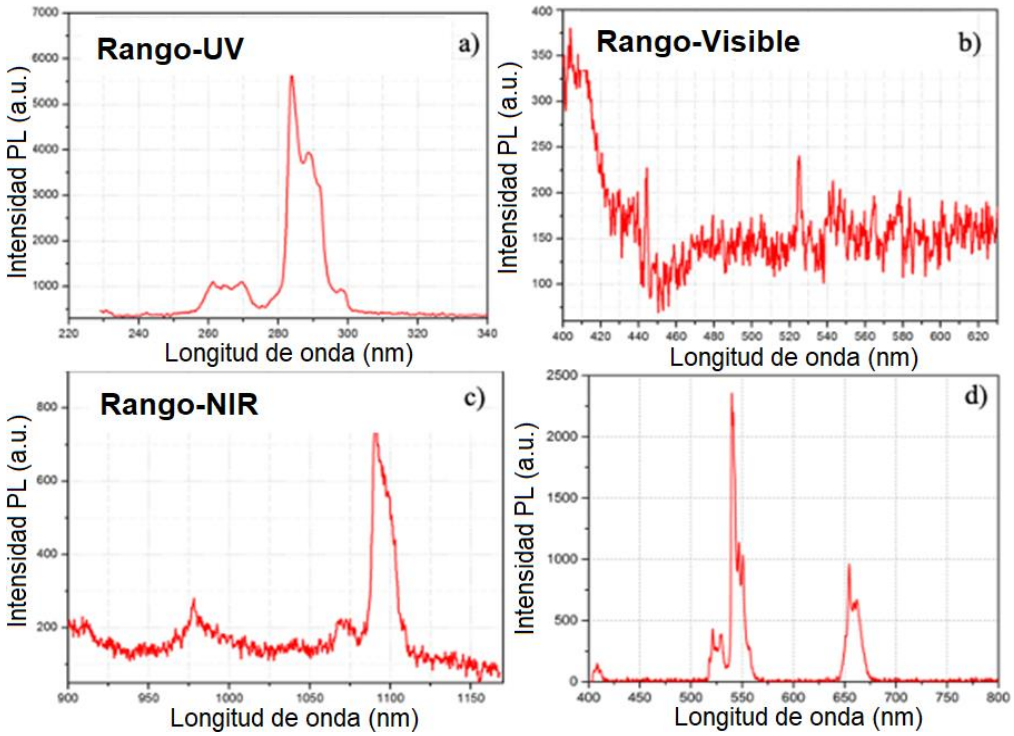


Figura 6.4 Emisión de fluorescencia de nanopartículas UpCvs de $NaYF_4$: $Yb_{0.3}$: $Nd_{0.01}$: $Er_{0.005}$ en los rangos a) UV, b) visible y c) NIR; y d) de Nps de $NaGdF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ bajo excitación con luz laser a 980 nm.

Por estas razones, y con el objeto de: i) analizar la estabilidad coloidal de las UpCvs de simetría esférica de composición $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ (como Nps modelo) en diferentes medios acuosos, y ii) estudiar la protección de estos recubrimientos frente a la degradación para potenciales aplicaciones biológicas, se realizaron cuatro modificaciones superficiales en estas UpCvs basadas en recubrimientos de AET, DMSA, PEG y PMA (UpCvs@AET, UpCvs@DMSA, UpCvs@PEG, UpCvs@PMA).

Las nanopartículas UpCvs estabilizadas con OA resultantes del proceso sintético se aglomeraron en medios acuosos, presentando un radio hidrodinámico de 212 ± 16 nm. Sin embargo, estas Nps sí se pudieron dispersar en medio de cultivo celular DMEM suplementado con proteínas séricas, obteniéndose un radio hidrodinámico de ca. 85 ± 6 y carga superficial de -18,9 ± 5,1 mV. Todas las modificaciones superficiales se prepararon a partir de la misma disolución madre de Nps recubiertas con OA a través del procedimiento de intercambio de ligandos. El éxito del proceso de recubrimiento se confirmó mediante los cambios en los

potenciales-ξ (-7.5 ± 1,1, -23.8 ± 4,9, -14.7 ± 3,6 y -22.5 ± 5,3 mV para recubrimientos con DMSA, AET, PEG y PMA, respectivamente, en medio acuoso a pH 7,4) y, principalmente, por espectroscopía FITR (**Figura 6.5 a**). El análisis de DLS también confirmó ciertos cambios en el tamaño hidrodinámico de las Nps después del proceso de funcionalización (**Figura 6.5 b**). A este respecto, en las Nps basadas en matrices de $NaYF_4$, los iones de Y^{3+} están coordinados por nueve iones vecinos, como se muestra en las simulaciones de dinámica molecular [33]. En la superficie de la Np, este número es menor después de la pérdida de iones de coordinación, y, por lo tanto, es posible que los ligandos se unan *vía* coordinación a estos iones de Y^{3+}. En principio, los ligandos proveen de un importante número de pares de electrones libres que podrían llevar al número máximo de coordinación. Por el contrario, una coordinación con 6 vecinos es más probable para los iones Yb^{3+} [34]. Por lo tanto, son esperables cambios tanto en el recubrimiento superficial, así como en la estabilidad de la unión de diferentes ligandos y matrices cristalinas. Además, la forma de las Nps también puede jugar un papel muy importante aportando efectos de curvatura y defectos de superficie que pueden alterar la energía de coordinación/unión del ligando [3].

A continuación, se testó la potencial degradación de las nanopartículas UpCvs esféricas de composición $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ recubiertas con los diferentes ligandos en medio celular de cultivo DMEM, DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS, medio imitador fagolisosomal (PSF, de sus siglas en inglés), y medio tamponado de borato básico. Así, se observó una importante transformación de las nanopartículas UpCvs bajo condiciones ácidas del medio fagolisosomal, particularmente para las Nps UpCvs@AET, y siguiendo la secuencia UpCvs@AET > UpCvs@DMSA > UpCvs@PEG ~ UpCvs@PMA debido al progresivo incremento de las concentraciones de iones F^- en el medio acuoso después de la incubación (**Figura 6.5 c-f**). Esta transformación afectó también a la fluorescencia de emisión de las UpCvs, en el que la cristalinidad de la partícula juega un papel determinante, provocando una importante reducción de la intensidad de fluorescencia comparada con las partículas recién obtenidas, en consonancia con trabajos previos (**Figura 6.5 h-k**) [35, 36, 37].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

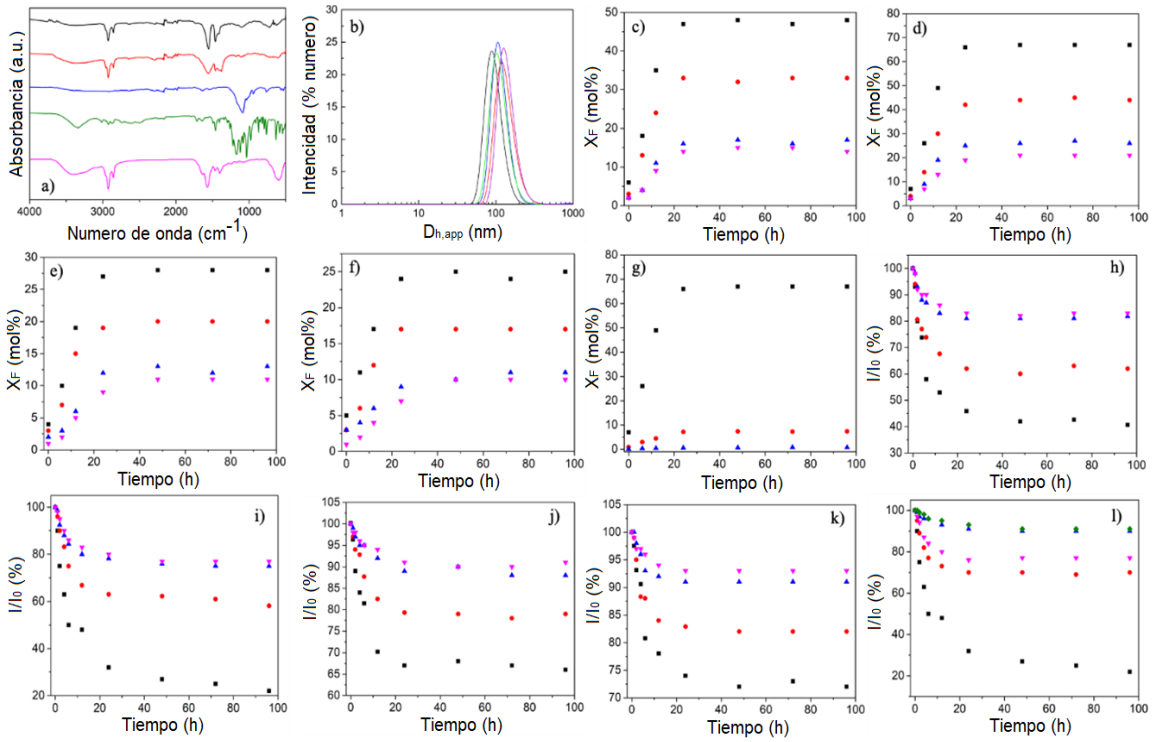


Figura 6.5 Espectros FTIR de nanopartículas UpCvs esféricas de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ recubiertas con OA (—), AET (—), DMSA (—), PEG (—), y PMA (—). b) Distribución de tamaños de nanopartículas UpCvs recubiertas con OA (—), AET (—), DMSA (—), PEG (—), y PMA (—). Fracción de iones F^- disueltos de nanopartículas UpCvs esféricas de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ (10 µg/mL) recubiertas de (●) AET, (■) DMSA, (▲) PEG, y (▼) PMA incubadas en c) disolución de tampón borato, d) PSF, e) DMEM, f) DMEM+10 (v/v) FBS, y g) PFS+1 mM de KF. Razón de decaimiento de fluorescencia de nanopartículas UpCvs esféricas recubiertas de (●) AET, (■) DMSA, (▲) PEG, y (▼) PMA incubadas en h) disolución de tampón borato, i) PSF, j) DMEM, k) DMEM+10 (v/v) FBS. l) Razón de decaimiento de fluorescencia para nanopartículas UpCvs esféricas de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ recubiertas con AET e incubadas en PSF a una concentración de 10 µg/mL en presencia de (●) 0 y (■) 1 mM KF, y a una concentración de (▼) 50, (▲) 100 y (◆) 1000 µg/mL en ausencia de KF.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los cambios en la señal de fluorescencia también podrían estar afectados por cierta floculación de las Nps, a la precipitación heterogénea de otros materiales en la superficie de las Nps (por ejemplo, fosfatos en el caso de disoluciones tampón de PBS), y/o al proceso de intercambio de ligandos superficiales que puede afectar a la respuesta luminiscente [38].

El efecto observado es mucho menos pronunciado a las mayores concentraciones de Nps (**Figura 6.5 g, l**), o en presencia de iones F^- añadidos

(**Figura 6.5 l**), de acuerdo con el hecho que la máxima concentración de F^- se determina por el valor de equilibrio y, por lo tanto, cuanto más diluida sea la dispersión de Nps se presentará una mayor fracción de sólidos disueltos en comparación con una dispersión más concentrada de Nps [19, 39, 40]. Esto es particularmente importante en sistemas altamente diluidos, como suelen ser los que se utilizan en aplicaciones biológicas, con una concentración de masa circulante de Nps de > 100 μg/mL [41].

Por otro lado, las imágenes de TEM confirman la importante alteración de las nanopartículas UpCvs@AET cuando se exponen al medio PFS (**Figura 6.6 a**), con una parcial pérdida de morfología, y la formación de cadenas de partículas entrelazadas o aglomeradas después de 48 h de incubación (**Figura 6.6 b**). Para las nanopartículas UpCvs@DMSA se observaron algunas alteraciones superficiales después del proceso de incubación (**Figura 6.6 f**); sin embargo, las nanopartículas UpCvs@PEG (**Figura 6.6 j**) y UpCvs@PMA (**Figura 6.6 n**) parecen no mostrar alteraciones morfológicas significativas, confirmando que los polímeros proporcionan una buena protección superficial y mantiene las partículas de manera individual y bien dispersas en el medio. Incluso, para el último tipo de nanopartículas se puede distinguir perfectamente el recubrimiento polímero.

Por el contrario, los cambios estructurales y fisicoquímicos observados para las partículas con los diferentes tipos de recubrimientos incubados en medio de cultivo DMEM con FBS suplementado es bastante menor. En este medio, las nanopartículas UpCvs@AET volvieron a mostrar una menor estabilidad estructural generando un gran número de iones F^- liberados en el medio acuoso y perdiendo emisión fluorescente. Sin embargo, esas variaciones son menores que las que se observaron previamente en PFS, lo que está de acuerdo con la relativamente buena morfología que presentan las nanopartículas tras la incubación (**Figura 6.6 d**).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

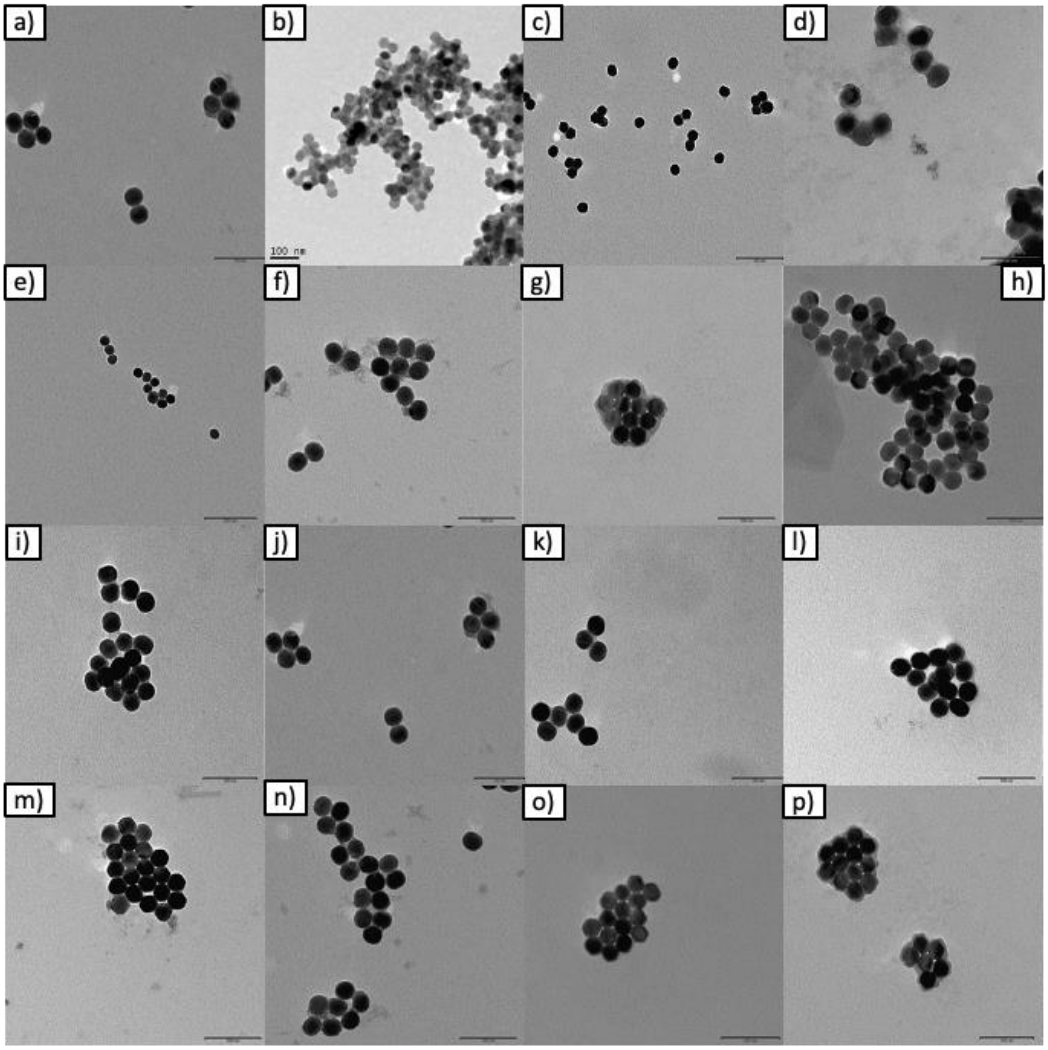


Figura 6.6 Imágenes TEM de nanopartículas UpCvs esféricas de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ UpCvs recubiertas con AET (a-d), DMSA (e-h), PEG (i-l) y PMA (m-p) incubadas a 0 (a, c, e, g, i, k, m, o) y 48 h (b, d, f, h, j, l, n, p) en PSF (a, b, e, f, i, j, m, n) y DMEM+10% (v/v) FBS (c, d, g, h, k, l, o, p).

Por otro lado, la evolución en la forma y la degradación de las nanopartículas UpCvs@DMSA en DMEM es muy pequeña, y únicamente unas pocas partículas se observaron aglomeradas, resultado que podría derivarse del propio proceso de secado para el análisis de las muestras. Las nanopartículas UpCvs@PEG y UpCvs@PMA mantuvieron perfectamente su morfología como se confirma de la baja cantidad de iones F^- liberados al medio y la mínima pérdida de emisión de fluorescencia, lo que confirmaría un gran empaquetamiento de los ligandos sobre la superficie de las Nps dotándolas, pues, de una excelente protección frente a la degradación. Para el medio DMEM parece que los aminoácidos, las vitaminas, los

azúcares y la mayoría de las proteínas presentes en su composición, y que dan lugar a la formación de una corona proteica, podrían colaborar para estabilizar y proteger las Nps [23].

Posteriormente, la estabilidad coloidal de las nanopartículas UpCvs funcionalizadas con los diferentes ligandos se monitorizó mediante el análisis de los posibles cambios en el tamaño hidrodinámico y el potencial-ζ de las partículas después de su incubación en medios DMEM+10% (v/v) FBS y PSF durante 48 h. **La Figura 6.7** muestra que en medio celular DMEM completo el tamaño hidrodinámico inicial de las nanopartículas UpCvs@DMSA es ca. 102 ± 13 nm, lo que indica que estas están presentes en la forma de pequeños agregados (dímeros o trímeros en disolución) con un potencial-ζ inicial de -13.5 ± 2.3 mV. Se observó además que el tamaño hidrodinámico se incrementó ligeramente durante el tiempo de incubación hasta ca. 112 ± 11 nm, probablemente como consecuencia de la formación de una pequeña corona proteica (**Figura 6.7 a**). Por el contrario, no se observaron variaciones importantes en la carga superficial de estas partículas excepto a 48 h, para el cual el potencial-ζ se incrementó ligeramente hasta ca. -11.5±1.5 mV (**Figura 6.7 b**).

Respecto a las nanopartículas UpCvs@AET, estas presentaron un tamaño inicial de ca. 107 ± 12 nm, pero con un incremento abrupto de este tamaño dentro de las primeras 10 h de incubación hasta ca. 122 ± 9 nm, probablemente debido a la combinación de una adsorción de proteínas sumado a una cierta desestabilización de la partícula. A mayores tiempos de incubación se produjeron progresivos incrementos adicionales del tamaño de partícula de hasta ca. 33 nm. En el caso de las nanopartículas UpCvs@PEG, el tamaño inicial fue de ca. 101 ± 8 nm que, comparado con los 31 ± 3 nm obtenidos por TEM, podría indicar un posible estiramiento de las cadenas del polímero PEG en el medio acuoso, contribuyendo al incremento de tamaño. Sin embargo, la formación de dímeros/trímeros de partículas tampoco se puede despreciar como en el caso de DMSA. Además, tanto el tamaño hidrodinámico como el potencial-ζ (ca. -14,0 ± 3,0 mV) de estas nanopartículas apenas cambian con el tiempo de incubación gracias a la estabilidad estérica que aporta el polímero (**Figura 6.7 a-b**). A este respecto, es importante mencionar que

la carga superficial de estas Nps es ligeramente negativa como consecuencia de la deslocalización de los pares de electrones del enlace éter de los monómeros de PEG, pero tampoco se puede despreciar completamente la contribución de algunas moléculas adsorbidas sobre las NPs [42]. Finalmente, las nanopartículas UpCvs@PMA mostraron un tamaño inicial de ca. 103 ± 7 nm y potencial-ζ de -14,4 ± 2,8 mV, que en ambos casos se incrementó ligeramente con el tiempo de incubación hasta alcanzar valores de ca. 109 ± 8 nm y -16, 2 ± 1,8 mV, respectivamente, lo que confirmaría la gran estabilidad de este tipo de partículas en medio de cultivo.

Por otro lado, se observaron ciertas variaciones en la estabilidad coloidal de las nanopartículas UpCvs cuando el medio de cultivo se cambió a PSF. El tamaño hidrodinámico de las nanopartículas UpCvs@AET aumentó de forma considerable desde el inicio de la incubación, ca. 181 ± 11 nm de tamaño inicial hasta los ca. 507 ± 25 nm después de 48 h de incubación (**Figura 6.7 c**), confirmándose una fuerte agregación como consecuencia de la degradación de las Nps mostrada previamente. Del mismo modo, el potencial-ζ varió de entre los 7,5 ± 2,3 mV hasta -7,3 ± 1,8 mV (**Figura 6.7 d**). Para las nanopartículas UpCvs@DMSA, el tamaño también experimentó un cierto incremento con el tiempo de incubación, desde ca. 113 ± 9 nm hasta 202 ± 10 nm y una variación de potencial-ζ desde -5,1 ± 1,3 mV hasta -11,9 ± 2,9 mV. Este comportamiento mostró que el DMSA otorga una mejor estabilidad a las partículas respecto al AET, sobre todo a tiempos de incubación más cortos lo que concuerda con los datos de degradación; no obstante, la estabilidad coloidal está lejos de ser óptima para aplicaciones biológicas, principalmente cuando las partículas pudiesen encontrarse o estar en contacto con un medio ácido. Respecto a las nanopartículas UpCvs@PEG, estas mostraron ser bastante estables incluso en un medio ácido como es el PSF, con tamaños relativamente constantes en el rango de 110-120 nm y sin signos de agregación. Además, se observó una progresiva reducción del potencial superficial de 0 a -9,7 ± 2,5 mV otorgando de esta manera también una estabilidad electrostática además de la polimérica de carácter estérico.

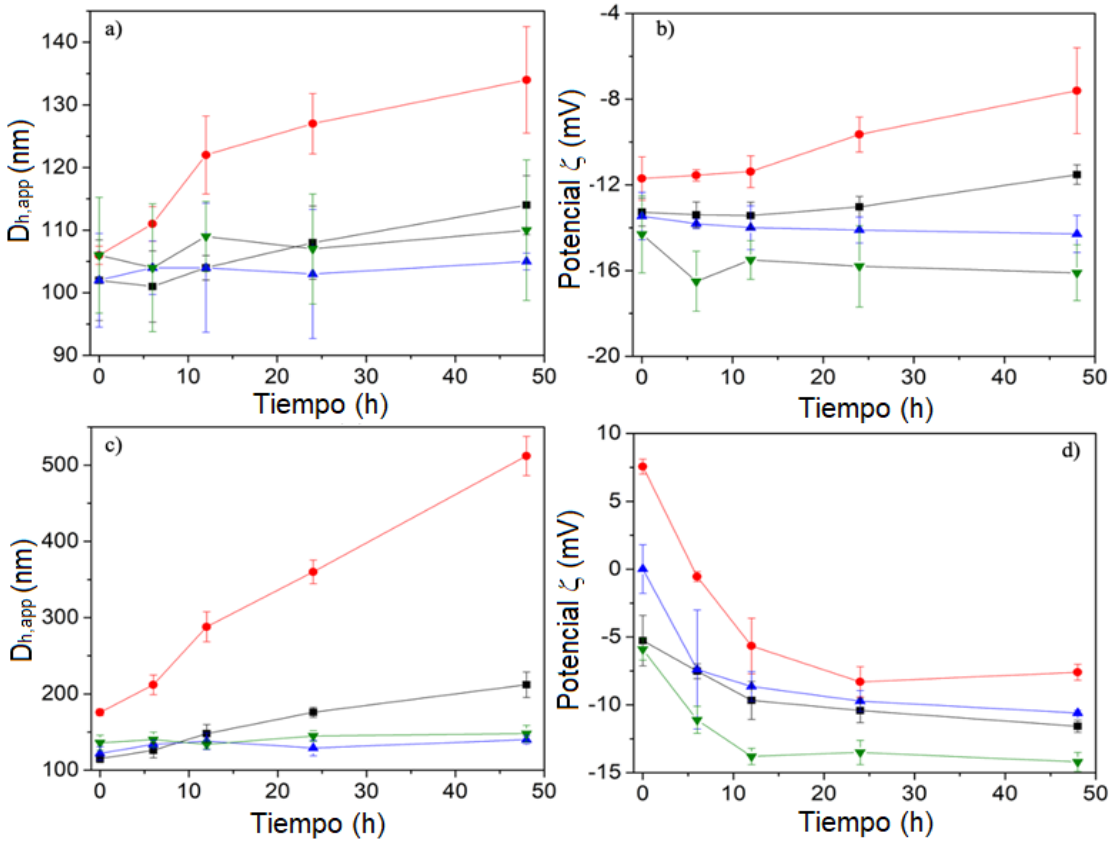


Figura 6.7 Estabilidad coloidal analizada en términos de cambio de (a, c) tamaño hidrodinámico y (b, d) potenciales ζ después de 48h de incubación en medios (a, b) DMEM+10% v/v FBS y (c, d) PSF para nanopartículas UpCvs esféricas $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ recubiertas con (●) AET, (■) DMSA, (▲) PEG, y (▼) PMA.

Finalmente, las nanopartículas UpCvs@PMA también mostraron una estabilidad coloidal muy aceptable, con tamaños entre 130-140 nm (**Figura 6.7 c**) que es ligeramente mayor al obtenido con las NPs recubiertas con PEG consecuencia de la formación de micelas poliméricas para la estabilización de las partículas. Como en el caso de las nanopartículas UpCvs@PEG, el potencial -ζ disminuye desde -6,2 ± 1,3 hasta -14.6 ± 4,5 mV después de la incubación (**Figura 6.7 d**), confirmando que este recubrimiento es adecuado para aplicaciones biológicas. A modo de resumen, los recubrimientos con DMSA y, especialmente, con PEG y PMA posibilitan a las nanopartículas UpCvs recubrimientos adecuados para medios que imitan las condiciones celulares, mientras que el de AET es más inestable y no es capaz de soportar la progresiva degradación y transformación de las nanopartículas UpCvs de tierras raras en tales condiciones.

6.3.3 Evaluación in vitro de las nanopartículas sobreconversoras

Gracias a su facilidad de modificación estructural y composicional y sus importantes propiedades ópticas bajo irradiación NIR, las nanopartículas UpCvs se han estudiado ampliamente como potenciales agentes de contraste de imagen y como plataformas para su uso en terapia fotodinámica. Sin embargo, la posibilidad de efectos adversos dañinos debido a la biotransformación o inherente toxicidad de sus componentes ha limitado su traslación a la aplicación clínica. Para confirmar si las nanopartículas UpCvs de composición general $NaYF_4$: Yb: Er con los recubrimientos más adecuados en términos de estabilidad son realmente biocompatibles, por lo menos a tiempos cortos, se estudió la viabilidad celular después de la administración de nanopartículas UpCvs modificadas superficialmente con UpCvs@AET, UpCvs@DMSA, UpCvs@PEG y UpCvs@PMA en una línea celular cancerígena como es la de cáncer cervical, HeLa, y en otra de fibroblastos de ratón 3T3 Balb tras 24 y 48 h de incubación mediante el ensayo de citotoxicidad CCK-8. La **Figura 6.8** muestra que todos los tipos de Nps recubiertas son no tóxicas durante las primeras 24 h de incubación, con una viabilidad alrededor del 80% en todos los casos para ambas líneas celulares. Tras 48 h de incubación, las Nps mostraron una dependencia más marcada de la toxicidad con la concentración, con viabilidades superiores al 80% para concentraciones por debajo de 9,1 μg/mL en células HeLa y de 36 μg/mL en las 3T3 Balb para nanopartículas UpCvs@AET; y de 36 μg/mL en células HeLa para UpCvs@DMSA (**Figura 6.8 b, d**). En particular, las nanopartículas UpCvs@AET mostraron la menor viabilidad de todas las analizadas, alcanzando ca. 41% a 48 h de incubación en células HeLa. Este comportamiento se puede asociar a la baja estabilidad estructural de las Nps con este recubrimiento, tal y como se demostró previamente en este Capítulo, y que puede permitir la liberación de iones que pueden ser perjudiciales para las células, particularmente para las cancerosas ya que presentan un metabolismo más acelerado. Para las nanopartículas UpCvs@DMSA, la citoviabilidad también disminuye a las concentraciones de Np más elevadas, pero en mucha menor medida que para las nanopartículas UpCvs@AET, de acuerdo una vez más con los resultados de estabilidad coloidal. Mientras tanto, las nanopartículas UpCvs@PEG y

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

UpCvs@PMA son muy citocompatibles, con viabilidades por encima del 90% para todas las líneas celulares y condiciones analizadas (**Figura 6.8**).

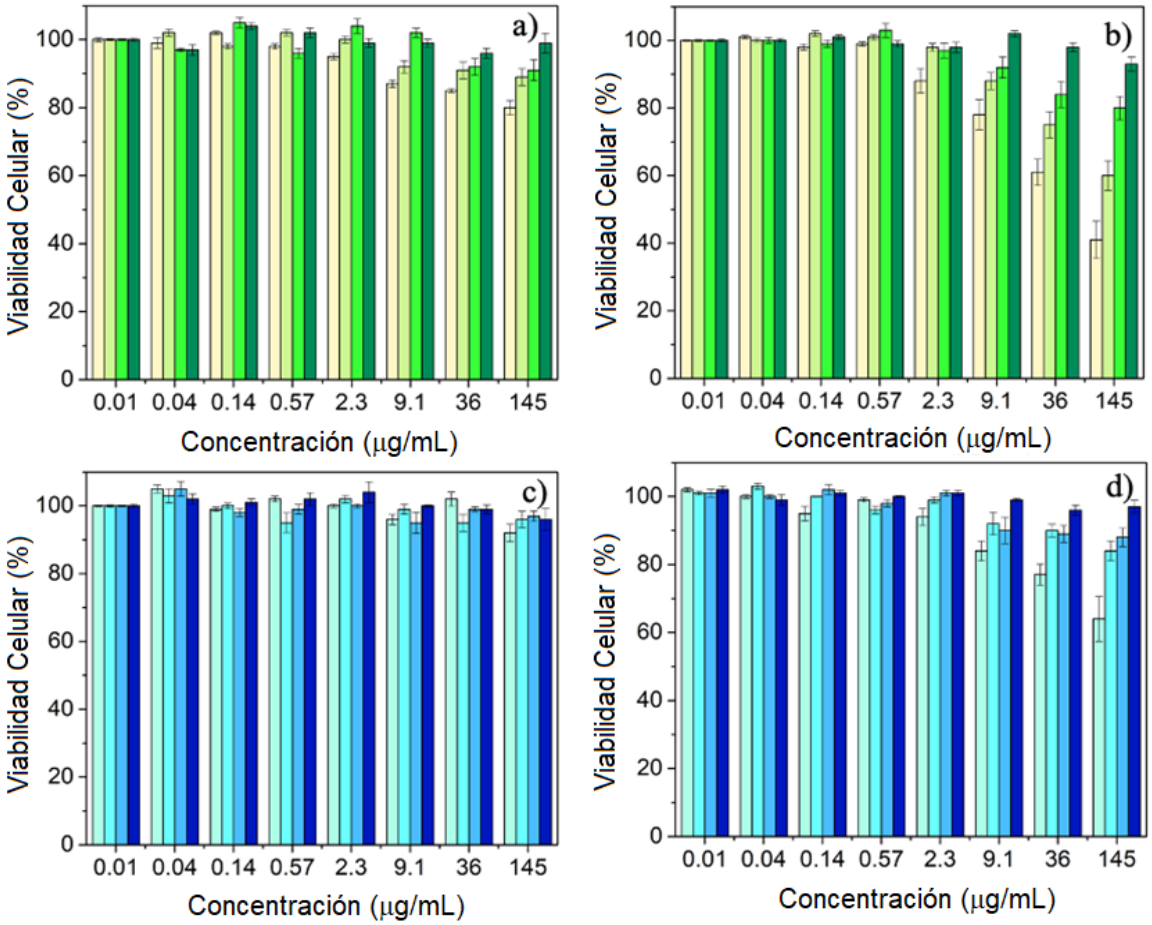


Figura 6.8 Viabilidad celular para nanopartículas UpCvs recubiertas con UpCvs@AET UpCvs@DMSA , UpCv@PEG y UpCvs@PMA en células Hela después de a) 24 y b) 48 h de incubación, y en células 3T3 Balb después de c) 24 h y d) 48 h de incubación.

Por otra parte, las imágenes de microscopía confocal demostraron la exitosa captación e internalización de los diferentes tipos de Nps dentro de las células HeLa en función de la naturaleza de su recubrimiento. La **Figura 6.9** muestra una gran señal de fluorescencia, después de la irradiación de las muestras con NIR, dentro del citoplasma celular durante las primeras 6 h, correspondiente a la internalización de las nanopartículas UpCvs@AET. También parece observarse que las partículas están agregadas, probablemente en el lisosoma, lo que estaría de acuerdo con los datos de estabilidad coloidal (**Figura 6.9 a**). Por el contrario, después de 48 h de incubación, la fluorescencia decrece de manera muy apreciable, hecho que respaldaría el

apantallamiento de la fluorescencia observado consecuencia de la degradación de la partícula (**Figura 6.9 b**). Además, la excreción de las partículas del interior celular también podría influir en esta disminución de la fluorescencia.

Por el contrario, las nanopartículas UpCvs@DMSA (**Figura 6.9 c**) y UpCvs@PEG (**Figura 6.9 e**) también se internalizaron dentro de las células, pero en menor medida que las nanopartículas UpCvs@AET, particularmente, las recubiertas con PEG. Las señales de fluorescencia para las UpCvs@DMSA aumentaron progresivamente con el tiempo de incubación y se volvieron mucho más intensas que las de las nanopartículas UpCvs@AET después de 48 h a pesar de la carga superficial negativa de este tipo de Nps (**Figura 6.9 d**). Además, el patrón de fluorescencia observado fue más intenso y de perfil puntuado, lo que indicaría su retención intracelular en la forma de Nps individuales. Esto confirmaría la mejor protección otorgado por el recubrimiento de DMSA.

Por su parte, las nanopartículas UpCvs@PEG mostraron una señal de fluorescencia inicial mucho más baja dentro de las células, que podría estar originada por la propia naturaleza de la cubierta de PEG impidiendo interacciones más fuertes con las células y, por lo tanto, dando lugar a una menor captación de Nps por estas (**Figura 6.9 e**). Sin embargo, una vez internalizadas, este tipo de nanopartículas se encuentran bien protegidas dentro de las células, como lo confirma las señales de fluorescencia observadas después de 48 h incubación (**Figura 6.9 f**). Finalmente, las nanopartículas UpCvs@PMA se internalizaron en menor medida al inicio del período de incubación si se compara con las UpCvs@AET, pero parece que mantienen una mayor fluorescencia dentro del citoplasma celular a lo largo del tiempo como sucede con las nanopartículas UpCv@DMSA, confirmando el buen papel protector de esta cubierta polimérica.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

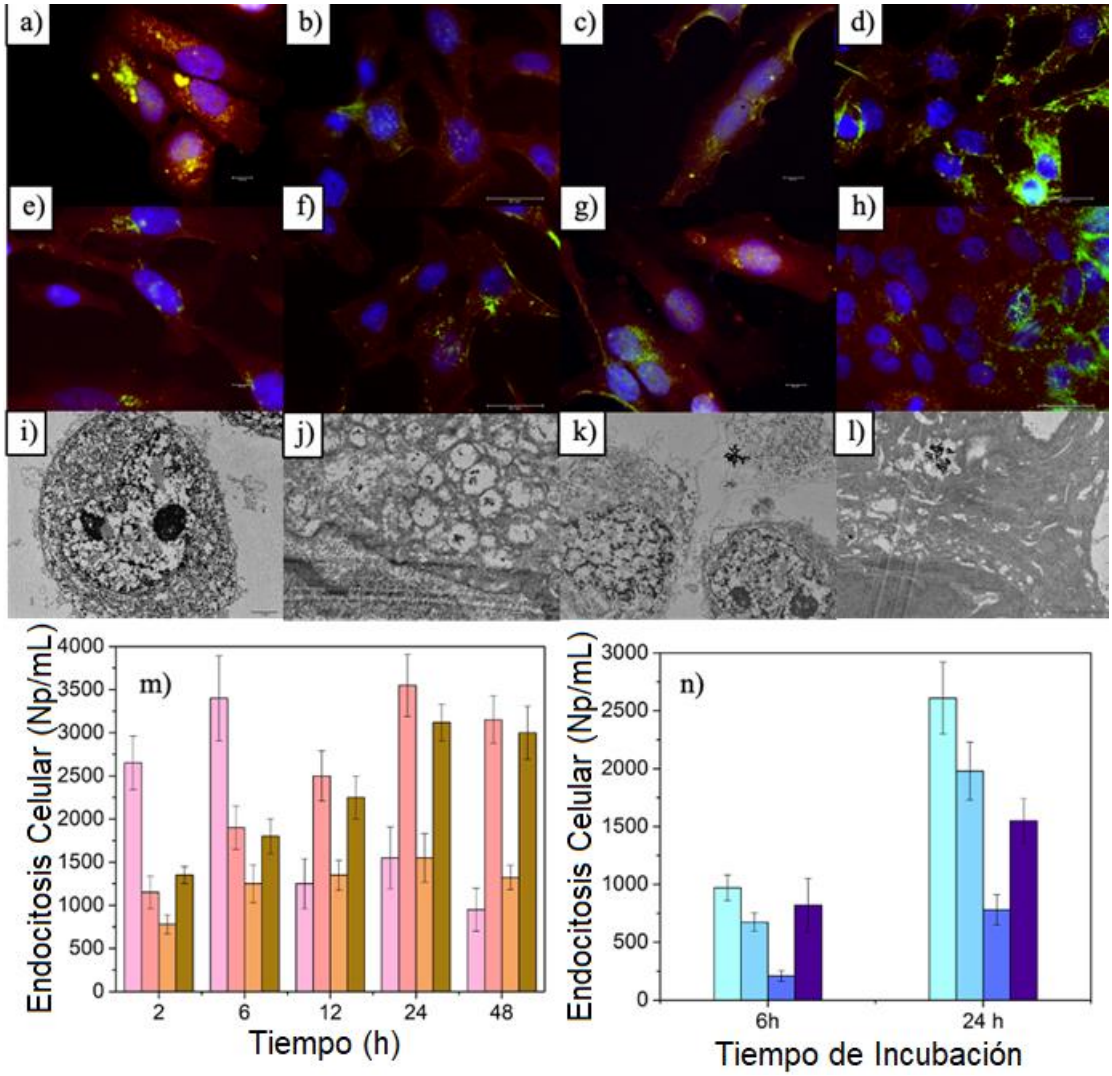


Figura 6.9 Imágenes de microscopía confocal después de la administración de a) UpCvs@AET-6h, b) UpCvs-24h, c) UpCvs@DMSA-6h, d) UpCvs@DMSA-24h, e) UpCvs@PEG-6h, f) UpCvs@PEG-24 h, g) UpCvs@PMA-6h, y h) UpCvs@PMA-24h en células HeLa. Imágenes de TEM indicando la internalización celular de i) UpCvs@AET, j-k) UpCvs@DMSA y l) UpCvs@PMA. m) Nps endocitadas en células HeLa a diferentes tiempos de incubación: UpCvs@AET , UpCvs@DMSA , UpCvs@PEG y UCNP@PMA . n) Nanopartículas exocitadas desde células HeLa después de 6 y 24 h de incubación: UpCvs@AET , UpCvs@DMSA , UCNP@PEG , y UCNP@PMA .

Para confirmar las observaciones de microscopía confocal se cuantificó la internalización de las Nps con las distintas funcionalizaciones mediante ICP-MS a diferentes tiempos de incubación. La **Figura 6.9 m** mostró que el contenido de UpCvs@AET internalizado dentro de las células HeLa fue inicialmente mayor, alcanzando un máximo después de 6 h tras su administración a las células y

disminuyendo posteriormente, tal y como se mostró en las imágenes de confocal, probablemente como resultado de la progresiva degradación de las partículas como se demostró por espectroscopía de fluorescencia y la determinación de iones F^- en disolución. Las imágenes de TEM de las nanopartículas UpCvs@AET dentro de las células HeLa también confirmaron la transformación de este tipo de Nps en otras mucho más pequeñas que están ampliamente difundidas a lo largo del citoplasma celular, y especialmente, presentes en las vesículas endosomales (**Figura 6.9 i-j**). De forma sorprendente, estas Nps transformadas también se encontraron en la mitocondria, por lo que reducción del tamaño consecuencia del proceso de degradación podría permitir su incorporación dentro de este orgánulo. La eliminación del AET de la superficie de la Np podría ser el origen de este proceso de degradación, ya que se ha demostrado que este recubrimiento con base de fosfato no es capaz de evitar la degradación bajo condiciones abióticas y bióticas [43].

Por el contrario, la internalización de las nanopartículas UpCv@DMSA alcanzó su máximo después de las 24 h con una ligera disminución después de este tiempo (**Figura 6.9 m**). Un patrón similar se observó también para las nanopartículas UpCv@PMA. Ambos tipos de Nps se encontraron presentes en el citoplasma celular y aparecieron formando agregados/clústeres (**Figura 6.9 k-l**). Finalmente, las nanopartículas UpCvs@PEG se internalizaron en mucha menor cantidad, lo que confirmaría las observaciones de las imágenes de confocal.

A pesar de existir numerosos trabajos que analizan el papel que el tamaño, forma y/ o superficie química juegan en los mecanismos de la captación celular de diferentes tipos de Nps por las células, pocos estudios han observado e identificado sus procesos de excreción y, hasta donde sabemos, ningún trabajo ha tratado/cuantificado la exocitosis de las nanopartículas UpCvs. La **Figura 6.9 n** muestra que las nanopartículas UpCvs@AET son el tipo de nanopartículas con mayor eliminación desde dentro de las células hacia el medio después de 6 h y 24 h de incubación, seguidas de las UpCvs@DMSA y UpCvs@PMA, en buena concordancia con los datos de internalización celular. Las nanopartículas UpCvs@AET podrían ser las más excretadas probablemente debido a la mayor degradación que presentan respecto a las otras cubiertas, tal y como se demostró a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

lo largo de este Capítulo. Así, la reducción de la intensidad de fluorescencia a partir de las imágenes de confocal para las nanopartículas UpCvs@AET podría ser causada por la rápida eliminación de estas Nps desde las células. En resumen, y de forma conjunta, estos resultados sugieren que las propiedades nativas de la superficie de las Nps, que podrían estar asociadas con el tipo y la cantidad de proteína sérica adsorbida *vía* interacciones hidrófobas o electrostáticas, determinan principalmente su destino endocítico o exocítico.

6.4 CONCLUSIÓN

En este trabajo se obtuvieron Nps sobreconversoras de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ de diferentes morfologías (cubos, cilindros, cilindros cortos y esferas) a través de cambios en las razones molares Ln^{3+}: OA. También se obtuvieron nanopartículas UpCvs con diferentes activadores: $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Tm_{0.005}$, $NaGdF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ y $NaYF_4$: $Yb_{0.3}$: $Nd_{0.01}$: $Er_{0.005}$. El cambio en la morfología de las partículas apenas afectó a las bandas de emisión de fluorescencia, mientras que el tipo de activador claramente dio lugar a diferentes espectros de emisión, como cabría esperar. Todas las nanopartículas UpCvs presentaron una estructura cristalina predominante β-hexagonal, pero una fase residual α-cúbica también está presente en diferentes proporciones mínimas. Para posibles aplicaciones biológicas, las Nps esféricas de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ con una razón molar Ln^{3+}: OA de 1:20 se funcionalizaron con cuatro ligandos diferentes: AET, DMSA, PEG y PMA con el fin de proteger las partículas de la degradación en medio fisiológico y, por consiguiente, evitar su potencial toxicidad además de asegurar su estabilidad coloidal. La modificación superficial de las Nps fue adecuada en la mayoría de los casos, observándose una importante degradación de las nanopartículas UpCvs@AET en PSF y, en particular, a concentraciones muy diluidas como se confirmó mediante el elevado incremento de iones F^- en disolución y una gran disminución de la emisión de fluorescencia. Por el contrario, los otros recubrimientos otorgaron mucha mejor protección a las partículas, siguiendo la secuencia UpCvs@PMA > UpCvs@PEG > UpCvs@DMSA.

Por su parte, se observó una degradación mucho menor de las Nps en condiciones básicas y, particularmente, en medio de cultivo celular, en las que las

cubiertas UpCvs@PMA > UpCvs@PEG fueron capaces de proteger completamente a las partículas. Además, se confirmó que la degradación se reguló por la concentración de disolución iónica en equilibrio, que puede controlarse mediante la adición de sales de fluoruro y/o aumentos de la concentración de NPs. Por otro lado, se observó que las Nps de $NaYF_4$: $Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ con diferentes recubrimientos eran razonablemente estables en medio de cultivo DMEM+10 FBS (v/v), probablemente gracias a la formación de una corona proteica alrededor de las Nps, confirmándose no obstante una mejor adecuación de los recubrimientos de PEG y PMA para potenciales aplicaciones biológicas. Por el contrario, las nanopartículas UpCvs@DMSA y, en especial, las de UpCvs@AET, se agregaron en medio ácido PSF probablemente como consecuencia de un proceso de degradación de las Nps mucho más importante.

Las nanopartículas UpCvs se mostraron biocompatibles, con viabilidades por encima del 80% para las dos líneas celulares estudiadas (de cáncer de cérvix humano HeLa, y fibroblastos murinos 3T3 Balb), excepto para las nanopartículas UpCvs@AET y UpCvs@DMSA después de 48 h de incubación y concentraciones de partícula por encima 9 y 145 µg/mL, respectivamente. Las nanopartículas UpCvs se internalizaron dentro de las células, observándose que esta es más rápida para las nanopartículas UpCvs@AET, con un máximo a las 6 h para disminuir después, tal y como se observó por microscopía confocal. Por el contrario, las nanopartículas UpCvs@DMSA y UpCvs@PMA mostraron una internalización más progresiva, mientras que la internalización de las UpCvs@PEG estuvo parcialmente limitada por las propiedades de la cubierta de PEG. Los datos de ICP-MS también confirmaron este perfil de internalización. Las imágenes de TEM mostraron que después de su administración las nanopartículas UpCvs@AET se degradaron mucho más dentro de las células, de acuerdo con los datos de fluorescencia y de disolución iónica, dando lugar a partículas mucho más pequeñas y ampliamente distribuidas a lo largo del citoplasma celular y, principalmente, dentro de vesículas. Además, las Nps con las otras cubiertas también se encontraron presentes dentro de las células, pero mucho más intactas y en la forma de agregados/clústeres dentro del citoplasma celular. Finalmente, también se comprobaron los niveles de eliminación de las UpCvs desde las células, observándose que las nanopartículas UpCvs@AET se

excretaron mucho más, probablemente debido a su mayor degradación respecto a los otros tipos de Nps.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.5 REFERENCIAS

[1] F. Auzel, "Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids," *Chemical Reviews,* vol. 104, no. 1, pp. 139-174, 2004.

[2] K. Zheng, K. Y. Loh, Y. Wang, Q. Chen, J. Fan, T. Jung, S. Hwan, Y. D. Suh and X. Liu, "Recent advances in upconversion nanocrystals: Expanding the kaleidoscopic toolbox for emerging applications," *NanoToday,* vol. 29, p. 100797, 2019.

[3] D. R. G. a. H. U. Güdel, "Design of Luminescent Inorganic Materials: New Photophysical Processes Studied by Optical Spectroscopy," *Accounts of Chemical Research,* vol. 33, no. 4, pp. 235-242, 2000.

[4] K. K.-U. G. H. S. Heer, "Highly Efficient Multicolour Upconversion Emission in Transparent Colloids of Lanthanide-Doped NaYF4 Nanocrystals," *Advanced Materials,* vol. 16, no. 23-24, pp. 2102-2105, 2004.

[5] C. C. L. &. L. Z. Wang, "Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy.," *Biomaterials,* vol. 32, no. 4, pp. 1110-1120, 2011.

[6] F. Z. H. L. S. V. T. R. A. K. N. R. S. &. T. H. J. van De Rijke, "Up-converting phosphor reporters for nucleic acid microarrays.," *Nature biotechnology,* vol. 19, no. 3, pp. 273-276, 2001.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[7] J. Liao, Z. Yang, S. Lai and Y. Yang, "Upconversion Emission Enhancement of NaYF 4 :Yb,Er Nanoparticles by Coupling Silver

Nanoparticle Plasmons and Photonic Crystal Effects," *The Journal of Physical Chemistry C,* vol. 118, no. 31, pp. 17992-17999, 2014.

[8] J. Y. M. &. D. Y. Yao, "Chemistry, biology, and medicine of fluorescent nanomaterials and related systems: new insights into biosensing, bioimaging, genomics, diagnostics, and therapy," *Chemical reviews,* vol. 114, no. 2, pp. 6130-6178, 2014.

[9] C. Wang, H. Tao, L. Cheng and Z. Liu, "Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles," *Biomaterials,* vol. 32, no. 26, pp. 6145-6154, 2011.

[10] S. Mura, J. Nicolas and P. Couvreur, "Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery," *Natrure Materials,* vol. 12, pp. 991-1003, 2013.

[11] R. J. Z. D. J. C. C. H. W. X. S. B. W. M. L. Y. P. Z. J. I. N. A. E. &. X. T. Li, "Enhancing the imaging and biosafety of upconversion nanoparticles through phosphonate coating.," *ACS nano,* vol. 9, no. 3, pp. 3293-3306, 2015.

[12] M. Rieckher, A. Lopes and B. Schumacher, "Chapter 11 - Genome Stability in Caenorhabditis elegans," in *Genome Stability,* Germany, Academic Press, 2016, pp. 163-186.

[13] E. A. Burton, "Chapter 7 - Zebrafish," in *Movement Disorders (Second Edition),* Pittsburgh, PA, USA, Academic Press, 2015, pp. 117-138.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[14] X. Z. J. L. J. &. Z. Y. Zhu, "Recent Progress of Rare-Earth Doped Upconversion Nanoparticles: Synthesis, Optimization, and Applications.," *Advanced science,* vol. 6, no. 22, p. 1901358, 2019.

[15] A. L. T. B. A. R. J. &. C. J. A. Gnach, "Upconverting nanoparticles: assessing the toxicity.," *hemical Society reviews,* vol. 44, no. 6, pp. 1561-1584, 2015.

[16] M. F. &. W. A. Torresan, "ritical Aspects on the Chemical Stability of NaYF4-Based Upconverting Nanoparticles for Biomedical Applications.," *ACS applied bio materials,* vol. 4, no. 2, pp. 1191-1210, 2021.

[17] K. T. K. K. H. &. P. J. S. Rim, "Toxicological evaluations of rare earths and their health impacts to workers: a literature review.," *Safety and health at work,* vol. 4, no. 1, pp. 12-26, 2013.

[18] H. B. G. V. &. C. G. Harvey, "Gadolinium Deposition Disease: A New Risk Management Threat.," *Journal of the American College of Radiology : JACR,* vol. 17, no. 4, pp. 546-550, 2020.

[19] D. P. O. V. J. M. B. &. P.-S. M. Lisjak, "Dissolution Mechanism of Upconverting AYF4:Yb,Tm (A = Na or K) Nanoparticles in Aqueous Media," *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids,* vol. 32, no. 32, pp. 8222-8229, 2016.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

[20] O. Plohl, S. Kralj, B. Majaron, E. Fröhlich, M. Ponikvar-Svet, D. Makovec and D. Lisjak, "Amphiphilic coatings for the protection of

upconverting nanoparticles against dissolution in aqueous media," *Dalton Transactions,* vol. 46, pp. 6975-6984, 2017.

[21] U. L. V. K. J. Š. P. S. O. H. M. J. O. F. P. K. V. Š. L. &. H. D. Kostiv, "A simple neridronate-based surface coating strategy for upconversion nanoparticles: highly colloidally stable 125I-radiolabeled NaYF4:Yb3+/Er3+@PEG nanoparticles for multimodal in vivo tissue imaging.," *Nanoscale,* vol. 9, no. 43, pp. 16680-16688, 2017.

[22] S. Wilhelm, M. Kaiser, C. Würth, J. Heiland, C. Carrillo-Carrion, V. Muhr, O. S. Wolfbeis, W. J. Parak, U. Resch-Genger and T. Hirsch, "Water dispersible upconverting nanoparticles: effects of surface modification on their luminescence and colloidal stability," *Nanoscale,* vol. 7, pp. 1403-1410, 2015.

[23] M. I. R. B. W. S. R. J. Y. Y. &. R.-G. U. Saleh, "Assessing the protective effects of different surface coatings on NaYF4:Yb3+, Er3+ upconverting nanoparticles in buffer and DMEM.," *Scientific reports,* vol. 10, no. 1, p. 19318, 2020.

[24] Y. F. S. L. D. X. J. W. F. W. Z. J. C. S. J. &. Y. C. H. Wang, "Rare-Earth nanoparticles with enhanced upconversion emission and suppressed rare-Earth-ion leakage," *Chemistry,* vol. 18, no. 18, pp. 5558-8864, 2012.

[25] Z. &. Z. Y. Li, "An efficient and user-friendly method for the synthesis of hexagonal-phase NaYF(4):Yb, Er/Tm nanocrystals with controllable shape and upconversion fluorescence.," *Nanotechnology,* vol. 19, no. 34, p. 345606, 2008.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[26] H. S. &. Z. Y. Qian, "Synthesis of hexagonal-phase core-shell NaYF4 nanocrystals with tunable upconversion fluorescence," *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids,* vol. 24, no. 21, pp. 12123-12125, 2008.

[27] S. Yu, R. Cao, J. Li and L. Meng, "Controlled synthesis of NdF3 and NaNdF4 micro- or nanocrystals by one-pot microwave-assisted hydrothermal reaction," *Journal of Fluorine Chemistry,* vol. 178, pp. 286-290, 2015.

[28] S. Z. J. Z. K. Wen, "Advances in highly doped upconversion nanoparticles," *Nature,* vol. 9, p. 2415, 2018.

[29] Z. Y. X. Y. R. W. M. Y. K. H. Z. J. H. W. a. X. X. Xiaofan Zhao, "Controlling the multicolor upconversion luminescence in CaF2 nanocrystals doped with Yb3+, Er3+ and Nd3+ ions under the excitation of a 808 nm laser," *Opt. Mater. Express,* vol. 9, pp. 4578-4587, 2019.

[30] Z. B. Y. L. H. J. a. Z. Q. Song N, "Understanding the Role of Yb3+ in the Nd/Yb Coupled 808-nm-Responsive Upconversion," *Frontiers in Chemistry,* vol. 6, p. 673, 2019.

[31] X. Z. Z. S. C. Y. L. Z. Z. J. X. X. Tian L, "The Upconversion Luminescence of Er3+/Yb3+/Nd3+ Triply-Doped β-NaYF4 Nanocrystals under 808-nm Excitation," *Materials,* vol. 7, no. 11, pp. 7289-7303, 2014.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[32] W. D. S. J. P. Q. L. Y. Liu Y, "Magnetic tuning of upconversion luminescence in lanthanide-doped bifunctional nanocrystals.," *Angewandte Chemie*, vol. 52, no. 16, pp. 4366-4369, 2013.

[33] B. Szefczyk, R. Roszak and S. Roszak, "Structure of the hexagonal NaYF4 phase from first-principles molecular dynamics," *RSC Advances*, vol. 4, pp. 22526-22535, 2014.

[34] C. C. Robinson and J. Fournier, "Co-ordination of Yb3+ in phosphate, silicate, and germanate glasses," *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, vol. 31, no. 5, pp. 895-904, 1970.

[35] A. L. H. P. E. H. N. P. M. L. a. T. S. Satu Lahtinen, "Disintegration of Hexagonal NaYF4:Yb3+,Er3+ Upconverting Nanoparticles in Aqueous Media: The Role of Fluoride in Solubility Equilibrium," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 121, no. 1, pp. 656-665, 2017.

[36] D. Lisjak, O. Plohl, M. Ponikvar-Svet and B. Majaron, "Dissolution of upconverting fluoride nanoparticles in aqueous suspensions," *RSC Advances*, vol. 5, pp. 27393-27397, 2015.

[37] F. H. Y. L. C. Wang, "Simultaneous phase and size control of upconversion nanocrystals through lanthanide doping," *Nature*, vol. 463, pp. 1061-1065, 2010.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[38] O. K. M. K. J. B. B. P.-S. M. W. C. L. D. &. R.-G. U. Plohl, "Optically Detected Degradation of NaYF4:Yb,Tm-Based Upconversion Nanoparticles in Phosphate Buffered Saline Solution.,"

Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, vol. 33, no. 2, pp. 553-560, 2017.

[39] L. E. G. J. A. V. A. N. P. P. S. S. J. G. &. M. P. A. Mackenzie, "The theoretical molecular weight of NaYF4:RE upconversion nanoparticles," *Scientific reports,* vol. 8, no. 1, p. 1106, 2018.

[40] E. W. C. P. C. M. M. &. R.-G. U. Andresen, "Time-resolved luminescence spectroscopy for monitoring the stability and dissolution behaviour of upconverting nanocrystals with different surface coatings.," *Nanoscale,* vol. 12, no. 23, pp. 12589-12601, 2020.

[41] T. H. Sandy F. Himmelstoß, "Long-Term Colloidal and Chemical Stability in Aqueous Media of NaYF4-Type Upconversion Nanoparticles Modified by Ligand-Exchange," in *Part. Part. Syst. Charact.*, 2019, p. 1900235.

[42] E. H. H. H. H. E. M. H. P. A. J. W. J. M. O. H. a. C. d. L. D. Sjoerd Hak, "The Effect of Nanoparticle Polyethylene Glycol Surface Density on Ligand-Directed Tumor Targeting Studied in Vivo by Dual Modality Imaging," *ACS Nano,* vol. 6, no. 6, pp. 5648-5658, 2012.

[43] J. Z. D. J. Li R, "Enhancing the imaging and biosafety of upconversion nanoparticles through phosphonate coating.," *ACS Nano,* vol. 9, no. 3, pp. 3293-3306, 2015.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Capítulo 7

"Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas."

Marie Curie

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo, se han desarrollado varias nanoplataformas basadas en dos tipos de nanopartículas inorgánicas, unas de carácter metálico como son los AuNRs y otras de carácter cerámico dopadas con iones lantánidos (UpCvs), para ser utilizadas como posibles herramientas teragnósticas multimodales y, en particular, que permitan desarrollar/aplicar distintas terapias de forma simultánea (quimioterapia, terapia fotodinámica, fototerapia, y terapia génica) además de una monitorización de la actividad terapéutica por bioimagen médica para el tratamiento del cáncer. Los diferentes nanosistemas construidos se han funcionalizado con diferentes polímeros sintéticos y naturales de cara a evitar su biodegradación, y mejorar su biocompatibilidad, biodisponibilidad y estabilidad coloiidal en medios fisiológicos relevantes.

Por lo que en la PARTE 1 de nuestro trabajo de investigación doctoral se refiere, se han desarrollado tres nanoplataformas híbridas distintas basadas en AuNRs que se funcionalizaron con capas de polímeros como el PSS, la PLL y el HA, mediante la técnica de LbL. En la primera de las nanoplataformas se obtuvo:

I. Un nanosistema terapéutico bimodal coloidalmente estable basado en i) la encapsulación exitosa en la nanoestructura inorgánica y, en particular, en su recubrimiento polimérico de un fármaco antineoplásico aplicado actualmente como terapia de primera línea para tratar diversos tipos de cánceres como es la DOXO; la explotación de las propiedades ópticas en el NIR de los AuNRs para convertirlos en agentes fototérmicos que permitan las tranformación de luz NIR incidente sobre ellos en calor

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

localizado, esto es, generar una terapia fototérmica (AuNRs/PSS/DOXO/PLL/HA).

II. Para ello, se consiguieron sintetizar AuNRs con un máximo del LPSR modificable entre los 700 y 816 nm, y longitud y ancho de Np en el rango de 32-36 nm y 8-12 nm (variación del AR de ca. 2.5 a 4.1), respectivamente, y observándose que no existe una elevada pérdida de eficiencia en la generación de calor fototérmico cuando se producen desplazamientos del LPSR de los AuNRs hacia el azul de hasta 70 nm respecto a la longitud de onda de la fuente CW de luz láser incidente (808 nm).

III. Se logró una funcionalización de la superficie de los AuNRs mediante la metodología LbL mediante la deposición secuencial de capas poliméricas de PSS, DOXO, PLL y HA, siendo la última capa la que otorga a la plataforma la capacidad de direccionamiento activo hacia los receptores CD44 sobreexpresados en diferentes tipos de células tumorales.

IV. La encapsulación del fármaco antineoplásico fue sumamente elevada, de hasta ca. 350 µg con un 70% de eficiencia de encapsulación.

V. La liberación de la DOXO es despreciable en los estadios iniciales de incubación gracias al empaquetamiento compacto de la capa polimérica superficial. La DOXO se libera simultáneamente gracias a la degradación enzimática de la capa de PLL a través de las proteasas fisiológicas y de la irradiación externa con luz NIR aplicada, dando lugar a perfiles de liberación en forma de escalera que permiten un excelente control sobre la difusión/liberación del fármaco desde la nanoplataforma.

VI. El análisis de la capacidad terapéutica multimodal de la nanoplataforma desarrollada demostró que la combinación de las terapias química y fototérmica genera una toxicidad dirigida importante hacia las células malignas gracias a la eficiencia de su internalización gracias a la afinidad por los receptores de membrana CD44 sobreexpresados en este tipo de células tumorales.

VII. Se pudo demostrar que la muerte celular originada por la combinación de ambas terapias es principalmente por apoptosis, lo que sugiere que el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inicio de la muerte celular se debe al efecto tóxico predominante del fármaco soportado adicionalmente por la fototermia localizada.

En la segunda de las nanoplataformas se obtuvo:

I. Un nanosistema terapéutico bimodal basado en i) la encapsulación exitosa en la nanoestructura inorgánica y, en particular, en su recubrimiento polimérico de una sonda fluorescente como la ICG empleada actualmente en la práctica clínica como agente de contraste en tomografía óptica para la visualización de estructurara retinales y coroideas, así como agente generados de ROS; y la explotación de las propiedades ópticas en el NIR de los AuNRs para convertirlos en agentes fototérmicos que permitan las tranformación de luz NIR incidente sobre ellos en calor localizado, esto es, generar una terapia fototérmica. De esta manera, se desarrolló un sistema bimodal que permitiese la aplicación simultánea de terapia PDT+PPTT bajo irradiación lumínica en NIR en condiciones adecuadas (AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA).

II. La estabilidad coloidal de la nanoplataforma obtenida fue adecuada, así como la fotoestabilidad de la sonda fluorescente encaspulada en la misma, lo que debe de permitir una imagen óptica de diagnóstico de las células cancerígenas presentes en el paciente, gracias a la internalización selectiva de la nanoplataforma en estas gracias a su direccionamiento activo.

III. En caso de que sea necesario, se puede controlar su velocidad y perfil de liberación de la ICG, usando tanto estímulos internos, enzimas como la tripsina, que degradan la capa de PLL y externos, la luz NIR gracias a las propiedades ópticas del tinte en sí mismo y de las Nps metálicas).

IV. La generación de ROS obtenida con la plataforma nos permite asegurar una respuesta citotóxica adecuada mediante terapia PDT para aplicaciones contra el cáncer, ya que la eficiencia de producción de ROS obtenida fue muy elevada, tanto en ensayos en tubio de ensayo como *in vitro* en células tumorales.

V. La conversión de luz en calor localizado proporcionada por la nanoplataforma AuNRs/PSS/PLL@ICG/HA fue menor en comparación

con la de AuNRs/PSS/PLL/HA, en la que no se encapsuló ICG. Este comportamiento podría estar originado por la baja sección transversal de absorción de las moléculas fluorescentes comparada con la del núcleo metálico y los efectos competitivos entre la molécula orgánica y la Np metálica en cuanto a la absorción lumínica.

VI. Bajo condiciones adecuadas de iluminación, la aplicación de luz NIR provoca un aumento de la toxicidad celular gracias al efecto simultáneo de la generación de ROS y la producción de calor fototérmico localizado, es decir, PDT y PPTT con carácter sinérgico, volviendo así, a esta nanoplataforma un nanomaterial con efectos potenciales en diagnóstico y terapia contra el cáncer.

Finalmente, en la tercera de las nanoplataformas teragnósticas, se obtuvo:

I. Una funcionalización de los AuNRs mediante la técnica de LbL para dotarlos de un recubrimiento superficial biocompatible formado por polielectrólitos de distinta carga eléctrica (PSS, PLL y HA), el fármaco antineoplásico DOXO, la sonda NIR fluorescente ICG conjugada covalentemente al biopolímero PLL, y cadenas de siRNA (que inhiben el punto de control celular PD-L1) intercaladas en las distintas capas para generar la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/ PLL@ICG/siRNA/HA.

II. La velocidad y perfil de liberación de las diferentes biomoléculas activas pudo controlarse utilizando tanto estímulos internos -proteasas como la tripsina gracias a la degradabilidad enzimática de la PLL, como externos - la luz NIR gracias a las propiedades ópticas de la ICG y los AuNRs, lo que redundaría en una actividad terapéutica más eficaz tanto por la regulación de la concentración terapéutica liberada como por la secuenciación de su aplicación y actividad.

III. La nanoplataforma demostró ser biocompatible y, en presencia de las condiciones de iluminación NIR adecuadas, se obtuvo una importante mejora de la toxicidad celular gracias a la actividad simultánea proporcionadas por el ROS, el calor fototérmico, la acción química de la DOXO y la inhibición de PD-L1 proporcionada por el siRNA,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

alcanzándose prácticamente la inhibición total de la proliferación celular cancerígena.

IV. Se comprobó también que la sobreexpresión de los receptores CD44 en las células HeLa a los que se une con gran afinidad al HA de la capa externa de la nanoplataforma da lugar a un direccionamiento activo, que permite niveles importantes de internalización celular, y permitiendo la liberación de las moléculas bioactivas en el citoplasma celular en contraposición a lo que sucede en las células 3T3 Balb empleadas como control, para las que el nivel de captación celular del nanosistema fue muy reducido.

V. El mecanismo de muerte celular inducido por la nanoplataforma AuNRs/PSS/DOXO/PLL@ICG/siRNA/HA a través de la aplicación simultánea de la terapia multimodal: PDT, quimioterapia, PPTT y silenciamiento génico es mayoritariamente la apoptosis, lo que sugiere que el comienzo de la muerte celular está principalmente regulado por el efecto tóxico del fármaco combinado con la PDT y la acción de silenciamiento génico. En contraste, solo a la temperatura de 37ºC se aprecia una cierta predominancia de la PPTT con la aparición de células necróticas.

VI. La nanoplataforma híbrida proporcionó, una terapia multimodal efectiva simultánea: PDT, PPTT, silenciamiento génico y quimioterapia para el tratamiento de tumores sólidos, consiguiendo su práctica erradicación *in vitro*, dependiendo de las condiciones del medio, por lo que se podr´q obtener una respuesta en estadios más tempranos, y terapia inicial, sin pérdida de tiempos entre la detección y el inicio de un tratamiento, esperando obtener una mejorar el bienestar del paciente y un índice de efectos secundarios reducidos.

En la PARTE 2 de la presente Tesis Doctoral se analizaron diferentes Nps inorgánicas sobreconversoras basadas en lantánidos (UpCvs) de estructura $NaYF_4$:$Yb_{0.18}$:$Er_{0.02}$ con diferentes simetrías (cubos, cilindros, cilindros cortos y esferas), y con diferentes activadores $NaYF_4$:$Yb_{0.18}$:$Tm_{0.005}$, $NaGdF_4$:$Yb_{0.18}$:$Er_{0.02}$ y $NaYF_4$:$Yb_{0.3}$:$Nd_{0.01}$:$Er_{0.005}$, con el objetivo futuro de explotar sus propiedades físicas para crear nuevos nanosistemas capaces de realizar simultáneamente diagnóstico y terapia (teragnóstica) médica o proporcionar capaciad de bioimagen multimodal para

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el diagnóstico temprano de las células tumorales. Se emplearon cuatro ligandos para funcionalizar las UpCvs: AET, DMSA, PEG y PMA con el fin de protegerlas de la degradación en medio fisiológico además de asegurar su estabilidad coloidal.

I. Las UpCVs descritas se obtuvieron mediante la metdología de descomposición térmica asistida por metanol, dando lugar a Nps muy monodispersas, estables en una variedad de disolventes orgánicos y fotoexcitables con una fuente de luz láser de 980 nm.

II. La modificación de la superficie de la Nps se realizó medinte la técnica de intercambio de ligando y fue satisfactoria; sin embargo, la intensidad de la degradación de las UpCvs funcionalizadas en disoluciones acidas y básicas de dichas modificaciones se observó que seguía la siguiente secuencia UpCvs@AET > UpCvs@PMA > UpCvs@PEG > UpCvs@DMSA, esto es, siendo la más inestable la UpCvs@AET. Por otro lado, las UpCvs más favorables para su aplicación en cultivo celular fueron UpCvs@PMA > UpCvs@PEG.

III. Se observó que las UpCvs de $NaYF_4$:$Yb_{0.18}$: $Er_{0.02}$ con diferentes recubrimientos eran razonablemente estables en medio de cultivo DMEM+10 FBS (v/v), probablemente gracias a la formación de la corona proteica alrededor de las Nps, lo que confirmó la mejor adecuación de las cubiertas de PEG y PMA para aplicaciones biológicas.

IV. Las UpCvs presentaron una biocompatibilidad adecuada en de las líneas celulares HeLa y 3T3 Balb; las únicas Nps que presentaron una cierta toxicidad después de 48 h de incubación fueron las UpCvs@AET y las UpCvs@DMSA.

V. La internalización celular de las UpCvs con los diferentes recubrimientos presentó máximos a diferentes tiempos de incubación: la nanoplataforma UpCvs@AET presentó un máximo de captación tras 6 h de incubación, mientras que las NPs de UpCvs@DMSA y UpCvs@PMA lo mostraron a las 24 h. Por el contrario, las UpCvs@PEG internalizaron muy débilmente debido a la capa de PEG que evita en gran medida el reconocimiento celular.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO I: PERMISO DE REPRODUCCIÓN DE FIGURAS

Permiso de figura 1.3.a

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 07, 2022

This Agreement between Miss. Lilia Arellano ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5358140929714
License date	Jul 29, 2022
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Advanced Materials
Licensed Content Title	Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance
Licensed Content Author	E. Hutter, J. H. Fendler
Licensed Content Date	Oct 29, 2004
Licensed Content Volume	16
Licensed Content Issue	19
Licensed Content Pages	22
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	NANOPLATAFORMAS INORGÁNICAS COMO ELEMENTOS ACTIVOS EN SISTEMAS TERAGNÓSTICOS Y DE BIODETECCIÓN
Institution name	Universidad de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Sep 2022
Portions	Figure 1top
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	Miss. Lilia Arellano Calle María Casares 7 3ºB Santiago de Compostela, 15706 Spain Attn: Ms. Lilia Arellano
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	**0.00 USD**
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

07/08/2

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR
  ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Althoug h most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non**Creative Commons Attribution Non-Commercial License**

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below) **Use by commercial "for-profit" organizations**

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Further details can be found on Wiley Online Library http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso de figura 1.3.b

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Aug 07, 2022

This Agreement between Miss. Lilia Arellano ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5358250324509
License date	Jul 29, 2022
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Talanta
Licensed Content Title	Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review
Licensed Content Author	Narges Elahi,Mehdi Kamali,Mohammad Hadi Baghersad
Licensed Content Date	Jul 1, 2018
Licensed Content Volume	184
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	20
Start Page	537
End Page	556
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of translations	1
Title	NANOPLATAFORMAS INORGÁNICAS COMO ELEMENTOS ACTIVOS EN SISTEMAS TERAGNÓSTICOS Y DE BIODETECCIÓN
Institution name	Universidad de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Sep 2022
Portions	Figure 1
Specific Languages	Spanish

Requestor Location Miss. Lilia Arellano

Calle María Casares 7 3ºB

Santiago de Compostela, 15706

Spain

Attn: Ms. Lilia Arellano

Publisher Tax ID GB 494 6272 12

Total **0.00 USD**

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.
5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve yourwork. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk here). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.
6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your futurerequests for Elsevier materials may attract a fee.
7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details providedby you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license atthe end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors,employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to anyother person without publisher's written permission.
12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the caseof publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, checkendorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

5. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation**: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.
16. **Posting licensed content on any Website**: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx or the Elsevier homepage for books at http://www.elsevier.com; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu. Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at http://www.elsevier.com. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.
Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:
Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.
Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.
If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.
Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.
Please refer to Elsevier's posting policy for further information.
18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.
19. **Thesis/Dissertation**: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions
You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.
Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:
Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.
The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.
If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.
Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:
CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by/4.0.
CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0.
CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee. Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access

Article aggregation

- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. **Other Conditions**:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso de figura 1.4.a

CCC Marketplace™

Order Number: 1257435
Order Date: 12 Aug 2022

Payment Information

LiliaArellano
liliaguadalupe.arellano@rai.usc.es
Payment method: Invoice

Billing Address:
Miss Lilia Arellano
Calle María Casares 7 3ºB
Santiago De Compostela, 1 5706
Spain

+34 660182144
alejandrodavid.varela@rai.usc.es

Customer Location:
Miss Lilia Arellano
Calle María Casares 7 3ºB
Santiago De Compostela, 1 5706
Spain

Order Details

1. Nanoscale Horizons

Billing Status: Open

Article: Exploiting the biological windows: current perspectives onuorescent bioprobes emitting above 1000 nm.

Order License ID	1257435-1	Type of use	Republish in a thesis/dissertation
Order detail status	Completed		
ISSN	2055-6764	Publisher	Royal Society of Chemistry
		Portion	Image/photo /illustration
			0,00 EUR
			Republication Permission

LICENSED CONTENT

Publication Title	Nanoscale Horizons	Rightsholder	Royal Society of Chemistry
Article Title	Exploiting the biological windows: current perspectives on uorescent bioprobes emitting above 1000 nm.	Publication Type	e-Journal
		Start Page	168
		End Page	184
		Issue	3
Author/Editor	Guo jia na mi ke xue zhong xin (China),, Royal Society of Chemistry (Great Britain),	Volume	1
Date	01/01/2016		

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		
Image/photo /illustration		Distribution	Worldwide
		Translation	Other translation needs
		Enter languages	Spanish
Print, Electronic		Copies for the disabled?	No
Academic institution		Minor editing privileges?	No
Life of current edition		Incidental promotional use?	No
Up to 499		Currency	EUR
Main product			
NANOPLATAFORMAS INORGÁNICAS COMO ELEMENTOS ACTIVOS EN SISTEMAS TERAGNÓSTICOS Y DE BIODETECCIÓN		Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
		Expected presentation date	2022-09-30
Pablo Taboada Antelo			
Lilia Arellano			
Figure 1		Title of the article/chapter the portion is from	Exploiting the biological windows: current perspectives on uorescent bioprobes emitting above 1000 nm.
Hemmer, Eva; Benayas, Antonio; LÃ©garÃ©, FranÃ§ois; Vetrone, Fiorenzo		Author of portion(s)	Hemmer, Eva; Benayas, Antonio; LÃ©garÃ©, FranÃ§ois; Vetrone, Fiorenzo
168-184		Issue, if republishing an article from a serial	3
		Publication date of portion	2016-05-25

Total Items: 1 Subtotal: 0,00 EUR

REQUEST DETAILS

Portion Type

Number of images / photos / illustrations 1

Format (select all that apply)

Who will republish the content? Duration of Use

Lifetime Unit Quantity

Rights Requested

NEW WORK DETAILS

Title

Instructor name

ADDITIONAL DETAILS

The requesting person / organization to appear on the license

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)

Editor of portion(s)

Volume of serial or 1 monograph

Page or page range of portion

Order Total: 0,00 EUR

Marketplace Order General Terms and Conditions

The following terms and conditions ("General Terms"), together with any applicable Publisher Terms and Conditions, govern User's use of Works pursuant to the Licenses granted by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the applicable Rightsholders of such Works through CCC's applicable Marketplace transactional licensing services (each, a "Service").

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1) Denitions. For purposes of these General Terms, the following denitions apply:

"License" is the licensed use the User obtains via the Marketplace platform in a particular licensing transaction, as set forth in the Order Conrmation.

"Order Conrmation" is the conrmation CCC provides to the User at the conclusion of each Marketplace transaction. "Order Conrmation Terms" are additional terms set forth on specic Order Conrmations not set forth in the General Terms that can include terms applicable to a particular CCC transactional licensing service and/or any Rightsholder-specic terms.

"Rightsholder(s)" are the holders of copyright rights in the Works for which a User obtains licenses via the Marketplace platform, which are displayed on specic Order Conrmations.

"Terms" means the terms and conditions set forth in these General Terms and any additional Order Conrmation Terms collectively.

"User" or "you" is the person or entity making the use granted under the relevant License. Where the person accepting the Terms on behalf of a User is a freelancer or other third party who the User authorized to accept the General Terms on the User's behalf, such person shall be deemed jointly a User for purposes of such Terms.

"Work(s)" are the copyright protected works described in relevant Order Conrmations.

2) Description of Service. CCC's Marketplace enables Users to obtain Licenses to use one or more Works in accordance with all relevant Terms. CCC grants Licenses as an agent on behalf of the copyright rightsholder identied in the relevant Order Conrmation.

3) Applicability of Terms. The Terms govern User's use of Works in connection with the relevant License. In the event of any conict between General Terms and Order Conrmation Terms, the latter shall govern. User acknowledges that Rightsholders have complete discretion whether to grant any permission, and whether to place any limitations on any grant, and that CCC has no right to supersede or to modify any such discretionary act by a Rightsholder.

4) Representations; Acceptance. By using the Service, User represents and warrants that User has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all Terms.

5) Scope of License; Limitations and Obligations. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The License provides only those rights expressly set forth in the terms and conveys no other rights in any Works

6) General Payment Terms. User may pay at time of checkout by credit card or choose to be invoiced. If the User chooses to be invoiced, the User shall: (i) remit payments in the manner identied on specic invoices, (ii) unless otherwise specically stated in an Order Conrmation or separate written agreement, Users shall remit payments upon receipt of the relevant invoice from CCC, either by delivery or notication of availability of the invoice via the Marketplace platform, and (iii) if the User does not pay the invoice within 30 days of receipt, the User may incur a service charge of 1.5% per month or the maximum rate allowed by applicable law, whichever is less. While User may exercise the rights in the License immediately upon receiving the Order Conrmation, the License is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if CCC does not receive complete payment on a timely basis.

7) General Limits on Use. Unless otherwise provided in the Order Conrmation, any grant of rights to User (i) involves only the rights set forth in the Terms and does not include subsequent or additional uses, (ii) is nonexclusive and non-transferable, and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Terms. Upon completion of the licensed use as set forth in the Order Conrmation, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Conrmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit, or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

2) Third Party Materials. In the event that the material for which a License is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) that are identied in such material as having been used by permission (or a similar indicator), User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Servic e, if available, or otherwise) for any of such third party materials; without a separate license, User may not use such third party materials via the License.

3) Copyright Notice. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any License granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Conrmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Used with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc." Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either on a cover page or in another location that any person, upon gaining access to the material which is the subject of a permission, shall see, or in the case of republication Licenses, immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specied in the Order Conrmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specied.

4) Indemnity. User hereby indemnies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs, and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein and in the Order Conrmation, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy, or other tangible or intangible property.

5) Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL, OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OR BOTH OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for the relevant License. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, aliates, successors, and assigns.

6) Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS." CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS, OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

7) Eect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the License set forth in the Order Conrmation and/or the Terms, shall be a material breach of such License. Any breach not cured within 10 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such License without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

8) Additional Terms for Specic Products and Services. If a User is making one of the uses described in this Section 14, the additional terms and conditions apply:

a) Print Uses of Academic Course Content and Materials (photocopies for academic coursepacks or classroom handouts). For photocopies for academic coursepacks or classroom handouts the following additional terms apply:

i) The copies and anthologies created under this License may be made and assembled by faculty membersindividually or at their request by on-campus bookstores or copy centers, or by o-campus copy shops and other similar entities.

ii) No License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identicalcopy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied) (ii) permit "publishing ventures" where any particular anthology would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any Publisher Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the OrderConrmation arising from data provided by User), any use authorized under the academic pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection ofessays, poems or articles;

C) use is limited to no more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or otherperiodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular anthology, whether photocopied or electronic, at morethan one institution of learning;

E) in the case of a photocopy permission, no materials may be entered into electronic memory byUser except in order to produce an identical copy of a Work before or during the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted. In the event that User shall choose to retain materials that are the subject of a photocopy permission in electronic memory for purposes of producing identical copies more than one day after such retention (but still within the scope of any permission granted), User must notify CCC of such fact in the applicable permission request and such retention shall constitute one copy actually sold for purposes of calculating permission fees due; and

F) any permission granted shall expire at the end of the class. No permission granted shall in any wayinclude any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied).

iv) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the academic pay-per-use Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sucient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any photocopies sold or by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this License for any reason.

b) Digital Pay-Per-Uses of Academic Course Content and Materials (e-coursepacks, electronic reserves, learning management systems, academic institution intranets). For uses in e-coursepacks, posts in electronic reserves, posts in learning management systems, or posts on academic institution intranets, the following additional terms apply:

i) The pay-per-uses subject to this Section 14(b) include:

A) Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for text-based content, which grants authorizations to import requested material in electronic format, and allows electronic access to this material to members of a designated college or university class, under the direction of an instructor designated by the college or university, accessible only under appropriate electronic controls (e.g., password);

A) Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for material consisting of photographs or other still images not embedded in text, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorization: to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above, including any necessary resizing, reformatting or modication of the resolution of such requested material (provided that such modication does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material, and provided that the resulting modied content is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Conrmation and the Terms), but not including any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material;

B) Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks or other academic distribution for audiovisual content, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorizations: (i) to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above; (ii) to display and perform the requested material to such members of such class in the physical classroom or remotely by means of streaming media or other video formats; and (iii) to "clip" or reformat the requested material for purposes of time or content management or ease of delivery, provided that such “clipping” or reformatting does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Conrmation and the Terms. Unless expressly set forth in the relevant Order Conformation, the License does not authorize any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material.

ii) Unless expressly set forth in the relevant Order Conrmation, no License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied or, in the case of Works subject to Sections 14(b)(1)(B) or (C) above, as described in such Sections) (ii) permit "publishing ventures" where any particular course materials would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any further limitations determined in the Rightsholder Terms (and notwithstanding anyapparent contradiction in the Order Conrmation arising from data provided by User), any use authorized under the electronic course content pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection ofessays, poems or articles;

C) use is limited to not more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or otherperiodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular materials, whether photocopied or electronic, at morethan one institution of learning;

E) electronic access to material which is the subject of an electronic-use permission must be limited bymeans of electronic password, student identication or other control permitting access solely to students and instructors in the class;

F) User must ensure (through use of an electronic cover page or other appropriate means) that anyperson, upon gaining electronic access to the material, which is the subject of a permission, shall see:

- a proper copyright notice, identifying the Rightsholder in whose name CCC has granted permission,
- a statement to the eect that such copy was made pursuant to permission,
- a statement identifying the class to which the material applies and notifying the reader that the material has been made available electronically solely for use in the class, and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

a statement to the eect that the material may not be further distributed to any person outside the class, whether by copying or by transmission and whether electronically or in paper form, and User must also ensure that such cover page or other means will print out in the event that the person accessing the material chooses to print out the material or any part thereof.

A) any permission granted shall expire at the end of the class and, absent some other form ofauthorization, User is thereupon required to delete the applicable material from any electronic storage or to block electronic access to the applicable material.

ii)Uses of separate portions of a Work, even if they are to be included in the same course material or thesame university or college class, require separate permissions under the electronic course content payper-use Service. Unless otherwise provided in the Order Conrmation, any grant of rights to User is limited to use completed no later than the end of the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted.

iii) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the electronic course contentService, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sucient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any electronic copies used by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this license for any reason.

c) Pay-Per-Use Permissions for Certain Reproductions (Academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting) (Non-academic internal/external business uses and commercial document delivery). The License expressly excludes the uses listed in Section (c)(i)-(v) below (which must be subject to separate license from the applicable Rightsholder) for: academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting; and non-academic internal/external business uses and commercial document delivery.

i) electronic storage of any reproduction (whether in plain-text, PDF, or any other format) other than on a transitory basis; ii) the input of Works or reproductions thereof into any computerized database; iii) reproduction of an entire Work (cover-to-cover copying) except where the Work is a single article; iv) reproduction for resale to anyone other than a specic customer of User;

v) republication in any dierent form. Please obtain authorizations for these uses through other CCC services or directly from the rightsholder.

Any license granted is further limited as set forth in any restrictions included in the Order Conrmation and/or in these Term s.

d) Electronic Reproductions in Online Environments (Non-Academic-email, intranet, internet and extranet). For "electronic reproductions", which generally includes e-mail use (including instant messaging or other electronic transmission to a dened group of recipients) or posting on an intranet, extranet or Intranet site (including any display or performance incidental thereto), the following additional terms apply:

i) Unless otherwise set forth in the Order Conrmation, the License is limited to use completed within 30 days for any use on the Internet, 60 days for any use on an intranet or extranet and one year for any other use, all as measured from the "republication date" as identied in the Order Conrmation, if any, and otherwise from the date of the Order Conrmation.

User may not make or permit any alterations to the Work, unless expressly set forth in the OrderConrmation (after request by User and approval by Rightsholder); provided, however, that a Work consisting of photographs or other still images not embedded in text may, if necessary, be resized, reformatted or have its resolution modied without additional express permission, and a Work consisting of audiovisual content may, if necessary, be "clipped" or

i) reformatted for purposes of time or content management or ease of delivery (provided that any such resizing, reformatting, resolution modication or “clipping” does not alter the underlying editorial content or meaning of the Work used, and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular License described in the Order Conrmation and the Terms.

15) Miscellaneous.

a) User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to theTerms, and that Rightsholder may make changes or additions to the Rightsholder Terms. Such updated Terms will replace the prior terms and conditions in the order workow and shall be eective as to any subsequent Licenses but shall not apply to Licenses already granted and paid for under a prior set of terms.

b) Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, ava ilableonline at www.copyright.com/about/privacy-policy/.

c) The License is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether anatural person or an organization of any kind) the License or any rights granted thereunder; provided, however, that, where applicable, User may assign such License in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of Us er's rights in any new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

d) No amendment or waiver of any Terms is binding unless set forth in writing and signed by the appropriateparties, including, where applicable, the Rightsholder. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by or on behalf of the User or its principals, employees, agents or aliates and purporting to govern or otherwise relate to the License described in the Order Conrmation, which terms are in any way inconsistent with any Terms set forth in the Order Conrmation, and/or in CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Conrmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Conrmation or in a separate instrument.

e) The License described in the Order Conrmation shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding ari sing out of, in connection with, or related to such License shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Conrmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso de figura 1.4 b

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 07, 2022

This Agreement between Miss. Lilia Arellano ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5358141227940
License date	Jul 29, 2022
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	CA: A Cancer Journal for Clinicians
Licensed Content Title	Photodynamic therapy of cancer: An update
Licensed Content Author	Jakub Golab, Brian C. Wilson, Jacques Piette, et al
Licensed Content Date	May 26, 2011
Licensed Content Volume	61
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	32
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	NANOPLATAFORMAS INORGÁNICAS COMO ELEMENTOS ACTIVOS EN SISTEMAS TERAGNÓSTICOS Y DE BIODETECCIÓN
Institution name	Universidad de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Sep 2022
Portions	Figure 2
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	Miss. Lilia Arellano Calle María Casares 7 3ºB Santiago de Compostela, 15706 Spain Attn: Ms. Lilia Arellano
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	**0.00 USD**
Terms and Conditions	

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sublicensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR
  ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Althoug h most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non**Creative Commons Attribution Non-Commercial License**

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below) **Use by commercial "for-profit" organizations**

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promo tional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Further details can be found on Wiley Online Library http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

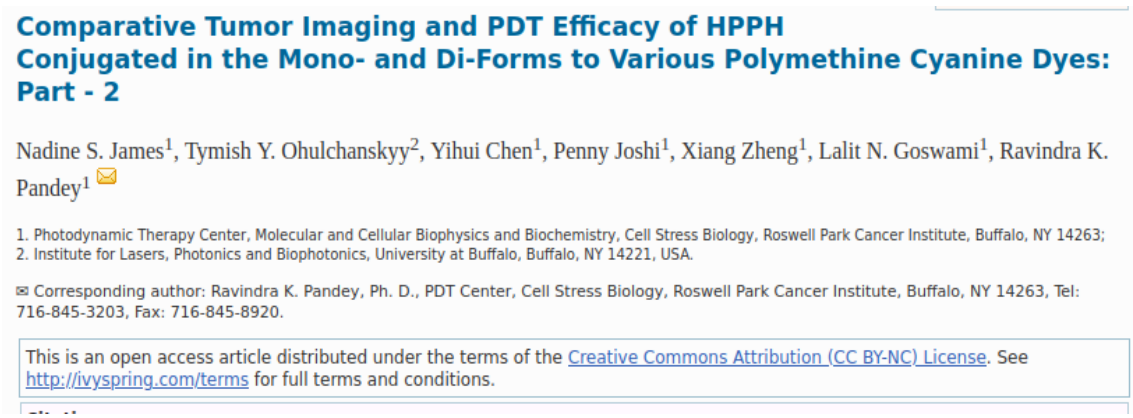
Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso de figura 1.6



Comparative Tumor Imaging and PDT Efficacy of HPPH Conjugated in the Mono- and Di-Forms to Various Polymethine Cyanine Dyes: Part - 2

Nadine S. James[1], Tymish Y. Ohulchanskyy[2], Yihui Chen[1], Penny Joshi[1], Xiang Zheng[1], Lalit N. Goswami[1], Ravindra K. Pandey[1]

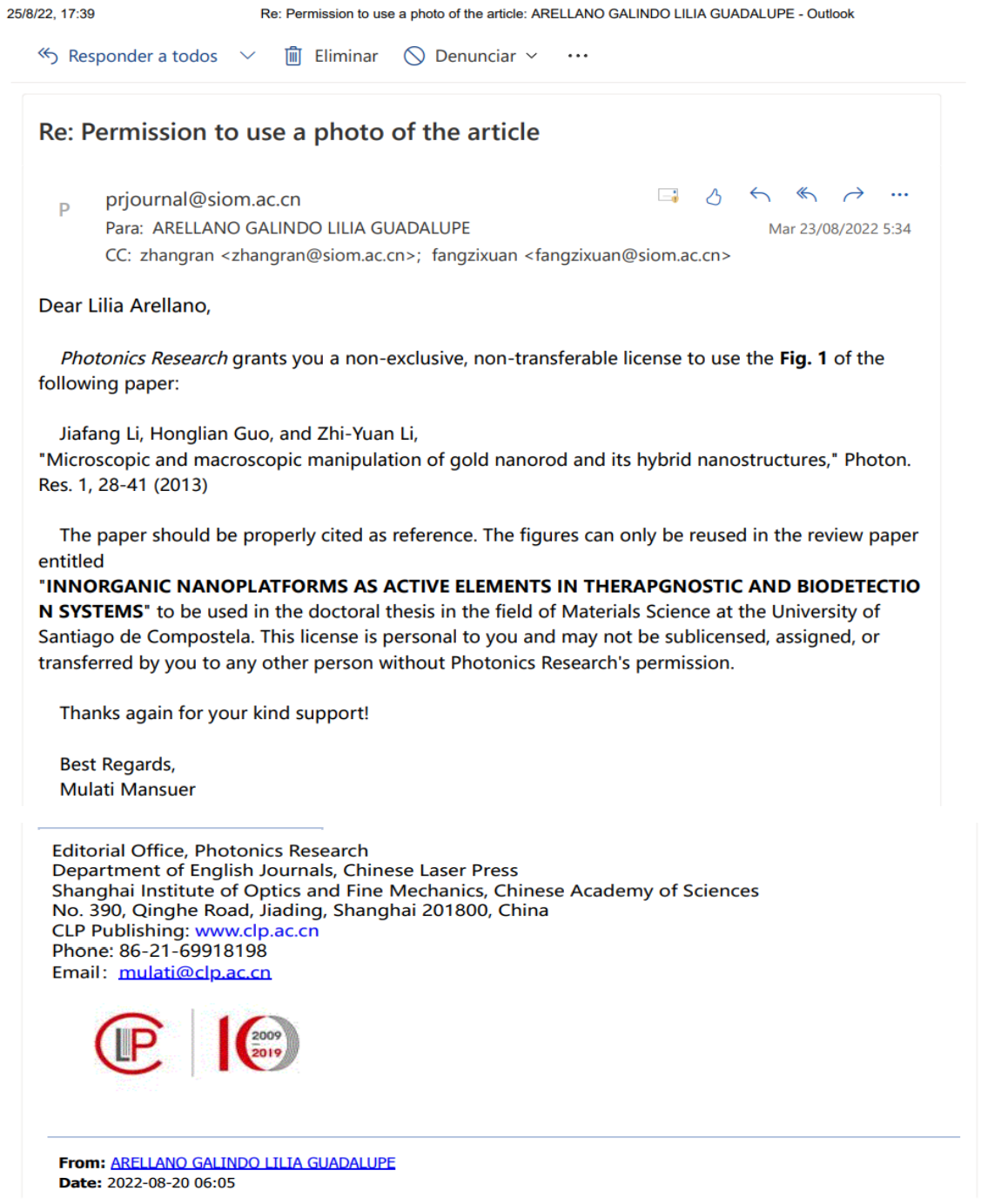
1. Photodynamic Therapy Center, Molecular and Cellular Biophysics and Biochemistry, Cell Stress Biology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY 14263;
2. Institute for Lasers, Photonics and Biophotonics, University at Buffalo, Buffalo, NY 14221, USA.

✉ Corresponding author: Ravindra K. Pandey, Ph. D., PDT Center, Cell Stress Biology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY 14263, Tel: 716-845-3203, Fax: 716-845-8920.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC) License. See http://ivyspring.com/terms for full terms and conditions.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso de figura 1.7 a y b



25/8/22, 17:39 Re: Permission to use a photo of the article: ARELLANO GALINDO LILIA GUADALUPE - Outlook

Responder a todos | Eliminar | Denunciar | ...

Re: Permission to use a photo of the article

prjournal@siom.ac.cn

Para: ARELLANO GALINDO LILIA GUADALUPE

Mar 23/08/2022 5:34

CC: zhangran <zhangran@siom.ac.cn>; fangzixuan <fangzixuan@siom.ac.cn>

Dear Lilia Arellano,

Photonics Research grants you a non-exclusive, non-transferable license to use the **Fig. 1** of the following paper:

Jiafang Li, Honglian Guo, and Zhi-Yuan Li,
"Microscopic and macroscopic manipulation of gold nanorod and its hybrid nanostructures," Photon. Res. 1, 28-41 (2013)

The paper should be properly cited as reference. The figures can only be reused in the review paper entitled
"**INNORGANIC NANOPLATFORMS AS ACTIVE ELEMENTS IN THERAPGNOSTIC AND BIODETECTIO N SYSTEMS**" to be used in the doctoral thesis in the field of Materials Science at the University of Santiago de Compostela. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without Photonics Research's permission.

Thanks again for your kind support!

Best Regards,
Mulati Mansuer

Editorial Office, Photonics Research
Department of English Journals, Chinese Laser Press
Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences
No. 390, Qinghe Road, Jiading, Shanghai 201800, China
CLP Publishing: www.clp.ac.cn
Phone: 86-21-69918198
Email: mulati@clp.ac.cn

From: ARELLANO GALINDO LILIA GUADALUPE
Date: 2022-08-20 06:05

about:blank 1/1

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso de figura 1.8

CCC Marketplace™

Order Number: 1257434
Order Date: 12 Aug 2022

Payment Information

LiliaArellano liliaguadalupe.arellano@rai.usc.es Payment method: Invoice	Billing Address: Miss Lilia Arellano Calle María Casares 7 3ºB Santiago De Compostela, 1 5706 Spain +34 660182144 alejandrodavid.varela@rai.usc.es	Customer Location: Miss Lilia Arellano Calle María Casares 7 3ºB Santiago De Compostela, 1 5706 Spain

Order Details

1. Chemical Society reviews

Billing Status: Open

Article: Gold nanorods and their plasmonic properties.

Order License ID	1257434-1	Type of use	Republish in a thesis/dissertation
Order detail status	Completed		
ISSN	1460-4744	Publisher	ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY
		Portion	Image/photo /illustration
			0,00 EUR
			Republication Permission

LICENSED CONTENT

Publication Title	Chemical Society reviews	Publication Type	e-Journal
		Start Page	2679
Article Title	Gold nanorods and their plasmonic properties.	End Page	2724
		Issue	7
Author/Editor	Royal Society of Chemistry (Great Britain)	Volume	42
		URL	http://www.rsc.org/csr
Date	01/01/1972		
Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

REQUEST DETAILS

Rightsholder	Royal Society of Chemistry	
Image/photo /illustration	Distribution	Worldwide
	Translation	Other translation needs
	Enter languages	Spanish
Print, Electronic	Copies for the disabled?	No
Academic institution	Minor editing privileges?	No
Life of current edition	Incidental promotional use?	No
Up to 499	Currency	EUR
Main product		
NANOPLATAFORMAS INORGÁNICAS COMO ELEMENTOS ACTIVOS EN SISTEMAS TERAGNÓSTICOS Y DE BIODETECCIÓN	Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
	Expected presentation date	2022-09-30
Pablo Taboada Antelo		
Lilia Arellano		
Figure 1	Title of the article/chapter the portion is from	Gold nanorods and their plasmonic properties.
Chen, Huanjun; Shao, Lei; Li, Qian; Wang, Jianfang	Author of portion(s)	Chen, Huanjun; Shao, Lei; Li, Qian; Wang, Jianfang
	Issue, if republishing an article from a serial	7
2679-2724	Publication date of portion	2013-04-07

Subtotal:	0,00 EUR
Order Total:	0,00 EUR

Marketplace Order General Terms and Conditions

The following terms and conditions ("General Terms"), together with any applicable Publisher Terms and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Portion Type

Number of images / photos / illustrations 1

Format (select all that apply)

Who will republish the content? Duration of Use

Lifetime Unit Quantity

Rights Requested

NEW WORK DETAILS

Title

Instructor name

ADDITIONAL DETAILS

The requesting person / organization to appear on the license

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)

Editor of portion(s)

Volume of serial or 42 monograph

Page or page range of portion

Total Items: 1

Conditions, govern User's use of Works pursuant to the Licenses granted by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the applicable Rightsholders of such Works through CCC's applicable Marketplace transactional licensing services (each, a "Service").

1) Denitions. For purposes of these General Terms, the following denitions apply:

"License" is the licensed use the User obtains via the Marketplace platform in a particular licensing transaction, as set forth in the Order Conrmation.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

"Order Conrmation" is the conrmation CCC provides to the User at the conclusion of each Marketplace transaction. "Order Conrmation Terms" are additional terms set forth on specic Order Conrmations not set forth in the General Terms that can incl ude terms applicable to a particular CCC transactional licensing service and/or any Rightsholder-specic terms.

"Rightsholder(s)" are the holders of copyright rights in the Works for which a User obtains licenses via the Marketplace plat form, which are displayed on specic Order Conrmations.

"Terms" means the terms and conditions set forth in these General Terms and any additional Order Conrmation Terms collectivel y.

"User" or "you" is the person or entity making the use granted under the relevant License. Where the person accepting the Ter ms on behalf of a User is a freelancer or other third party who the User authorized to accept the General Terms on the User's be half, such person shall be deemed jointly a User for purposes of such Terms.

"Work(s)" are the copyright protected works described in relevant Order Conrmations.

2) Description of Service. CCC's Marketplace enables Users to obtain Licenses to use one or more Works in accordance with all relevant Terms. CCC grants Licenses as an agent on behalf of the copyright rightsholder identied in the relevant Order Conrmation.

3) Applicability of Terms. The Terms govern User's use of Works in connection with the relevant Licen se. In the event of any conict between General Terms and Order Conrmation Terms, the latter shall govern. User acknowledges that Rightsholders have complete discretion whether to grant any permission, and whether to place any limitations on any grant, and that CCC has no right to supersede or to modify any such discretionary act by a Rightsholder.

4) Representations; Acceptance. By using the Service, User represents and warrants that User has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all Terms.

5) Scope of License; Limitations and Obligations. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The License provides only those rights expressly set forth in the terms and conveys no other rights in any Works

6) General Payment Terms. User may pay at time of checkout by credit card or choose to be invoiced. If the User chooses to be invoiced, the User shall: (i) remit payments in the manner identied on specic invoices, (ii) unless otherwise specically stated in an Order Conrmation or separate written agreement, Users shall remit payments upon receipt of the relevant invoice from CCC, either by delivery or notication of availability of the invoice via the Marketplace platform, a nd (iii) if the User does not pay the invoice within 30 days of receipt, the User may incur a service charge of 1.5% per month or the maximum rate allowed by applicable law, whichever is less. While User may exercise the rights in the License immediately upon receiving the Order Conrmation, the License is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if CCC does not receiv e complete payment on a timely basis.

7) General Limits on Use. Unless otherwise provided in the Order Conrmation, any grant of rights to User (i) involves only the rights set forth in the Terms and does not include subsequent or additional uses, (ii) is nonexclusive and non-transferable, and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Terms. Upon completion of the licensed use as set forth in the Order Conrmation, User shall eith er secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work. User ma y only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Conrmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publici ty, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit, or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any re asonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

Third Party Materials. In the event that the material for which a License is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materi als) that are identied in such material as having been used by permission (or a similar indicator), User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service, if

2) available, or otherwise) for any of such third party materials; without a separate license, User may not use such third party materials via the License.

3) Copyright Notice. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any License granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Conrmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Used with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc." Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either on a cover page or in another location that any person, upon gaining access to the material which is the subject of a permission, shall see, or in the case of republication Licenses, immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specied in the Order Conrmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specied.

4) Indemnity. User hereby indemnies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs, and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein and in the Order Conrmation, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy, or other tangible or intangible property.

5) Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL, OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OR BOTH OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for the relevant License. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents , aliates, successors, and assigns.

6) Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS." CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS, OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

7) Eect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the License set forth in the Order Conrmation and/or the Terms, shall be a material breach of such License. Any breach not cured within 10 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such License without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

8) Additional Terms for Specic Products and Services. If a User is making one of the uses described in this Section 14, the additional terms and conditions apply:

a) Print Uses of Academic Course Content and Materials (photocopies for academic coursepacks or classroom handouts). For photocopies for academic coursepacks or classroom handouts the following additional terms apply:

i) The copies and anthologies created under this License may be made and assembled by faculty membersindividually or at their request by on-campus bookstores or copy centers, or by o-campus copy shops and other similar entities.

i) No License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identicalcopy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immedia tely preceding or following the entire portion of the Work copied) (ii) permit "publishing ventures" where any particular anthology would be systematically marketed at multiple institutions.

ii) Subject to any Publisher Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the OrderConrmation arising from data provided by User), any use authorized under the academic pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identier as assigned by the ins titution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection ofessays, poems or articles;

C) use is limited to no more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or otherperiodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular anthology, whether photocopied or electronic, at morethan one institution of learning;

E) in the case of a photocopy permission, no materials may be entered into electronic memory byUser except in order to produce an identical copy of a Work before or during the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted. In the event that User shall choose to retain materials that are the subject of a photocopy permission in electronic memory for purposes of producing identical copies more than one day after such retention (but still within the scope of any permission granted), User must notify CCC of such fact in the applicable permission request and such retention shall constitute one copy actually sold for purposes of calculating permission fees due; and

F) any permission granted shall expire at the end of the class. No permission granted shall in any wayinclude any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied).

iii) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the academic pay-per-useService, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sucient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any photocopies sold or by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this License for any reason.

b) Digital Pay-Per-Uses of Academic Course Content and Materials (e-coursepacks, electronic reserves, learning management systems, academic institution intranets). For uses in e-coursepacks, posts in electronic reserves, posts in learning management systems, or posts on academic institution intranets, the following additional terms apply:

i) The pay-per-uses subject to this Section 14(b) include:

A) Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for text-based content, which grants authorizations to import requested material in electronic format, and allows electronic access to this material to members of a designated college or university class, under the direction of an instructor designated by the college or university, accessible only under appropriate electronic controls (e.g., password);

Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for material consisting of photographs or other still images not embedded in text, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorization: to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above, inclu ding any necessary resizing, reformatting or modication of the resolution of such

A) requested material (provided that such modication does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material, and provided that the resulting modied content is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Conrmation and the Terms), but not including any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material;

B) Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks or other academic distribution for audiovisual content, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorizations: (i) to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above; (ii) to display and perform the requested material to such members of such class in the physical classroom or remotely by means of streaming media or other video formats; and (iii) to "clip" or reformat the requested material for purposes of time or content management or ease of delivery, provided that such “clipping” or reformatting does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Conrmation and the Terms. Unless expressly set forth in the relevant Order Conformation, the License does not authorize any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material.

ii) Unless expressly set forth in the relevant Order Conrmation, no License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied or, in the case of Works subject to Sections 14(b)(1)(B) or (C) above, as described in such Sections) (ii) permit "publishing ventures" where any particular course materials would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any further limitations determined in the Rightsholder Terms (and notwithstanding anyapparent contradiction in the Order Conrmation arising from data provided by User), any use authorized under the electronic course content pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection ofessays, poems or articles;

C) use is limited to not more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or otherperiodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular materials, whether photocopied or electronic, at morethan one institution of learning;

E) electronic access to material which is the subject of an electronic-use permission must be limited bymeans of electronic password, student identication or other control permitting access solely to students and instructors in the class;

F) User must ensure (through use of an electronic cover page or other appropriate means) that anyperson, upon gaining electronic access to the material, which is the subject of a permission, shall see:

- a proper copyright notice, identifying the Rightsholder in whose name CCC has granted permission,
- a statement to the eect that such copy was made pursuant to permission,
- a statement identifying the class to which the material applies and notifying the reader that the material has been made available electronically solely for use in the class, and
- a statement to the eect that the material may not be further distributed to any person outside the class, whether by copying or by transmission and whether electronically or in paper form, and User must also ensure that such cover page or other means will print out in the event that the person accessing the material chooses to print out the material or any part thereof.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A) any permission granted shall expire at the end of the class and, absent some other form ofauthorization, User is thereupon required to delete the applicable material from any electronic storage or to block electronic access to the applicable material.

ii) Uses of separate portions of a Work, even if they are to be included in the same course material or thesame university or college class, require separate permissions under the electronic course content payper-use Service. Unless otherwise provided in the Order Conrmation, any grant of rights to User is limited to use completed no later than the end of the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted.

iii) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the electronic course contentService, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sucient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any electronic copies used by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this license for any reason.

c) Pay-Per-Use Permissions for Certain Reproductions (Academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting) (Non-academic internal/external business uses and commercial document delivery). The License expressly excludes the uses listed in Section (c)(i)-(v) below (which must be subject to separate license from the applicable Rightsholder) for: academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting; and non-academic internal/external business uses and commercial document delivery.

i) electronic storage of any reproduction (whether in plain-text, PDF, or any other format) other than on atransitory basis;

ii) the input of Works or reproductions thereof into any computerized database;iii) reproduction of an entire

Work (cover-to-cover copying) except where the Work is a single article; iv) reproduction for resale to anyone other

than a specic customer of User;

v) republication in any dierent form. Please obtain authorizations for these uses through other CCC services or directly from the rightsholder.

Any license granted is further limited as set forth in any restrictions included in the Order Conrmation and/or in these Terms.

d) Electronic Reproductions in Online Environments (Non-Academic-email, intranet, internet and extranet). For "electronic reproductions", which generally includes e-mail use (including instant messaging or other electronic transmission to a dened group of recipients) or posting on an intranet, extranet or Intranet site (including any display or performance incidental thereto), the following additional terms apply:

i) Unless otherwise set forth in the Order Conrmation, the License is limited to use completed within 30 days for any use on the Internet, 60 days for any use on an intranet or extranet and one year for any other use, all as measured from the "republication date" as identied in the Order Conrmation, if any, and otherwise from the date of the Order Conrmation.

User may not make or permit any alterations to the Work, unless expressly set forth in the OrderConrmation (after request by User and approval by Rightsholder); provided, however, that a Work consisting of photographs or other still images not embedded in text may, if necessary, be resized, reformatted or have its resolution modied without additional express permission, and a Work consisting of audiovisual content may, if necessary, be "clipped" or reformatted for purposes of time or content management or ease of delivery (provided that any such resizing, reformatting, resolution modication or “clipping” does not alter the underlying editorial content or meaning of the Work

i) used, and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular License described in the Order Conrmation and the Terms.

15) Miscellaneous.

a) User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to theTerms, and that Rightsholder may make changes or additions to the Rightsholder Terms. Such updated Terms will replace the prior terms and conditions in the order workow and shall be eective as to any subsequent Licenses but shall not apply to Licenses already granted and paid for under a prior set of terms.

b) Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, availableonline at www.copyright.com/about/privacy-policy/.

c) The License is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether anatural person or an organization of any kind) the License or any rights granted thereunder; provided, however, that, where applicable, User may assign such License in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in any new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

d) No amendment or waiver of any Terms is binding unless set forth in writing and signed by the appropriateparties, including, where applicable, the Rightsholder. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by or on behalf of the User or its principals, employees, agents or aliates and purporting to govern or otherwise relate to the License described in the Order Conrmation, which terms are in any way inconsistent with any Terms set forth in the Order Conrmation, and/or in CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Conrmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Conrmation or in a separate instrument.

e) The License described in the Order Conrmation shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such License shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state co urt located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Conrmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso de figura 1.10 y 1.12

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Aug 07, 2022

This Agreement between Miss. Lilia Arellano ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5358250623900
License date	Jul 29, 2022
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Coordination Chemistry Reviews
Licensed Content Title	Functionalized gold nanorods for nanomedicine: Past, present and future
Licensed Content Author	Jie Zhou,Zhonglin Cao,Nishtha Panwar,Rui Hu,Xiaomei Wang,Junle Qu,Swee Chuan Tjin,Gaixia Xu,Ken-Tye Yong
Licensed Content Date	Dec 1, 2017
Licensed Content Volume	352
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	52
Start Page	15
End Page	66
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	2
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of translations	1
Title	NANOPLATAFORMAS INORGÁNICAS COMO ELEMENTOS ACTIVOS EN SISTEMAS TERAGNÓSTICOS Y DE BIODETECCIÓN
Institution name	Universidad de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Sep 2022
Portions	Figure 6, Figure 7,
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	Miss. Lilia Arellano Calle María Casares 7 3ºB Santiago de Compostela, 15706 Spain Attn: Ms. Lilia Arellano
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	**0.00 USD**
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensin g transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account a nd that are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicat ed.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:
"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."
4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.
5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve yourwork. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk here). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.
6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your futurerequests for Elsevier materials may attract a fee.
7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details providedby you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Bill ing and Payment terms and conditions.
8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license atthe end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respectiv e officers, directors,employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other th an as specifically authorized pursuant to this license.
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to anyother person without publisher's written permission.
12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the caseof publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, checkendorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or C CC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.
14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their solediscretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation**: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

15. **Posting licensed content on any Website**: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx or the Elsevier homepage for books at http://www.elsevier.com; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu. Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at http://www.elsevier.com . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

16. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.
Please refer to Elsevier's posting policy for further information.
18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.
19. **Thesis/Dissertation**: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions
You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.
Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:
Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.
The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.
If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.
Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:
CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by/4.0.
CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0.
CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee. Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

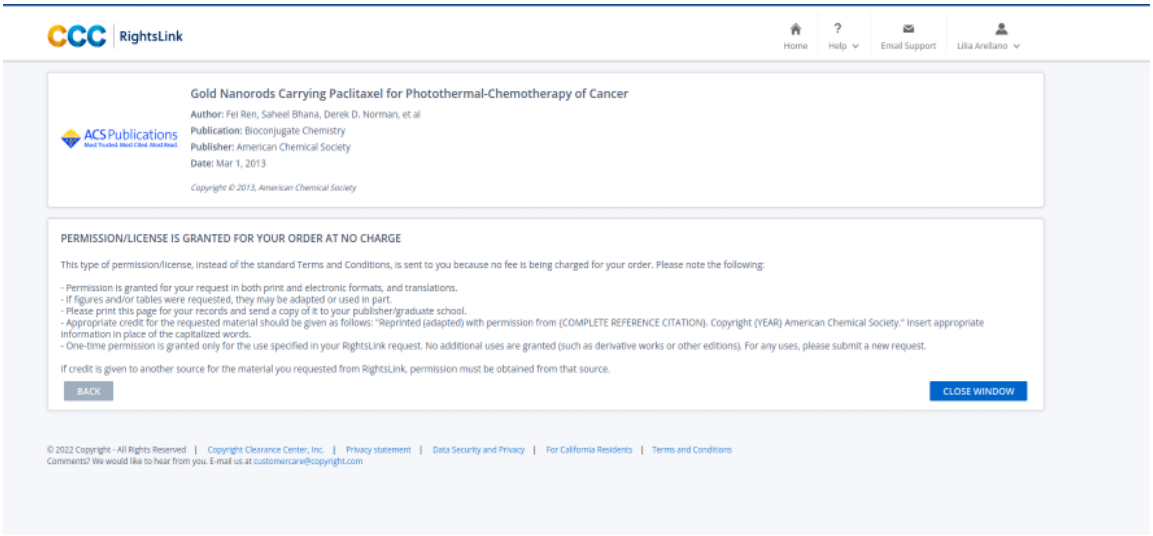
Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. **Other Conditions**:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Permiso de figura 1.12 b



CCC RightsLink

Home | Help | Email Support | Lilia Arellano

Gold Nanorods Carrying Paclitaxel for Photothermal-Chemotherapy of Cancer

Author: Fei Ren, Saheel Bhana, Derek D. Norman, et al
Publication: Bioconjugate Chemistry
Publisher: American Chemical Society
Date: Mar 1, 2013

Copyright © 2013, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

BACK | CLOSE WINDOW

© 2022 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Data Security and Privacy | For California Residents | Terms and Conditions
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso de figura 1.13

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Aug 07, 2022

This Agreement between Miss. Lilia Arellano ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5358170114707
License date	Jul 29, 2022
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Nano Today
Licensed Content Title	Recent advances in upconversion nanocrystals: Expanding the kaleidoscopic toolbox for emerging applications
Licensed Content Author	Kezhi Zheng,Kang Yong Loh,Yu Wang,Qiushui Chen,Jingyue Fan,Taeyoung Jung,Sang Hwan Nam,Yung Dong Suh,Xiaogang Liu
Licensed Content Date	Dec 1, 2019
Licensed Content Volume	29
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	1
Start Page	100797
End Page	0
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of translations	1
Title	NANOPLATAFORMAS INORGÁNICAS COMO ELEMENTOS ACTIVOS EN SISTEMAS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Portions	Figure 1 c
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	Miss. Lilia Arellano

Calle María Casares 7 3ºB

Santiago de Compostela, 15706

Spain

Attn: Ms. Lilia Arellano

Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	**0.00 USD**

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:
"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."
4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.
5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk here). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.
6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.
7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and

5. conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditi ons and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.
6. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their solediscretion , for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyr ight Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation**: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.
16. **Posting licensed content on any Website**: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image ; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at http://www.sciencedirect.com/science /journal/xxxxx or the Elsevier homepage for books at http://www.elsevier.com; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu. Licensing material from an Elsevier book: A hyper -text link must be included to the Elsevier homepage at http://www.elsevier.com . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millio ns of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and u se the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society -owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation -only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation**: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by/4.0.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee. Commercial reuse includes:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. **Other Conditions**:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Permiso de Figura 1.14

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 07, 2022

This Agreement between Miss. Lilia Arellano ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5358170560057
License date	Jul 29, 2022
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Advanced Materials
Licensed Content Title	Highly Efficient Multicolour Upconversion Emission in Transparent Colloids of Lanthanide-Doped NaYF4 Nanocrystals
Licensed Content Author	M. Haase, H.-U. Güdel, K. Kömpe, et al
Licensed Content Date	Dec 16, 2004
Licensed Content Volume	16
Licensed Content Issue	23-24
Licensed Content Pages	4
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	NANOPLATAFORMAS INORGÁNICAS COMO ELEMENTOS ACTIVOS EN SISTEMAS TERAGNÓSTICOS Y DE BIODETECCIÓN
Institution name	Universidad de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Sep 2022
Portions	Figure 4
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	Miss. Lilia Arellano Calle María Casares 7 3ºB Santiago de Compostela, 15706 Spain Attn: Ms. Lilia Arellano
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	**0.00 USD**
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a"Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions

established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at http://myaccount.copyright.com).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sublicensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order,** is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR
  ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of th is Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Althoug h most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non**Creative Commons Attribution Non-Commercial License**

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC)License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below) **Use by commercial "for-profit" organizations**

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

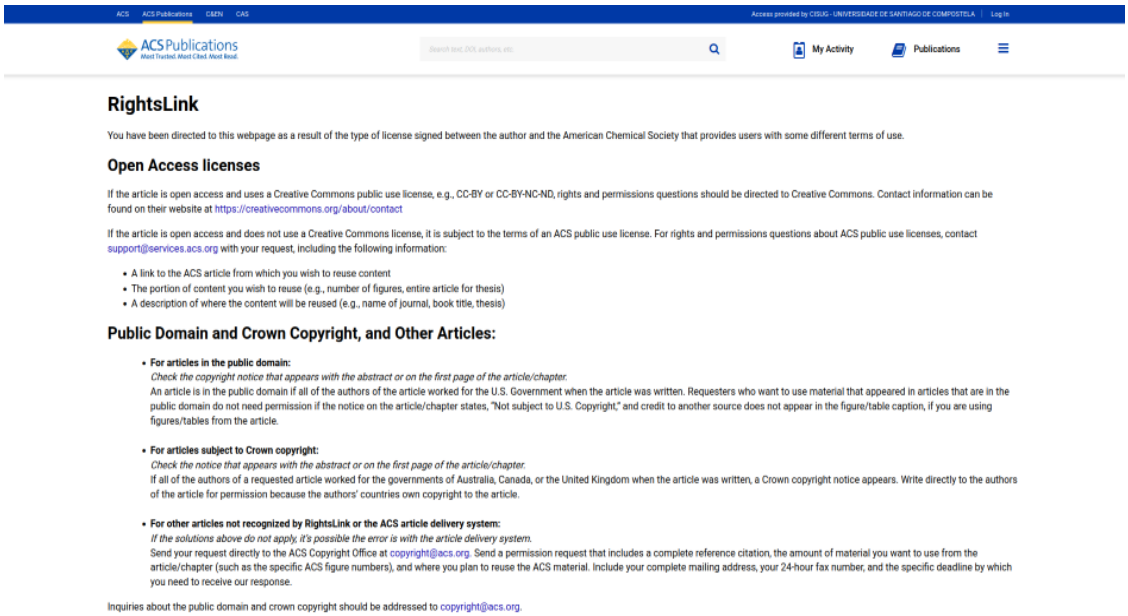
Further details can be found on Wiley Online Library http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Permiso de figura 1.15



ACS ACS Publications C&EN CAS Access provided by: CSUG - UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA | Log In

ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

My Activity Publications

RightsLink

You have been directed to this webpage as a result of the type of license signed between the author and the American Chemical Society that provides users with some different terms of use.

Open Access licenses

If the article is open access and uses a Creative Commons public use license, e.g., CC-BY or CC-BY-NC-ND, rights and permissions questions should be directed to Creative Commons. Contact information can be found on their website at https://creativecommons.org/about/contact

If the article is open access and does not use a Creative Commons license, it is subject to the terms of an ACS public use license. For rights and permissions questions about ACS public use licenses, contact support@services.acs.org with your request, including the following information:

- A link to the ACS article from which you wish to reuse content
- The portion of content you wish to reuse (e.g., number of figures, entire article for thesis)
- A description of where the content will be reused (e.g., name of journal, book title, thesis)

Public Domain and Crown Copyright, and Other Articles:

- **For articles in the public domain:**
  Check the copyright notice that appears with the abstract or on the first page of the article/chapter.
  An article is in the public domain if all of the authors of the article worked for the U.S. Government when the article was written. Requesters who want to use material that appeared in articles that are in the public domain do not need permission if the notice on the article/chapter states, "Not subject to U.S. Copyright," and credit to another source does not appear in the figure/table caption, if you are using figures/tables from the article.

- **For articles subject to Crown copyright:**
  Check the notice that appears with the abstract or on the first page of the article/chapter.
  If all of the authors of a requested article worked for the governments of Australia, Canada, or the United Kingdom when the article was written, a Crown copyright notice appears. Write directly to the authors of the article for permission because the authors' countries own copyright to the article.

- **For other articles not recognized by RightsLink or the ACS article delivery system:**
  If the solutions above do not apply, it's possible the error is with the article delivery system.
  Send your request directly to the ACS Copyright Office at copyright@acs.org. Send a permission request that includes a complete reference citation, the amount of material you want to use from the article/chapter (such as the specific ACS figure numbers), and where you plan to reuse the ACS material. Include your complete mailing address, your 24-hour fax number, and the specific deadline by which you need to receive our response.

Inquiries about the public domain and crown copyright should be addressed to copyright@acs.org.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La primera parte de esta tesis doctoral se centra en el desarrollo de nanoplataformas inorgánicas basadas en nanopartículas de oro en forma de nanocilindro para el tratamiento contra el cáncer. Para ello, se procedió a la síntesis de nanocilindros modificados superficialmente por la técnica capa por capa, para dotarlos de estabilidad y biocompatibilidad. El objetivo de esta nanoplataforma es permitir multiterapia a partir sus propiedades ópticas (fototérmica, fotodinámica y química).
En la segunda parte de la tesis, el objetivo se centró en la obtención de nanopartículas sobreconversoras con buenas propiedades para diagnosis por imagen gracias a la absorción de energía en el infrarrojo y su emisión en el visible, es decir, trabajando de este modo en la ventana biológica.