



# Estudio del efecto fototermal plasmónico generado por nanobarras de oro en células gástricas tumorales

Sergio Daniel Pardo Rincón

Trabajo de grado de maestría para optar al título de Magíster en Ciencias Naturales y  
Matemática

Director

Juan Humberto Serna Restrepo. Doctor (PhD) en Física.

Asesora

Yuliet Montoya Osorio. Doctora (PhD) en Ciencias Médicas

Universidad Pontificia Bolivariana

Escuela de Ingenierías

Maestría en Ciencias Naturales y Matemática

Medellín, Antioquia, Colombia

2024

El contenido de este documento no ha sido presentado con anterioridad para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o en cualquiera otra universidad.

# Agradecimientos

A la Universidad Pontificia Bolivariana, por brindarme la oportunidad de seguir cumpliendo sueños y dar un paso hacia adelante en mi formación como profesional.

Al proyecto *"Terapia fototermal plasmónica basada en nanoestructuras de oro como tratamiento terapéutico de adenocarcinoma gástrico evaluado en un modelo in silico y en un modelo ex vivo"* y todos sus participantes, por creer en mí y permitirme ser parte de su desarrollo.

A los Grupos de Investigación en Dinámica Cardiovascular y Óptica y Espectroscopía, por darme la bienvenida, abrirme las puertas y apoyar cada proceso de mi labor científica.

A mis padres, por su paciencia infinita.

A Jorge David y Sonia Marcela, por ser los amores de mi vida.

# Resumen

La terapia fototermal plasmónica es una técnica relativamente nueva que aprovecha las propiedades ópticas únicas de nanoestructuras metálicas como las nanobarras de oro para inducir calor localizado en células principalmente tumorales bajo irradiación láser, y así, estimular su muerte vía apoptosis. Este estudio, enmarcado dentro del proyecto "*Terapia fototermal plasmónica basada en nanoestructuras de oro como tratamiento terapéutico de adenocarcinoma gástrico evaluado en un modelo in silico y un modelo ex vivo*", evaluó la respuesta de células gástricas tumorales de la línea AGS a las nanobarras de oro que fueron internalizadas en ellas. Las nanobarras de oro se sintetizaron por métodos verdes mediante una metodología híbrida que usó el extracto etanólico de la guayaba agria (*Psidium guineense*) como agente reductor, y que permitió establecer un protocolo de síntesis que dio como resultado la obtención de nanobarras con relación de aspecto de 4 y un espectro de onda resonante longitudinal en la región del infrarrojo cercano, alrededor de 827 nm. Seguidamente, las células tumorales fueron tratadas con estas nanobarras y posteriormente irradiadas con un láser de 840 nm para así generar el efecto fototermal plasmónico. Los resultados obtenidos demostraron que las nanobarras de oro de síntesis verde internalizadas en las células gástricas tumorales pudieron generar un efecto fototermal plasmónico efectivo bajo las condiciones de irradiación láser empleadas, lo cual se tradujo en un aumento localizado de temperatura, y por consiguiente, en un daño térmico selectivo en las células AGS.

La muerte celular por apoptosis como consecuencia de la terapia se constató mediante citometría de flujo, utilizando pruebas de potencial mitocondrial y anexina V-7AAD. Estos análisis confirmaron que las células tratadas exhibieron una disminución en el potencial

mitocondrial y una mayor exposición de anexina V en su membrana celular, indicativos típicos de este tipo de muerte.

Los hallazgos de esta investigación son innovadores y presentan un panorama prometedor en la lucha contra el cáncer, ofreciendo la posibilidad de minimizar el daño a tejidos sanos circundantes y mejorando la eficacia de los tratamientos en tumores localizados.

**Palabras clave:** Terapia fototermal plasmónica, Nanobarras de oro, Síntesis verde, cáncer, apoptosis, citometría de flujo.

# Abstract

Plasmonic photothermal therapy is a relatively new technique that takes advantage of the unique optical properties of metallic nanostructures such as gold nanorods to induce localized heat in mainly tumor cells under laser irradiation, and thus stimulate their death via apoptosis. This study, framed within the project *"Plasmonic photothermal therapy based on gold nanostructures as a therapeutic treatment for gastric adenocarcinoma evaluated in an in silico model and an ex vivo model"* evaluated the response of gastric tumor cells from the AGS line to the gold nanorods that were internalized in them. The gold nanorods were synthesized by green methods using a hybrid methodology that used the ethanolic extract of sour guava (*Psidium guineense*) as a reducing agent, and which allowed the establishment of a synthesis protocol that resulted in the obtaining of nanorods with aspect ratio of 4 and a longitudinal resonant wave spectrum in the near-infrared region, around 827 nm. Next, the tumor cells were treated with these nanorods and subsequently irradiated with an 840 nm laser to generate the plasmonic photothermal effect. The results obtained demonstrated that the green synthesis gold nanorods internalized in the gastric tumor cells were able to generate an effective plasmonic photothermal effect under the laser irradiation conditions used, which translated into a localized increase in temperature, and consequently, in a Selective thermal damage in AGS cells.

Apoptotic cell death as a consequence of therapy was confirmed by flow cytometry, using mitochondrial potential and annexin V-7AAD tests. These analyzes confirmed that the treated cells exhibited a decrease in mitochondrial potential and an increased exposure of annexin V in their cell membrane, typical indicators of this type of death.

The findings of this research are innovative and present a promising outlook in the fight against cancer, offering the possibility of minimizing damage to surrounding healthy tissues and improving the effectiveness of treatments in localized tumors.

**Keywords:** Photothermal therapy, Gold Nanorods,, Green synthesis, cancer, apoptosis, flow cytometry

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Descripción del Problema y Justificación . . . . .	1
1.2. Antecedentes y Estado del Arte . . . . .	3
1.3. Hipótesis . . . . .	13
1.4. Objetivos . . . . .	14
1.4.1. Objetivo General . . . . .	14
1.4.2. Objetivos Específicos . . . . .	14
<b>2. Marco Teórico</b>	<b>15</b>
2.1. Terapia Fototermal Plasmónica . . . . .	16
2.2. Nanobarras de oro . . . . .	17
2.2.1. Plasmón de superficie localizada . . . . .	18
2.2.2. Síntesis verde de nanobarras de oro . . . . .	19
2.3. Fibroblastos 3T3 . . . . .	20
2.4. Células gástricas tumorales AGS . . . . .	21
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>23</b>
3.1. Síntesis de nanobarras de oro . . . . .	25
3.2. Evaluación de la citotoxicidad de nanobarras de oro . . . . .	26
3.3. Irradiación . . . . .	28
3.4. Determinación de la vía de muerte celular . . . . .	32
3.4.1. Potencial mitocondrial . . . . .	32
3.4.2. Anexina V / 7-AAD . . . . .	33
<b>4. Resultados y Análisis</b>	<b>34</b>

4.1. Citotoxicidad de nanobarras de oro en fibroblastos 3T3 . . . . .	34
4.2. Vía de muerte celular . . . . .	37
4.2.1. Potencial mitocondrial . . . . .	38
4.2.2. Anexina V / 7-AAD . . . . .	44
<b>5. Conclusiones y Recomendaciones</b>	<b>48</b>
<b>Referencias</b>	<b>50</b>
<b>Anexos</b>	<b>58</b>



# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Descripción del Problema y Justificación

¿Cuáles son los efectos del aumento de temperatura en células gástricas tumorales producidos por la generación de plasmones resonantes localizados en nanobarras de oro internalizadas y sintetizadas por métodos verdes?

El cáncer no es de causa unidireccional, es una mezcla de múltiples factores dentro de los que se destaca el cambio genético que controla el crecimiento y la apoptosis celular. Según el Ministerio de Salud Colombiano, el cáncer es considerado un problema de salubridad pública, donde la cantidad de personas que padecen y mueren como causa de esta enfermedad va en un constante aumento con el pasar de los años (Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, 2012).

Dentro de las múltiples manifestaciones de esta afección, se encuentra el cáncer de estómago, que, para el contexto nacional, es el más letal (Portillo Miño et al., 2021). Variados son sus orígenes y abarcan un gran espectro de posibilidades, donde la bacteria *Helicobacter pylori* es considerada como la principal causante, pero no la única, pues otros factores como genética, dieta, alcoholismo, tabaquismo y obesidad también son factores a tener en cuenta (Soond Zamyatnin, 2022)

Los avances tecnológicos han puesto al servicio de la salud tratamientos cancerológicos como son quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y cirugías oncológicas (Sitarz et al., 2018), pero en los últimos años un procedimiento ha llamado la atención de quienes estudian

este campo: La Terapia Fototermal Plasmónica.

El campo de la nanotecnología, y en particular el uso de las nanopartículas metálicas, han demostrado resultados muy prometedores en aplicaciones biomédicas (Morán, 2016), y son parte fundamental del método anteriormente mencionado, que no sólo puede llevar a buen término un proceso frente a la enfermedad, sino que también supone una mejoría frente a las terapias actualmente utilizadas, pues direccionan su actuar sobre la zona específica y evitan, en principio, los efectos secundarios y adversos que estas generan en todo el cuerpo (Cobley et al., 2010).

La Terapia Fototermal Plasmónica tiene como principio conducir a hipertermia a las células cancerígenas mediante la generación de plasmones resonantes localizados (LSPR) en nanoestructuras metálicas, las cuales han sido previamente internalizadas en el sistema con la finalidad de inducir muerte apoptótica y una posterior disminución de la zona tumoral (Pérez-Hernández et al., 2015). Este es un procedimiento que se debe ejecutar bajo ciertas propiedades fundamentales, donde el establecimiento del tiempo de tratamiento, la concentración de nanopartículas a utilizar, la longitud de onda y la potencia del láser para irradiación, determinan el éxito del mismo, pues una falla en cualquiera de los parámetros, podría conducir a la destrucción tisular vía necrosis (y no por la apoptosis necesaria), empeorando así la condición inicial (Pérez-Hernández, 2016).

Para entender el comportamiento de las nanopartículas de oro (más específicamente, nanobarras de oro) y la funcionalidad de la irradiación de las mismas en un organismo vivo, se hace imprescindible la comprensión primaria de dichos ambientes en un entorno in vitro. Con tal fin, se han establecido una serie de métodos que evalúan los efectos de la irradiación con luz láser tanto en células gástricas tumorales como en fibroblastos 3T3 con nanobarras de oro internalizadas, disponiendo de técnicas de medición de temperatura, determinación de vía de muerte celular y seguimiento del tratamiento.

De esta forma, el proyecto busca el conocimiento y la descripción detallada de las consecuencias de la internalización e irradiación de nanobarras de oro en células sanas y de la línea AGS, de modo que la comparación de los efectos bajo diferentes condiciones, permita evaluar

y establecer conclusiones que expliquen el comportamiento celular ante un tratamiento como el propuesto, con el objetivo de particularizar y enumerar el impacto obtenido de la experimentación y los factores influyentes que deben tenerse en cuenta para una futura aplicación in vivo. Asimismo, el estudio adquiere más relevancia al enfocarse en células estomacales, pues son elementos que al convertirse en tumorales generan un cáncer muy agresivo y en donde no se tiene claro aún el efecto de un tratamiento por hipertermia, y que, además, al tratarse de un órgano interno, crea la necesidad de conocer cuáles son verdaderamente los parámetros ópticos de irradiación para generar efectos plasmónicos que puedan aumentar la eficiencia de la terapia.

## **1.2. Antecedentes y Estado del Arte**

A nivel mundial, alrededor de 11 millones de casos nuevos de cáncer son detectados por año, donde aproximadamente el 80% se manifiesta en países en vía de desarrollo, y allí, conviven en un contexto de desigualdad social y necesidades básicas insatisfechas. Sumado a esto, y teniendo en cuenta que cerca del 30% de los cánceres son prevenibles, se hace necesario el planteamiento de acciones que no sólo controlen, sino que también mitiguen, detecten y prevengan los factores de riesgo asociados a esta enfermedad (Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, 2012).

En los más de cien años que lleva investigándose el cáncer, se ha demostrado que existen algunas condiciones y comorbilidades que aumentan las posibilidades de desarrollar neoplasias, destacándose el envejecimiento, consumo de tabaco y alcohol, exposición a radiaciones y agentes químicos, ciertas infecciones virales y bacterianas, exceso de producción de hormonas, antecedentes familiares y sobrepeso (Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, 2018), y con el paso del tiempo, en la búsqueda de soluciones ante uno de los problemas de salud pública más preocupantes, globalmente hablando, la exploración médica y científica no se detiene.

Debido al impacto y las repercusiones que el cáncer trae a la sociedad, el interés sobre el tema se expande por todo el planeta. Según plataformas como Scopus y Google Trends,

Estados Unidos, Reino Unido, Irlanda, China y Japón son los países que sobresalen tanto en títulos publicados por regiones como en búsquedas web durante los últimos 5 años. (*Ver Anexo 1. Vigilancia tecnológica*). Las bases de datos registran documentos de investigación en cáncer que datan de 1866 -11 para ese año- y su crecimiento ha sido exponencial, llegando a un pico de 235661 publicaciones en 2022. Asimismo, considerando la multifactoriedad del cáncer, la medicina no es el único campo de exploración, pues también se ciñe a otras áreas del conocimiento como ingeniería, ciencia de materiales, física, enfermería, bioquímica e inmunología, y a su vez, los principales autores en el tema son de diversos orígenes (Tabla 1.)

Autor	Cantidad de publicaciones entre 2019 y 2023
Pawlik, T.M.	613
Briganti, A.	602
Shariat, S.F.	567
Karakiewicz, P.I.	457
Saad, F.	447
Curigliano, G.	400
Brenner, H.	389
Lorenz, J.	373
Baradaran, B.	346
Doki, Y.	345

*Tabla 1. Principales autores de documentos relacionados con cáncer. Elaboración propia con datos obtenidos de Scopus*

Hablando específicamente del cáncer de estómago, recientemente se han establecido múltiples causas y circunstancias que hacen de una persona más susceptible a presentar esta condición, siendo la bacteria *Helicobacter pylori* la principal causante, seguido de factores genéticos, úlceras, dieta alta en sal, obesidad, el virus Epstein-Barr, consumo de alcohol, entre otros (Rawla Barsouk, 2019). La infección por *Helicobacter pylori* no sólo ha sido asociada al aumento en el riesgo de desarrollar cáncer por las lesiones causadas a nivel gástrico,

también se ha establecido como un contribuyente en la progresión del mismo por la inflamación generada a partir del sistema inmune del paciente, y su posterior manifestación de proteasas catepsinas lisosomales (Soond Zamyatnin, 2022). Entonces, teniendo en cuenta que *Helicobacter pylori* está presente en aproximadamente el 60% de la población mundial (muchas veces de forma asintomática) y en el 84% de los diagnosticados con cáncer de estómago (Sitarz et al., 2018), algunos investigadores han ido demostrando que, en ciertos países desarrollados como Japón, la incidencia de esta bacteria ha venido disminuyendo, y por consiguiente, está sucediendo lo mismo con el cáncer gástrico, con la salvedad de que ésta es sólo una de las variantes de la enfermedad y que es posible desarrollarla sin necesidad de la infección bacteriana (Abe Ushiku, 2022).

Autor	Cantidad de publicaciones entre 2019 y 2023
Li, P.	169
Huang, C.M.	159
Lu, J.	159
Zheng, C.H.	146
Lin, J.X.	133
Xie, J.W.	131
Che, Q.Y.	129
Yoshikawa, T.	129
Shitara, K.	122
Wang, J.B.	117

*Tabla 2. Principales autores de documentos relacionados con cáncer gástrico. Elaboración propia con datos obtenidos de Scopus*

La expresión génica ha sido estudiada como un mecanismo de detección temprana de cáncer gástrico. Si bien existe muy poca información afín, el uso de biopsias analizadas por medio de microarreglos de expresión génica, pruebas PCR e histopatología, ha permitido asociar a grupos de proteínas claudinas (CLDN1) y metaloproteinasas (MMP9) con los cambios moleculares en la mucosa estomacal que terminan por convertir la gastritis en

cáncer (Rivas-Ortiz et al., 2022). De igual forma, respecto al tratamiento, el cáncer es mayormente contenido con quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, gastrectomía e incluso la combinación de dos o más de estos métodos (Sitarz et al., 2018). Sin embargo, en tiempos recientes, una nueva forma de combatir el cáncer en general ha venido haciéndose un espacio: La Terapia Fototermal Plasmónica.

La implementación de la Terapia Fototermal Plasmónica como tratamiento contra el cáncer tiene registros de casi 20 años, y desde ese entonces se habla de la capacidad de absorción del infrarrojo cercano de las nanopartículas metálicas y de la diferencia de aumento de temperatura entre las células tratadas versus las no tratadas (Hirsch et al., 2003). Para ese caso en particular, las nanopartículas utilizadas fueron nanoesferas, que de hecho siguen siendo muy populares a la fecha, pero con el paso del tiempo y debido a sus características, las nanobarras de oro fueron haciéndose un espacio en el estudio de la terapia fototermal (Lal et al., 2008 y Bagley et al., 2013, citados en Liao et al., 2021). Aquí, vale la pena resaltar que, dependiendo de las condiciones de iluminación láser, las nanobarras de oro también poseen una eficiencia de conversión fototermal (PCE) superior al 50%, valores comparables con las nanojaulas del mismo metal, pero que están por encima de las cifras PCE que presentan las nanoesferas (H. S. Kim & Lee, 2018).

Dentro de los estudios más recientes que involucran a las nanobarras de oro en terapia fototermal plasmónica, se encuentra el realizado por Kang et al. (2017), en donde se da la aplicación de nanobarras de oro conjugadas con porfirina y trastuzumab en el tratamiento de cáncer de seno. Aquí, se utilizaron nanobarras con relación de aspecto de 4 (40 nm de longitud / 10 nm de ancho), observando un aumento de temperatura que va desde los 25°C hasta casi los 65°C mediante la irradiación con láser a una longitud de onda de 808 nm con una potencia de 2 W/cm<sup>2</sup> durante 12 minutos en 4 ciclos de calentamiento-enfriamiento. El aumento de la temperatura se ve directamente relacionado con la concentración de las nanopartículas, pues a mayor concentración más efecto hipertérmico, sin embargo, y dependiendo del linaje celular empleado, esto también repercute en la viabilidad celular, pues altas concentraciones de nanopartículas (también en combinación con una modificación en la potencia del láser) sugieren una reducción significativa en la misma. Tras 12 días de irradiación en un

ambiente in vivo con células cancerígenas cultivadas en ratones, se logró demostrar que la combinación de las nanobarras conjugadas en combinación con irradiación láser, disminuyen significativamente el volumen tumoral.

Otras investigaciones de relevancia que utilizan nanobarras de oro en terapia fototermal plasmónica indican que éstas, tienen la capacidad de inhibir los procesos invasivos y metastásicos de las células cancerígenas (Alí et al., 2017), que al momento de la irradiación el tipo de tejido es más importante que su cercanía a la epidermis, pues en los tejidos con altos niveles de absorción se da un mayor calentamiento (Cheong et al., 2021), y que los patrones de muerte celular en este tratamiento dependen de qué tanto sea el aumento de la temperatura, pues 6°C de diferencia (de 43°C a 49°C) incrementan sustancialmente la cantidad de células muertas y el porcentaje de necrosis en las mismas (Zhang et al., 2018).

La aplicación de Terapia Fototermal con Nanobarras de Oro ha demostrado ser capaz de obtener resultados positivos y esperanzadores, aunque también trae consigo algunos retos (Taylor et al., 2022). Uno de los principales desafíos frente a todo el proceso, es la biocompatibilidad celular de las nanobarras de oro, y en general, de todas las nanopartículas que puedan implementarse en la terapia fototermal (Xie et al., 2021). Debido a la citotoxicidad que presentan los GNRs, originaria de su síntesis química y a los residuos de CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) que esta genera, se hace necesaria la conjugación mediante intercambio de ligandos y el recubrimiento de las nanobarras con elementos que le permitan ser absorbidas por la célula de manera más “natural”, eliminando así su carácter dañino y, por ende, aumentando la viabilidad celular del procedimiento (Zhao et al., 2021). Cuando se habla del método de recubrimiento de superficie de las nanopartículas, se entiende que los materiales llamados a cumplir esta función son normalmente polímeros, como, por ejemplo, la albúmina de suero bovino (BSA), que gracias a su eficacia en la reducción de toxicidad y al impedimento que le confiere a las partículas en relación a su agregación, se convierte en la “camisa” ideal (Zhao et al., 2021). Respecto al intercambio de ligandos, se recurre a los “tioles” para eliminar el Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB) que se encuentra en la superficie de las nanopartículas de oro obtenidas mediante síntesis química. Aquí, el polietilenglicol (PEG) puede eliminar por completo el CTAB, pero también confiere gran

solubilidad y prevención de adhesión de proteínas no deseadas, por lo que es la molécula más utilizada para dicho fin (Ali et al., 2017). Ambas metodologías logran resultados positivos y aumento de la viabilidad celular.

Pero existe otra forma de obtener nanobarras de oro biocompatibles con las células, y esa es mediante la síntesis verde, también conocida como biosíntesis. Su obtención se da a partir del uso de extractos vegetales, casi siempre obtenidos de cáscaras de fruta, y a diferencia de la síntesis química, este método consigue que los GNRs muestren niveles de citotoxicidad muy bajos, independientemente de la concentración que sea utilizada (Pechyen et al., 2021).

Con estos retos “superados”, la investigación en terapia fototermal ha ido ahondando en otros aspectos de importancia e influyentes, como lo son la potencia de irradiación, el tamaño de nanopartículas y la concentración de las mismas, y las posibles afectaciones al tejido sano.

En búsqueda de las condiciones óptimas para el tratamiento, los más recientes estudios han ido demostrando y comprobando la intervención directa de la potencia de irradiación en el aumento de temperatura, confirmando que una mayor potencia facilita la llegada de la hipertermia en el sistema (Ashrafi et al., 2016; Zhao et al., 2021). Sin embargo, un tiempo prolongado de irradiación bajo una potencia alta, generaría efectos adversos incluso en el tejido sano circundante, por lo que no sólo se recomiendan periodos cortos de irradiación, sino también intercalarlos con intervalos de enfriamiento, para así mantener la distribución del calor dentro de los márgenes adecuados (D. Kim & Kim, 2021).

El tamaño de las nanobarras también es relevante. Cuando las nanopartículas de oro son muy grandes, tienden a acumularse en la superficie de los tejidos y a reducir su eficiencia hipertérmica, mientras que un tamaño reducido de estas facilitaría su penetración, a tal punto que incluso podrían permear la membrana nuclear de las células tratadas, contribuyendo en una distribución de calor más uniforme (Pratap et al., 2021; X. D. Zhang et al., 2011). A su vez, la concentración interviene tanto en el aumento de temperatura como en la distribución de calor; a mayor concentración de nanobarras, más delta de temperatura, pero menos uniformidad de distribución, mientras que una concentración de nanobarras más baja

determina un delta de temperatura más pequeño pero una mejor distribución de calor a lo largo del tejido tratado (Ashrafi et al., 2016; Xie et al., 2021).

Como muestra de la fuerza que ha tomado la terapia fototermal en el tratamiento del cáncer, está la cantidad de publicaciones científicas que incluyen en su cuerpo el término “Photothermal Therapy” y el aumento de papers en diversas bases de datos. Los principales autores investigadores en el tema son de origen asiático (Tabla 3.), correspondiéndose con el interés de búsquedas web y el posicionamiento de Corea del Sur como el país con la mayor atención puesta en la Terapia Fototermal. De igual manera, el origen de los estudios publicados es mayoritariamente Chino. (*Ver Anexo 1. Vigilancia tecnológica*).

Autor	Cantidad de publicaciones entre 2019 y 2023
Fan, Q.	63
Tang, B.Z.	63
Chen, Y.	54
Wu, A.	44
Yang, P.	41
Lin, J.	40
Zhang, H.	40
Xie, Z.	37
Dong, X.	36
Huang, P.	36

*Tabla 3. Principales autores de documentos relacionados con terapia fototermal. Elaboración propia con datos obtenidos de Scopus*

Al igual que lo atractivo de la terapia fototermal, el interés en las nanobarras de oro y su aplicación en tratamiento tumoral ha aumentado, pues estas son acreedoras de un potencial que transmite seguridad y efectividad en el tratamiento en cuestión (An et al., 2017; Zong et al., 2021). Las principales bases de datos corroboran y establecen un seguimiento a la producción científica conexas con las nanobarras de oro, dejando en evidencia el crecimiento

en los escritos relacionados al tema particular, aunque con un leve decaimiento en los últimos 5 años (*Ver Anexo 1. Vigilancia tecnológica*).

Autor	Cantidad de publicaciones entre 2019 y 2023
Liz-Marzán, L.M.	32
Ha, J.W.	31
Mahmoud, N.N.	21
Link, S.	20
Wu, X.	19
Khlebtsov, B.N.	18
Khlebtsov, N.G.	18
Wang, J.	17
He, Y.	14
Kan, C.	14

*Tabla 4. Principales autores de documentos relacionados con nanobarras de oro.*

*Elaboración propia con datos obtenidos de Scopus*

Si bien los fibroblastos 3T3 han sido ampliamente estudiados e incluidos en numerosos estudios biológicos por su facilidad de adhesión, cultivo y crecimiento (Scopus reporta documentos que datan de 1964 y hasta la fecha se han publicado más de 64000 títulos que circunscriben esta línea celular), su uso en terapia fototermal plasmónica no está ni cerca de esa cifra. De hecho, en total se han divulgado apenas 181 artículos relacionados (siendo el primer informe del año 2008) y en la búsqueda de los últimos 5 años, solo aparecen 118 papers (Tabla 5).

Autor	Cantidad de publicaciones entre 2019 y 2024
Cheng, Y.	9
Zhang, Q.	9
Xiao, J.	6
Zhou, Z.	6
Cuiz, Z.	5
Fan, Q.	5
Li, Z.	5
Liu, X.	5
Tan, L.	5
Wang, Y.	5

*Tabla 5. Principales autores de documentos relacionados con fibroblastos 3T3 y Terapia Fototermal. Elaboración propia con datos obtenidos de Scopus*

Chueh et al. (2014) en un estudio de diferenciación de efectos citotóxicos de nanopartículas de oro en diferentes líneas celulares en mamíferos, demostraron que las AuNP's, mediante autofagia, disminuyen el crecimiento celular en fibroblastos 3T3. A través del tratamiento con una solución acuosa comercial de nanobarras de oro de longitudes entre 10-40 nm y con periodos de incubación de 24, 48 y 72 horas, se determinó que tanto el tiempo del procedimiento como la concentración de las nanopartículas están directamente relacionados con la tasa de supervivencia de las células 3T3, no así con la progresión del ciclo celular. La viabilidad se ve disminuida a medida que aumentan los dos parámetros anteriormente mencionados, pero el porcentaje de células en G1, S y G2/M se mantiene estable. Igualmente, se comprobó que esta línea celular, en comparación con otras como MRC-5 (también fibroblastos pero de origen humano) tiene una mayor proporción de internalización de nanopartículas.

Por su parte, Kalpama et al. (2013) utilizaron los fibroblastos 3T3 para la evaluación de la citotoxicidad de nanopartículas de oro sintetizadas por métodos verdes. Teniendo como base el extracto de las hojas de *Torreya nucifera*, *Cinnamomum japonicum* y *Nerium indicum*, lograron conseguir nanoesferas de oro de 20 nm y 50 nm, y tras un periodo de

incubación (con células) de 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> bajo diferentes concentraciones de nanopartículas, establecieron que salvo aquellas nanoestructuras derivadas de *C. japonicum*, las nanopartículas de oro procedentes de la biosíntesis exhiben bajos niveles de toxicidad, sin importar la concentración de las mismas.

La relación entre cáncer gástrico, terapia fototermal y nanobarras de oro está documentada con algunas investigaciones que dan cuenta de los efectos positivos de este tratamiento. Se ha demostrado que la terapia fototermal con nanobarras de oro tiene una incidencia directa en la muerte apoptótica de las células gástricas cancerígenas sin afectar las células normales de la mucosa estomacal, pues después de períodos de irradiación, la temperatura se eleva a niveles de hipertermia y los ensayos de anexina-v demuestran esta vía de muerte (Yang et al., 2016). De igual forma, el tumor no sólo disminuye la velocidad de su crecimiento, sino que, al cabo de algunas semanas de procedimiento, su volumen se ve reducido, generando un panorama esperanzador en el combatir de esta enfermedad (Yang et al., 2017; Yang et al., 2016). Sin embargo, en bases de datos como Scopus, sólo se relacionan 10 documentos totales que involucran estas palabras clave (Tabla 6).

Autor	Cantidad de publicaciones totales
Cui, D.	3
Zhang, C.	3
Zhi, X.	3
Bao, C.	2
Ni, J.	2
Pan, F.	2
Wang, k.	2
Yang, Y.	2
Yang, Y.	2
Chai, J.	1

*Tabla 6. Autores relacionados con la aplicación de terapia fototermal con nanobarras de oro en células gástricas tumorales. Elaboración propia con datos obtenidos de Scopus*

### 1.3. Hipótesis

Cuando los tejidos presentan estados de hipoxia y disminución del pH extracelular, se hacen más termosensibles. Siendo así, la termosensibilidad específica de las células cancerígenas es en promedio, mayor a la de las células sanas, pues como característica principal se tiene que los tejidos tumorales son ácidos y faltos de oxígeno (Chen et al., 2019; Muz et al., 2015).

Al implementar en cultivos celulares una terapia fototermal plasmónica basada en nanobarras de oro sintetizadas por métodos verdes, se espera que gracias a la termosensibilidad específica de las células se evidencien diferencias en los resultados que esta produce, de modo que estudiar el efecto del tratamiento en células sanas y tumorales posibilitaría encontrar que estas últimas se vean más afectadas, evidenciando en ellas un mayor aumento de temperatura bajo las mismas condiciones de irradiación y poniendo de manifiesto su muerte apoptótica, para así, confirmar la efectividad del procedimiento.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo General**

Evaluar el efecto de la terapia fototermal plasmónica en células gástricas tumorales, con nanobarras de oro internalizadas.

### **1.4.2. Objetivos Específicos**

- Realizar una revisión bibliográfica que dé cuenta de los avances y la actualidad en el estado del arte de la terapia fototermal plasmónica con nanobarras de oro.
- Analizar los efectos fototermales en células gástricas tumorales a partir de los datos obtenidos de la inducción de la muerte celular dada a través de la generación LSPR en nanobarras de oro internalizadas.
- Verificar el mecanismo de muerte celular durante el proceso de terapia fototermal plasmónica.

## Capítulo 2

### Marco Teórico

Cuando se habla de cáncer es necesario no referirse a él como una única enfermedad, pues la realidad muestra que es un compendio de más de cien caracteres, muy distintos entre sí, pero que comparten una característica principal: el crecimiento anormal y desordenado de las células somáticas, generalmente ocasionado por alteraciones genéticas y la acumulación de mutaciones puntuales (Instituto Nacional de Cancerología E.S.E., 2004). Dicho crecimiento descontrolado se traduce en la formación de masas tisulares conocidas como tumores, que se diferencian por su disposición de expansión sobre las distintas zonas del cuerpo, considerándose malignos a aquellos capaces de diseminarse, y benignos, a los que no (Cedeño et al., 2022).

Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, en 2020 se atribuyeron a esta condición alrededor de 11 millones de muertes en el mundo, ubicándola como la causa principal de fallecimiento (una de cada seis personas muere en el planeta como consecuencia del cáncer). Así mismo, se espera que para 2040 el número de nuevos casos de cáncer reportados aumente a 29,5 millones, con un número de decesos ascendente a 16,4 millones. Sin embargo, entre el 30 % y el 50 % de los diagnósticos podrían evitarse simplemente con la reducciones de los factores de riesgo y la aplicación de estrategias preventivas (OMS, 2022).

Dentro de las múltiples variedades de esta afección, el cáncer gástrico está calificado como uno de los tipos más letales alrededor del mundo, especialmente en hombres de avanzada edad. Estadísticamente, los tumores estomacales ocupan el quinto lugar en manifestaciones,

pero el tercero en mortalidad, causando más de un millón de nuevos casos y un estimado de decesos de 783000 personas para el año 2018 (Rawla & Barsouk, 2019). En Colombia, el cáncer de estómago es el más letal y el tercero con mayor incidencia, y su aparición se asocia al desarrollo inflamatorio de las mucosas estomacales ocasionado por la infección bacteriana de *Helicobacter pylori*, traducido primeramente en gastritis para luego progresar a atrofia, metaplasia, displasia y finalmente, cáncer (Oliveros et al., 2019). Ahora bien, existen otros factores de riesgo asociados como los son una edad mayor de 50 años, ser de sexo masculino, tener dietas salinas, el alcoholismo y el tabaquismo (Portillo Miño et al., 2021).

Independientemente de la tipificación, el tratamiento del cáncer está principalmente centrado en quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y cirugía de remoción, procedimientos considerados altamente invasivos y que contrario a lo que se busca, reducen la calidad de vida del paciente (Sitarz et al., 2018), por consiguiente, se hace necesaria la búsqueda de alternativas y es ahí donde la terapia fototermal plasmónica basada en nanobarras de oro se abre paso.

## 2.1. Terapia Fototermal Plasmónica

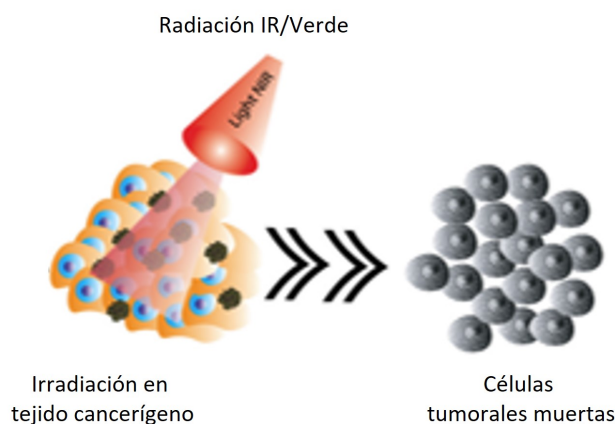


Figura 1. Resumen gráfico de la Terapia Fototermal Plasmónica. Fuente propia.

Fundamentada en la hipertermia y llevando a los tejidos tumorales a un intervalo de temperaturas que va desde los 38°C hasta los 45°C para prescindir y evitar el crecimiento de las células cancerígenas a través del daño y sensibilización de las mismas, la terapia fototermal

plasmónica es un tratamiento alternativo contra el cáncer que genera calor desde el exterior por medio de un plasmón de resonancia de superficie localizado en una nanoestructura metálica, generalmente de oro o plata. Para generar el efecto deseado, es necesario utilizar una fuente de radiación láser que además de generar el plasmón, debe estar fuera de la ventana biológica para eludir la absorción de luz por parte de la célula. La magnitud del aumento de la temperatura, el tiempo de irradiación y el tamaño de las nanopartículas, son los factores determinantes en la efectividad de la terapia fototermal, donde se busca obstaculizar la necrosis de los tejidos y encontrar una muerte celular vía apoptosis (Rivas, 2018).

El uso de nanopartículas de oro en este tratamiento contra el cáncer tiene su base en la internalización de las mismas de parte de las células tumorales, de modo que, al ser sometidas a radiación con luz láser, la temperatura del sistema experimentará un incremento que deberá ser controlado con el fin de asegurar una muerte celular apoptótica en el tejido canceroso, afectando lo menos posible a las células sanas. Cabe aclarar que para que las nanopartículas puedan ser utilizadas en estos tratamientos, deben ser de baja toxicidad, poseer gran absorción en longitudes de onda específicas, ser de fácil esparcimiento en líquidos biocompatibles y a su vez generar comodidad al momento de funcionalizarse para su ingreso en las zonas tumorales (Louis & Pluchery, 2017). Es por esto que los estudios se han centrado en nanopartículas de metales nobles, ya que cumplen con los parámetros anteriormente mencionados.

## **2.2. Nanobarras de oro**

En ese aspecto y teniendo en cuenta que el oro es considerado un metal pesado y noble que al encontrarse en forma de nanopartícula cumple con los requerimientos para ser utilizado en terapia fototermal, las nanorods son su geometría con más terreno ganado en estudio e implementación. Estas nanoestructuras en forma de barra o bastón se sintetizan en muchos tamaños y se identifican por tener propiedades químicas y ópticas que pueden alterarse dependiendo de los parámetros de obtención, donde sus dos bandas de resonancia plasmónica superficial varían según de la relación de aspecto (Onaciu et al., 2019).

Al igual que las demás formas que pueden adoptar las nanopartículas de oro, las nanobarras ostentan características esenciales que traducen su accionar en gran absorción óptica, conversión fototérmica y mejora en la intensidad del campo eléctrico, remarcando que es su generación de plasmones de superficie lo que las destaca como partícipes activas en tratamientos de hipertermia (Liao et al., 2021).

### 2.2.1. Plasmón de superficie localizada

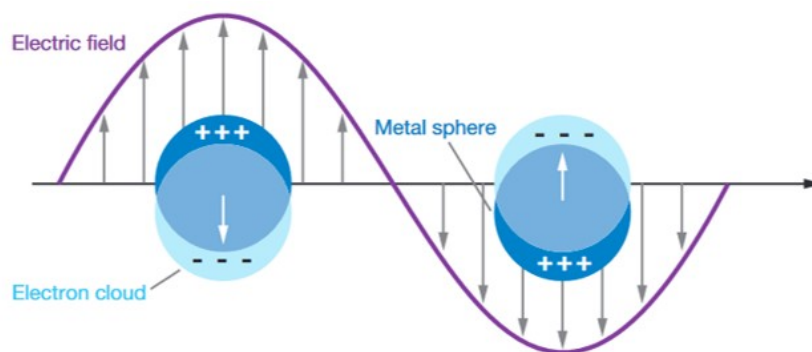


Figura 2. Diagrama ilustrativo de un plasmón de superficie. Willets y Van Duyne (2007).

Un plasmón, generado particularmente en los metales mediante la aplicación de campos eléctricos o impulsos de fotones, es la oscilación colectiva de los electrones de conducción presentes en la última capa de valencia, por lo tanto, un plasmón de superficie no es más que una onda de densidad de carga que aparece en la zona externa de dichos materiales (Espinosa, 2013). Los plasmones de superficie son clasificados en plasmones superficiales de propagación y plasmones superficiales localizados, siendo los primeros aquellos que pueden excitarse en las películas metálicas, mientras que los segundos han de provocarse en nanopartículas, posibilitando una amplia gama de aplicaciones que van desde interacciones moleculares hasta usos biomédicos (Chen & Ming, 2012).

Así, una resonancia de plasmón de superficie localizada se crea cuando se induce una vibración que resuena con la forma de la superficie metálica (Rodríguez-Oliveros et al., 2015), de modo que cuando una nanopartícula se expone a luz láser, los electrones libres de sus átomos se estimulan a un estado de oscilación que genera la separación de las cargas superficiales y establece un dipolo eléctrico, pudiendo usarse la luz absorbida para obtener

imágenes ópticas, y la dispersada, para generar de calor. (Gutierrez-Cruz et al., 2022).

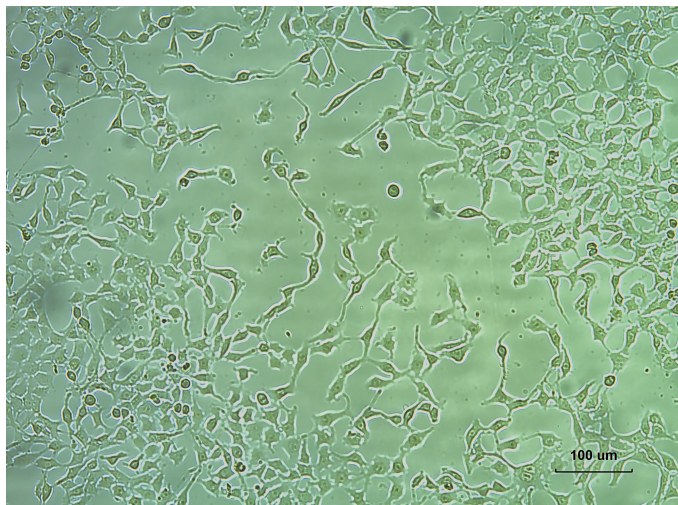
Aunque las nanopartículas esféricas muestran una única banda de resonancia superficial, las cilíndricas exhiben dos, y su espectro se asocia con la relación de aspecto y el método de síntesis por el cuál son obtenidas (Gutierrez-Cruz et al., 2022).

### **2.2.2. Síntesis verde de nanobarras de oro**

Cuando en los procesos de síntesis de nanopartículas se usan extractos de plantas, bacterias, hongos o cualquier otro tipo de material orgánico como agente reductor y estabilizante, se considera que este es un proceso de síntesis verde, o biosíntesis. Para las nanobarras de oro son especialmente efectivos los extractos de plantas, pues gracias a su facilidad para donar electrones, la alta cantidad de compuestos fenólicos que allí se encuentran juegan un papel fundamental en la eficiencia biológica y catalítica del proceso. No obstante y a pesar de que conjuntamente a las ventajas ya mencionadas, esta metodología de obtención ofrece menores niveles de citotoxicidad y hace más efectivo el tratamiento de la terapia fototermal, su implementación no es la esperada (Malínika, 2018; López, 2021; Pechyen et al., 2021).

La síntesis verde de nanobarras de oro inicia con la preparación y el lavado del material vegetal para eliminación de impurezas y una posterior obtención de sus extractos en solventes orgánicos, donde la finalidad es la obtención de los principios activos, que son particularmente antioxidantes. Estos extractos se dejan en reposo por al menos una hora, se protegen de la luz, se almacenan a temperaturas bajo cero y su uso recomendado es posterior a las 24 horas de consecución. Seguidamente y bajo los protocolos de Li et al.(2018) y Scaraberi et al. (2015), se realiza la síntesis de semillas y nanobarras usando CTAB como agente precursor y  $H[AuCl_4]$  para reducción, para finalmente adicionar el extracto del material vegetal que cumple la función de estabilizar.

## 2.3. Fibroblastos 3T3



*Figura 3. Fibroblastos 3T3. Fuente propia.*

Y es que si bien la síntesis verde de nanomateriales tiene como base la disminución de citotoxicidad y el aumento de la biocompatibilidad, esta debe ser corroborada en laboratorio, y para ello, los fibroblastos 3T3 han jugado un papel fundamental en investigación científica, pues son una de las células más utilizadas incluyéndose en múltiples estudios no sólo de terapia fototermal, sino también de análisis protéicos y morfológicos, debido a su sencilla adhesión y fácil cultivo (Mukhopadhyay, 2015).

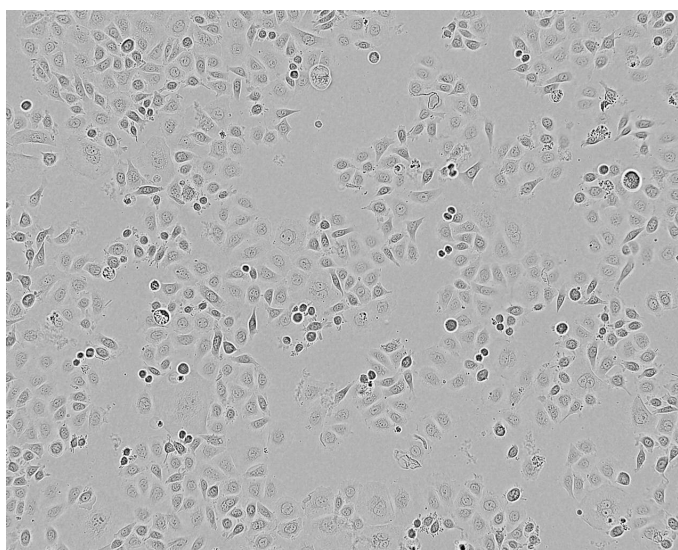
Los fibroblastos son probablemente las células más importantes del estroma en los tejidos y órganos, y sus funciones principales son la producción de la matriz extracelular, el mantenimiento de la homeóstasis, la síntesis de colágeno y la secreción de citoquinas para promover destrucción tisular e incitar la reabsorción ósea (Acosta, 2006). Son células que pueden provenir de cualquier lugar del cuerpo, aunque con funciones heterogéneas que están directamente relacionadas con un microambiente, de modo que la expresión génica de los mismos es específica de cada tejido, organismo y etapa del desarrollo (Alfonso, 2022).

En ese sentido, la línea celular de fibroblastos embrionarios NIH 3T3 es obtenida a partir de un aislamiento en ratón llevado a cabo en 1962 en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Nueva York por George Todaro y Howard Green.

La expresión “3T3” hace referencia al protocolo de inoculación y transferencia celular para la línea y significa “transferencia de 3 días, inóculo 3 x 10<sup>5</sup> células” (Todaro & Green, 1962).

Los fibroblastos NIH 3T3 se duplican entre 20 y 26 horas, y dentro de las condiciones ideales para su crecimiento se encuentra la presencia de suero específico en el medio de cultivo para proporcionar factores de crecimiento adicionales, antibióticos para prevenir el crecimiento bacteriano, 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C de temperatura (NIH3T3.com).

## 2.4. Células gástricas tumorales AGS



*Figura 4. Células AGS. UK Health Security Agency, culture collections.*

A pesar de que un análisis preliminar de la terapia fototermal plasmónica en fibroblastos 3T3 da luces sobre los posibles resultados a obtener, se hace necesaria la continuidad del mismo en células específicas, y teniendo en cuenta que la condición objetivo de este estudio es el cáncer de estómago, las células AGS, particularmente empleadas en estudios de ciencias biomédicas, proyección de medicamentos, interacciones patógeno-huesped y por supuesto, cáncer gástrico (www.cytion.com), son la línea a emplear.

AGS es una línea celular hiperploide, con 49 cromosomas, aislada en 1979 de una paciente blanca de 54 años con adenocarcinoma gástrico no tratado y que muestra una morfología epitelial del tejido estomacal. Son adherentes, su tiempo de duplicación va desde 24 hasta 48

horas y su manutención en condiciones de laboratorio es relativamente fácil, donde exhibe un patrón de crecimiento agresivo con potencial tumorigénico ([www.cytion.com](http://www.cytion.com)).

En investigaciones sobre cáncer gástrico, se usan como modelo para estudiar los mecanismos moleculares y celulares relacionados a la enfermedad, además de proporcionar un medio de exploración para las interacciones entre las células tumorales y *Helicobacter pylori*, dejando en evidencia la relación existente entre los factores bacterianos, la proliferación tumoral, la apoptosis y las respuestas inflamatorias ([www.cytion.com](http://www.cytion.com)).

## Capítulo 3

# Materiales y métodos

Este trabajo hace parte del proyecto "*Terapia fototermal plasmónica basada en nanoestructuras de oro como tratamiento terapéutico de adenocarcinoma gástrico evaluado en un modelo in silico y en un modelo ex vivo*" desarrollado desde la convocatoria RETO DE FOCOS ESTRATÉGICOS AÑO 2022, adscrito al Grupo de Automática y Diseño, Grupo de Óptica y Espectroscopía, Grupo de Energía y Termodinámica, Grupo de Dinámica Cardiovascular, Grupo de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica, Grupo de Investigación e Innovación Ambiental y ejecutado por la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), Universidad de Antioquia (UdeA), Escuela de Ingeniería de Antioquia (EIA) e Institución Universitaria Pascual Bravo (I.U.Pascual Bravo). Su objetivo, como el nombre lo indica, es desarrollar una plataforma de terapia fototermal plasmónica basada en nanopartículas de oro para adenocarcinoma gástrico evaluada en un modelo in silico y en un modelo ex vivo, de modo que previo al desarrollo del presente estudio, se habían ejecutado valoraciones que daban cuenta de posibles resultados prometedores.

Siguiendo una metodología híbrida a partir de la modificación de los métodos con y sin semillas reportados por Scarabelli et al., (2015) y Li et al., (2018) para la síntesis química de nanobarras, y seguida de un proceso de purificación a través de técnicas de centrifugación, se lograron obtener nanobarras por síntesis verde a partir del extracto etanólico de la guayaba agria con una relación de aspecto de 4 y cuya longitud de onda máxima longitudinal se encuentra en 827 nanómetros (Figura 4).

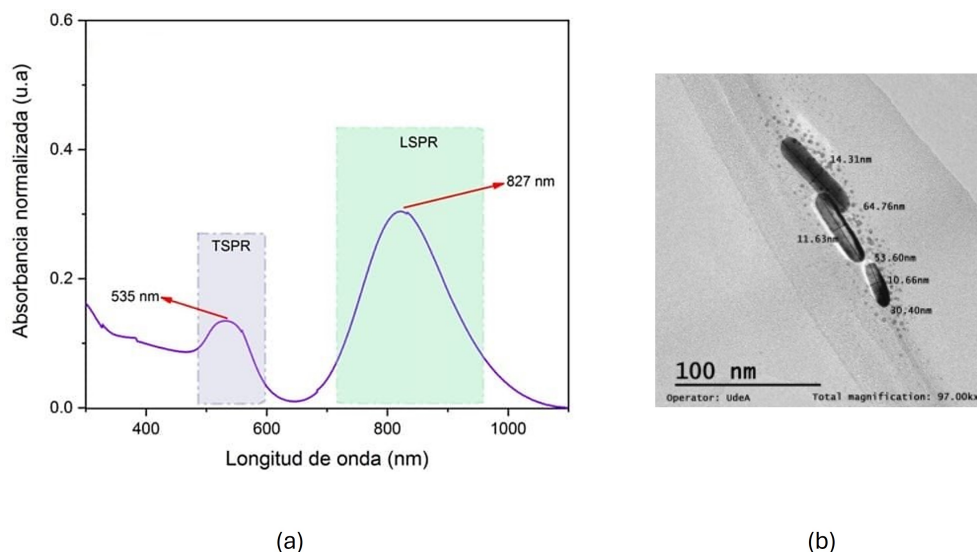


Figura 4. Espectro UV-Vis (a) y micrografías TEM (b) de nanobarras de oro obtenidas con el extracto de la guayaba agria. (Montoya, 2023).

A continuación, estas nanobarras se sometieron a procesos de irradiación de 2100 segundos totales con 4V de potencia y un láser de 840 nm (600 segundos de estabilización del sistema, 900 segundos de irradiación y 600 segundos de relajación del sistema), garantizando la temperatura inicial de 37°C dentro de un incubador con sensor de temperatura, para así representar, de la mejor forma posible, la naturaleza térmica del cuerpo humano. Con las mismas condiciones se realizaron tres mediciones, cada una de ellas posterior al tiempo de relajación del sistema y se determinó la existencia de un aumento promedio máximo de temperatura de 3,6°C, comprobando, en principio, la efectividad de las nanoestructuras, del proceso de irradiación, de la generación de plasmones y de la posible implementación positiva de las nanobarras de oro sintetizadas por métodos verdes en los tratamientos de hipertermia (Figura 5).

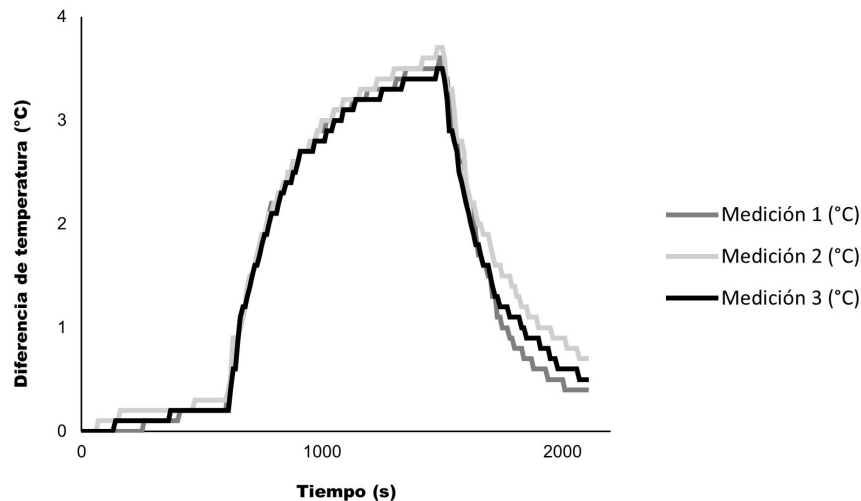


Figura 5. Aumento de temperatura producto de la irradiación de las nanobarras de oro sintetizadas por métodos verdes. (Serna et al, 2023)

Bajo estos parámetros, se definió un protocolo donde el propósito era el estudio del efecto fototermal plasmónico generado por las nanobarras de oro sintetizadas por métodos verdes a partir del extracto etanólico de la guayaba agria sobre células gástricas tumorales. Para ello, el primer paso fue la evaluación de la citotoxicidad de las nanobarras de oro en células, esto con el fin de determinar una concentración efectiva de nanoestructuras que certificara altos porcentajes de viabilidad celular. Como segunda medida se estableció un sistema de irradiación donde mediante luz láser se estimularon las nanobarras internalizadas en las células y se pretendía generar muerte celular. Finalmente y con el objetivo de determinar la vía de muerte celular práctica del procedimiento anterior, se ejecutaron ensayos de citometría de flujo.

### 3.1. Síntesis de nanobarras de oro

Como se mencionó previamente, la síntesis verde de nanobarras de oro se dio siguiendo una metodología híbrida a partir de la modificación de los métodos con y sin semillas reportados por Scarabelli et al., (2015) y Li et al., (2018) para la síntesis química. El proceso inició con la preparación de la guayaba agria que debe usarse completa, en estado de maduración apto para el consumo y con un lavado previo. Como primera medida, la fruta es cortada y

licuada para obtener una mezcla homogénea, y posteriormente, se deja reposar durante una hora para su almacenamiento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Por medio de solventes orgánicos y con base en la propuesta de Contreras-Calderón et. al (2011), se realizó la separación de los principios activos de la guayaba agria y el extracto obtenido se guardó durante 24 horas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y protegido de la luz.

A continuación, a una solución de CTAB al 50 mM, se adicionó  $\text{HAuCl}_4$  al 100 mM y se agitó por 5 min a 400 rpm. Inmediatamente, se agregó  $\text{AgNO}_3$  a 100 mM y se agitó suavemente. Seguidamente, se agregaron 320  $\mu\text{L}$  el extracto de guayaba agria y, por último, para completar la síntesis de semillas, se dispusieron 24  $\mu\text{L}$   $\text{NaBH}_4$  a 10 mM con agitación final de 5 min.

Continuadamente, se agregó  $\text{HCl}$  a 1 M y  $\text{HAuCl}_4$  a 50 mM a una solución de CTAB al 0.1 M bajo 5 minutos de agitación a 400 rpm. Después, se añadió  $\text{AgNO}_3$  a 10 mM y se agitó por 20 segundos. Acto seguido, se agregó ácido ascórbico al 100 mM y se agitó por 30 segundos. Luego, se adicionaron 14.4  $\mu\text{L}$  de solución de semillas y se agitó durante 3 minutos a 500 rpm.

Como medida final, 1.5 mL de la solución resultante se centrifugaron a 5400 rpm durante una hora. Allí, se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet en agua destilada para nuevamente centrifugar a la misma velocidad durante 16 min. El sobrenadante de esta segunda centrifugación corresponde a las nanobarras de oro caracterizadas en la figura 4.

## **3.2. Evaluación de la citotoxicidad de nanobarras de oro**

Si bien se ha reportado que las nanobarras de oro sintetizadas por técnicas verdes son menos citotóxicas que las obtenidas por métodos químicos, determinar una concentración efectiva de las mismas y que garantice un alto porcentaje de viabilidad celular, es fundamental para la terapia fototermal plasmónica. Con ese panorama, el diseño experimental se planteó

en base a definir tanto la concentración de nanobarras como el tiempo de tratamiento.

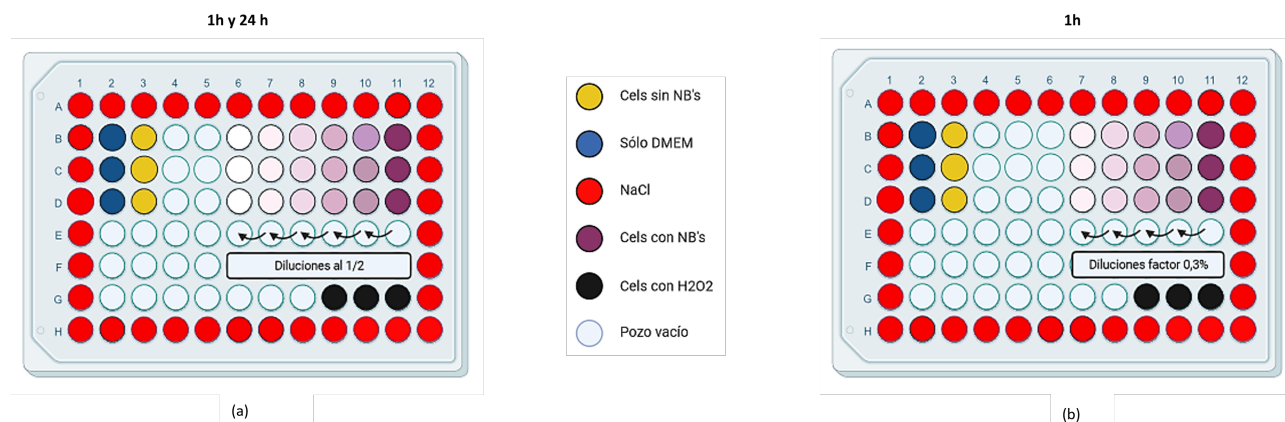


Figura 6. Diseño experimental inicial (a) y definitivo (b) para valoración de citotoxicidad por colorimetría vía reducción de metil tiazol tetrazolio (MTT). Elaborado en *biorender.com*.

En placas de 96 pozos y siguiendo el modelo de la figura 6a, se sembraron 90  $\mu\text{L}$  con 10000 fibroblastos 3T3 y medio de cultivo DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco), y se llevaron a incubadora durante 24 horas (37  $^{\circ}\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ ). Con las nanobarras ya sintetizadas y purificadas, se prepararon diluciones en medio de cultivo con factor de cambio de 1/2, iniciando en 50% v/v y llevándolas hasta 1,56% v/v. Tras retirar el DMEM de los pozos sembrados 24 horas antes, se adicionaron las diluciones y se dio el tiempo estipulado para cada tratamiento. Fundamentado en artículos publicados por otros autores (Kang et al., 2017; Liao et al., 2021; Xie et al., 2021, Zong et al., 2021), los tiempos de internalización de las nanobarras escogidos fueron de 1 hora y 24 horas, y cada uno de los tiempos se efectuó en placas diferentes. Posterior a cada tratamiento, se efectuó la evaluación de citotoxicidad mediante ensayo colorimétrico por reducción de metil tiazol tetrazolio (MTT) (4 horas) con isopropanol ácido frío (15 horas en incushaker a 37  $^{\circ}\text{C}$  y 70 rpm) y lectura de absorbancias (570 nm) en multiskan. Como control positivo se utilizó peróxido de hidrógeno, en los pozos exteriores de cada placa se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  para evitar la evaporación de los tratamientos y también se midió la absorbancia de solo el medio de cultivo. Todos los ensayos se realizaron para un  $n = 3$ .

La viabilidad celular se determinó con la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ celular = \left( \frac{Abs.\ de\ células\ tratadas}{Abs.\ de\ células\ control} - \frac{Abs.\ del\ medio}{Abs.\ del\ medio} \right) \cdot 100$$

*Ecuación 1. Cálculo de viabilidad celular.*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la primera tanda de ensayos, donde sólo se obtuvieron viabilidades celulares prometedoras con 1 hora de interacción células-nanobarras y una concentración de 1,56 % v/v (resultados que serán mostrados y analizados más adelante), se modificó el modelo inicial (Fig. 6a) y se diseñó un nuevo experimento partiendo de esa concentración de nanopartículas, realizando nuevas diluciones con factor de cambio de 0,3 % para llegar a una concentración final también de 0,3 % (Figura 6b).

El protocolo de estas nuevas pruebas fue el mismo utilizado anteriormente: placas de 96 pozos, siembra de 10000 fibroblastos 3T3, 24 horas de incubación a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>, extracción del medio de cultivo, adición de los tratamientos únicamente durante 1 hora, retiro de las diluciones para agregar nuevamente DMEM e iniciar el ensayo de MTT (4 horas) con isopropanol ácido frío (15 horas en incushaker a 37 °C y 70 rpm) y una lectura final de absorbancias en multiskan. La viabilidad celular se determinó con la fórmula previamente descrita.

Con las concentraciones efectivas determinadas en los fibroblastos, se realizó el mismo procedimiento de MTT para las células gástricas tumorales (AGS), manteniendo los mismos tiempos y la misma cantidad de células por pozo (10000).

### **3.3. Irradiación**

Con el objetivo de incidir un aumento de temperatura en las células sanas y tumorales con nanobarras de oro internalizadas y dando continuidad al paso anterior, se puso en marcha el montaje de irradiación que se observa en la figura 7.

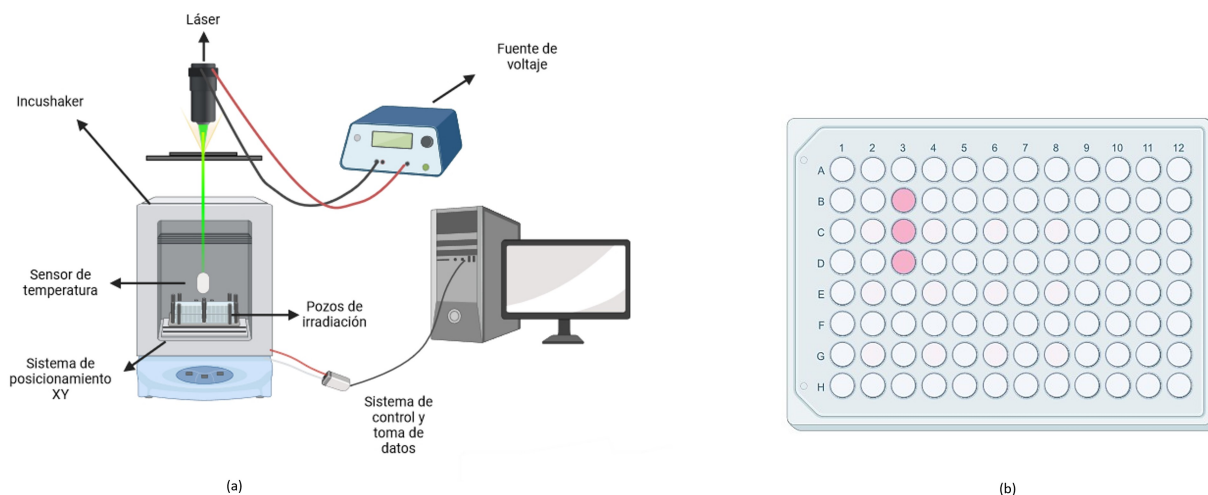


Figura 7. Montaje experimental de irradiación (a) y pozos a utilizar (b). Elaborado en biorender.com.

Dentro de un incubador que permite mantener la temperatura a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 8a), se dispone de un láser cuya longitud de onda es de aproximadamente  $840\text{ nm}$ , un objetivo de microscopio de aumentos (10x) que posibilita direccionar el haz hacia una placa de pozos donde se depositan las muestras distribuidas como se muestra en la figura 4b. La medición de temperatura se realizó a través de un sensor infrarrojo MLX90614 (Figura 8b) y el diodo láser se conecta a una fuente de voltaje (Figura 8a).

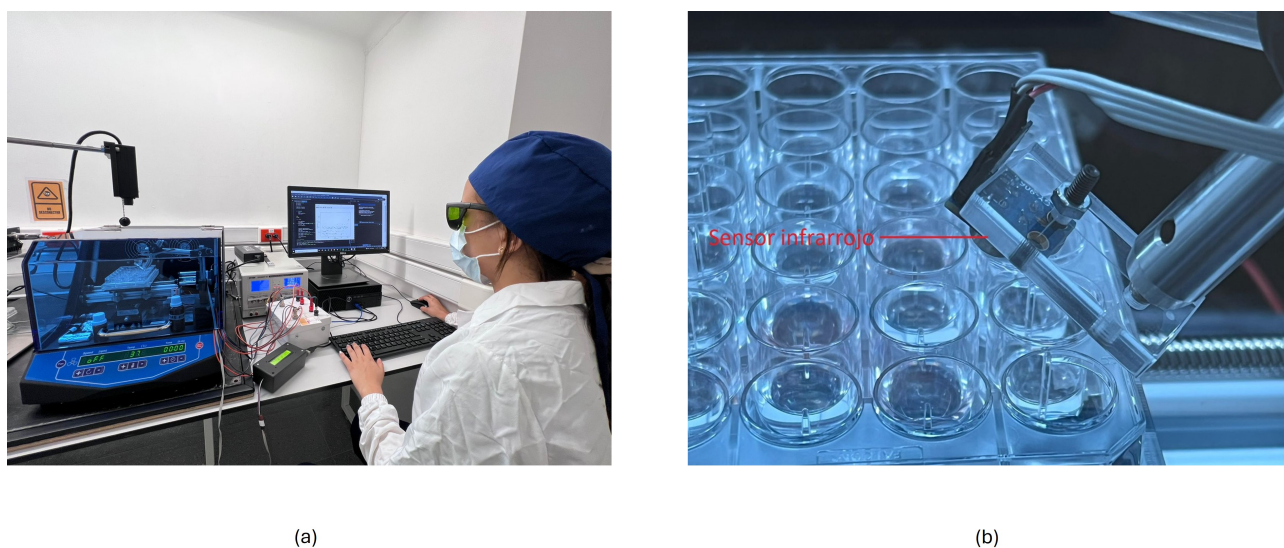


Figura 8. Montaje experimental de irradiación dentro de incubador (a) y sensor infrarrojo MLX90614 para medición de temperatura (b). Banco óptico de irradiación celular para aplicación en terapia fototermal plasmónica. Grupo de Óptica y Espectroscopia y Grupo de Automática y Diseño A+D. Universidad Pontificia Bolivariana.

Adicionalmente, se instaló un desplazador en dos dimensiones para el posicionamiento de cada pozo a irradiar (Figura 9), conformado por una base que se fabricó para fijar la placa de pozos de cultivo y por una configuración ortogonal de actuadores lineales (KIT-2040-CA-25) donde se modificó la carrera de los mismos para ajustarse al espacio de trabajo del incushaker. Para el movimiento del sistema se implementó el uso de motores paso a paso bipolares (NEMA 17 17HD48002-22B) con sus respectivos controladores MA860H, y todo fue programado por medio de la plataforma Arduino. De este modo que fue posible garantizar la correcta incidencia del láser en las muestras. El funcionamiento y posicionamiento de este desplazador se describe en la figura 10.

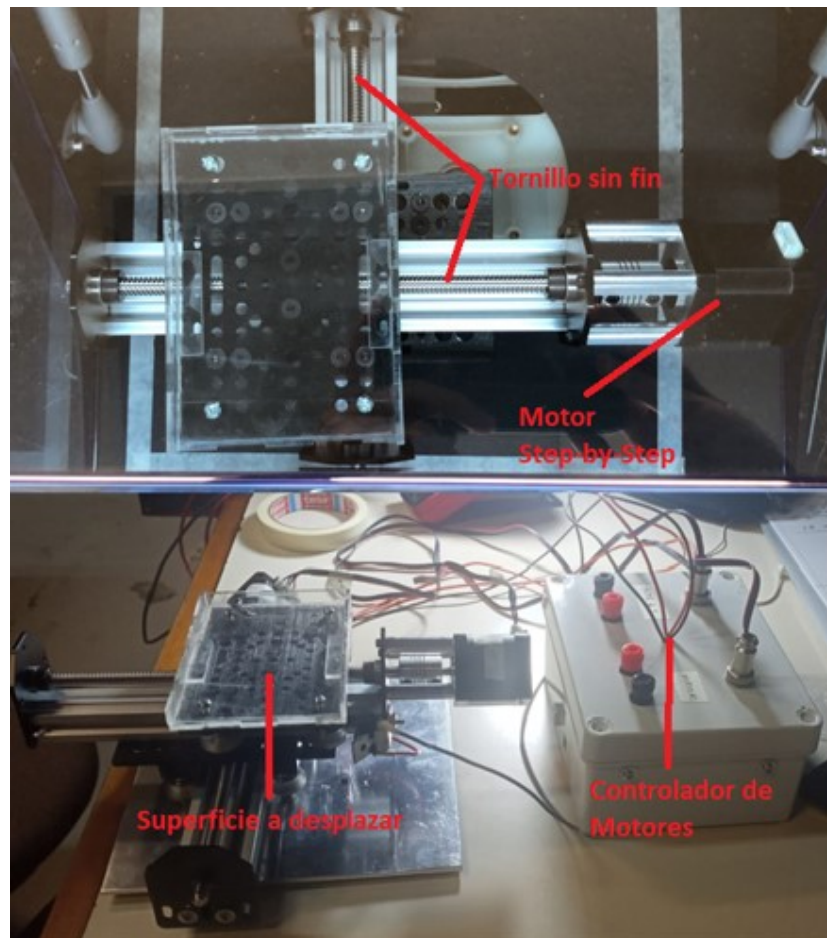
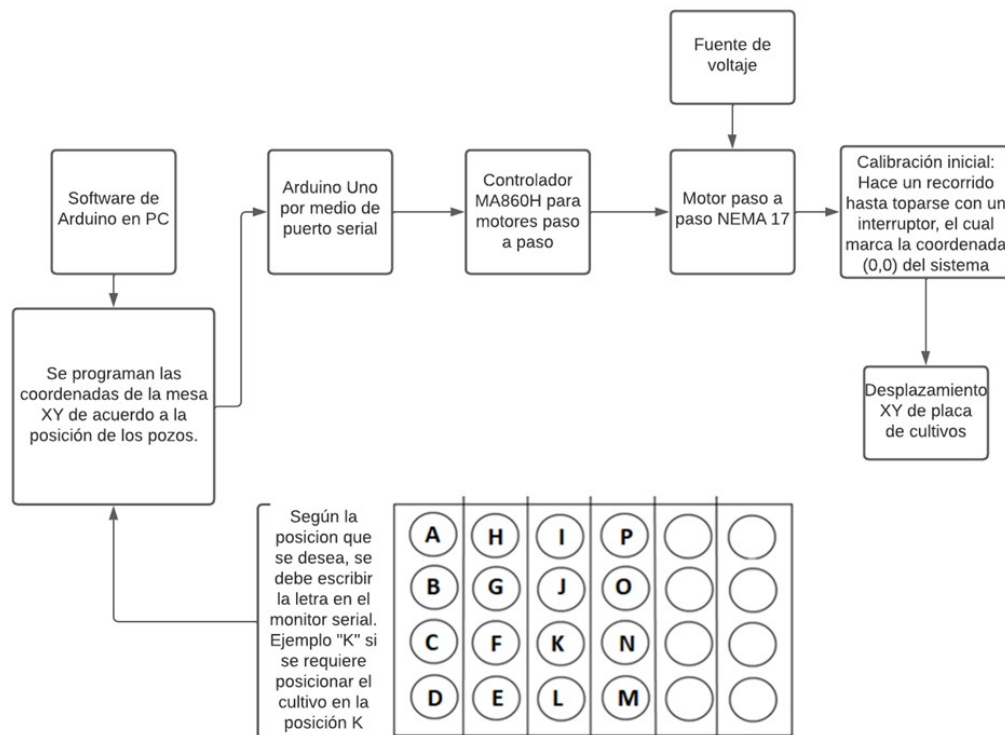


Figura 9. Sistema de desplazamiento en dos dimensiones y su controlador. Banco óptico de irradiación celular para aplicación en terapia fototermal plasmónica. Grupo de Óptica y Espectroscopia y Grupo de Automática y Diseño A+D. Universidad Pontificia Bolivariana.



*Figura 10. Funcionamiento del sistema de desplazamiento en dos dimensiones. Banco óptico de irradiación celular para aplicación en terapia fototermal plasmónica. Grupo de Óptica y Espectroscopia y Grupo de Automática y Diseño A+D. Universidad Pontificia Bolivariana.*

Cada pozo contenía 300  $\mu\text{L}$  de células con su respectivo tratamiento de nanobarras y el procedimiento de irradiación se distribuyó de la siguiente manera: 600 segundos para la estabilización del sistema, 900 segundos de irradiación y finalmente 600 segundos de relajación, cumpliendo con un total de 2100 segundos. Para evitar la evaporación de las muestras, los pozos aledaños a éstas contenían 200  $\mu\text{L}$  de agua. Cada medición se realizó tres veces y para complementar los ensayos, se llevó a cabo un experimento control bajo las condiciones previamente establecidas, pero con agua destilada y desionizada en lugar de las muestras celulares.

Con el fin de mantener el estándar del estudio y garantizar el trabajo bajo las mismas estipulaciones, este protocolo fue utilizado para las células AGS y replicado con los fibroblastos 3T3. Consecuentemente, al terminar el periodo de irradiación en cada placa de pozos, esta fue llevada de inmediato para su análisis citométrico.

### 3.4. Determinación de la vía de muerte celular

Para la determinación de la vía de muerte celular se utilizaron dos pruebas de citometría de flujo: Potencial mitocondrial y Anexina V / 7-AAD.

#### 3.4.1. Potencial mitocondrial

En esta prueba, se empleó el kit comercial Muse® MitoPotential, que, de forma simultánea, permite evaluar los cambios en el potencial mitocondrial (marcador de apoptosis temprana) y la permeabilidad de la membrana plasmática (marcador de muerte). Los resultados obtenidos se expresan en porcentajes de células vivas, despolarizadas/vivas, despolarizadas/muertas y células muertas.

Para la evaluación de los efectos de la terapia fototermal plasmónica sobre células gástricas tumorales y la posterior determinación de vía de muerte, se utilizaron 8 grupos muestrales en los que se incluye el control de células irradiadas sin nanopartículas, un control positivo de células sin irradiar, un conjunto de células con nanopartículas sin irradiar y células con internalización de las 5 diferentes concentraciones de nanobarras expresadas en % v/v que fueron previamente seleccionadas en los ensayos de citotoxicidad por MTT (1,5 % v/v; 1,2 % v/v; 0,9 % v/v; 0,6 % v/v; 0,3 % v/v). Cada conjunto de prueba incluye 3 datos, al igual que en el proceso irradiación.

Se sembraron 10.000 células/pozo, las muestras fueron tratadas con nanobarras para un volumen final de 80  $\mu$ L (completando los 200  $\mu$ L con medio de cultivo) y la identificación de cada grupo se dio con las siguientes etiquetas:

Grupo muestral	Nomenclatura de marcación
Control células irradiadas sin NB's	CC-IRR
1,5 % v/v Nanobarras de oro síntesis verde	T1
1,2 % v/v Nanobarras de oro síntesis verde	T2
0,9 % v/v Nanobarras de oro síntesis verde	T3
0,6 % v/v Nanobarras de oro síntesis verde	T4
0,3 % v/v Nanobarras de oro síntesis verde	T5
Control + sin irradiar	Control +
Control células con NB's sin irradiar	CC-SIRR

Tabla 7. Etiquetado de muestras utilizadas en la prueba de potencial mitocondrial

### 3.4.2. Anexina V / 7-AAD

En este ensayo se empleó un kit comercial de detección de apoptosis Anexina V con 7-AAD (7-aminoactinomicina D), que permite evaluar la translocación del fosfolípido fosfatidilserina (marcador de apoptosis media) y la integridad de la membrana celular (marcador de apoptosis tardía/muerte). Los resultados obtenidos se expresan indicando la positividad de los marcadores [Anexina(-) / 7-AAD(+), Anexina(+)/ 7-AAD(+), Anexina(-) / 7-AAD(-), Anexina(+)/ 7-AAD(-)] y en términos porcentuales. El protocolo, los grupos muestrales y los tiempos de cada prueba son los mismos utilizados en la evaluación de potencial mitocondrial, y la interpretación de los resultados se da de la siguiente manera:

Positividad de los marcadores	Resultado
Anexina(-) / 7-AAD(-)	Células vivas / viables
Anexina(+)/ 7-AAD(-)	Apoptosis media
Anexina(+)/ 7-AAD(+)	Apoptosis tardía
Anexina(-) / 7-AAD(+)	Células muertas / necrosis

Tabla 8. Interpretación de los resultados obtenidos en la prueba de Anexina V con 7-AAD posterior a la aplicación de la terapia fototermal plasmónica en células AGS.

## Capítulo 4

# Resultados y Análisis

### 4.1. Citotoxicidad de nanobarras de oro en fibroblastos 3T3

Los niveles de citotoxicidad causados por las nanobarras de oro en fibroblastos 3T3 están dados por el porcentaje de viabilidad celular, es decir, por la cantidad de células vivas antes y después del tratamiento. De acuerdo con Kim et al. (2018), Liao et al. (2021) y Xie et al. (2021), , este parámetro disminuye a medida que la concentración de nanopartículas aumenta, a menos que, dichas estructuras cuenten con un recubrimiento que maximice su biocompatibilidad. Para este caso en particular, y aunque las nanobarras son sintetizadas por métodos verdes, se esperaba que la tendencia fuera inversamente proporcional, de modo que al aumentar el porcentaje volumétrico de estas, la proporción de células vivas debía disminuir. Al respecto y aunque con algunas aristas, este estudio pudo comprobar dicho efecto en 1 hora de interacción células-nanobarras.

En los ensayos realizados con el primer modelo propuesto, se encontró que para 1 hora de tratamiento, el mayor porcentaje de viabilidad celular (63,21 %) corresponde a una concentración volumétrica de nanobarras de 1,56 % v/v . Sin embargo, las demás concentraciones mostraron niveles de citotoxicidad muy elevados, imposibilitando su uso en terapia fototermal plasmónica (Figura 11). Incluso, el control positivo utilizado (10  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno al 5 %), fue menos tóxico.

Por medio de ese mismo modelo, los experimentos de 24 horas de tratamiento desvelaron niveles de citotoxicidad muy altos para todas las concentraciones evaluadas. Contrario a lo observado en las pruebas de 1 hora, aquí el mayor porcentaje de viabilidad celular se encontró en la concentración más alta de nanobarras (50%), lo cual puede deberse en parte a la capacidad de regeneración de las células, pues, como se explicó previamente en este escrito, el tiempo de duplicación de los fibroblastos 3T3 está entre 20 y 26 horas (Figura 11).

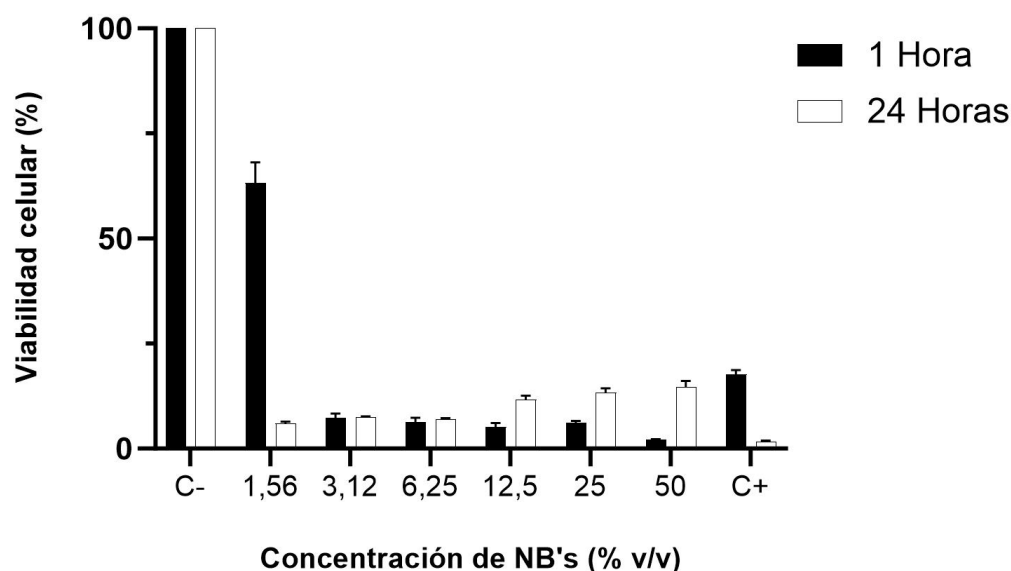


Figura 11. Viabilidad celular para las diferentes concentraciones de nanobarras de oro evaluadas. Tiempos de tratamiento: 1 hora y 24 horas.

Por más que parece incuestionable la desigualdad entre los resultados obtenidos con tiempos de tratamiento y concentraciones diferentes, se planteó un análisis ANOVA para corroborarlo estadísticamente (Tabla 9). Los valores conseguidos en este test demuestran que efectivamente existen diferencias significativas en ambos factores.

Con estos resultados, y teniendo en cuenta que la viabilidad celular mínima para proceder con los procedimientos de irradiación de terapia fototermal es del 70%, se modificó el protocolo de evaluación de citotoxicidad como se muestra en la figura 6 y se comenzaron las nuevas pruebas.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de los cuadrados	Valor F	Valor P	Valor crítico para F
Concentraciones NB's	1179,517591	5	235,9035183	0,7005806	0,6471462	5,050329058
Tiempos de Tratamiento	75,82034165	1	75,82034165	0,225169429	0,6551298	6,607890974
Error	1683,628681	5	336,7257363			
<b>Total</b>	<b>2938,966615</b>	<b>11</b>				

Tabla 9. Test Anova de dos factores para los múltiples parámetros utilizados en la primera etapa de pruebas de citotoxicidad.

En esta segunda etapa (mismas condiciones previas pero sólo 1 hora de tratamiento), se constató nuevamente la relación existente entre concentración de nanobarras y citotoxicidad. El mayor nivel de viabilidad (84,56 %) se ubicó con el 0,3 % v/v de nanobarras, mientras que los niveles más bajos (60 %) se vincularon con el 1,5 % v/v (Figura 12). Los tiempos de tratamiento intermedios (3 horas y 7 horas) que se habían considerado para evaluación, fueron descartados, tomando en consideración que a mayor número de horas de interacción células-nanopartículas, menor iba a ser la viabilidad celular.

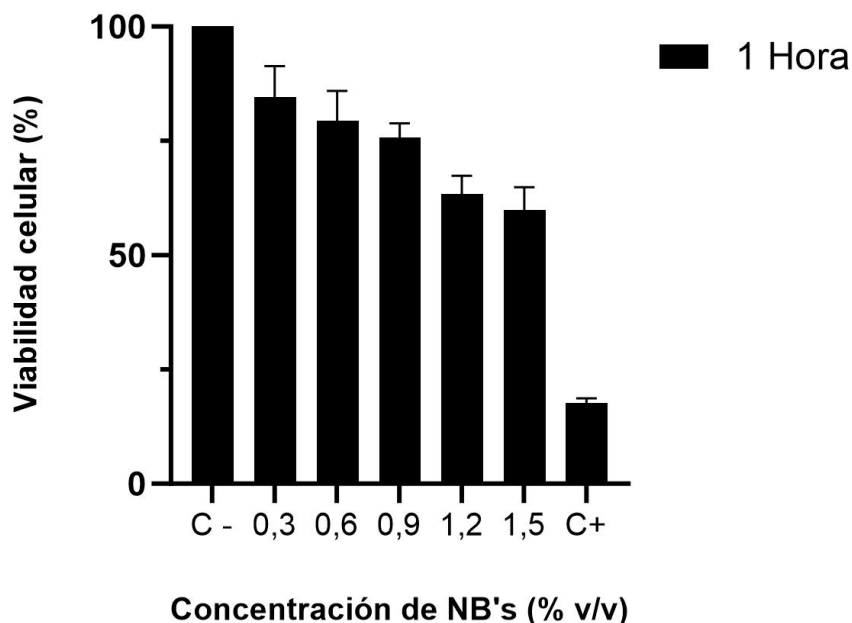


Figura 12. Viabilidad celular para las diferentes concentraciones de nanobarras de oro evaluadas en la segunda etapa de ensayos. Tiempo de tratamiento: 1 hora.

Con el fin de valorar la capacidad de las nanobarras de oro obtenidas del extracto de guayaba verde para reducir la viabilidad de los fibroblastos 3T3 bajo las condiciones propuestas en la segunda etapa de ensayos de citotoxicidad, se estimó la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) (Figura 13). Considerando que el valor de  $IC_{50}$ , para este caso en particular, define la concentración de nanobarras necesaria para disminuir la tasa de supervivencia celular en un 50 %, un porcentaje volumétrico de 1,798 % v/v en tratamientos de 1 hora, causaría dicho efecto.

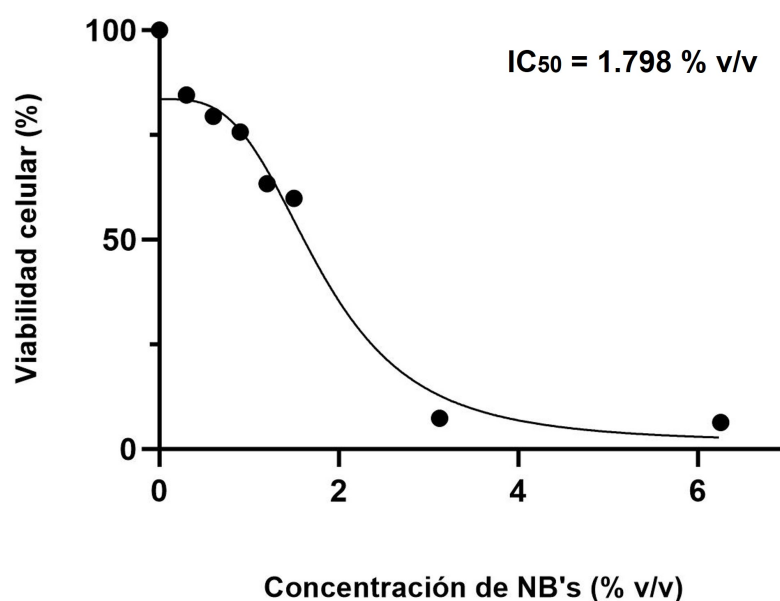


Figura 13.  $IC_{50}$  para la concentración de nanobarras en % v/v vs Viabilidad celular. Tiempo de tratamiento: 1 hora.

## 4.2. Vía de muerte celular

Los resultados mostrados en este apartado son los obtenidos como producto del procedimiento de irradiación que fue descrito en el capítulo 3, sección 3.3. A pesar de que el proceso metodológico corresponde a una descripción del montaje, los efectos de su implementación

se evidencian en el tipo de muerte celular detectado a través de las pruebas de citometría de flujo.

#### 4.2.1. Potencial mitocondrial

En concordancia con lo publicado por Kim et al. (2018), Liao et al. (2021), Xie et al. (2021), Zhao et al. (2021) y Zong et al. (2021), se evidencia que la concentración de nanobarras utilizada en la terapia fototermal tiene una influencia directa en la muerte celular. Con una concentración efectiva de 1,5 % v/v de nanopartículas, se obtuvo una despolarización total de 96,1 %, y a medida que dicha concentración disminuye, también lo hace la efectividad del tratamiento (Figura 14).

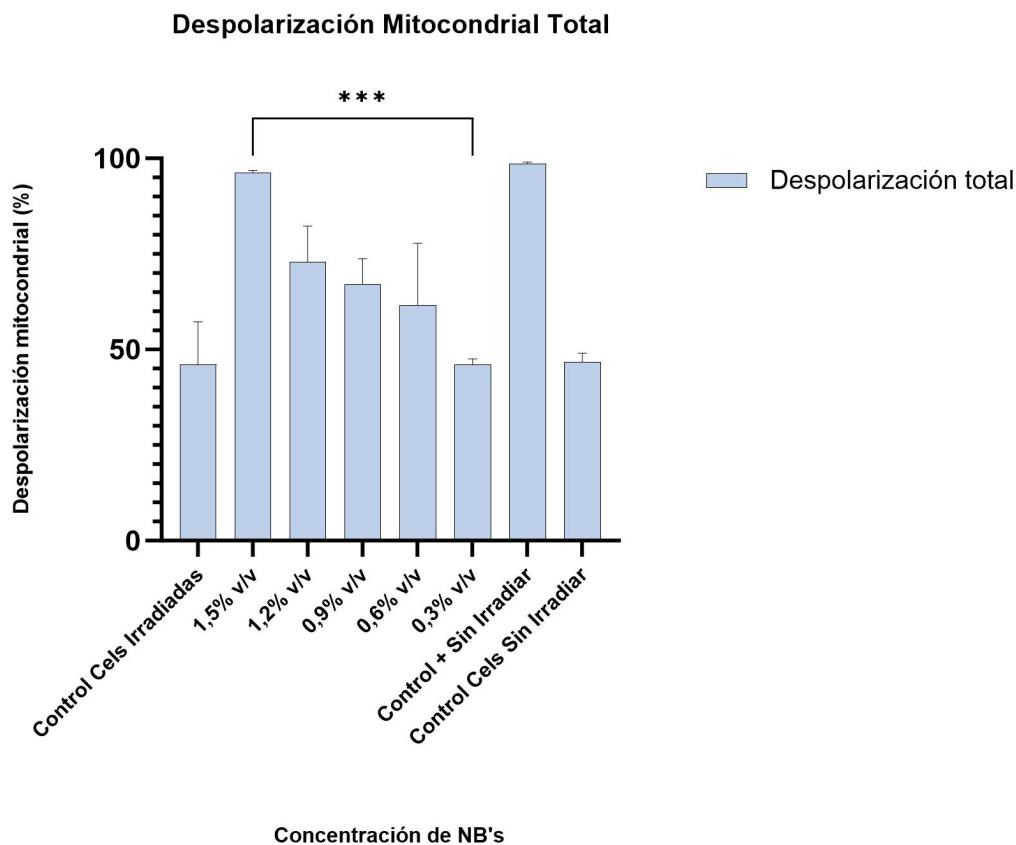


Figura 14. Despolarización mitocondrial total por cada grupo muestral.

Si bien el porcentaje de células muertas se mantiene bajo en todas las condiciones evaluadas, la diferencia principal, además de la despolarización total, se encuentra en las células muertas que manifiestan pérdida de potencial mitocondrial. Aquí, nuevamente se comprueba que al incrementar la concentración de nanobarras, lo hace igualmente el porcentaje de células despolarizadas/muertas (Figura 15). Por su parte, los grupos control con células irradiadas sin nanobarras y células con nanobarras, pero sin irradiar, presentan prácticamente el mismo porcentaje de despolarización mitocondrial total que el obtenido con la menor concentración de nanopartículas valorada (0,3% v/v), demostrando no sólo el poco efecto real del tratamiento con tan poca cantidad de nanoestructuras metálicas, sino también la importancia de complementar la internalización de las mismas con un correcto protocolo de irradiación (Tabla 10.)

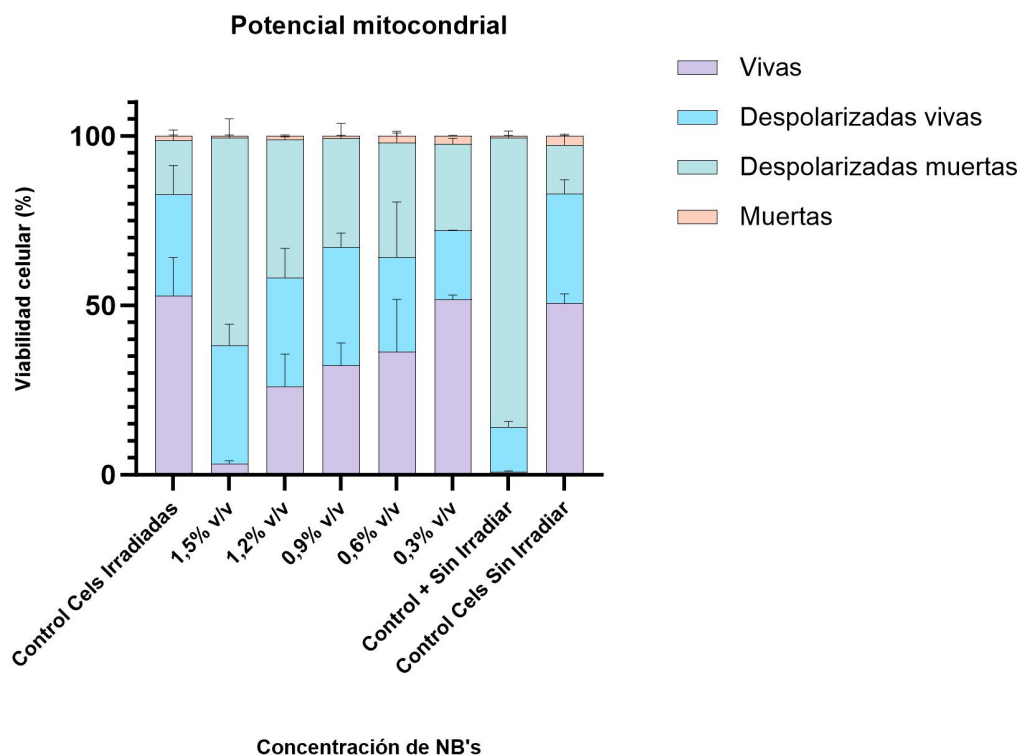


Figura 15. Porcentaje de células vivas, muertas, y en estado apoptótico por cada muestra para la prueba de potencial mitocondrial.

	Vivas (%)	Despolarizadas vivas (%)	Despolarizadas muertas (%)	Despolarizadas totales (%)	Muertas (%)
Control céls. irradiadas sin NB's	52,76	30,06	15,93	46	1,23
1,5% v/v	3,33	34,86	61,26	96,16	0,53
1,2% v/v	26,06	31,96	40,9	72,86	1,1
0,9% v/v	32,23	34,83	32,23	67,06	0,73
0,6% v/v	36,3	27,93	33,66	61,63	2,06
0,3% v/v	51,65	20,4	25,55	46	2,35
Control + sin irradiar	0,86	13,3	85,3	98,6	0,53
Control céls. con NB's sin irradiar	50,63	32,23	14,46	46,7	2,66

*Tabla 10. Porcentaje de células vivas, muertas, despolarizadas vivas, despolarizadas muertas y despolarizadas totales por cada muestra en prueba de potencial mitocondrial*

Estadísticamente, por medio de análisis de varianza ANOVA, se desarrollaron todas las comparaciones posibles para encontrar las diferencias entre los resultados logrados en el laboratorio y su significancia. Se tomó como punto de partida el porcentaje de células vivas resultante y posterior a la aplicación de la terapia fototermal en células AGS con nanobarras de oro internalizadas, encontrándose una disparidad importante para este ítem. Nada sorprendente, teniendo en cuenta que los valores van desde el 3,3% hasta 51,65% (Tabla 11).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<b>Entre grupos</b>	3719,843333	4	929,9608333	12,44319487	0,000676748	3,478049691
<b>Dentro de los grupos</b>	747,365	10	74,7365			
<b>Total</b>	4467,208333	14				

*Tabla 11. Análisis ANOVA de un factor para el porcentaje de células vivas obtenido luego de la aplicación de la terapia fototermal plasmónica en un cultivo AGS.*

En consecuencia, se planteó la misma comparación, pero con el porcentaje de células muertas post tratamiento. Aunque en principio, el efecto fototermal se muestra similar para este apartado, el test de varianza expone desemejanzas relevantes (Tabla 12).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	7,869333333	4	1,967333333	12,57082002	0,000649464	3,478049691
Dentro de los grupos	1,565	10	0,1565			
<b>Total</b>	<b>9,434333333</b>	<b>14</b>				

*Tabla 12. Análisis ANOVA de un factor para el porcentaje de células muertas obtenido luego de la aplicación de la terapia fototermal plasmónica en un cultivo AGS.*

Respecto a la despolarización total, se esperaba una diferencia significativa por los porcentajes obtenidos. El test de varianza lo comprobó (Tabla 13).

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	4018,990667	4	1004,747667	12,69668161	0,000623839	3,478049691
Dentro de los grupos	791,3466667	10	79,13466667			
<b>Total</b>	<b>4810,337333</b>	<b>14</b>				

*Tabla 13. Análisis ANOVA de un factor para el porcentaje de células con despolarización mitocondrial total obtenido luego de la aplicación de la terapia fototermal plasmónica en un cultivo AGS.*

Con el fin de comprobar la divergencia entre los datos obtenidos de la aplicación de terapia fototermal con la menor concentración evaluada de nanopartículas (0,3% v/v) y los grupos control de células sin irradiar y células irradiadas, pero sin nanobarras, se plantearon análisis de varianza en donde se compararon los porcentajes de células vivas (Tabla 14), células muertas (Tabla 15) y despolarización mitocondrial total (Tabla 16). Como se había escrito previamente, los resultados expusieron que no existen diferencias significativas cuando de células vivas y despolarización total se habla, aunque sí las hay a nivel de células muertas, sin existir una desigualdad sustancial en estos últimos valores. Con esto, se reafirma la importancia de una cantidad suficiente de nanopartículas internalizadas y del proceso de irradiación para un efecto real de la terapia fototermal plasmónica. Además, permite descartar la implementación de bajas concentraciones de nanobarras.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P	Valor crítico para F
Entre grupos	6,831666667	2	3,415833333	0,07417707	0,929345347	5,14325285
Dentro de los grupos	276,2983333	6	46,04972222			
<b>Total</b>	<b>283,13</b>	<b>8</b>				

Tabla 14. Análisis ANOVA de un factor para la comparación de efectos resultantes de la aplicación de terapia fototermal plasmónica en grupos control y células AGS con el 0,3 % v/v de nanobarras de oro internalizadas. Células vivas.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P	Valor crítico para F
Entre grupos	3,401666667	2	1,700833333	14,6133652	0,004941249	5,14325285
Dentro de los grupos	0,698333333	6	0,116388889			
<b>Total</b>	<b>4,1</b>	<b>8</b>				

Tabla 15. Análisis ANOVA de un factor para la comparación de efectos resultantes de la aplicación de terapia fototermal plasmónica en grupos control y células AGS con el 0,3 % v/v de nanobarras de oro internalizadas. Células muertas.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P	Valor crítico para F
Entre grupos	0,98	2	0,49	0,011005465	0,989074791	5,14325
Dentro de los grupos	267,14	6	44,52333333			
<b>Total</b>	<b>268,12</b>	<b>8</b>				

Tabla 16. Análisis ANOVA de un factor para la comparación de efectos resultantes de la aplicación de terapia fototermal plasmónica en grupos control y células AGS con el 0,3 % v/v de nanobarras de oro internalizadas. Células con despolarización mitocondrial.

De igual forma, se realizó la misma observación estadística pero comparando los resultados obtenidos con la mayor concentración de nanobarras evaluada (1,5 % v/v) y el control positivo. Aquí, se mostró que sí existen diferencia entre las varianzas del porcentaje de células vivas (Tabla 17) y despolarizadas totales (Tabla 18), pero no en el de células muertas (Tabla 19). Además, vale la pena destacar que tanto el control positivo como dicha concentración de nanopartículas, manifestaron células en apoptosis por encima del 95 %, pudiendo así considerarse esta como la cantidad de nanopartículas ideal para la aplicación de terapia fototermal plasmónica con los parámetros de irradiación definidos en este estudio.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P	Valor crítico para F
Entre grupos	9,126666667	1	9,126666667	24,77828054	0,007609327	7,708647422
Dentro de los grupos	1,473333333	4	0,368333333			
<b>Total</b>	<b>10,6</b>	<b>5</b>				

Tabla 17. Análisis ANOVA de un factor para la comparación de efectos resultantes de la aplicación de terapia fototermal plasmónica en grupo control positivo y células AGS con el 1,5 % v/v de nanobarras de oro internalizadas. Células vivas.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P	Valor crítico para F
Entre grupos	8,881666667	1	8,881666667	23,57964602	0,008303955	7,708647422
Dentro de los grupos	1,506666667	4	0,376666667			
<b>Total</b>	<b>10,38833333</b>	<b>5</b>				

Tabla 18. Análisis ANOVA de un factor para la comparación de efectos resultantes de la aplicación de terapia fototermal plasmónica en grupo control positivo y células AGS con el 1,5 % v/v de nanobarras de oro internalizadas. Células con despolarización mitocondrial.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P	Valor crítico para F
Entre grupos	2,77556E-17	1	2,77556E-17	6,40513E-16	0,999999981	7,708647422
Dentro de los grupos	0,173333333	4	0,043333333			
<b>Total</b>	<b>0,173333333</b>	<b>5</b>				

Tabla 19. Análisis ANOVA de un factor para la comparación de efectos resultantes de la aplicación de terapia fototermal plasmónica en grupo control positivo y células AGS con el 1,5 % v/v de nanobarras de oro internalizadas. Células muertas.

Finalmente, mediante un análisis de varianza de dos factores, se cuantificó la relación entre todas las concentraciones de nanobarras estudiadas y el porcentaje alcanzado de células despolarizadas vivas y muertas (Tabla 20). La evidencia sugiere que tanto en las concentraciones evaluadas, como en el tipo de despolarización inducida y la interacción entre ambos factores, existen diferencias estadísticamente significativas.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Concentraciones evaluadas	2010,879667	4	502,7199167	10,85305669	7,64223E-05	2,866081402
Desp. vivas y desp. muertas	570,7240833	1	570,7240833	12,32117651	0,00220272	4,351243503
Interacción	693,653	4	173,41325	3,743762222	0,019746279	2,866081402
Dentro del grupo	926,4116667	20	46,32058333			
<b>Total</b>	<b>4201,668417</b>	<b>29</b>				

*Tabla 20. Análisis ANOVA de dos factores para la comparación de los efectos resultantes de la aplicación de terapia fototermal plasmónica en todas las concentraciones de nanobarras estudiadas.*

#### **4.2.2. Anexina V / 7-AAD**

A modo de comentario preliminar, los efectos aquí observados difícilmente se creerían positivos. Tanto las concentraciones de nanobarras estudiadas como los grupos control revelaron niveles de apoptosis considerablemente bajos (Figura 16). El mayor porcentaje se obtuvo con el grupo control de células irradiadas sin nanopartículas, resultado antagónico al mostrado en el test de potencial mitocondrial. A su vez, no parece existir una relación evidente entre la concentración de nanobarras y la respuesta al tratamiento, pues más allá de el aspecto a considerar (Células vivas, muertas o apoptóticas), no hay una tendencia concluyente en las estimaciones alcanzadas (Figura 17).

Ahora bien, teniendo en cuenta que un kit de Anexina V/7-AAD no detecta los estados apoptóticos tempranos, cabe la posibilidad de que dentro del porcentaje de células consideradas vivas/sanas/viables se encuentre una cantidad de células con pérdida de potencial mitocondrial. Sin embargo, cualquier valor estimado aquí sería especulativo.

Al igual que en el ensayo de potencial mitocondrial, se plantearon análisis ANOVA de un factor para determinar diferencias entre los resultados conseguidos en el laboratorio y su relevancia. Al comparar los efectos de la terapia fototermal en todas las concentraciones de nanobarras estudiadas, se encontró que existe una disparidad significativa cuando se habla de células vivas (Tabla 21) y células necróticas (Tabla 22) pero no en apoptosis total (Tabla 23), lo cual permitiría afirmar que bajo este ensayo, la cantidad de nanopartículas no tiene injerencia directa en el impacto del tratamiento.

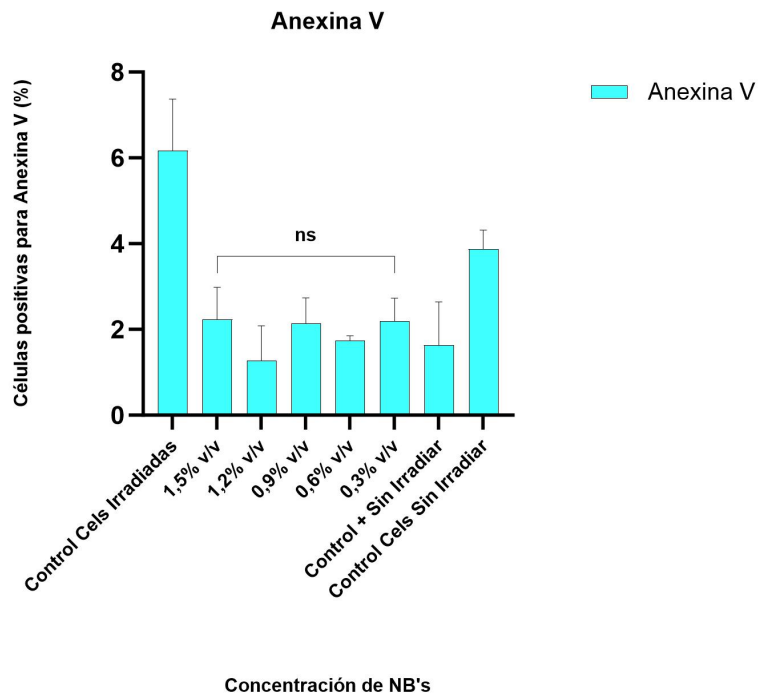


Figura 16. Positividad total para Anexina V por cada grupo muestral.

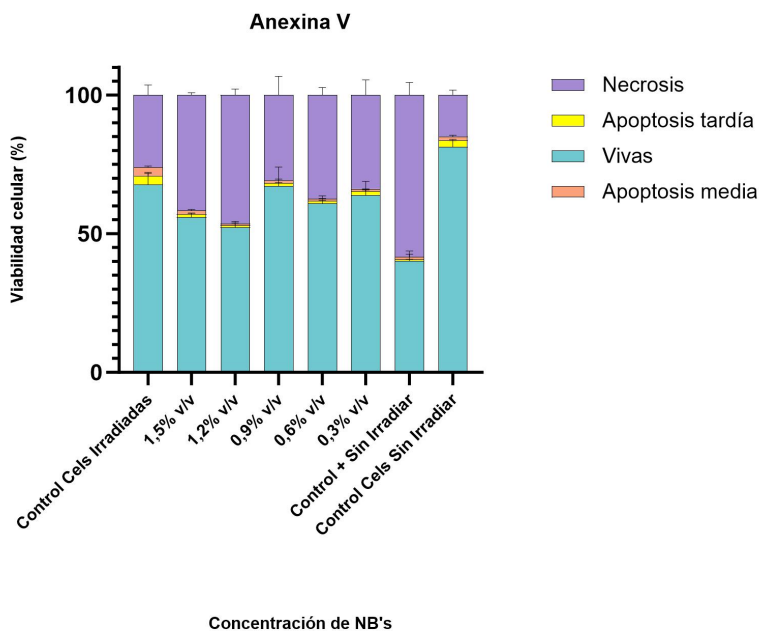


Figura 17. Porcentaje de células vivas, necróticas y en estado apoptótico por cada muestra en test de Anexina V/7-AAD

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<b>Entre grupos</b>	424,644	4	106,161	6,134346469	0,009263667	3,478049691
<b>Dentro de los grupos</b>	173,06	10	17,306			
<b>Total</b>	597,704	14				

*Tabla 21. Análisis ANOVA de un factor para el porcentaje de células vivas obtenido luego de la aplicación de la terapia fototermal plasmónica en un cultivo AGS. Prueba Anexina V/γ-AAD.*

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor crítico para F</i>
<b>Entre grupos</b>	464,2293333	4	116,0573333	6,618736218	0,007170218	3,478049691
<b>Dentro de los grupos</b>	175,3466667	10	17,53466667			
<b>Total</b>	639,576	14				

*Tabla 22. Análisis ANOVA de un factor para el porcentaje de células necróticas obtenido luego de la aplicación de la terapia fototermal plasmónica en un cultivo AGS. Prueba Anexina V/γ-AAD.*

Para terminar, a través de un análisis de varianza de dos factores, se ponderó la relación entre todas las concentraciones de nanobarras estudiadas y el porcentaje alcanzado de células en apoptosis media y tardía (Tabla 24). La demostración apunta a que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas, el tipo de apoptosis inducida ni la interacción de los factores, de modo que este test de Anexina V insinúa nuevamente que la cantidad de nanopartículas no jugaría un papel sustancial en la terapia, al menos bajo los parámetros definidos en este estudio.

\*Debido a la inexistencia de una disparidad real en los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones de nanobarras valoradas, las comparaciones estadísticas que involucran los grupos de control muestral fueron descartadas para los ensayos con Anexina V/γ-AAD.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P	Valor crítico para F
Entre grupos	2,050666667	4	0,512666667	1,361061947	0,314395368	3,478049691
Dentro de los grupos	3,766666667	10	0,376666667			
<b>Total</b>	<b>5,817333333</b>	<b>14</b>				

Tabla 23. Análisis ANOVA de un factor para el porcentaje de células apoptóticas obtenido luego de la aplicación de la terapia fototermal plasmónica en un cultivo AGS. Prueba Anexina V/γ-AAD.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P	Valor crítico para F
Concentraciones evaluadas	1,098666667	4	0,274666667	2,215053763	0,103968914	2,866081402
Apoptosis media y tardía	0,3	1	0,3	2,419354839	0,135527026	4,351243503
Interacción	0,333333333	4	0,083333333	0,672043011	0,619046624	2,866081402
Dentro del grupo	2,48	20	0,124			
<b>Total</b>	<b>4,212</b>	<b>29</b>				

Tabla 24. Análisis ANOVA de dos factores para la comparación de los efectos resultantes de la aplicación de terapia fototermal plasmónica en todas las concentraciones de nanobarras estudiadas. Prueba Anexina V/γ-AAD.

Por primera vez en cuatro años de investigación relacionada con la aplicación de terapia fototermal plasmónica en la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), se consiguieron resultados positivos y prometedores ante una futura implementación médica del tratamiento. Bajo los criterios experimentales analizados, tanto los fibroblastos 3T3 como las células gástricas tumorales (AGS) mostraron un comportamiento acorde a lo reportado en la literatura, y los altos porcentajes de muerte celular apoptótica conseguidos con las concentraciones de nanobarras estimadas, principalmente con el 1,5% v/v, dan cuenta del éxito de este estudio.

Si bien no es algo completamente innovador a nivel mundial, el producto de este proceso sí representa un avance significativo nacional e incluso regional, y demuestra que la síntesis verde de nanobarras de oro a partir del extracto etanólico de la guayaba agria (*Psidium guineense*) desarrollada desde la metodología híbrida propuesta por el Grupo de Dinámica Cardiovascular de la UPB, forma nanoestructuras cilíndricas que a bajas concentraciones no sólo son de reducida citotoxicidad, sino que también al ser incluidas en un tratamiento de terapia fototermal plasmónica, ofrecen resultados promisorios.

## Capítulo 5

# Conclusiones y Recomendaciones

La terapia fototermal plasmónica, aunque emergente, es presente y futuro en la investigación y lucha contra el cáncer. Este estudio demostró de manera concluyente que las nanobarras de oro sintetizadas por métodos verdes, una vez internalizadas en células gástricas tumorales, son biocompatibles a bajas concentraciones y mantienen altos niveles de viabilidad durante la primera hora de tratamiento, conservando la integridad mitocondrial necesaria para evadir los procesos de muerte necrótica. Además, tienen la capacidad de generar un efecto fototermal plasmónico bajo la irradiación láser específica empleada. Dicho impacto se manifestó en la inducción de apoptosis en las células tratadas, que comprobado mediante los análisis de citometría de flujo propuestos, alcanzó hasta un 96 % de muerte celular por esta vía, validando así la capacidad de dichas nanoestructuras para inducir un tipo de muerte celular controlada y beneficiosa, y subrayando la selectividad de la terapia en la eliminación de células tumorales. Sin embargo, vale la pena recalcar que altas concentraciones de nanobarras y mayores tiempos de tratamiento impactan negativamente la factibilidad del procedimiento, pues si bien las nanopartículas empleadas son de origen verde, no cuentan con un recubrimiento que aisle por completo los remanentes de los compuestos provenientes de la síntesis y que generan la citotoxicidad, que a posteriori, favorece la destrucción de los tejidos, de modo que si se quisiera trabajar con grandes cantidades de nanobarras de oro, se recomienda utilizar revestimientos como la albúmina o el polietilenglicol (PEG). Asimismo, una alta concentración de nanobarras también impactaría los aumentos de temperatura, pues a mayor cantidad de nanopartículas mayor será la potencia del tratamiento, por lo tanto,

dicha variación obligaría a reestructurar y replantear los parámetros de irradiación.

Desde una perspectiva clínica, los hallazgos de esta investigación sugieren un potencial significativo para la terapia fototermal plasmónica como estrategia terapéutica. Al reducir la necesidad de tratamientos invasivos y la toxicidad generalizada y asociada con otros procedimientos, esta técnica podría mejorar la calidad de vida de los pacientes al tiempo que favorece su eficacia.

No obstante, para avanzar hacia aplicaciones médicas, es crucial abordar varios desafíos y realizar pruebas adicionales, incluyendo la optimización de las dosis de nanobarras de oro y los parámetros de irradiación láser en diferentes tipos celulares a los evaluados aquí, todo con el fin de maximizar la capacidad terapéutica y minimizar los posibles efectos adversos. Además, la validación preclínica de estos hallazgos será fundamental para garantizar la seguridad a largo plazo de esta tecnología.

En resumen, este estudio ha establecido una sólida plataforma para futuras investigaciones en el campo de la terapia fototermal plasmónica utilizando nanobarras de oro sintetizadas por métodos verdes. Los resultados obtenidos no solo han ampliado significativamente nuestro entendimiento sobre las aplicaciones potenciales de las nanoestructuras metálicas en oncología, sino que también han delineado una vía prometedora hacia procedimientos más efectivos. Estos hallazgos alientan a continuar explorando y refinando la técnica, con el objetivo último de mejorar los resultados clínicos y la calidad de vida de los pacientes.

## Referencias

Abe, H., & Ushiku, T. (2022). Pathological Diversity of Gastric Cancer from the Viewpoint of Background Condition. In *Digestion* (Vol. 103, Issue 1). <https://doi.org/10.1159/000519337>

Acosta, A. (2006). El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. *Univ Odontol* 2006 Jun-Dic; 25(57):26-33.

Alfonso, S. (2022). Caracterización de fibroblastos aislados de la mucosa palatina de individuos con defectos de labio y/o paladar hendido no sindrómico en cultivo 2D y 3D. Universidad de Antioquia, Facultad de Odontología. Medellín, Colombia.

Ali, M. R. K., Wu, Y., Tang, Y., Xiao, H., Chen, K., Han, T., Fang, N., Wu, R., & El-Sayed, M. A. (2017). Targeting cancer cell integrins using gold nanorods in photothermal therapy inhibits migration through affecting cytoskeletal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(28), E5655–E5663. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703151114>

An, L., Wang, Y., Tian, Q., & Yang, S. (2017). Small gold nanorods: Recent advances in synthesis, biological imaging, and cancer therapy. In *Materials* (Vol. 10, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma10121372>

Ashrafi, S. J., Yazdian, F., Zaremi, A. S. H., Mohhammadnejad, J., & Dinarvand, R. (2016). Thermal distribution of silica coated gold nano rods in tissue-like phantom as in vitro model for plasmonic photo thermal therapy. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 9(3), 1189–1201. <https://doi.org/10.13005/bpj/1067>

Chen, Y. & Ming, H. (2012). Review of Surface Plasmon Resonance and Localized Surface Plasmon Resonance Sensor. *Photonic Sensors* (2012) Vol. 2, No. 1: 37–49. <https://doi.org/10.1007/s13320-011-0051-2>

Chen, D., Tang, Y., Zhu, J., Zhang, J., Song, X., Wang, W., Shao, J., Huang, W., Chen, P., & Dong, X. (2019). Photothermal-pH-hypoxia responsive multifunctional nanoplatform for cancer photo-chemo therapy with negligible skin phototoxicity. *Biomaterials*, 221. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119422>

Cheong, J. K., Popov, V., Alchera, E., Locatelli, I., Alfano, M., Menichetti, L., Armanetti, P., Maturi, M., Franchini, M. C., Ooi, E. H., & Chiew, Y. S. (2021). A numerical study to investigate the effects of tumour position on the treatment of bladder cancer in mice using gold nanorods assisted photothermal ablation. *Computers in Biology and Medicine*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2021.104881>

Chicheł, A., Skowronek, J., Kubaszewska, M., & Kanikowski, M. (2007). Hyperthermia - Description of a method and a review of clinical applications. In *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* (Vol. 12, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/S1507-1367\(10\)60065-X](https://doi.org/10.1016/S1507-1367(10)60065-X)

Chueh, P., Lian, R-Y., Lee, Y-H., Zeng, Z-M., Chuang, S-M. (2014). Differential cytotoxic effects of gold nanoparticles in different mammalian cell lines. *Journal of Hazardous Materials* 264 (2014) 303-312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.031>

Cobley, C. M., Au, L., Chen, J., & Xia, Y. (2010). Targeting gold nanocages to cancer cells for photothermal destruction and drug delivery. In *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 7, Issue 5, pp. 577–587). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.1517/17425240903571614>

Contreras-Calderón, L. Calderón-Jaimes, E. Guerra-Hernández, and B. García-Villanova, (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, vol. 44, no. 7, pp. 2047–2053, Aug. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.003>

Corzo, A. (2012). Síntesis de nanopartículas de oro obtenidas por reducción de H[AuCl<sub>4</sub>].

Rev. Soc. Quím. Perú v.78 n.2 Lima abr./jun. 2012. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2012000200003](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2012000200003)

Espinosa, Y. (2013). Automatización de un sentido de resonancia de plasmones de superficie para medición de índice de refracción. Centro de Investigaciones en óptica A.C. <https://cio.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1002/808/1/03124.pdf>

Grupo de Óptica y Espectroscopia; Grupo de Automática y Diseño A+D. (2023). Banco óptico de irradiación celular para aplicación en terapia fototermal plasmónica. Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.

Gutierrez-Cruz, F. V., Ancira-Cortez, A., Camacho-López, M. A., Isaac-Olivé, K. y Jiménez-Mancilla, N. (2022). Calentamiento de nanopartículas de oro inducido por excitación fotónica y multifotónica. 30(2). Postprint. ISSN: 2395-8782 Sección: Ciencias de la Salud Humana. Universidad Autónoma del Estado de México, México. <https://cienciaergosum.uaemex.mx/article/download/15908/14451>

Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., Hazle, J. D., Halas, N. J., & West, J. L. (2003). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23). <https://doi.org/10.1073/pnas.2232479100>

Kalpana, D., Tirupathi, P.B., Sankarganesh, A., Park, W., Lee, S., Wahab, R., Cha, Y., Lee, Y. (2013). Biogenesis of Gold Nanoparticles Using Plant Powders and Assessment of In Vitro Cytotoxicity in 3T3-L1 Cell Line. *J Pharm Innov* (2013) 8:265–275. DOI 10.1007/s12247-013-9166-x

Kang, X., Guo, X., An, W., Niu, X., Li, S., Liu, Z., Yang, Y., Wang, N., Jiang, Q., Yan, C., Wang, H., & Zhang, Q. (2017). Photothermal therapeutic application of gold nanorod-porphyrin-trastuzumab complexes in HER2-positive breast cancer. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep42069>

Kim, D., & Kim, H. (2021). Induction of apoptotic temperature in photothermal therapy under various heating conditions in multi-layered skin structure. *International Journal of*

Molecular Sciences, 22(20). <https://doi.org/10.3390/ijms222011091>

Kim, H. S., & Lee, D. Y. (2018). Near-infrared-responsive cancer photothermal and photodynamic therapy using gold nanoparticles. In *Polymers* (Vol. 10, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/polym10090961>

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. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.664123>

López, A., Lucero, J. (2021). Síntesis verde de Nanopartículas de oro y plata. Universidad de Sonora. División de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Física. Posgrado en Nanotecnología. Tesis Doctoral. Hermosillo, Sonora. México

Louis, C., & Pluchery, O. (2017). Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology 2nd Edition. In *Gold Nanoparticles For Physics, Chemistry And Biology (Second Edition)*.

Lucioni, A. (2012). Síntesis de Nanopartículas de oro Obtenidas por Reducción de  $H[AuCl]_4^{a*}$ . In *Rev Soc Quím Perú* (Vol. 78, Issue 2).

Malínkina, M. (2018). Estudio de la Obtención de Nanopartículas de Oro utilizando Extracto de Raspo de Uva. Universitat Politècnica de Catalunya. BarcelonaTech.

Montoya, Y. (2023). Informe técnico: Síntesis de nanobarras de oro obtenidas a partir del extracto etanólico de guayaba agria. Terapia fototermal plasmónica basada en nanoestructuras de oro como tratamiento terapéutico de adenocarcinoma gástrico evaluado en un modelo in silico y en un modelo ex vivo.

Mukhopadhyay, R. (2015). Generating the 3T3 cell line, the oncogene hypothesis and horses. *ASBMB TODAY, The Member Magazine Of The American society for biochemistry and molecular biology*. <https://www.asbmb.org/asbmb-today/people/010115/generating-the-3t3-cell-line>

Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., & Azab, A. K. (2015). The role of hypoxia in

cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*, 83. <https://doi.org/10.2147/hp.s93413>

Oliveros, R., Pinilla Morales, R. E., Facundo Navia, H., & Sánchez Pedraza, R. (2019). Cáncer gástrico: una enfermedad prevenible. Estrategias para intervención en la historia natural. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 34(2). <https://doi.org/10.22516/25007440.394>

Onaciu, A., Braicu, C., Zimta, A. A., Moldovan, A., Stiufuc, R., Buse, M., Ciocan, C., Buduru, S., & Berindan-Neagoe, I. (2019). Gold nanorods: From anisotropy to opportunity. An evolution update. In *Nanomedicine* (Vol. 14, Issue 9, pp. 1203–1226). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0409>

Pechyen, C., Ponsanti, K., Tangnorawich, B., & Ngernyuang, N. (2021). Waste fruit peel – Mediated green synthesis of biocompatible gold nanoparticles. *Journal of Materials Research and Technology*, 14, 2982–2991. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.08.111>

Pérez-Hernández M. (2016). Estudio del Mecanismo Molecular de Apoptosis y de la Seguridad de la Terapia Fototermal Aplicada al Tratamiento del Cáncer Utilizando Nanoprismas de Oro Funcionalizados. Universidad de Zaragoza. <https://digital.csic.es/handle/10261/127970>

Pérez-Hernández, M., del Pino, P., Mitchell, S. G., Moros, M., Stepien, G., Pelaz, B., Parak, W. J., Gálvez, E. M., Pardo, J., & de La Fuente, J. M. (2015). Dissecting the molecular mechanism of apoptosis during photothermal therapy using gold nanoprismes. *ACS Nano*, 9(1), 52–61. <https://doi.org/10.1021/nn505468v>

Portillo Miño, J. D., Araujo Prado, L. M., Melo Yepes, J. M., & Carlosama Rosero, Y. H. (2021). Características sociodemográficas e histopatológicas en pacientes con cáncer gástrico en una población con alto riesgo en Colombia. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 36(1). <https://doi.org/10.22516/25007440.544>

Pratap, D., Shah, R. K., Khandekar, S., & Soni, S. (2021). Photothermal effects in small gold nanorod aggregates for therapeutic applications. <http://arxiv.org/abs/2108.12200>

Rawla, P., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: Global trends, risk factors and prevention. In *Przegląd Gastroenterologiczny* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.5114/pg.2018.80001>

Rivas, M. (2018). Síntesis de Nanopartículas de Oro y Plata para su aplicación en Terapias Alternativas de Cáncer: Terapia Fotodinámica y Terapia Fototérmica.

Rivas-Ortiz, C. I., Morales-Guerrero, S. E., Ponce-De-león-rosales, S., Gamboa-Domínguez, A., Rangel-Escareño, C., Uscanga-Domínguez, L. F., Aguilar-Gutiérrez, G. R., Kershenobich-Stalnikowitz, D., López-Vidal, Y., & Castillo-Rojas, G. (2022). Overview of Gene Expression Analysis in Gastric Disease Infected with *Helicobacter pylori*: CLDN1 and MMP9 Could Be Biomarkers for Early Diagnosis of Gastric Cancer. *Processes*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/pr10020196>

Rodríguez-Oliveros, R., Paniagua-Domínguez, R., Sánchez-Gil, J., Macías, D. (2015). Plasmon spectroscopy: Theoretical and numerical calculations, and optimization techniques. *Nanospectroscopy 2015*; 1:67–96. <https://doi.org/10.1515/nansp-2015-0006>

Rojas Montoya, V., & Montagné, N. (2019). Generalidades del cáncer gástrico. *Revista Clínica Escuela de Medicina UCR-HSJD*, 9(2). [https://doi.org/10.15517/rc\\_ucr-hsjd.v9i2.37351](https://doi.org/10.15517/rc_ucr-hsjd.v9i2.37351)

Sitarz, R., Skierucha, M., Mielko, J., Offerhaus, G. J. A., Maciejewski, R., & Polkowski, W. P. (2018). Gastric cancer: Epidemiology, prevention, classification, and treatment. In *Cancer Management and Research* (Vol. 10). <https://doi.org/10.2147/CMAR.S149619>

Soond, S. M., & Zamyatnin, A. A. (2022). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: a lysosomal protease perspective. In *Gastric Cancer* (Vol. 25, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s10120-021-01272-8>

Taylor, M. L., Wilson, R. E., Amrhein, K. D., & Huang, X. (2022). Gold Nanorod-Assisted Photothermal Therapy and Improvement Strategies. *Bioengineering*, 9(5), 200. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9050200>

Todaro, G., Green, G. (1962). Quantitative Studies of the Growth of Mouse Embryo Cells in Culture and their Development into Established Lines. From the Department of Pathology, New York University School of Medicine, New York. <https://rupress.org/jcb/article-pdf/17/2/299/1534908/299.pdf>

Willets, K., Van Duyne, R. (2007). Localized Surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu Rev Phys Chem.* 2007;58:267-97. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.58.032806.104607>

Xie, L., Zhang, X., Chu, C., Dong, Y., Zhang, T., Li, X., Liu, G., Cai, W., & Han, S. (2021). Preparation, toxicity reduction and radiation therapy application of gold nanorods. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01209-4>

Yang, M., Liu, Y., Hou, W., Zhi, X., Zhang, C., Jiang, X., Pan, F., Yang, Y., Ni, J., & Cui, D. (2017). Mitomycin C-treated human-induced pluripotent stem cells as a safe delivery system of gold nanorods for targeted photothermal therapy of gastric cancer. *Nanoscale*, 9(1). <https://doi.org/10.1039/c6nr06851k>

Yang, Y., Zhang, J., Xia, F., Zhang, C., Qian, Q., Zhi, X., Yue, C., Sun, R., Cheng, S., Fang, S., Jin, W., Yang, Y., & Cui, D. (2016). Human CIK Cells Loaded with Au Nanorods as a Theranostic Platform for Targeted Photoacoustic Imaging and Enhanced Immunotherapy and Photothermal Therapy. *Nanoscale Research Letters*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1468-8>

Zhang, X. D., Wu, D., Shen, X., Liu, P. X., Yang, N., Zhao, B., Zhang, H., Sun, Y. M., Zhang, L. A., & Fan, F. Y. (2011). Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2071–2081. <https://doi.org/10.2147/ijn.s21657>

Zhang, Y., Zhan, X., Xiong, J., Peng, S., Huang, W., Joshi, R., Cai, Y., Liu, Y., Li, R., Yuan, K., Zhou, N., & Min, W. (2018). Temperature-dependent cell death patterns induced by functionalized gold nanoparticle photothermal therapy in melanoma cells. *Scientific*

Reports, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26978-1>

Zhao, S., Luo, Y., Chang, Z., Liu, C., Li, T., Gan, L., Huang, Y., & Sun, Q. (2021). BSA-Coated Gold Nanorods for NIR-II Photothermal Therapy. *Nanoscale Research Letters*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03627-7>

Zong, Q., Dong, N., Yang, X., Ling, G., & Zhang, P. (2021). Development of gold nanorods for cancer treatment. In *Journal of Inorganic Biochemistry* (Vol. 220). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111458>

# Anexos

## Anexo 1. Informe de Vigilancia Tecnológica

### Terapia Fototermal

En los últimos años, la investigación en Terapia Fototermal se ha fortalecido. Muestra de ello es la cantidad de publicaciones científicas que incluyen en su cuerpo el término “Photothermal Therapy” y el aumento de papers relacionados con el tema en el pasar de los años (Figura 1.1). Muchas bases de datos presentan ese incremento, pero Scopus es una en donde es más evidente.

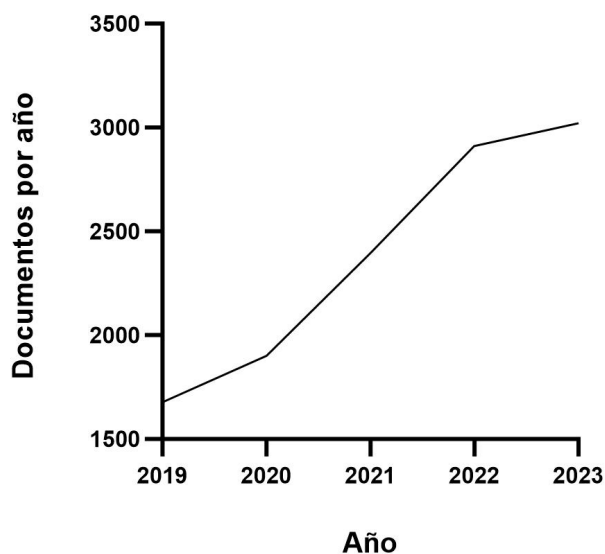


Figura 1.1. Registro del término “Photothermal Therapy” de los últimos 5 años en la base de datos Scopus. Elaboración propia basada en los datos obtenidos de la plataforma.

De esta búsqueda, se obtiene una lista de los principales autores investigadores en el tema, siendo todos de origen asiático (Figura 1.2), relacionándose con el interés de búsquedas web obtenido desde Google Trends (Figura 1.3) donde se muestra a Corea del Sur como el país con más interés en la Terapia Fototermal, y con el origen de los estudios publicados que muestra a China como el país con más cantidad de estudios en este campo (Figura 1.4).

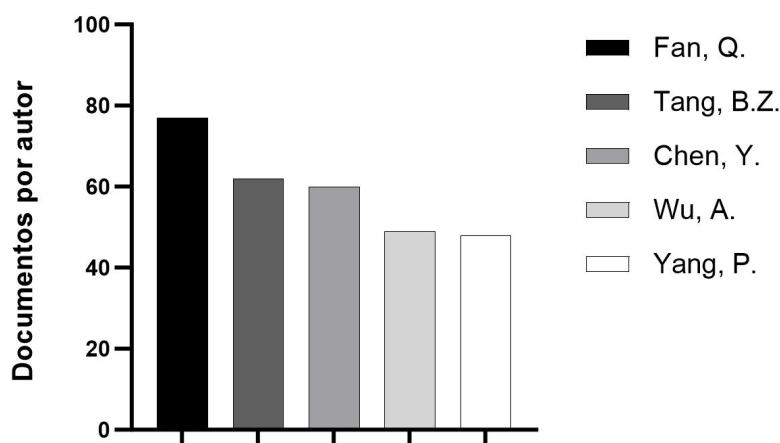


Figura 1.2. . Principales autores de documentos relacionados con la Terapia Fototermal.  
Fuente: Scopus. Elaboración propia basada en los datos obtenidos de la plataforma.



Figura 1.3. Interés en Terapia Fototermal desglosado por regiones. Fuente: Google Trends.

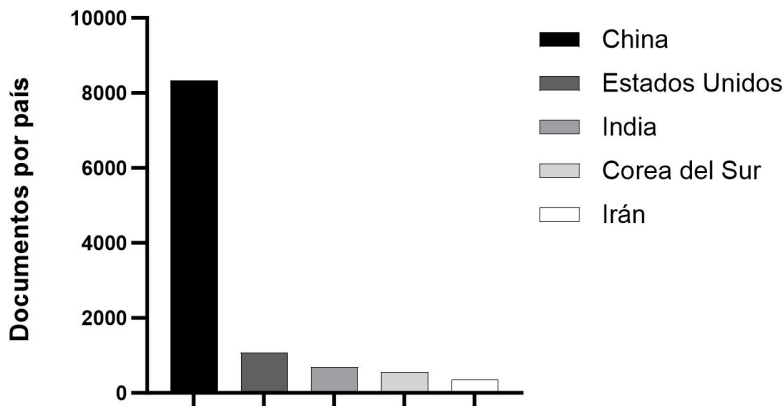


Figura 1.4. Países con más publicaciones relacionadas con la Terapia Fototermal. Fuente: Scopus. Elaboración propia basada en los datos obtenidos de la plataforma.

Adicionalmente, a través de Scopus se hizo el desglose de los tipos de publicaciones relacionadas con la terapia fototermal, encontrando que entre Reviews y Artículos, se tiene más del 95 % de las mismas (Figura 1.5).

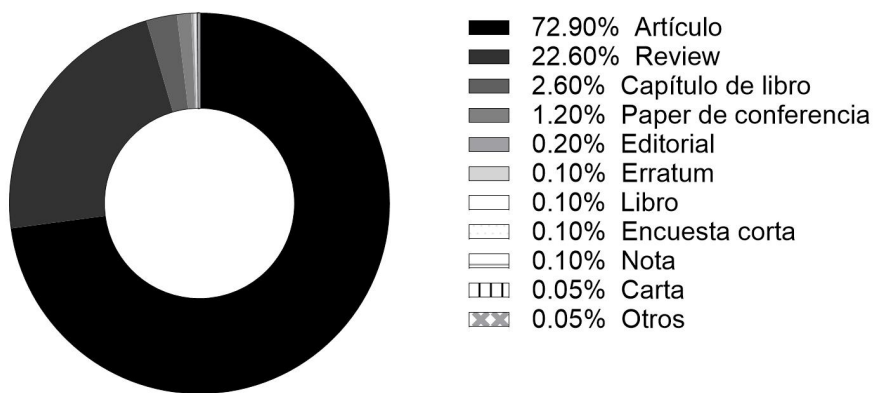


Figura 1.5. Tipos de publicaciones relacionadas con la Terapia Fototermal. Fuente: Scopus. Elaboración propia basada en los datos obtenidos de la plataforma.

Asimismo, se realizó la búsqueda de términos relacionados en la plataforma Carrot2.

Aquí, se obtiene que la Terapia de Tumores (Tumor Therapy) es el término documental más relacionado (Figura 1.6).

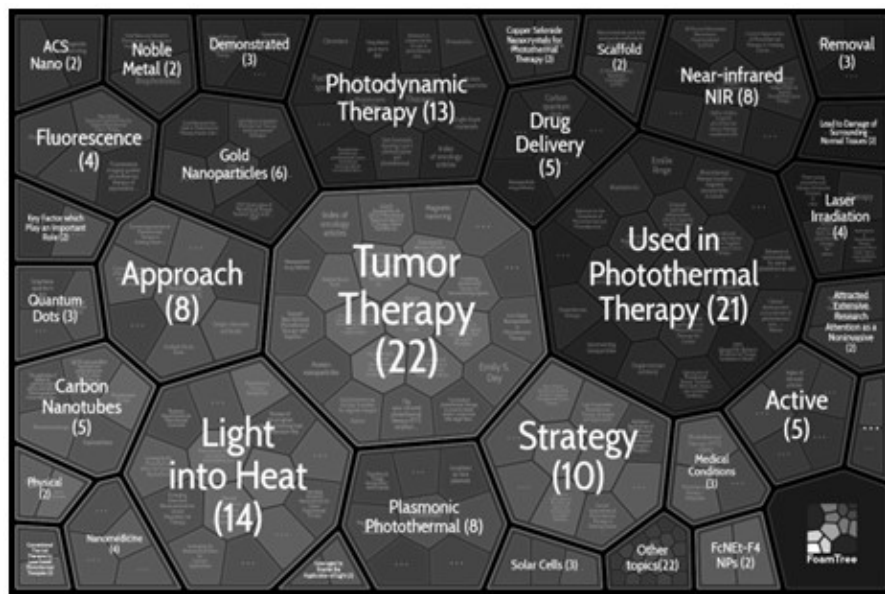


Figura 1.6. Términos documentales más relacionados con la Terapia Fototermal. Fuente: Carrot2

## Nanobarras de Oro

Al igual que la atención en la terapia fototermal, el interés en las nanobarras de oro y su aplicación en tratamiento tumoral ha venido en aumento, pues estas son acreedoras de un potencial que transmite seguridad y efectividad en el tratamiento en cuestión (An et al., 2017; Zong et al., 2021). En función de corroborar y establecer un seguimiento a la producción científica conexas con las nanobarras de oro, se realizó una búsqueda en la base de datos Scopus, dejando en evidencia un crecimiento en los escritos relacionados al tema particular, aunque en los últimos 5 años el número ha decaído. (Figura 1.7).

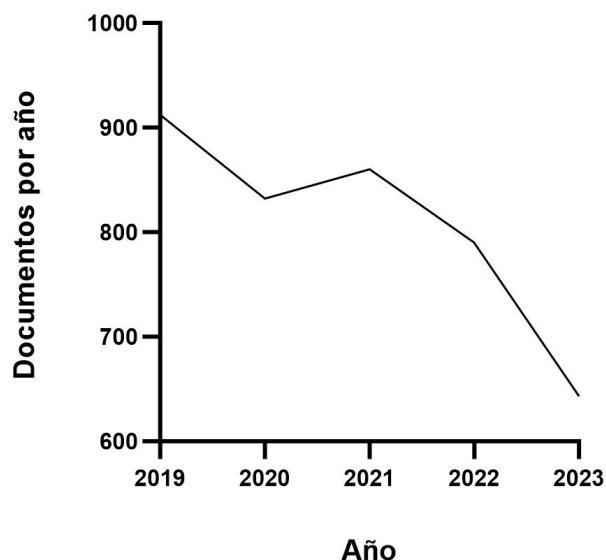


Figura 1.7. Registro del término “Gold Nanorods” de los últimos 5 años en la base de datos Scopus. Elaboración propia basada en los datos obtenidos de la plataforma.

De esta misma búsqueda, se elabora una lista con los principales autores investigadores en el tema (Figura 1.8). Aquí, la tendencia es más variada en comparación con los trabajos realizados en terapia fototermal. Según Google Trends, son India y Estados Unidos las regiones que presentan un mayor interés en las nanobarras de oro (Figura 1.9), a pesar de que Scopus muestra que nuevamente China aventaja a los demás países en cuanto a publicaciones se refiere (Figura 1.10)

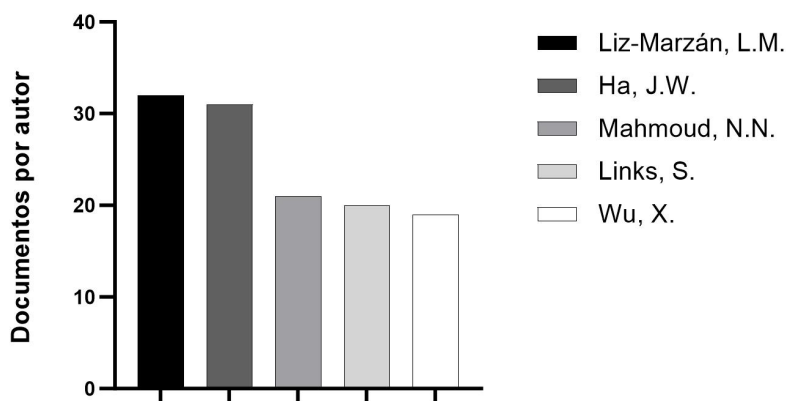


Figura 1.8. Principales autores de documentos relacionados con nanobarras de oro. Fuente: Scopus. Elaboración propia basada en los datos obtenidos de la plataforma.



Figura 1.9. Interés en Nanobarras de oro desglosado por regiones. Fuente: Google Trends

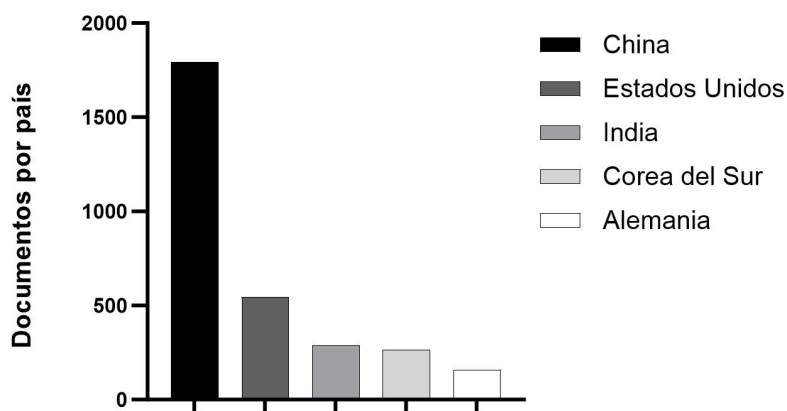


Figura 1.10. Países con más publicaciones relacionadas con las nanobarras de oro. Fuente: Scopus. Elaboración propia basada en los datos obtenidos de la plataforma

De igual forma, a través de Scopus se hizo la segregación de los tipos de publicaciones relacionadas con nanobarras de oro, encontrando que entre Reviews y Artículos, se tiene casi el 95 % de las mismas (Figura 1.11)

