

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Telecomunicación



**Aplicación de Terapia Fototérmica
mediada por Nanopartículas de Oro
Biofuncionalizadas en Modelos Murinos
de Glioblastoma y Melanoma**

TESIS DOCTORAL

Presentada para optar al título de Doctor por:

Javier Domingo Díez

Grado en Biología Mención Sanitaria
Máster en Gestión y Desarrollo de Tecnologías Biomédicas

Madrid, 2024



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingenieros de
Telecomunicación

Doctorado en Ingeniería Biomédica

**Aplicación de Terapia Fototérmica
mediada por Nanopartículas de Oro
Biofuncionalizadas en Modelos Murinos
de Glioblastoma y Melanoma**

TESIS DOCTORAL

Presentada para optar al título de Doctor por:

Javier Domingo Díez

Grado en Biología Mención Sanitaria
Máster en Gestión y Desarrollo de Tecnologías Biomédicas

Bajo la dirección de:

Dr. José Javier Serrano Olmedo

Dra. Milagros Ramos Gómez

Madrid, 2024

Título: Aplicación de Terapia Fototérmica mediada por Nanopartículas de Oro Biofuncionalizadas en Modelos Murinos de Glioblastoma y Melanoma

Autor: Javier Domingo Díez

Programa de Doctorado: Ingeniería biomédica

Dirección de tesis:

Dr. José Javier Serrano Olmedo, Universidad Politécnica de Madrid
(Director)

Dra. Milagros Ramos Gómez, Universidad Politécnica de Madrid
(Codirectora)

Revisores externos:

Tribunal de tesis:

Fecha de defensa:

Esta tesis ha sido parcialmente financiada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España, ref.: PGC2018-097531-B-I00.

Dedicado a todas las personas que me han acompañado en el camino, en especial,
a mi madre.

Agradecimientos

Quería agradecer esta tesis a las personas que han confiado en mí y me dieron la oportunidad de emprender este viaje de la tesis doctoral, mis directores Milagros y José Javier. Gracias por todos los consejos y conocimientos a lo largo de estos cuatro años. Por permitirme viajar y conocer diferentes países en congresos y conferencias. Así como aprender muchísimo en un mundo tan difícil como es el de la investigación en España e impulsar mi carrera creciendo tanto humana como profesionalmente. Sin ellos, no se hubiera hecho tan ameno.

A todos mis compañeros del laboratorio: Karla, Mili, Marta, Nico, Josefa, Raquel, Clara, Andrés y Miguel. Por apoyarnos cada uno y sacar todas las tesis estando juntos en cada momento. Por supuesto, a Lorena, por ayudarme en absolutamente todos los formatos que existen de la tesis y las risas. Mención honorífica a mi compañera y gran amiga que me llevo del CTB, a la emperatriz, Soledad. Inmensas gracias por todo lo vivido, por nuestras ‘pitipausas’, anécdotas, locuras por Catania y nuestras risas que se escuchan en todo el centro aunque estemos fuera. Mi confidente y compañera de batallas, sin ti esto no hubiese sido ni parecido.

Gracias a mi familia, mis hermanos Nacho, por nuestra pasión por el deporte y Alberto por nuestro gusto por los tatuajes, Carmen, por estar siempre y especialmente mi madre, por el apoyo incondicional, la confianza ciega que tienen en mí y por hacer todo lo posible para seguir hacia adelante, sin importar las dificultades y trabas que la vida nos ha puesto. Cómo agradecer en unas pocas líneas todo lo que mi madre me ha inculcado, su perseverancia y esfuerzo, su superación, su espíritu de lucha incansable y su sacrificio entre otros. La educación y los valores que me has transmitido, el saber estar y ser una persona de provecho es lo que has hecho de mí mamá, el hombre que soy hoy en día. Gracias por esto y muchísimo más que no se puede describir con palabras, gracias por absolutamente todo, espero que estés muy orgullosa de mí, porque esto no es solo mío, también es tuyo. Ya puedes presumir de tu niño, de tu doctor, lo hemos conseguido!!

A mis tíos José y ‘Tata’, y por supuesto a mis primos Alejandro y Andrea, por la preocupación e interés en la tesis doctoral. Al ‘Yayo’ por presumir de nieto y a la ‘Yaya’ que donde quieras que estés seguro que me estás viendo, sabiendo que llegaría lejos. Todos nos acordamos muchísimo de ti y te echamos de menos. A mi padre, esta tesis también es para ti, por no rendirte nunca.

A la familia que se elige, a mis amigos: Íñigo, Irene, Borja, Darío y mis ‘Palmeros del 3C’, Jorge y Sergio. Qué decir en casi 10 años de amistad. Por todo lo que hemos pasado juntos, por todas las noches de fiesta, por todos los ‘CosmoChampions’, viajes, amarillas, y cervezas arreglando nuestros problemas o simplemente haciendo lo que mejor sabemos hacer, disfrutar. Por nosotros, por nuestra trayectoria, por PXXR CLVNG y por todo lo que estamos consiguiendo juntos, que no se acabe, ‘A lo bajini, volando bajito’. A mi neoyorkina, por permitirme cumplir un sueño como ver un partido de NFL en directo, esperando a que vuelvas de tus andaduras americanas para compartir momentos y vivencias juntos.

No, no me olvido de vosotras, nunca me olvido. A mis chicas Mónica y Carol, por aguantarme casi la década que llevamos juntos, que sabemos todos, que fácil no es. Por brindar juntos en cada capítulo de nuestras vidas, por lo que somos y por lo que seremos, pero siempre juntos. Por los viajes en metro yendo a la universidad siempre llegando tarde, por la Zambrano y el maratón de exámenes, los cines, por nuestros recuerdos y, especialmente, por cuidarme y aconsejarme.

A Patricia por todos los viajes a Barcelona y todos los planes improvisados. Porque nos juntamos y somos un terremoto inaguantable e imparable. A Gema y a Jusep, lo que ese máster unió, jamás se podrá separar, es imposible. Por los copernicazos, porque si este ‘trío calavera’ sale de fiesta, nosotros mismos nos bastamos y nos sobramos. Una vallecana, un ventillero y un zamorano, parece un chiste. A mis valencianos favoritos, Sofía y Pablo, amigos que desde que tengo memoria siempre han estado conmigo. Por nuestro Gandía y todo lo que eso conlleva, por las visitas sorpresas a Madrid. Dicen por ahí, que quien tiene un amigo valenciano, tiene un amigo para siempre, y en este caso personalmente, no se equivocan.

A mi gran amigo Óscar, 12 años dándole todo y lo que queda. Por Marvel, nuestras tradiciones y nuestra sinceridad. Copenhague, Dublín y el siguiente destino

después de esta tesis, ya te lo aseguro yo. Siempre apostando por hacer cosas nuevas, nunca decir que no a absolutamente nada y darme los mejores consejos justo en el momento adecuado.

Bonus track para una persona que se ha hecho muy importante en poco tiempo, que no esperaba pero que ha aparecido en el mejor momento. Este parrafito va para ti, Alba. Por escucharme y comprenderme, por aguantarme en mis momentos de delirio total con la tesis, por nuestros viajes y crucigramas y, sinceramente, gracias por el comienzo de algo tan bonito. Por nuestro futuro y nuestro 'Patio' lleno de flores, brindemos, chin chin. Para lo bueno y para lo malo, aquí queda. Palabritas mágicas.

Abstract

Photothermal therapy is a non-invasive technique that selectively eliminates tumor cells by increasing the temperature in the 40-43°C range. For this purpose, nanoparticles, generally gold, are irradiated with a laser at a wavelength of 808 nanometers, generating heat by a physical phenomenon called plasmon resonance. In this thesis, rod-shaped gold nanoparticles (nanorods) of different dimensions, coatings and biofunctionalizations (polyethylene glycol and hyaluronic acid) are used. Results obtained *in vitro* with CT2A and B16F10 cells, corresponding to glioblastoma and melanoma cell lines respectively, are presented. In both cell lines, the cytotoxicity profile of the different nanoparticles, their cell internalization, the result of the application of photothermal therapy, the characterization of the type of cell death, the impact of temperature on photothermal therapy as well as the synergistic effect between such therapy and chemotherapy, where the drug 5-Fluouracil has been used, are described. Regarding the results of *in vivo* photothermal therapy, a murine tumor model has been developed in C57/BL-6 mice for both glioblastoma and melanoma. The effect of nanoparticles biofunctionalized with hyaluronic acid, a ligand of the CD44 marker present in both types of cancer, is studied. The application of photothermal therapy decreases the size of the intracranial glioblastoma tumor in mice, evaluated by magnetic resonance imaging and behavioral tests. A histological study of glioblastoma tumors has been performed where the presence of reactive microglia, tumor characteristics and tumor delimitation are evaluated. Also, positive results of the optimization of photothermal therapy in a murine melanoma model are presented. In conclusion, the high efficacy of photothermal therapy mediated by different types of gold nanorods applied *in vitro* is demonstrated, analyzing the mechanisms generated as the induction of cancer cell apoptosis. The results obtained in the application of photothermal therapy *in vivo* demonstrate that the size of the tumor mass is reduced without affecting the surrounding healthy tissue, inducing apoptosis via Caspase 3 in C57/BL-6 mice, improving their survival.

Keywords: Photothermal therapy, cancer, nanorods, glioblastoma, melanoma

Resumen

La terapia fototérmica es una técnica no invasiva que elimina de forma selectiva las células tumorales mediante el aumento de la temperatura en el intervalo de 40-43°C. Para ello se utilizan nanopartículas, generalmente de oro, que son irradiadas con un láser a una longitud de onda de 808 nanómetros generando calor mediante el fenómeno físico llamado resonancia de plasmones. En esta tesis se utilizan nanopartículas de oro con forma de bastones (nanorod) de diferentes dimensiones, recubrimientos y biofuncionalizaciones (Polietilenglicol y ácido hialurónico). Se presentan resultados obtenidos *in vitro* con células de CT2A y B16F10, correspondientes a líneas celulares de glioblastoma y melanoma respectivamente. En ambas líneas celulares, se describen el perfil de citotoxicidad de las diferentes nanopartículas, su internalización celular, el resultado de la aplicación de la terapia fototérmica, la caracterización del tipo de muerte celular, el impacto de la temperatura en la terapia fototérmica así como el efecto sinérgico entre dicha terapia y la quimioterapia, donde se ha utilizado el fármaco 5-Fluouracilo. En lo referente a los resultados de la terapia fototérmica *in vivo*, se ha desarrollado un modelo murino tumoral en ratones C57/BL-6 tanto para glioblastoma como para melanoma. Se estudia el efecto de las nanopartículas biofuncionalizadas con ácido hialurónico, ligando del marcador CD44 que presentan ambos tipos de cáncer. La aplicación de la terapia fototérmica disminuye el tamaño del tumor intracraneal de glioblastoma en los ratones, evaluado mediante imágenes de resonancia magnética y pruebas conductuales. Se ha realizado un estudio histológico de los tumores de glioblastoma donde se evalúa la presencia de microglía reactiva, características del tumor y su delimitación. También, se presentan resultados positivos de la optimización de la terapia fototérmica en un modelo de melanoma murino. En conclusión, se demuestra la gran eficacia de la terapia fototérmica mediada por diferentes tipos de nanorods de oro aplicados *in vitro*, analizando los mecanismos que se generan como la inducción de la apoptosis de las células cancerosas. Los resultados obtenidos en la aplicación de la terapia fototérmica *in vivo* demuestran que se reduce el tamaño de la masa

tumoral sin afectar al tejido sano circundante, induciendo apoptosis vía Caspasa 3 en ratones C57/BL-6, mejorando su supervivencia.

Palabras clave: Terapia fototérmica, cáncer, nanorods, glioblastoma, melanoma.

Tabla de Contenido

Capítulo 1.	Introducción	1
1.1.	Nanotecnología y nanomedicina.....	1
1.2.	Aspectos éticos de la nanotecnología y nanomedicina	2
1.3.	Glioblastoma y melanoma.....	4
1.3.1.	Glioblastoma	4
1.3.2.	Melanoma.....	6
1.4.	Terapias de hipertermia.....	9
1.5.	Terapia fototérmica y nanopartículas de oro	16
1.6.	Efecto sinérgico de la terapia fototérmica con quimio e inmunoterapia.....	24
Capítulo 2.	Estado del arte	27
Capítulo 3.	Hipótesis y objetivos	42
3.1	Hipótesis.....	42
3.2	Objetivos	42
Capítulo 4.	Materiales y Métodos	44
4.1	Síntesis y biofuncionalización de NPs	44
4.1.1	Síntesis de NPs sin funcionalización	44
4.1.1.1	Síntesis de Pd@Au NRs	44
4.1.1.2	Síntesis de PdNSs.....	45
4.1.1.3	Síntesis de AgNSs.....	46
4.1.1.4	Síntesis de AuNSs	46
4.2	GNRs recubiertos y biofuncionalizados.....	47
4.2.1	Síntesis y caracterización de GNRs recubiertos con PEG.....	47
4.2.2	Curvas de temperatura.....	48
4.2.3	Imágenes térmicas.....	49
4.3	GNRs biofuncionalizados.....	49
4.3.1	Síntesis y caracterización de HA-GNRs.....	50
4.4	Experimentos <i>in vitro</i>	51
4.4.1	Cultivos celulares	51
4.4.2	Irradiación láser	52
4.4.3	Estudios de viabilidad celular	52
4.4.4	Internalización celular de PEG-GNRs	53

4.4.5	Terapia Fototérmica (PTT)	54
4.4.6	Cuantificación de apoptosis mediante citometría de flujo después de la aplicación de PTT mediada por PEG-GNRs	55
4.4.7	Tinción Lisosomal.....	55
4.4.8	5-Fluorouracilo	56
4.4.9	Terapia fototérmica en combinación con el fármaco 5-FU.....	57
4.5	Experimentos <i>in vivo</i>	58
4.5.1	Modelo murino de melanoma con células B16F10	58
4.5.2	Modelo murino de glioblastoma implantando células CT2A	58
4.5.2.1	Modelo de tumor cerebral en ratón	59
4.5.2.2	Experimentos de PTT <i>in vivo</i>	60
4.5.2.3	Adquisición de imágenes de resonancia magnética.....	60
4.5.2.4	Prueba conductual.....	61
4.5.2.5	Inmunohistoquímica	61
4.6	Análisis estadístico	62
Capítulo 5.	Resultados	63
5.1.	Caracterización de NPs sin biofuncionalizar	63
5.1.1.	Caracterización de Pd@Au NRs	63
5.1.2.	Caracterización de PdNSs.....	64
5.1.3.	Caracterización de AgNSs	65
5.2.	Caracterización de GNRs recubiertos con PEG y biofuncionalizados con HA	66
5.2.1.	Caracterización de PEG-GNRs. Curvas de temperatura y fotos térmicas.....	66
5.2.2.	Caracterización de HA-GNRs	70
5.3.	Experimentos <i>in vitro</i> con PEG-GNRs.....	74
5.3.1.	Efectos de la irradiación con láser en células CT2A y B16F10	74
5.3.2.	Viabilidad de las células CT2A y B16F10 en presencia de PEG-GNRs	78
5.3.3.	Internalización de PEG-GNRs en CT2A y B16F10.....	80
5.3.4.	Terapia Fototérmica mediada por PEG-GNRs. Efecto de la temperatura basal del cultivo celular	83
5.3.5.	Mecanismos de Muerte celular implicados en la PTT mediada por PEG-GNRs	85
5.3.6.	Efecto de PTT en combinación con el 5-Fluorouracilo	89
5.4.	Experimentos <i>in vivo</i> con PEG-GNRs	95
5.4.1.	Modelo murino de melanoma. Evaluación temporal del tamaño del tumor	95
5.5.	Experimentos <i>In vitro</i> con HA-GNRs	100
5.5.1.	Viabilidad de las células CT2A y B16F10 en presencia de HA-GNRs.....	100
5.5.2.	Terapia Fototérmica mediada por HA-GNRs	104
5.6.	Experimentos <i>in vivo</i> con HA-GNRs	105
5.6.1.	Modelo murino de glioblastoma.....	105
4.6.1.1	Tratamientos con PTT. Volumetría tumoral.....	105
4.6.1.2	Prueba de campo abierto	109
4.6.1.3	Análisis histológico	110
Capítulo 6.	Discusión	115

6.1. Experimentos <i>In vitro</i>	115
6.1.1. Caracterización y citotoxicidad de los GNRs	115
6.1.2. Internalización de los PEG-GNRs.....	119
6.1.3. Tratamiento con PTT mediado por GNRs	119
6.1.4. Caracterización de la muerte celular con PTT mediada por GNRs.....	121
6.1.5. Efecto sinérgico entre PTT mediada por GNRs y quimioterapia.....	123
6.2. Experimentos <i>In vivo</i>	126
6.2.1. Modelo murino de melanoma.....	126
6.2.2. Modelo murino de glioblastoma.....	128
Capítulo 7. Conclusiones	133
Capítulo 8. Bibliografía	135

Lista de Figuras

Figura 1.1. Fundamento de la Terapia fototérmica o PTT mediada por nanopartículas de oro (GNPs).....	17
Figura 4.1: Esquematación de cada diseño experimental seguido con cada uno de los GNRs (PEG-GNRs y HA-GNRs).	51
Figura 4.2: Diagrama del flujo de trabajo de inducción del tumor a partir de una inyección subcutánea de células B16F10 en ratones C57/BL-6 y su tratamiento con PTT.	58
Figura 4.3: Flujo de trabajo para los experimentos in vivo en ratones C57/BL-6 para la inducción del tumor de glioblastoma y su evolución posterior al tratamiento con PTT.	59
Figura 5.1: Espectros UV-Vis de las semillas Au (t=0; b=1cm) y Au@Pd NR (diluido 1:10; t=0; b=1 cm).....	63
Figura 5.2: Espectros UV-Vis de AuPd NR (diluido 1:10; t=0; b=1 cm) (A), AuPd NR (t=24h; b=0,1cm), sobrenadante 1 (sur 1), pellet 1, sur 2 y pellet 2 (diluido 1:10; t=0; b=0,1 cm). Envejecimiento del pellet 2 de AuPd NR (diluido 1:10; t=0,24,96; b=0,1cm) (B).	64
Figura 5.3: Espectros UV-Vis de Pd NS (diluido 1:20; t=0,24; b=1 cm), sur1, pellet 1, sur 2 y pellet 2 (diluido 1:20; t=0; b=0,1 cm) (A). Envejecimiento Pd NS pellet 2 (diluido 1:20; t=0,24,96; b=0,1cm) (B)	65
Figura 5.4: Espectros UV-Vis de Ag NS sur1, pellet 1, (diluido 1:20; t=0; b=0,1 cm) (A). Envejecimiento Ag y NS pellet 1 (diluido 1:20; t=24,; b=0,1cm) (B).	65
Figura 5.5: Pico de absorbancia a 808 nm de LGNRs (A) y SGNRs (D). Imágenes TEM de LGNRs (B-C) y SGNRs (E-F) con diferentes aumentos.	67
Figura 5.6: Curvas de temperatura obtenidas irradiando LGNRs, SGNRs y CGNRs a concentraciones crecientes (1 µg/mL, 2 µg/mL, 5 µg/mL y 10 µg/mL) durante 10 minutos utilizando un láser de 808 nm a 4,5 W (A). Curvas de temperatura obtenidas irradiando LGNRs, SGNRs, y CGNRs a una concentración de 50 µg/mL mostrando tres ciclos de encendido/apagado del láser. Los GNRs se irradiaron durante 60 segundos a 4,5 W, después se apagó el láser hasta que la muestra volvió a su temperatura inicial para comenzar el siguiente ciclo de irradiación (B). Imágenes térmicas de LGNRs, SGNRs y CGNRs	

en una placa p96 multipocillo a una concentración de 50 µg/mL. Las muestras se irradiaron a 4,5 W durante 30 segundos y las imágenes se tomaron a intervalos de 10 segundos (C)..	69
Figura 5.7. Espectros UV-visibles (cubeta b=0,1 cm) de GNRs antes (dilución 1:10 de los GNRs preparados) y después de la purificación (dilución 1:10 de las muestras de pellets).	71
Figura 5.8: Espectros UV-visibles (cubeta b=1cm) de 200kDa-HA-GNRs (A) y 700kDa-HA-GNRs (B) antes y después de la purificación.	71
Figura 5.9: Fotografías representativas de las muestras de HA-GNRs tras el procedimiento de purificación. Inmediatamente después de la centrifugación (A), los residuos de agregados en el Eppendorf (B) y el sobrenadante (C).	73
Figura 5.10: Viabilidad de las células CT2A y B16F10 evaluada mediante el ensayo XTT 24 h después de la irradiación con un láser de 808 nm durante 10 minutos a las potencias indicadas. Las células se irradiaron a RT (A) y a 37 °C (B). **p<0,01; ***p<0,001.	75
Figura 5.11: Imágenes de microscopía de fluorescencia de las células CT2A y B16F10 marcadas con calceína en verde (células vivas) e IP en rojo (células muertas) tras 24h de la exposición al láser a diferentes potencias (de 1W a 4,5W) durante 10 minutos a RT (A) y (de 0,5W a 2,5W) a 37 °C (B). Barra de escala: 400 µM	77
Figura 5.12: Viabilidad de células CT2A (A) y B16F10 (B) determinada mediante el ensayo XTT tras incubación con concentraciones crecientes de LGNRs, SGNRs y CGNRs durante 24 h. También se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo Calceina-IP en células CT2A (C) y B16F10 (D) incubadas con todos los tipos de GNRs a 2 µg/ml durante 24h. Las células viables se muestran marcadas con calceína en verde y las células muertas marcadas con IP en rojo. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Barra de escala: 400 µm.	78
Figura 5.13: Imágenes de microscopía de fluorescencia de las células CT2A (A) y B16F10 (B) marcadas con calceína en verde (células vivas) e IP en rojo (células muertas) tras 24 horas de incubación en presencia de LGNRs, SGNRs y CGNRs a diferentes concentraciones (1 µg/mL, 2 µg/mL y 5 µg/mL. Barra de escala: 400 µm.	80
Figura 5.14: Perfiles 3D de emisión y excitación de autofluorescencia de los diferentes PEG-GNRs mediante microscopio confocal.	81

Figura 5.15: Imágenes de microscopía confocal de barrido láser de células CT2A y B16F10 incubadas con LGNRs, SGNRs y CGNRs a 2µg/mL durante 24 h. Tras la fijación, las células se tiñeron con faloidina (verde) y los núcleos con Hoechst (azul). Los GNRs se detectaron por autofluorescencia (rojo). Las imágenes muestran que todos los tipos de GNR (rojo) se internalizaron eficazmente en el citosol de las células CT2A y B16F10. Barra de escala: 30 µm.....	82
Figura 5.16: Imágenes de microscopía de campo claro (A-C y G-I) y campo oscuro (D-F y J-L) de células CT2A (A-F) y B16F10 (G-L). Ambos tipos celulares se incubaron con LGNRs y SGNRs a 2 µg/mL durante 24 h, los paneles de control muestran células sin GNRs. La captación de LGNRs y SGNRs por las células CT2A y B16F10 se cuantificó contando los píxeles de color/célula por encima del umbral (células de control) utilizando el software ImageJ. Barras de escala: 15 µm.	83
Figura 5.17: Viabilidad de células CT2A (A y C) y B16F10 (B y D) evaluada mediante el ensayo XTT tras tratamientos PTT realizados irradiando células preincubadas con LGNRs, SGNRs y CGNRs a 2 µg/mL durante 24 h y posteriormente irradiadas con un láser de 808 nm a 4,5 W durante 30 minutos a RT (A y B) y a 37°C (C y D). ***p<0.001.	85
Figura 5.18: Análisis de la muerte celular mediante citometría de flujo (tinción con anexina V y PI) en células CT2A (A) y B16F10 (B) 24 h después de los tratamientos con PTT. Para los tratamientos de PTT, las células se preincubaron con LGNRs y SGNRs a 2 µg/mL durante 24 h y luego se irradiaron con un láser de 808 nm a 4,5 W durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células apoptóticas se definieron como células Annexina-V ⁺ /PI ⁻ y las células necróticas como células Annexin-V ⁻ /PI ⁺ y Annexin-V ⁺ /PI ⁺ . ***p<0,001 (entre grupos de células apoptóticas).....	87
Figura 5.19: Tinción lisosomal y de calceína en células CT2A (A-H) y B16F10 (I-P) incubadas con LGNRs y SGNRs a 2 µg/ml durante 24 h y sometidas después a tratamientos PTT irradiando las células con un láser de 808 nm a 4,5 W durante 30 min. Los lisosomas se tiñeron de rojo con LysoTracker y las células viables de verde con Calcein-AM. La intensidad de fluorescencia de la tinción lisosomal por célula viable se cuantificó en todas las condiciones utilizando ImageJ en células CT2A (Q) y B16F10 (R). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Barra de escala: 20µm.	88

Figura 5.20: Viabilidad de células B16F10 determinada mediante el ensayo XTT (A) y Calceína-IP (B) tras incubación con concentraciones crecientes de 5-FU (0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1 µg/mL, 1.5 µg/mL, 2 µg/mL y 2.5 µg/mL) durante 24 h. ***p<0,001. Barra de escala: 400 µm.....	90
Figura 5.21: Viabilidad de células B16F10 determinada mediante el ensayo XTT (A) y Calceína-IP (B) transcurridas 24h de la aplicación de PTT mediada por SGNRs (2 µg/mL) irradiando con el láser a 4.5W durante 10 minutos en ausencia y presencia de 5-FU (0.5 µg/mL). ****p<0,0001. Barra de escala: 400 µm.	91
Figura 5.22: Viabilidad de células B16F10 determinada mediante el ensayo XTT (A) y Ca/IP (B) 24h después de la aplicación de PTT mediada por SGNRs (1 µg/mL) y 5-FU (0.25 µg/mL y 0.5 µg/mL) a una potencia de 4.5 W durante 10 minutos. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Barra de escala: 400 µm.	92
Figura 5.23: Viabilidad de células B16F10 determinada mediante el ensayo XTT (A) y Ca/IP (B) 24h después de la aplicación de PTT mediada por SGNRs (1 µg/mL) y 5-FU (0.25 µg/mL y 0.5 µg/mL) a una potencia de 1.2 W durante 10 minutos. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Barra de escala: 400 µm.	94
Figura 5.24: Método de medición del tumor de melanoma con un calibre electrónico	96
Figura 5.25: Evolución del tamaño del tumor de células de melanoma B16F10 en ratones C57/BL-6 en distintos puntos temporales (4, 7, 11, 15 y 23 días) medidos con calibre electrónico. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 ****p<0.0001.....	97
Figura 5.26: Comparación del tamaño del tumor en ratones C57/BL-6 a los que se les ha aplicado PTT a los 4 (A) y 11 días (B) post inyección de células B16F10.	98
Figura 5.27: Comparación del diámetro del tumor (A) y sus pesos (B) en ratones C57/BL-6 a los que se les ha aplicado PTT a 7 días después de la inyección de las células B16F10. **p<0.01, ***p<0.001.	99
Figura 5.28: Viabilidad de células CT2A (A) y B16F10 (B) determinada mediante el ensayo XTT tras incubación con concentraciones decrecientes (1:10, 1:20, 1:50 y 1:100) de 200kDa-HA-GNRs y 700kDa-HA-GNRs durante 24 h. También se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo Calcein5a-IP en células CT2A (C) y B16F10 (D) incubadas con todos los	

tipos de HA-GNRs a 1:100 durante 24h. Las células viables se muestran en verde y las células muertas en rojo. ****p<0,0001. Barra de escala: 200 μm.	101
Figura 5.29: Imágenes microscopía de fluorescencia de cels CT2A (A) y B16F10 (B) marcadas con calceína en verde (células vivas) e IP en rojo (células muertas), tras 24 horas de incubación con los tipos de HA-GNRs indicados (200kDa-HA-GNRs y 700kDa-HA-GNRs) a diferentes concentraciones (1:10, 1:20, 1:50, 1:100). Barra de escala: 200 μm.	103
Figura 5.30: Viabilidad de células CT2A (A) y B16F10 (B) evaluada mediante el ensayo XTT tras los tratamientos de PTT realizados en las células preincubadas con 200kDa-HA-GNRs y 700kDa-HA-GNRs a una dilución de 1:100 durante 24 h y luego irradiadas con un láser de 808 nm a 4,5 W durante 10 minutos a temperatura ambiente. ***p<0.001. También se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo Calceina-IP en células CT2A (C) y B16F10 (D) incubadas con todos los HA-GNRs indicados y aplicando la irradiación del láser a 4.5W después de 24h de la PTT. ****p<0,0001. Barra de escala: 200 μm.	104
Figura 5.31: IRM de ratones control (A-B) y ratones a los que se aplicó PTT (C-D) adquiridas en dos momentos diferentes: una semana (A y C) y dos semanas (B y D) después del momento en el que se aplicó la PTT. Las flechas blancas indican la masa tumoral en distintas localizaciones.	107
Figura 5.32: Volumen de masa tumoral analizado en los tres grupos de ratones: control, GNRs y PTT una semana (A) y dos semanas (B) después del tratamiento. La curva de supervivencia de Kaplan Meier muestra la evolución de la población de ratones supervivientes en cada grupo a lo largo del tiempo (C). IRM individualizadas una semana después del tratamiento de los ratones de control (D) y de los ratones tratados una semana después de la aplicación de PTT. Barra de escala: 4mm. *p<0,05.	108
Figura 5.33: Los gráficos muestran los datos analizados de la distancia recorrida (A) y su velocidad (B) de la prueba de comportamiento en campo abierto del grupo de ratones: control, GNR y PTT realizada 2 semanas después del tratamiento con PTT. Mapa de calor (C) que muestra las zonas donde los ratones se encontraban durante el ensayo de comportamiento de campo abierto y la trayectoria recorrida representada por una línea roja (D).	110

Figura 5.34: Imágenes de fluorescencia de secciones de cerebros de ratones control mostrando el hemisferio derecho (A-C y F-H) donde se localiza el tumor. Las secciones se marcaron con anticuerpos anti- nestina en verde (A-E) y anticuerpo anti-Iba1 en rojo (F-J), los núcleos se contrateñieron en todas las secciones con Hoechst. El cuadrado negro indica la zona del cerebro donde se tomaron las imágenes de fluorescencia a mayores aumentos: tejido cerebral normal (D e I) y dentro del tumor (E y J). Barra de escala de las imágenes del hemisferio derecho: 800 μm . Barra de escala de las imágenes: 100 μm 112

Figura 5.35: Imágenes de fluorescencia de una inmunohistoquímica de Iba1. La población de microglía fuera del tumor (A-C), dentro del tumor (D-F) y en el límite del tumor (G-I) a diferentes aumentos. Primera barra de escala: 100 μm . Segunda barra de escala: 200 μm 113

Figura 5.36: Imágenes de fluorescencia del hemisferio derecho (A-C y F-H) e imágenes de fluorescencia (D-E e I-J) de un ratón control (A-E) y tratado con PTT (F-J). Las secciones cerebrales se tiñeron con el anticuerpo primario anti-caspasa 3 activada y con Hoechst. La caspasa 3 activada aparece marcada en rojo y los núcleos en azul. Los cuadrados indican las diferentes zonas tumorales a las que pertenecen las imágenes de fluorescencia de un animal control (D-E) y de ratones con tratamiento de PTT (I-J). Barra de escala de las imágenes del hemisferio derecho: 800 μm Barra de escala: 200 μm 114

Lista de Tablas

Tabla 2.1. Estado del arte de la aplicación de PTT con GNRs para el tratamiento de melanoma.....	28
Tabla 2.2 Estado del arte de la aplicación de PTT con GNRs para el tratamiento de glioblastoma.....	34
Tabla 4.1: Volúmenes utilizados de Anexina V e IP en citometría de flujo.....	55
Tabla 4.2: Volúmenes correspondientes a la concentración del fármaco 5-FU en los pocillos para evaluar su citotoxicidad.....	56
Tabla 4.3: Anticuerpos utilizados para la realización de inmunohistoquímicas con sus respectivas diluciones.....	62
Tabla 5.1: Incrementos de temperatura obtenidos cuando los PEG-GNRs a las concentraciones indicadas fueron expuestos a un láser de 808nm a 4.5W durante 10 minutos.....	68
Tabla 5.2: Valores LSPR, relaciones de aspecto calculadas (R) para GNRs, 200kDa-HA-GNRs y 700kDa-HA-GNRs. La última columna informa de la concentración calculada (C) para las muestras no diluidas.	72

Abreviaturas y Acrónimos

5-FU	5-Fluorouracilo
AgNS	Nanoesferas de plata
AuNS	Nanoesferas de oro
Ca	Calceina
CGNRs	<i>Commercial gold nanorods</i>
CTAB	Bromuro de cetil-trimetilamonio
DAMPs	Patrones moleculares asociados al peligro
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DOX	Doxorrubicina
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
ERP	<i>Enhanced Permeation and Retention effect</i>
FBS	Suero Fetal Bovino
GBM	Glioblastoma Multiforme
GNPs	<i>Gold nanoparticles</i>
GNRs	<i>Gold Nanorods</i>
HA	<i>Hyaluronic Acid</i>
HIFU	<i>High Intensity Focused Ultrasound</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HW	<i>High Weight</i>
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IRM	Imágenes de resonancia magnética

LGNRs	<i>Large Gold Nanorods</i>
LSPR	<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
MHz	Megahercios
NIR	<i>Near Infrared Light</i>
NPs	Nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEG	Polietilglicol
PBS	<i>Buffer Phosphate</i>
PdNS	Nanoesferas de Paladio
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
PI	Ioduro de Propidio
PR	<i>Phenol red</i>
PTT	<i>Photothermal therapy</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
RES	Sistema reticuloendotelial
RT	<i>Room Temperature</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SGNRs	<i>Small Gold Nanorods</i>
SPION	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro
TLR	<i>Toll-Like-Receptor</i>
UV	Luz ultravioleta
W	Vatio

XTT	Sal	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida
-----	-----	---

Capítulo 1. Introducción

1.1. Nanotecnología y nanomedicina

La nanotecnología es una de las aplicaciones biomédicas más prometedora del siglo XXI. Se define como la ciencia, ingeniería y tecnología que utiliza estructuras dentro de la escala nanométrica (1-100 nanómetros) con originales y útiles aplicaciones en diferentes campos de estudio e investigación como la física, química, biología y electrónica. La nanotecnología se establece a través de dos condiciones esenciales: el uso de estructuras en escala nanométrica controlando tanto la forma como el tamaño, y las ventajas de las propiedades de los materiales utilizados que le confieren su tamaño nanométrico.

Por tanto, la nanociencia es un punto de convergencia, entre la ciencia de los materiales, física y biología, que estudia las estructuras y moléculas en la escala nanométrica. La nanomedicina es la aplicación de la nanociencia en el campo de la medicina [1]. La nanomedicina tiene como objetivo principal el diseño de estructuras con una favorable farmacocinética con numerosos propósitos biológicos como incrementar la vida media de dichas estructuras, proporcionar una buena absorción celular y estabilidad, lograr una reducción en la degradación del nanomaterial y favorecer el reconocimiento del sistema inmune o el desarrollo de una terapia dirigida [2]. Recientes estudios han destacado el enorme potencial que las tecnologías aportan a la biomedicina para el diagnóstico y desarrollo de nuevas terapias en la lucha contra numerosas enfermedades. Durante las últimas décadas, diversas aplicaciones, que ofrece la nanotecnología aplicada en nanociencia, han sido objeto de investigación y desarrollo obteniendo resultados óptimos y prometedores. El diagnóstico, la liberación de fármacos e imagen molecular son un claro ejemplo de campos intensivamente investigados dentro del área de la biología y la medicina. Además, la nanomedicina ha avanzado especialmente en la disciplina de la oncología. Este progreso se ha logrado debido a la especificidad y eficacia de los nanomateriales obtenida en el reconocimiento de tumores con numerosas moléculas gracias a la utilización de nanopartículas,

fármacos o anticuerpos. Muchos estudios realizados, en los que se incluye esta tesis, han demostrado que se pueden emplear nanomateriales con sus ventajosas propiedades para una terapia dirigida o la liberación de moléculas terapéuticas para modular procesos biológicos como metabolismo, autofagia, estrés oxidativo o favoreciendo la actividad anticancerígena.

Las mejoras en el campo de la física, química y ciencias de los materiales han proporcionado nanomateriales con propiedades únicas para mejorar el tratamiento de tumores y disminuir la resistencia a las terapias actuales como a la quimioterapia o radioterapia. Estos nanomateriales como los que se usan en este trabajo, las nanopartículas de oro, pueden actuar como *nanocarriers* para la liberación de agentes terapéuticos específicos como fármacos, ácidos nucleicos o agentes inmunes. Las innovaciones en biomedicina están actualmente incluidas en diferentes ensayos clínicos para el futuro desarrollo de nuevas terapias cancerígenas [1]. Además, estas terapias novedosas en desarrollo, como la hipertermia óptica, puede tener efectos sinérgicos con los tratamientos convencionales, obteniendo una eficacia mejor en la eliminación de células tumorales [3].

1.2. Aspectos éticos de la nanotecnología y nanomedicina

La nanoética o el estudio de los aspectos éticos de la nanotecnología y sus implicaciones sociales es un campo emergente y también polémico [4]. Es una disciplina constituida por varios problemas relacionados con la nanotecnología en diversos aspectos dentro de la sociedad. Estas cuestiones son suficientes para dotar a la nanoética como una disciplina con su propia autonomía [5], ya que confieren una condición necesaria para que exista una ética delimitada y ciertamente aplicada. Debido a que la nanotecnología mejora los efectos de la interacción humana, política y economía, surgen diversos problemas éticos como el dinero invertido en diferentes países y el efecto de la propia nanotecnología en los países desarrollados. La influencia de esta emergente tecnología y sus campos de aplicación son muy influyentes y no se deben ignorar los efectos que tienen los países que desarrollan, investigan e invierten en las aplicaciones que la

nanotecnología ofrece [6]. Su efecto será diferente cuando las personas tengan diferentes oportunidades y distintos estilos de vida dependiendo de su situación económica y lugar en el que viven. Los países desarrollados con grandes industrias consideran que el poder nanotecnológico es imprescindible para la competencia global. Se considera un país desarrollado si cumple con diversos estándares y criterios como pueden ser el producto nacional bruto, estabilidad política y la igualdad entre los ciudadanos de dicho país. Existen otros aspectos a tener en cuenta como su efecto en los investigadores debido a que la incertidumbre en los resultados de la investigación clínica y científica de la nanotecnología se considera también una incertidumbre para la seguridad del investigador como los efectos citotóxicos de las nanopartículas de distinta naturaleza que se utilizan. O el dinero invertido en nanomedicina y nanotecnología ya que la atención por estos campos de investigación está creciendo.

Principalmente se hace un enfoque ético en el efecto de la nanotecnología sobre la salud y la medicina. El coste de la producción de nanodispositivos y herramientas de nanocirugía y sus aplicaciones establecen un problema de especulación ética. No es fácil predecir y cuantificar la toxicidad de los materiales utilizados a una escala nanométrica debido a las propiedades que le confieren en ese determinado tamaño y los efectos que pueden generar esos materiales en condiciones de tamaño macro. Otro impacto de la nanotecnología en la medicina influye en la relación entre el paciente y el médico. El diagnóstico y el tratamiento que debe seguir el paciente depende del uso adecuado de la nanotecnología. Para la psicología de los pacientes debe haber una relación de confianza entre el paciente y su médico conservando la relación humana entre ellos. Los avances en la nanotecnología transforman la profesión médica de una ejecución más humana a un servicio de equipo y tecnología.

Recientemente, hay que evaluar el impacto del desarrollo de este campo de investigación sobre el sistema de salud, especialmente en la estructura del sistema de salud. Gracias al liderazgo de las tecnologías emergentes, prevención de enfermedades, diagnóstico temprano y las mejoras en los sistemas de imágenes para monitorizar el estado de salud de los pacientes la estructura del sistema de

salud debería cambiar. Como resultado de estas mejoras, la atención al paciente es casa adquiere más importancia que la atención en el propio hospital. Por otro lado, es importante una adecuada integración entre el conocimiento clínico y el conocimiento que aportan las nanotecnologías para abordar de forma adecuada las innovaciones y avances en los sistemas sanitarios. Las expectativas sobre la nanotecnología son grandes debido a la capacidad de mejora sobre la vida de los pacientes y los masivos beneficios en el campo de la nanomedicina, Por lo tanto, la capacidad técnica y la correcta adecuación de la nanomedicina no debe ser subestimada.

En conclusión, los procesos y métodos nuevos en nanomedicina aplicados clínicamente deben estar bien integrados en el sistema de salud, la aplicación de la nanomedicina tiene una capacidad de mejora y un efecto inmediato en los pacientes y sus protocolos deben estar bien estandarizados y descritos paso a paso con resultados clínicos relevantes y demostrados. Solo bajo esas circunstancias, la nanomedicina puede ser integrada en la práctica clínica [7].

1.3. Glioblastoma y melanoma

1.3.1. Glioblastoma

Glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor maligno y primario cerebral más común [8]. Además, es definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un glioma grado IV [9], [10]. Es clasificado principalmente en GBM primario o isocitrato deshidrogenasa (IDH) *wildtype* GBM, el cual es desarrollado *de novo* y representa el 90% de los diagnósticos, y GBM secundario o IDH mutante GBM, el cual es el resultado de una progresión desde un glioma difuso de bajo grado II o III y representa el 10% de los casos [11]. La incidencia de GBM es 5 por cada 100.000 personas comprendidas entre 45-54 años y se incrementa con la edad. Varía dependiendo del sexo siendo 1.48 más común en hombres [8], [12]. Además, es más común en gente de raza caucásica que en otras etnias [13].

El Desarrollo de síntomas neurológicos como déficits neurológicos, pérdida de memoria, cambios de personalidad, afasia o pérdida del campo visual en periodos

superiores a semanas o meses requiere una evaluación neurológica. En ocasiones, el desarrollo de los síntomas ocurre de una forma rápida, pudiéndose confundir con un ictus. La pérdida del lenguaje también puede asociarse a un estado de confusión o delirio. Las convulsiones se manifiestan en un intervalo del 20-40% de los pacientes y ocasionalmente un comienzo local del tumor se manifiesta en algunos pacientes [14]. La imagen de resonancia magnética (IRM) es una técnica comúnmente aplicada en la práctica clínica para el diagnóstico y el seguimiento post tratamiento [12], [13]. Los pacientes con GBM presentan una pobre prognosis y el tiempo de supervivencia es extremadamente corto si no se detecta a tiempo o el paciente no recibe ningún tipo de tratamiento. La media de supervivencia desde el diagnóstico es alrededor de 15 meses y, tan solo, un 5% sobrevive los primeros cinco años. [15].

El tratamiento convencional para combatir el GBM incluye la cirugía, quimio y radioterapia o una combinación de las dos estrategias terapéuticas. Hoy en día, el tratamiento más común consiste en una cirugía para eliminar la masa tumoral seguido de un tratamiento de quimioterapia con temozolomida y sesiones de radioterapia [16], [17], [18]. Pacientes con sospecha de un glioma maligno deben ser considerados para una intervención quirúrgica, aliviando el efecto que ejerce la masa aumentando la presión intracraneal, logrando una citoreducción y adquirir una muestra del tumor para su precisa caracterización histológica y molecular.

Después de un primer tratamiento, los pacientes con GBM suelen recaer ya que se ha desarrollado otra vez una masa tumoral al no eliminar todas las células del tumor primario en el primer tratamiento, por tener este tumor una alta capacidad de infiltración. Estadísticamente, todos los pacientes que presentan GBM experimentan un progreso de la enfermedad en un periodo de 7 a 10 meses. Desafortunadamente, no existe ningún tratamiento estandarizado y demostrado en la recurrencia del GBM mejorando el tiempo de supervivencia. Las opciones del tratamiento en este caso deben ser individualizados y considerarse seriamente ser sometido o seleccionado a un ensayo clínico. Se puede considerar una extirpación quirúrgica, aunque en la mayoría de los casos no es posible debido a la localización del tumor, está extendida en varias partes del cerebro o por el bajo estado físico del

propio paciente. La gran mayoría de los ensayos clínicos solo contemplan pacientes que se van a someter a una segunda cirugía, permitiendo la exposición preoperatoria al fármaco que está siendo testado, para la posterior evaluación del efecto generado sobre el objetivo molecular. Por lo que todos los candidatos al ensayo deben ser candidatos obligatorios a cirugía [14].

Numerosos ensayos clínicos en fase III han resultado fallidos con el objetivo de mejorar la supervivencia de pacientes que padecen GBM, con decepcionantes resultados a pesar de obtener prometedores datos y evidencias en sus correspondientes ensayos clínicos de fase I y II. Esta decepción se debe a la selección inadecuada que justifican un ensayo en fase III, diseño subóptimo de la terapia en fase II, falta de datos moleculares o la falta de pruebas de farmacodinámicas. Una vez reconocidos los fallos cometidos en la fase II, se pueden adaptar rápidamente para mejorar la habilidad de identificar adecuadamente los tratamientos que permitan la supervivencia o el prolongamiento de la vida en los pacientes con GBM [19].

Nuevas y emergentes terapias están apareciendo para cumplir tales objetivos, como la inmunoterapia [20] o el tratamiento por calor o hipertermia [21], para mejorar el resultado y la efectividad en pacientes con GBM debido a la resistencia del tumor a la quimio y radioterapia. Además, estos nuevos tratamientos pueden ser combinados con terapias convencionales debido al efecto sinérgico existente entre ellas [22].

1.3.2. Melanoma

El melanoma es el tipo de cáncer con el potencial metastásico más significativo comparado con todos los tumores sólidos. El melanoma cutáneo se desarrolla a partir de las transformaciones malignas de los melanocitos productores de melanina en la epidermis basal cutánea [23]. En cambio, el melanoma no cutáneo surge a partir de esta misma transformación de melanocitos en la úvea [24], tracto gastrointestinal [25], genitales y sistema urinario [26] y las meninges [27].

En cuanto al melanoma cutáneo, es un cáncer agresivo e invasivo de la piel y representa el 1.7% de todos los cánceres en la población mundial y ocupando el lugar número 15 entre todos los cánceres comunes en el mundo. La incidencia del melanoma no para de incrementarse dependiendo de la edad, reportándose nuevos casos en el rango de edad comprendido entre los 65-74 años con una media donde los casos de melanoma se diagnostican a los 64 años. La incidencia relacionada con el sexo es más común en mujeres a temprana edad, mientras que en hombres prevalece a partir de los 55 años [28]. También depende de la localización geográfica, donde la mayor incidencia ocurre en Australia y Nueva Zelanda. Por otro lado, en Europa es más común en el norte de Europa, especialmente en los países nórdicos y la baja incidencia se encuentra en el sur y este de Europa. Por lo tanto, la incidencia de la enfermedad varía en los diferentes países, fenotipo de la piel y la exposición a la luz solar [23].

Entre los factores de riesgo ambientales para desarrollar melanoma, se encuentra principalmente la exposición a la luz ultravioleta (UV) de la luz solar. El riesgo de desarrollar la enfermedad está directamente relacionado con la exposición al sol, por tanto, al espectro de la radiación UV. Otros factores como el tiempo de exposición y los patrones de exposición incrementan la posibilidad de la aparición de melanoma. En particular, una exposición intensa e intermitente (típico historial de quemaduras debido a la luz solar) está asociado con un mayor riesgo comparado con una exposición de forma continua, más frecuentemente relacionado con cáncer de piel diferente al melanoma o queratosis actínica. Las ondas UV son absorbidas mediante proteínas nucleares y ácidos de las células de la piel, melanocitos incluidos. El estrés oxidativo asociado provoca grandes cambios en los melanocitos transformándose en células cancerosas mediante la afectación a los mecanismos de reparación del ADN provocando numerosas mutaciones induciendo carcinogénesis [29], [30].

Otros factores de riesgo pueden ser los factores hereditarios, factores genéticos, un sistema inmune comprometido favoreciendo condiciones inmunosupresoras o los pigmentos nevi, proliferaciones benignas producidas por los propios melanocitos en la piel. Dichos pigmentos no suelen cambiar de tamaño y desaparecen a lo largo

de la vida. Aproximadamente el 33% de los melanomas son derivados directamente de estas proliferaciones benignas, mientras que el resto son melanomas producidos con origen *de novo*.

La producción de melanina es la única función de los melanocitos. Este pigmento tiene propiedades antioxidantes como oxidantes. La transformación de antioxidante a oxidante se produce principalmente por la exposición al sol, pero también por los numerosos factores de riesgo mencionados anteriormente. La acción oxidante resulta en la producción intracelular de radicales libres, causando un daño irreparable e irreversible en el material genético al producir numerosas mutaciones. La excesiva proliferación, desdiferenciación e inmortalización de tipos celulares específicos son las causas derivadas de estas mutaciones [23].

El melanoma provoca una grave morbilidad y mortalidad, ya que suele provocar metástasis en estadios muy tempranos siendo difícil de erradicar debido a su desarrollada resistencia a la quimioterapia. La presencia de varias mutaciones y las alteraciones en el microambiente tumoral, mediante la sobreexpresión de proteínas que favorecen la invasión y la filtración tumoral, son el origen de la metástasis. La supervivencia media de los pacientes que desarrollan melanoma cutáneo metastásico es de 5-8 meses, siendo el pronóstico aún peor si el melanoma afecta a las zonas mucosas.

La mayoría de las pacientes con diagnóstico temprana de melanoma están en los estadios tempranos del desarrollo del tumor y el tratamiento a seguir es la extirpación del tumor mediante cirugía con la eliminación total sin recurrencia del tumor. Sin embargo, algunos pacientes con la enfermedad diseminada y con diagnóstico tardío representan el 10% de los casos de melanoma con una prognosis mala y probablemente con baja respuesta al tratamiento [31].

El diagnóstico del melanoma cutáneo se ha establecido en las últimas décadas principalmente en las características histológicas combinadas con el análisis de los marcadores inmunohistoquímicos presentes en las células tumorales. El diagnóstico ha cambiado radicalmente en los últimos años para detectar las lesiones benignas mediante el análisis genético la identificación de mutaciones relativas a melanoma para identificar el origen maligno de las células cancerosas

[32]. Desde 2011 se ha revolucionado el tratamiento de melanoma, en pacientes que se encuentran en una fase muy avanzada, con el desarrollo de la inmunoterapia siendo la terapia más eficaz. Desafortunadamente, los marcadores predictivos no se han integrado directamente en la práctica clínica, aunque el conocimiento y evidencia científica sobre las características inmunogénicas del melanoma se ha incrementado enormemente en los últimos años. Un ejemplo claro de la aplicación de la inmunoterapia es la utilización de anticuerpos para la inhibición de diferentes dianas como pueden ser la proteína 1 anti-muerte celular programada o PD-1, su correspondiente ligando o PD-L1 y la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos conocido como CTLA-4 [33].

1.4. Terapias de hipertermia

La palabra hipertermia se refiere al incremento de la temperatura de forma local y localizada, regional o generalizada en el cuerpo humano y puede ser utilizada para eliminar células tumorales. La hipertermia se puede clasificar según la temperatura alcanzada, la zona donde se incrementa la temperatura o la técnica utilizada para producirla.

- Según la temperatura se puede clasificar en:
 - Se denomina hipertermia suave cuando la elevación de la temperatura aumenta dentro del rango de 41-43 grados centígrados generando una reoxigenación y un aumento del riego sanguíneo a nivel tisular del tumor, provocando la desnaturalización de proteínas, inhibición de la reparación del ADN, una activación de la respuesta al estrés del retículo endoplasmático, inducción de proteínas de shock térmico (*Heat Shock Protein*, HSP) [34] y la puesta en marcha de los mecanismos apoptóticos en las células tumorales. Además, numerosos estudios demuestran que este tipo de hipertermia puede inducir una respuesta inmunológica. La expresión de HSPs activa la respuesta inmune [35], las células cancerosas modulan los marcadores de membrana y otros factores como respuesta al calor pudiendo generar una respuesta inmunogénica [36], el propio calor

activa el sistema inmune, se produce una liberación de exosomas [37] que contienen antígenos tumorales activando las células inmunes facilitando su migración a la masa tumoral debido a la alta permeabilidad de la vasculatura del tumor generado por el calor [38], [39].

- Se considera termoablación si la temperatura aumenta más de 45 grados centígrados provocando una disminución del flujo sanguíneo y una baja tasa de disipación del calor en el tumor. En cuanto a nivel celular, se produce la desorganización del citoesqueleto, desnaturalización de proteínas, rotura de la membrana plasmática, alteraciones en la conformación del DNA y, por tanto, necrosis produciendo una muerte inmunogénica. Hay evidencias de la liberación de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) por la ruptura de la membrana plasmática provocando la sobreexpresión de calreticulina en la superficie de las células tumorales. La exposición de antígenos tumorales y calreticulina activa la respuesta inmune de los linfocitos T. La ablación del tumor eleva la temperatura en el tejido sano que rodea el tumor y puede causar efectos tóxicos no deseados [38], [40].
- Según la zona donde se aplica la hipertermia:
 - **Local:** generalmente utilizada para el tratamiento de tumores sólidos y localizadas o cerca de la superficie de la piel o los orificios naturales del cuerpo [41]. A su vez, dependiendo de la localización del tumor hay diferentes tipos de hipertermia local; hipertermia externa; si el tumor está cerca de la piel usando una fuente externa al cuerpo como pueden ser antenas o dispositivos de ultrasonidos o microondas; hipertermia endocavitaria o intraluminal; utilizada en tumores localizados en distintas cavidades accesibles como el recto, e hipertermia intersticial para el tratamiento de tumores profundos como puede ser un tumor cerebral [42]. La radiación local asociada a una hipertermia suave ha demostrado su capacidad de activación de

una respuesta inmunogénica frente al tumor. La hipertermia local en combinación con tratamientos convencionales de la práctica clínica como la quimio o radioterapia ha tenido un auge en los últimos años despertando un gran interés debido a los resultados obtenidos en investigación [43].

- **Regional:** es adecuado para tumores avanzados y profundos como en la región del abdomen y de la pelvis. Este tipo de hipertermia es más compleja que la hipertermia local por sus propiedades físicas y fisiológicas, por lo que requiere más planificación. La hipertermia regional suministra energía también a los tejidos adyacentes, por lo que el calentamiento selectivo del tumor sólo es posible cuando la disipación del flujo sanguíneo en el tejido sano es mayor que la del tejido tumoral. Principalmente se tratan tumores como el carcinoma rectal, cervical, de vejiga y próstata o sarcoma de tejidos blandos [44].
- **Hipertermia de todo el cuerpo:** se define como la elevación de la temperatura corporal inducida físicamente, abarca desde aplicaciones breves y leves de calor hasta aplicaciones que deben realizarse en el entorno de una unidad de cuidados intensivos. Se puede clasificar según el rango de temperatura alcanzada en el cuerpo desde una sonda rectal. Se considera suave cuando la temperatura está por debajo de los 38°C, solamente en el caso de que sea aplicado por menos de 30 minutos no se necesita la monitorización del paciente. Sus aplicaciones son la rehabilitación, terapia física, ortopedia o reumatología. Se considera moderada cuando la temperatura está en un rango febril (38,5 °C – 40,5 °C) bajo sedación, monitorización y cuidados médicos para el tratamiento de enfermedades reumatológicas, dermatológicas, medicina ambiental, inmunológicas y, principalmente, infecciones crónicas o enfermedades oncológicas. Si la temperatura supera los 40,5 °C se clasifica como extrema y el paciente se encuentra en un profundo plano anestésico con cuidados intensivos. Esta opción sólo se aplica en tratamientos oncológicos e

infecciones crónicas [45], [46]. Este tipo de hipertermia es el más complejo y menos utilizado debido a los cuidados intensivos y los impactos negativos en el cuerpo.

- Según el método utilizado:
 - **Ultrasonidos:** emplea energía acústica a frecuencias de 0,5-10 Megahercios (MHz) para calentar los tejidos. Las ondas se concentran en una zona focal específica generando calor debido a las pérdidas por fricción de las colisiones moleculares resultantes de la onda de presión de ultrasonidos aplicada. Los ultrasonidos concentrados de alta frecuencia o *High Intensity Focused Ultrasound* (HIFU) es el principal tratamiento en la lucha contra el cáncer siendo una tecnología emergente. Específicamente, se generan ondas acústicas en el rango de 1 – 7 MHz. HIFU ocasiona tanto efectos térmicos incluyendo el calentamiento físico en el tejido diana por la absorción de las ondas, como efectos mecánicos. A dosis bajas (<55°C) se conduce a un aumento de la permeabilidad celular siendo ventajoso para la liberación de fármacos mediante calor. A dosis altas (>55°C) se induce un estado de muerte celular por necrosis coagulativa, característica de las terapias de ablación tumoral. En referencia a los efectos mecánicos, se incluyen la fuerza de radiación, aumento de la presión y, la más importante, la cavitación acústica. La cavitación acústica describe el proceso de las diferencias de cambios de presión en el tejido diana para la oscilación y el colapso de microburbujas a altas frecuencias. Se produce sonoporación, proceso por el que la presión de las ondas afecta a las estructuras celulares creando poros en la membrana plasmática, cuando se aplica HIFU a bajas frecuencias. Una de las principales ventajas de HIFU es el margen mínimo donde se puede aplicar la terapia, discriminando el tejido diana de los tejidos sanos que le rodean. Sus aplicaciones son numerosas como la generación de hipertermia y termoablación, liberación de fármacos o neuromodulación [47], [48], [49]. Hay numerosos ensayos clínicos

para el tratamiento de miomas, cáncer de próstata, mama y tumores del sistema nervioso central [47].

- **Campo electromagnético:** se aplica un campo magnético sinusoidal alterno de alta frecuencia usando una o más antenas. Se causa calor dieléctrico mediante la rotación, colisión, polarización y vibración de las moléculas bipolares. El calentamiento de los tejidos se produce por la conducción iónica en el fluido extracelular a bajas frecuencias (<1MHz) actuando las membranas celulares como aislantes. La polarización molecular se genera a altas frecuencias (>1MHz) provocando la permeabilización de las membranas celulares [50]. En esta categoría se encuentran la hipertermia por radiofrecuencias, microondas, infrarrojos e irradiación por láser. La radiofrecuencia y las microondas producen la hipertermia o ablación del tejido diana mediante un catéter o agujas dependiendo del tamaño y localización del tumor y antenas fuera del cuerpo para el tratamiento de tumores [51]. La principal diferencia es la aplicación de la hipertermia por radiofrecuencia o por microondas, ya que se tratan tumores profundos o tumores superficiales respectivamente. Las microondas tienen una profundidad de actuación desde la superficie hasta los 4cm, siendo una técnica hipertérmica muy dependiente del tamaño ya que es recomendable aumentar la temperatura en el 90% del volumen del tumor. La localización de la masa tumoral también genera un conflicto, ya que a más de 4cm de profundidad no pueden ser aplicada esta técnica, o con tumores semiprofundos donde se encuentran desde la superficie de la piel y superar los 4cm de profundidad. Sin embargo, las radiofrecuencias tienen la propiedad de generar calor a altas profundidades del tejido tratado [52], [53]. Los infrarrojos se aplican desde lámparas infrarrojas solamente para calentar la superficie del tejido siendo la profundidad de penetración menos de 1cm [54]. En este caso, la irradiación por láser se produce mediante una fibra óptica guiada liberando la energía lumínica en el tumor, minimizando

puntos calientes y la generación de calor no deseado en los tejidos sanos [55].

- **Mediada por nanopartículas:** las nanopartículas (NPs) son definidas como materiales cuyas dimensiones son menores a 100 nm. Los recientes avances en la fabricación e ingeniería de NPs permiten crear estructuras de distintos materiales a escala nanométrica modulando su tamaño y forma, así como añadir biomoléculas en su superficie para estudiar sus interacciones en los sistemas biológicos. Las fuentes de energía más comunes usadas para la generación de calor por NPs son la luz y los campos electromagnéticos [56]. De esta forma, se pueden distinguir la hipertermia magnética y la hipertermia óptica o terapia fototérmica (*Photothermal therapy*, PTT) según la naturaleza de las NPs utilizadas, características de cada técnica y su fuente de energía [57]. La hipertermia magnética utiliza la capacidad calorífica de las NPs magnéticas para inducir la muerte celular a las células tumorales en presencia de un campo magnético alterno. Las NPs más usadas en hipertermia magnética son NPs de óxido de hierro (como maghemita, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, hematita $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ o magnetita Fe_3O_4) debido a sus características magnéticas y la facilidad de recubrir su superficie como por ejemplo utilizando dextrano. Se pueden utilizar otro tipo de NPs de zinc o cobre, pero muestran mayor toxicidad. Las NPs Fe_3O_4 y son las más estudiadas y usadas en investigación debido a sus características únicas como el superparamagnetismo, por la cual reciben el conocido nombre de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPION), relación superficie-volumen, mayor área superficial y la fácil síntesis y metodología de separación. Las SPION tienen la ventaja de que cuando no están en presencia de un campo magnético alterno, se desmagnetizan, esta característica junto con la buena estabilidad coloidal que minimiza el riesgo de agregación de las NPs en la sangre las convierte en un tipo de NPs con relevancia clínica [58]. Existen

numerosos ensayos clínicos donde se aplica la hipertermia magnética para el tratamiento de tumores [59]. La hipertermia óptica o PTT utiliza nanopartículas de oro que liberan calor debido a una radiación de una fuente externa de luz, en este caso un láser a 808nm para inducir la muerte celular de las células cancerígenas. Este es el tipo de hipertermia que se aplica en esta tesis doctoral y se desarrolla en el siguiente punto de la Introducción nombrado Terapia fototérmica y nanopartículas de oro.

1.5. Terapia fototérmica y nanopartículas de oro

La hipertermia óptica, conocida más comúnmente como *Photothermal therapy* (PTT), es un tratamiento emergente no invasivo contra el cáncer muy efectivo, capaz de eliminar las células tumorales de forma selectiva mediante la conversión de la luz, irradiada por un láser de longitud de onda adecuada, a calor gracias a la utilización de NPs de oro. Se la incidencia de la luz provoca la excitación de los plasmones que empiezan a oscilar y a liberar calor mediante el efecto físico conocido como Resonancia de plasmones superficiales (*Surface Plasmon Resonance*, SPR). La PTT induce la muerte celular por calor en el tejido tumoral expuesto a una luz cerca del infrarrojo (*Near-Infrared Light*, NIR) en presencia de NPs de oro. PTT es una terapia prometedora debido a su simple aplicación, bajo tiempo de tratamiento y la rápida recuperación post-tratamiento. Esta terapia tiene como principal ventaja la focalización de la generación de calor en el tejido tumoral evitando daños en los tejidos sanos. Las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales permiten la selectividad de las células cancerígenas. En la localización del tumor los nanomateriales son irradiados con una fuente externa de luz provocando la generación de calor, como se observa en la Figura 1.1 [60]. Las NPs son irradiadas en el espectro de la primera ventana biológica del NIR con un rango de luz que abarca un intervalo de 650nm-1024nm. Las ventanas biológicas son definidas como los rangos espectrales donde los tejidos son parcialmente transparentes debido a la reducción simultánea de la absorción y reflejo de la luz a esa longitud de onda de forma específica. La piel y diferentes tejidos, o moléculas como la hemoglobina, presentan una mínima absorbancia en el rango NIR, especialmente en la radiación con longitudes de onda en el intervalo de 650nm-900 nm con un pico de transmisión en los 800nm [61]. Este rango de longitudes de onda del espectro electromagnético es lo que se considera la primera ventana biológica perteneciente al NIR.

Gracias a esto, la irradiación de las NPs a una longitud de onda de 808nm en el tejido tumoral puede penetrar sin consecuencias en los tejidos biológicos en comparación con otras longitudes de onda. Existe una segunda ventana biológica en el espectro NIR desde los 1000nm hasta los 1350nm, correspondiéndose con los

límites del espectro con las bandas de absorción del agua. Es importante recalcar que la hemoglobina, oxihemoglobina y el agua presentan un mínimo coeficiente de absorción en la región NIR comprendida entre los 650-900nm, por lo que el principal interés en la aplicación de la PTT se encuentra en la primera ventana biológica de la región NIR [62].

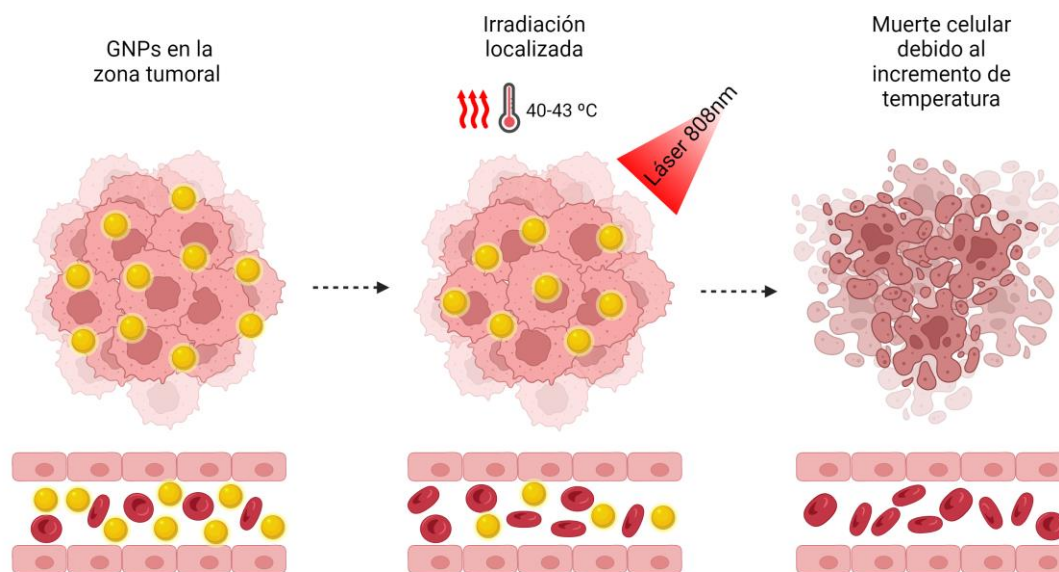


Figura 1.1. Fundamento de la Terapia fototérmica o PTT mediada por nanopartículas de oro (GNPs).

Los avances en la nanotecnología han resultado en la producción de diferentes nanomateriales con múltiples aplicaciones. Debido a sus propiedades únicas que le confieren el tamaño en la nanoescala, las NPs utilizadas en PTT pueden ser de distintos materiales dividiéndose en NPs de origen orgánico e inorgánico. Los nanomateriales fototérmicos deben tener un alto coeficiente de absorción y estar acumulados de forma eficiente en la masa tumoral.

Los nanomateriales orgánicos tienen la ventaja de ser más biocompatibles con una mayor degradación. Los nanomateriales basados en el carbono (nanotubos de carbono y grafeno), los colorantes orgánicos y los nanotransportadores poliméricos son los nanoagentes fototérmicos orgánicos más utilizados [63]. Principalmente

este tipo de NPs se utilizan en terapia fotodinámica (*Photodynamic Therapy*, PDT) e incluyen pequeñas biomoléculas orgánicas y conjugados de nanomateriales poliméricos. Este tipo de nanomateriales han mostrado ser buenos agentes terapéuticos frecuentemente usados para imágenes de tumores y su tratamiento mediante la producción de ROS [64], [65]. Los nanomateriales orgánicos más comunes en PDT son nanomateriales de moléculas orgánicas pequeñas como tintes de cianina, porfirinas, boro dipirrometeno, diketopirrolpirrol o ftalocianinas.

Los nanomateriales más usados en PTT son de origen inorgánico. Entre ellos se encuentran los metales óxidos que han recibido especial atención en el campo de investigación de PTT debido a su bajo coste, gran biocompatibilidad, excelente estabilidad coloidal y su ajustable espacio de banda donde se encuentra su pico de absorción. Los más conocidos en esta categoría son el óxido de hierro, óxido de zinc y óxido de manganeso. Otro tipo de nanomateriales usados son los dicalcogenuros de metales de transición, compuestos por capas de metales de transición como el cobre o titanio y dos capas de átomos de calcogenuro. Esta conformación les confiere una fuerte absorción dentro del espectro NIR, un buen coeficiente de conversión y muy buena estabilidad fototérmica. Sin embargo, las NPs metálicas son los mejores nanomateriales para la aplicación de PTT por sus características y propiedades fisicoquímicas y ópticas. Principalmente son NPs de oro, plata, paladio y platino [63], [66], [67], [68].

Las nanopartículas de oro (*gold nanoparticles*, GNPs) son las más estables de las NPs descritas anteriormente, y son empleadas en numerosos campos de investigación debido a su gran biocompatibilidad. Su principal característica es el SPR en el que se produce la oscilación de los electrones en la superficie de un metal. Es un fenómeno óptico único en el que la luz se dispersa o se absorbe cuando se irradia un metal con luz de una longitud de onda específica que coincide con el ciclo de oscilación del plasmón. En los nanomateriales, y sobre todo en las GNPs, se produce de manera localizada (*Localized surface plasmon resonance* LSPR) debido al tamaño de la superficie de las GNPs, el plasmón no se mueve, sino que oscila en su lugar. Los plasmones oscilan y se libera energía térmica produciendo el calor.

Tanto la absorción como la dispersión de la luz dependen del tamaño de las GNPs y su ruta de síntesis [69], [70].

Se pueden sintetizar por numerosas vías de síntesis, pero principalmente existe la vía descendiente o también llamada *top-down*, un proceso subtractivo que comienza con cortes de un material a granel hasta conseguir el nanomaterial autoensamblado con tamaño nano mediante fotolitografía o *micropatterning* [71], [72]. El método de síntesis es rápido, aunque tiene la limitación de la fabricación de NPs de tamaño uniforme. Existen otros métodos físicos que entran dentro de esta categoría como la pirólisis, termólisis e inducción por radiación. El enfoque descendiente tiene grandes limitaciones en el control de la superficie y estructura de la generación de GNPs afectando significativamente a sus propiedades físicas y químicas. La distribución de los tamaños no está controlada por lo que es poco rentable [73]. El otro mecanismo de síntesis es la vía ascendente o *down-top*, una técnica emergente en los últimos años clasificándose, dependiendo del método empleado como físico, utilizando técnicas como la ablación por láser [74], irradiación por microondas o ultrasonidos o la deposición por pulverización catódica. Mediante métodos biológicos se obtienen NPs derivadas de extractos intracelulares o extracelulares de células procariotas (bacterias y aminocetos), eucariotas (algas, levaduras u hongos) y extractos de plantas (cortezas, raíces u hojas) [75]. Por último, el método más empleado hoy en día, se basa en la reducción química de metaliones en soluciones como el hidróxido de sodio (NaOH), borohidruro de sodio (NaBH₄), bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB), dodecil sulfato de sodio (SDS) y citrato de sodio [74], [75].

La síntesis de GNPs mediante la reducción química es comúnmente conocida como la síntesis Turkevich o la vía clásica de síntesis introducida por el científico Turkevich en 1951 que da nombre a la propia ruta sintética [76], [77]. Esta técnica utiliza el citrato trisódico como agente reductor. El procedimiento se tiene que realizar teniendo en cuenta factores primordiales como el pH y temperatura durante el proceso, y principalmente, la relación molar [HAuCl₄]/[Citrato] para la estabilidad de las GNPs. De una forma resumida, la síntesis se divide en tres partes: la formación de *clusters* metálicos de tamaños de 1 a 2 nm mediante la

reducción de iones, el proceso de coalescencia donde se unen dos o más clusters creando un único conglomerado metálico disminuyendo el número de NPs pero aumentando su tamaño progresivamente hasta los 4-5nm aproximadamente y el último paso de crecimiento de NPs donde el tamaño aumenta drásticamente a partir del conglomerado cuando alcanza los 4-5nm generando las GNPs debido a la reducción drástica del 70-80% iones disueltos en la solución. Posteriormente se ha ido introduciendo cambios a la síntesis desarrollada por Turkevich, conocida como el método Turkevich, modificado como la utilización de agentes estabilizantes, por ejemplo 3-mercaptopropionato sódico, para controlar el tamaño de las GNPs [78]. Otra modificación de suma importancia ha sido la síntesis en condiciones más suaves, en ausencia de calor durante el proceso. La introducción de NaBH_4 en presencia o ausencia de citrato sódico y las variaciones molares de los iones Au completan todos los cambios de la síntesis Turkevich [79], [80].

La síntesis de los GNPs es de suma importancia debido a que pueden dotar de características ópticas determinadas, dependiendo de la forma y estructura de las NPs, en las que se incluyen las nanoesferas, *nanorods* (GNRs), nanoestrellas, nanocubos y nanoconchas.

Las nanoesferas son sintetizadas mediante la reducción controlada en una solución acuosa de HAuCl_4 con diferentes agentes reductores en varias condiciones llegando a tener un diámetro desde 2 nm hasta más de 100nm. El tamaño y diámetro por tanto de las nanoesferas se controlan mediante el balance de oro/citrato. Normalmente, este tipo de GNPs tienen un pico de absorción comprendido entre 510-550nm dependiendo del rango de distribución de tamaño de dichas GNPs. Las nanoesferas tienen numerosas aplicaciones con muchas ventajas, pero su principal limitación es la acumulación en una determinada zona, así como su baja eficacia antitumoral en cáncer metastásicos [81].

Los nanocubos se sintetizan utilizando plata que da forma por sustitución galvánica a nanoestructuras de oro vacías en el interior mediante la reducción de AgNO_3 en solución acuosa de HAuCl_4 [82]. Su principal aplicación es su utilización como biosensores y su uso no es muy común en la hipertermia óptica.

En cuanto a las nanoestrellas, tienen una forma redonda con numerosas puntas que sobresalen del núcleo aumentando su superficie con relación al tamaño. Su principal ventaja es la superficie disponible que presentan para ser biofuncionalizadas. Pueden ser sintetizadas mediante semillas o directamente en un único paso de síntesis. La primera es la más común donde se utiliza CTAB como agente de recubrimiento y su principal problema es la citotoxicidad. Variando el tamaño de las semillas, las GNP's obtenidas pueden variar desde 40 nm hasta 200 nm teniendo su pico de absorción en un intervalo de 600-950 nm. El segundo método de síntesis no tiene mucha reproducibilidad debido a la alta sensibilidad en las variaciones de las condiciones experimentales como concentración, temperatura o pH. Las nanoestrellas son prominentes en numerosos campos de investigación, en los que se incluyen la catálisis, biosensores o PTT [81].

Los nanorods (GNRs) son las NPs utilizadas en esta tesis y se desarrollará a profundidad su uso en PTT durante todo este trabajo de investigación. Los diversos tamaños de los GNRs les permiten ser muy activas en la ventana NIR y son muy interesantes en el campo de la investigación y nanomedicina. En cuanto al mecanismo de síntesis, debe haber control a nivel termodinámico y cinéticamente, ya que hay que tener en cuenta diversos factores como la longitud, grosor, rendimiento de la reducción del oro y la forma de las NPs obtenidas. La síntesis más usada es por semillas, en la que se utiliza, como en los nanoestrellas, el surfactante CTAB. La reducción de la sal de oro se produce por el agente de reducción como NaBH_4 . Una vez producidas las semillas, sirven como sitios de nucleación para los GNRs que aumentan su tamaño en la solución de crecimiento en presencia de un agente reductor débil como puede ser el ácido ascórbico [83], [84], [85]. Los GNRs son muy atractivos debido a su forma anisotrópica con sus dos bandas de absorción que presentan por sus ejes longitudinal y transversal. El eje longitudinal tiene la banda de absorción más fuerte del LSPR, mientras que la transversal es más débil, ambos dentro del espectro NIR. Siendo los perfectos candidatos para la aplicación de PTT. Además, su forma alargada puede promover la captación celular de los GNRs en comparación con las GNP's esféricas. Presentan una mayor estabilidad mecánica en comparación con las nanoestructuras como los

nanotubos, ya que los GNRs pueden soportar mejor diversas condiciones fisiológicas y degradación enzimática [86].

Así pues, también se puede manipular el tamaño y la superficie disponible para su biofuncionalización, proceso por el cual diversas biomoléculas con interés clínico son adheridas a la superficie de las NPs dotándolas con diversas funciones como reconocimiento de células tumorales, actuación de enzimas o liberación de fármacos. Los GNRs tienen un área de superficie muy grande para el tamaño tan pequeño que presentan, siendo perfectas candidatas para ser cargadas farmacológicamente. Las GNPs pueden ser directamente conjugadas con diferentes biomoléculas como proteínas, aminoácidos, fármacos, anticuerpos, fluorocromos, enzimas y ácidos nucleicos (ADN y ARN) entre otros. La modificación de la química de la superficie de las GNPs les confiere estabilidad, eficacia, y disminuye su citotoxicidad [87].

Cuando las GNPs se exponen a un entorno biológico como puede ser el suero o el plasma, se unen proteínas del entorno a la superficie de las GNPs en relación a su superficie/volumen. Como se ha mencionado anteriormente, la biofuncionalización ha cobrado un gran interés, ofreciendo posibilidades para importantes aplicaciones biomédicas que van desde el diagnóstico, obtención de imágenes, marcadores de microscopía electrónica, administración específica de fármacos o diversos tratamientos donde se incluye la PTT [88].

La biocompatibilidad de las GNPs es un factor crucial antes de su aplicación clínica. Aunque la naturaleza inerte de las GNPs las hace relativamente biocompatibles, hay que evaluar su citotoxicidad que depende de su tamaño, forma, propiedades superficiales y composición química. Si no tienen un recubrimiento, cuando las GNPs son internalizadas por las células, las proteínas presentes en el entorno fisiológico se unen formando la proteína corona dando lugar a un complejo NP-proteína. Esta corona proteica tiene una estructura variable e inestable que desempeña una función clave en la biodistribución de las GNPs en el organismo. Esta proteína corona puede ser leve debido a que las proteínas que se unen tienen una afinidad débil, corto periodo de resistencia, baja concentración de proteína, tiempo de cambio de proteínas unidas y muchas sustituciones de unas proteínas

con otras. Sin embargo, estas proteínas pueden tener una unión fuerte con una larga duración de unión, alta concentración proteica, bajo tiempo de cambio de proteínas unidas y alta tasa de cambios conformacionales generando una proteína corona fuerte. Este complejo proteico puede estar formado por más de 100 proteínas si las GNPs desnudas están en contacto con un plasma o suero no tratado [89], [90].

Dentro del complejo corona, se encuentran opsoninas que pueden ser reconocidas por las células inmunes que forman parte del sistema reticuloendotelial (RES). Este reconocimiento del sistema inmune afecta a la biodistribución de las GNPs, su tiempo de circulación en sangre y son eliminadas más fácilmente. La proteína corona añade cambios en el tamaño inicial de las GNPs, así como en su carga, internalización por parte de las células y reconocimiento de los macrófagos del RES promoviendo su fagocitosis. Para evitar el reconocimiento de las GNPs por el sistema inmune se le añade polietilglicol (PEG), proceso denominado PEGilación. Las GNPs de esta forma, quedan camufladas a través de la unión del PEG a la superficie de las GNPs protegiéndola del sistema inmune y aumentando su tiempo en el torrente sanguíneo. Rara vez se consigue evitar el reconocimiento rápido por parte del RES ya que aún pueden ser captada por las células inmunes. La PEGilación se realiza mediante enlaces covalentes de cadenas de diferentes tamaños del polietilglicol (PEG) en la superficie de las GNPs que aumentan su internalización en las células favoreciendo la aplicación de PTT [91], [92].

La última característica a destacar de las GNPs en PTT es su acumulación en el tejido tumoral, llamado efecto de permeabilización y retención mejorada (*enhanced permeation and retention, EPR, effect*). La neovascularización irregular masiva en los tumores con anomalías funcionales en los vasos sanguíneos tumorales favorece el efecto EPR [93]. La vasculatura es densa y desorganizada debido a la demanda de las células tumorales de nutrientes y oxígeno. El endotelio tiene membranas basales deficientes y estructuras fenestradas en los vasos sanguíneos inmaduros. Los pericitos y la capa de músculo liso son deficientes en la respuesta al estímulo de la presión sanguínea. Los huecos entre las células endoteliales son poco frecuentes en un tumor y las vías transendoteliales son el mecanismo dominante de extravasación de las GNPs al tejido tumoral. Estas estructuras confieren

permeabilidad, no solo hacia las GNPs, sino a la extravasación de nutrientes y macromoléculas al espacio intersticial del tumor [94], [95]. La elevada expresión de agentes inflamatorios como pueden ser el óxido nítrico, interleucina-6, interleucina-2, interferón gamma o el factor de crecimiento endotelial vascular, también mantiene el efecto EPR [96]. Por último, la falta de drenaje del sistema linfático en el tumor (efecto de retención asociado al ERP) [97], provoca la retención de macromoléculas, ofreciendo una oportunidad de administrar fármacos anticancerígenos macromoleculares de forma pasiva.

La forma activa consiste en la conjugación de biomoléculas de interés que interactúan con sus receptores o ligandos presentes en las células tumorales, permitiendo la endocitosis y acumulación de las GNRs en las células. Así pues, la orientación activa tiene una mayor probabilidad de endocitosis que la orientación pasiva en los tumores sólidos [88].

1.6. Efecto sinérgico de la terapia fototérmica con quimio e inmunoterapia

Los tratamientos convencionales del cáncer incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y terapia hormonal. Entre ellos, la quimioterapia se ha utilizado ampliamente en el ámbito clínico debido a su capacidad para bloquear la proliferación celular e inducir la apoptosis de las células, y goza del reconocimiento de la comunidad médica oncológica mundial. Sin embargo, el uso clínico de fármacos quimioterapéuticos sigue estando asociado a problemas como el daño innecesario a las células normales del organismo, que provoca reacciones adversas y resistencia a los fármacos [98].

Además, la introducción de nuevas terapias emergentes para el tratamiento sinérgico del cáncer puede minimizar los problemas asociados a la quimioterapia única y mejorar eficazmente la eficacia. La fototerapia, como nueva terapia auxiliar para la erradicación tumoral no invasiva, incluye la PTT. La administración simultánea de fármacos quimioterapéuticos mediante nanotransportadores o *nanocarriers* como las GNPs puede dar lugar a resultados

terapéuticos sinérgicos favorables. La aplicación combinada de PTT y quimioterapia puede eliminar rápidamente las células cancerosas mediante el calor local producido por los GNPs a corto plazo, seguido de la eliminación a largo plazo de las células tumorales residuales debido a la acción prolongada de los fármacos quimioterapéuticos y su distribución uniforme en los tejidos tumorales, lo que se espera que aumente la sensibilidad de los fármacos quimioterapéuticos mediante PTT y supere las deficiencias de la quimioterapia. Así pues, es prometedor lograr un resultado sinérgico mediante el uso de quimioterapia y fototerapia [99], [100], [101].

La inmunoterapia contra el cáncer ha logrado notables respuestas clínicas debido a sus ventajas únicas, incluyendo inducción antitumoral específica y respuesta inmunomemoria a largo plazo. Sin embargo, la tasa de respuesta es baja y los efectos secundarios son los principales obstáculos para el uso generalizado de la inmunoterapia en la práctica clínica. Como se ha mencionado anteriormente, los fármacos pueden llegar a las células tumorales de forma activa o pasiva, siendo eliminadas mediante el nanofármaco administrado o por la generación de calor producido por la irradiación de los GNRs. Tras el tratamiento, se liberan fragmentos celulares y antígenos asociados a las células tumorales activando así la inmunidad sistémica. De esta forma se ataca a las células que se encuentran en otros lugares del organismo diferente a la zona tumoral principal como pueden ser tumores residuales o metastásicos. Otra gran ventaja es la generación de inmunomemoria que podría prevenir la reaparición del cáncer. La combinación de PTT con la inmunoterapia permite la eliminación selectiva de los tumores e inducir efectos inmunitarios antitumorales sostenidos, lo que se denomina inmunoterapia fototérmica [102].

Los fragmentos celulares de las células tumorales pueden no ser suficientes para la aparición de una respuesta inmune, por lo que las GNPs pueden combinarse con inmunoestimulantes u otros fármacos inmunitarios para potenciar las respuestas inmunitarias antitumorales de todo el organismo. Los métodos utilizados en el tratamiento de la inmunoterapia fototérmica asociadas GNPs se clasifican en la producción de muerte celular inmunogénica, agonistas inmunitarios y vacuna

contra el cáncer, bloqueos de puntos de control inmunitarios y anticuerpos monoclonales específicos para tumores e inhibidores de moléculas pequeñas [103].

Gracias a los continuos avances en las técnicas de síntesis de las GNPs, proporcionan una vía eficaz para el tratamiento contra el cáncer debido a su química superficial, bioinercia y baja toxicidad, así como su forma adaptable (como nanoesferas y nanorods principalmente) como se ha mencionado en puntos anteriores en este trabajo. En concreto, estas NPs se han empleado para administrar quimioterapéuticos como doxorrubicina [104] o 5-Fluouracilo (5-FU) [105] o inmunoadyuvantes [106].

Los GNRs que se utilizan en esta tesis, además son unos perfectos candidatos para la conjugación con fármacos, anticuerpos, inmunoadyuvantes... para combatir el cáncer y mejorar los tratamientos convencionales como la quimioterapia y los nuevos como inmunoterapia debido a su efecto sinérgico [107].

Capítulo 2. Estado del arte

En este trabajo se han realizado ensayos de PTT donde se han utilizado tanto *in vitro* como *in vivo* la forma de las GNPs con más eficacia calorífica: los GNRs.

Se han llevado a cabo experimentos de citotoxicidad celular para evaluar la biocompatibilidad de los GNRs en líneas celulares murinas tumorales CT2A y B16F10, correspondiente a glioblastoma y melanoma respectivamente. Numerosos estudios avalan la biocompatibilidad y los efectos no citotóxicos en diferentes líneas celulares murinas en distintos tipos de cáncer como en células de hepatoma Hep-G2 [108], cáncer de mama MCF-7 y T47D [109] o melanoma en B16F10 [110]. También la citotoxicidad de los GNRs está evaluada en distintas líneas celulares humanas como cáncer de hígado humano Sk-Hep-1 [111] o líneas celulares humanas no tumorales como fibroblastos humanos HDF [112] y CCD-1064Sk [113]. Los GNRs están recubiertos con PEG (como se indica en el apartado 4.2.1) como es habitual para mejorar tanto su citotoxicidad como su capacidad de biofuncionalización en aplicaciones de PTT, como se demuestra además en esta tesis.

En la literatura se pueden encontrar muchos estudios donde diferentes GNPs son utilizadas para realizar el tratamiento de PTT *in vitro* e *in vivo*. En las siguientes tablas Tabla 2.1 y Tabla 2.2 se recogen los trabajos donde se han utilizado GNRs para la aplicación de PTT tanto en melanoma como en glioblastoma, en la que se indica la estrategia de biofuncionalización, tipo celular y conclusiones importantes de dichos estudios.

Tabla 2.1. Estado del arte de la aplicación de PTT con GNRs para el tratamiento de melanoma.

Nanopartícula de oro (dimensiones)	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	Línea celular	Conjugación	Terapia aplicada	Parámetros del láser	Resultados	Bibliografía
GNRs (10 nm eje transversal)	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	B16F10 (línea celular de melanoma)	Polietilenimina	PTT	10-100 J/cm ² <i>In vitro</i> 40-50 J/cm ² <i>In vivo</i>	Optimización de internalización de GNRs. Confirmación de la inducción génica mediante un láser NIR en un modelo murino a una dosis baja manteniendo la viabilidad celular.	[114]
GNRs (10x 40 nm)	<i>In vitro</i>	B16-BL6	Polietilenimina y ácido fólico	PTT	0.55 A 0.60 A 0.65 A	Demostración de que el mecanismo de apoptosis y necrosis es dependiente de la temperatura alcanzada mediante	[115]

						PTT mediada por GNRs.	
GNRs (55 nm de longitud, 6 nm de diámetro)	<i>In vitro</i>	B16F10 B16G4F (Línea celular de melanoma no melanótica)	Ftalocianina de zinc tetracarboxilada Ftalocianina de zinc tetracarboxilada metilglucaminada	PTT y PDT	20 J/cm ²	Las ftalocianinas no inducen citotoxicidad en las células de melanoma. La PTT y PDT combinadas tienen un efecto sinérgico que mejora los resultados de las terapias aisladas.	[116]
GNRs (17 x 68nm)	<i>In vitro</i>	MEL-5	Poli-ε-caprolactona y PEG con DOX	PTT y quimioterapia con liberación de fármacos	50-250mW	Liberación controlada de un quimiofármaco a hipertermia suave a través de GNRs que actúan como transportadores.	[117]
						Demostración del efecto EPR por micelas cargadas de DOX pegadas a la	[118]

GNRs (50 nm longitud aprox.)	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> Balb-c	B16F10	Poli (d, l-lactida) con PEG en una micela termosensible (200 – 300 nm)	PTT y quimioterapia	1200 mV	superficie de los GNRs discriminando el tumor de tejidos sanos. Liberación controlada de DOX en grandes concentraciones en el tejido diana.	[119]
GNRs (50 nm diámetro)	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i> C57BL-6	B16F10	GNRs con PEG y óxido de grafeno cargados con DOX	PTT y quimioterapia	100mV	Tratamiento secuencial con PTT y luego con quimioterapia y simultáneo demostrando el efecto sinérgico de los dos tratamientos a la vez y no secuenciados.	[120]
	<i>In vitro</i>			PTT	1 W/cm ²	Mejora de la radiosensibilización	[120]

GNRs (15.6 x 44.4 nm)		A375 (línea celular de melanoma)	RGD (Arg-Gly-Asp)			de las células tumorales de melanoma a través de PTT	[121]
GNRs (10 x 51 nm)	<i>In vitro</i>	B16F10	2000 Da PEG 5000 Da PEG 10000 Da PEG	PTT	21.2 W/cm ²	Se determina la influencia del PEG en la producción térmica de los GNRs. Un PEG con una longitud óptima del polímero de 5 kDa potencia la generación de calor por parte de los GNRs en su aplicación PTT.	[121]
GNRs (50 nm de longitud aprox.)	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	B16F10	Nanocompuesto de GNR-Óxido de sílice-DOX-	PTT y quimioterapia	1 W/cm ² <i>In vitro</i> 0.8 W/cm ² <i>In vivo</i>	La plataforma multifuncional tiene gran biocompatibilidad y un notable efecto terapéutico combinado fototérmico,	[122]

	C57BL-6		sulfuro de cobre-PEG				fotodinámico y quimioterapéutico. CUxS y DOX actúan como inmunoadyuvantes con un tiempo de irradiación breve e intensidad leve, induciendo la activación de las células dendríticas y, por tanto, del sistema inmune.
							Éxito del funcionamiento de la [123]
GNRs (50-60 nm)	<i>In vitro</i> <i>e in vivo</i>	B16F10	CPR (agonista del receptor TLR)	PTT e inmunoterapia	1 W/cm ²	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	biofuncionalización con agonistas TLR duales con GNRs para la inmunoterapia fototérmica. Pueden servir como inmunoadyuvantes
	C57BL-6						
	Balb-c						

en el lugar del tumor, reprogramando un entorno inmunoestimulador y activando la inmunidad antitumoral sistémica.

GNRs (35 nm)	<i>In vitro</i>	B16F10	Condroitín sulfato A	PTT	4 W/cm ²	Biofuncionalización mediante interacción electrostática con gran captación por las células de melanoma.	[124]
--------------	-----------------	--------	----------------------	-----	---------------------	---	-------

Tabla 2.2 Estado del arte de la aplicación de PTT con GNRs para el tratamiento de glioblastoma.

Nanopartícula de oro (dimensiones)	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	Línea celular	Conjugación	Terapia aplicada	Parámetros del láser	Resultados	Bibliografía
GNRs (11.4 x 49.1 nm)	<i>In vitro</i>	C6 (línea celular de glioma)	Neuropéptido (ANGIOPEP-2)	PTT	1 W/cm ²	Se mejora la captación celular para lograr una terapia fototérmica eficaz y específica de gliomas. Citotoxicidad con la biofuncionalización por autofagia y mediante apoptosis cuando PTT es aplicada.	[125]
GNRs (dentro de los liposomas >200nm)	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	U87-MG (línea celular glioblastoma humano)	PEG 5000 Da Envueltos en liposomas cargados con DOX	PTT y quimioterapia	0.5 W/cm ²	Diseño de un nanotransportador liposomal termosensible con liberación eficiente y rápida de DOX. Los GNRs se utilizan para aplicar PTT y aumentar la cantidad	[126]

						de fármaco en el tumor localizado
						[127]
GNRs (15x75 nm)	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	U87-MG	RGD-PEG- ⁶⁴ Cu	PTT	1 W/cm ²	La integración de ⁶⁴ Cu en la superficie de los GNRs proporciona radiotrazables estables para monitorizar con precisión su distribución <i>in vivo</i> mediante Tomografía de emisión de positrones que ayudan a desarrollar protocolos para PTT más específicos para reducir los efectos secundarios.
						[128]
GNRs (65 nm)	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	U87-MG	⁶⁴ Cu -Óxido de grafeno con DOX	PTT, PDT y quimioterapia	0.5 W/cm ² <i>In vitro</i> 0.25 W/cm ² <i>In vivo</i>	Una vesícula híbrida con los GNRs biofuncionalizados. Efecto sinérgico de la terapia quimiofototérmica provoca la ablación completa de

						tumor permitiendo una irradiación a baja potencia del láser.
GNRs (70 nm)	<i>In vitro</i> <i>e in vivo</i>	U251-MG (línea celular de glioblastoma)	Proteína-1 quimioatrayente de monocitos – metal-orgánico con base de hierro	PTT	1-1.5 W/cm ² <i>In vitro</i> 1 W/cm ² <i>In vivo</i>	Atracción de macrófagos producidos por la biofuncionalización de los GNRs y mejor internalización en las células tumorales. Se inhibe la proliferación de células tumorales promoviendo el proceso de apoptosis. [129]
GNRs (20.6 x 4.5 nm)	<i>In vitro</i> <i>e in vivo</i> Balb/c	N2A (línea celular de glioblastoma)	Albúmina y NPs (GNRs-Alb-NPs)	PTT	1.5 W/cm ²	Orientación pasiva hacia el tumor y tamaño apropiado para la eliminación via renal de las GNRs debido a la albúmina. Notable eficacia antitumoral mediante PTT. [130]
						Hidrogeles con DOX de liberación controlada y [131]

GNRs (9 x 28 nm)	<i>In vitro</i> (embebidas en un hidrogel)	C6	sin biofuncionalización en un PEG-hidrogel cargados con DOX	PTT y quimioterapia	5 mW/mm ²	GNRs sin citotoxicidad inicial. Cuando los geles se irradian se consigue una reducción considerable de la viabilidad de las células de glioma. No se observa ningún efecto sinérgico entre las dos terapias pero se demuestra un sistema hidrogel para PTT y quimioterapia.
GNRs (9 x 28 nm)	<i>In vitro</i> <i>e in vivo</i>	U87-MG	PEG - Poli-ε-caprolactona - RGD - DOX	PTT y quimioterapia	0.2 W/cm ² <i>In vitro</i> 0.1 W/cm ² <i>In vivo</i>	NPs híbridas con [132] liberación de DOX inhibiendo el crecimiento tumoral de forma completa. Excelente estabilidad coloidal, fuga inhibida del fármaco solamente liberado con irradiación NIR suave y tiempo de circulación en torrente

						sanguíneo prolongado. Control temporal y espacial del fármaco sin citotoxicidad observada <i>in vivo</i> .
GNRs (16 x 66 nm)	<i>In vitro</i>	U87-MG	GNRs recubiertas con una capa de sílice SiO ₂ – NPs de óxido de hierro (IONPs) y antiCD44	PTT	2.5 W/cm ²	GNRs híbridas con [133] propiedades superparamagnéticas y fototérmicas. Selección específica de células tumorales a través de la expresión CD44. Podría utilizarse para quimioterapia.
GNRs (250 nm con poros de 10-15 nm)	<i>In vitro</i>	F98 (línea celular de glioblastoma) a)	GNRs de sílice poroso-peptido Neurofilament light-IONPs	PTT	Sin Irradiación	Diseño de una [134] nanoestructura 3D para el tratamiento de GBM con GNRs. Se demuestran efectos sobre la actividad mitocondrial de células tumorales.
						[135]

GNRs	<i>In vitro</i>	U87MG MCF7 (Línea celular de carcinoma)	Dispositivo de co-cultivo hidrogelmicrofluídico	PTT	4.27 W	Desarrollo de un dispositivo de co-cultivo hidrogelmicrofluídico para el estudio de PTT por GNRs y la migración de células cancerosas. Herramienta muy útil para el estudio de PTT en 3D y migración de células metastásicas.
GNRs (10 x 40 nm)	<i>In vitro</i>	1321N1 (línea celular de astrocitos)	Sin conjugación	PTT	1.2 W	Aplicación de los GNRs [136] en PTT en células astrocíticas induciendo el mecanismo de apoptosis como principal muerte celular.
GNRs (10 x 40 nm)	<i>In vitro e in vivo</i>	CT2A	Anticuerpo CD133	PTT	0.98 A	Aplicación de PTT en [137] un GBM de ratón. Disminución considerable del volumen tumoral intracraneal. No hay

C57BL-6						citotoxicidad de GNRs y están dirigidas a las células tumorales por la biofuncionalización antiCD133.
---------	--	--	--	--	--	---

[138]

GNRs (9 x 28 nm)	<i>In vitro</i>	X01 (Línea celular de GBM humana)	Nestina - PEG	PTT	5 mW/mm ²	PTT logra paralizar el crecimiento de esferoides de GBM, así como una disminución significativa en su tamaño. Distintos tipos de pequeños péptidos pueden ser utilizados para dirigir las GNRs a distintos tipos de tumores.
------------------	-----------------	-----------------------------------	---------------	-----	----------------------	--

[139]

		X01	Péptido de nestina - PEG y	PTT	5 mW/mm ²	Simulación del microambiente tumoral y tejido tumoral gracias
--	--	-----	----------------------------	-----	----------------------	---

GNRs (9 x 28 nm)	<i>In vitro</i> en hidrogeles	solamente con PEG Hidrogeles de PEG con péptidos de metaloproteasas y heparina	Cultivos 2D 25 mW/mm ² Hidrogeles	a los hidrogeles. Las células son más resistentes a PTT en cultivos 3D proporcionando una visión más realista de la terapia <i>in vivo</i> .
------------------	-------------------------------------	--	--	--

Capítulo 3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

La optimización de la aplicación de la PTT mediada por GNRs de distinto tamaño puede resultar de gran utilidad en la eliminación de células tumorales tanto *in vitro* (utilizando líneas celulares derivadas de glioblastoma y melanoma murinos), como *in vivo* en modelos murinos de glioblastoma y melanoma.

3.2 Objetivos

Los objetivos se clasifican según la experimentación *in vitro* e *in vivo*:

1. *In vitro*:

- 1.1. Optimizar los distintos parámetros de PTT, en los que se incluyen potencia del láser, tiempo de irradiación, concentración de GNRs, generación de temperatura y densidad celular para realizar correctamente los experimentos *in vitro*.
- 1.2. Caracterización de los GNRs experimentales de distinto tamaño y comerciales para la optimización de la PTT.
- 1.3. Estudios de citotoxicidad de todos los tipos de GNRs experimentales y comerciales en ambas líneas celulares, CT2A y B16F10, con concentraciones crecientes de GNRs.
- 1.4. Estudio de viabilidad celular y eficacia del PTT con diferentes GNRs experimentales y a diferentes temperaturas en las líneas celulares CT2A y B16F10.
- 1.5. Localización e internalización celular de los PEG-GNRs mediante microscopía confocal y de campo oscuro.
- 1.6. Caracterizar el tipo de muerte celular, apoptosis o necrosis, inducido por PTT mediadas por PEG-GNRs de las líneas tumorales CT2A y B16F10.

2. *In vivo*:

- 2.1. Optimización del modelo tumoral murino *in vivo* en ratones C57/BL-6 mediante la inducción del tumor de glioblastoma y melanoma por inyección de células B16F10 y CT2A respectivamente.
- 2.2. Aplicación de PTT mediada por GNRs en los modelos murinos desarrollados en ratones C57/BL-6.
- 2.3. Controlar el crecimiento del tumor a lo largo del tiempo mediante IRM en glioblastoma y un calibre electrónico en melanoma.
- 2.4. Estudio de la muerte celular inducida por PTT mediante inmunohistoquímica de Caspasa 3 activa, comportamiento de la microglía a través de su marcador específico Iba1 e identificación de la localización del tumor mediante nestina y Hoechst en cortes histológicos de cerebro.

Capítulo 4. Materiales y Métodos

4.1 Síntesis y biofuncionalización de NPs

4.1.1 Síntesis de NPs sin funcionalización

Este apartado de la tesis se ha realizado durante el periodo de estancia de tres meses en el Laboratorio de BioSuperficies NanoHíbridas liderado por la Dra. Cristina Satriano perteneciente al Departamento de Ciencias Químicas en la Universidad de Catania, Catania, Sicilia, Italia. Durante este periodo se sintetizaron NPs de diferentes metales.

Después de la síntesis de cada una de ellas, descritas a continuación, se realizó toda la caracterización: purificación de las NPs por centrifugación en serie, UV-Vis nm a espectros en diferentes puntos temporales y *Dynamic Light Scattering* (DLS). En el UV-VIS (rango de 190 a 1100 nm), se utilizaron dos tipos de cubeta con 1 cm y 0,1 cm de anchura. Las muestras deben ser comparadas entre ellas con las mismas condiciones, la concentración y cubeta. Todos los gráficos se han realizado con el *software* MagicPlot.

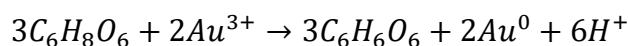
4.1.1.1 Síntesis de Pd@Au NRs

Las primeras NPs sintetizadas fueron bimetálicas compuestas por paladio y oro con forma de rod (Paladio@oro NRs o Pd@Au NRs). La síntesis está dividida en dos pasos: síntesis de las semillas de oro y la formación de los Pd@Au NRs .

1. Síntesis de las semillas de oro

Se mezclaron 5 mL de HAuCl₄ 0,5 mM con 5 mL de solución de CTAB 0,2 M. Se añadió rápidamente 1 mL de NaBH₄ 6mM recién preparado en la solución bajo agitación durante 2 minutos a 30°C.

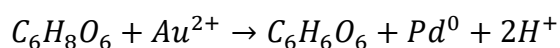
La ecuación de la reacción es la siguiente:



2. Formación de los Pd@Au NRs:

0,14g de CTAB y 27,4 uL de NaOL 3 M se disolvieron en 5mL de MilliQ a 30°C y se añadieron 440 ul de AgNO₃ 4 mM a la solución durante 15 min. Se añadieron 198 ul de 25.4 mM HAuCl₄ y 158 ul de 25.4 mM H₂PdCl₄, y la solución se mantuvo durante 150 minutos bajo agitación a 30°C. Se añadieron secuencialmente 25 ul de ácido ascórbico 64mM, 24 ul de solución de semilla de Au. La dispersión de nanopartículas se mantuvo a 30°C durante 3h. La temperatura se elevó a 95°C, y se añadieron 960 ul de ácido ascórbico 64 mM. Después de 2 minutos, el color se volvió negro y el vial se retiró del baño de agua, se puso a temperatura ambiente y se añadieron 0,088 g de polivinilpirrolidona (PVP) [140].

La ecuación es la siguiente:

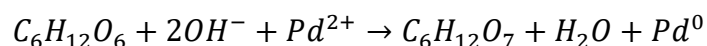


Se diluye la muestra en función del valor de absorbancia para comparar. Una vez terminada la síntesis, se procede a la purificación. Todo el volumen se reparte en un eppendorf con 2 mL de volumen cada uno. Se necesitan dos centrifugaciones seriadas a 8000 rpm durante 15 minutos. Después de cada dilución, se separan el sobrenadante y el pellet, resuspendiéndose el pellet en agua MilliQ.

4.1.1.2 Síntesis de PdNSs

Otras NPs sintetizadas fueron las nanoesferas de Paladio (PdNSs) [141], [142]. Se preparó una solución de sal de paladio 60 mM disolviendo 21,2 mg de PdCl₂ en 2 mL de HCl 0,2M en un vial de vidrio de 4 mL a 60°C. Este paso tiene que ser bajo agitación hasta que la sal metálica esté completamente disuelta (se obtuvo una solución de color naranja brillante). Se añadieron 21 mg de polvo de PVP 0,2 mM a la solución. Para reducir la sal de paladio, se añadió la mezcla preparada a 10 mL de disolución acuosa de D-(+)-glucosa 0,6M, en un rompedor de vidrio de 25 mL a temperatura ambiente, bajo agitación moderada. Por último, se añadió gota a gota NaOH 1M a la mezcla de reacción hasta alcanzar un pH=7,4 (el color pasó de naranja a marrón).

La ecuación de la reacción para la síntesis de PdNSs es la siguiente:

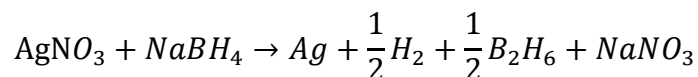


Las nanopartículas resultantes se centrifugaron dos veces a 8.000 rpm durante 1 min. Se lavó con tampón PBS 10 mM (pH=7,4) entre los dos pasos de centrifugación, para eliminar el exceso de PdCl₂ y glucosa de la dispersión de nanopartículas y concentrar el nanosistema.

4.1.1.3 Síntesis de AgNSs

Se añaden 30 mL de 0,002M NaBH₄ en un matraz en un baño de hielo sobre una placa de agitación. El baño de hielo se utiliza para ralentizar la reacción y controlar mejor el tamaño y la forma final de las partículas. Se deja enfriar durante unos 20 minutos. Se añade gota por gota 2 mL de 0,001M AgNO₃ en la solución de NaBH₄ en agitación a aproximadamente 1 gota por segundo. La solución de Ag se vuelve amarilla debido a la absorción aproximadamente a 386 nm. Se añade una gota de PVP al 0,3%. Se añade suficiente alcohol polivinílico (PVA) sólido para obtener una solución al 4%. Esperar 1 hora y 45 minutos [143].

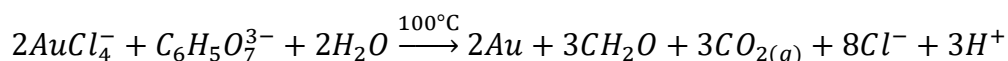
La ecuación es la siguiente:



4.1.1.4 Síntesis de AuNSs

Se realizó una síntesis sencilla para la formación de nanoesferas de oro (AuNSs) [144]. Se añadieron 20 mL de HAuCl₄ a 20 mL de MilliQ en un vial de vidrio de 25 mL a 105°C, bajo agitación (se obtuvo una solución amarilla). Se añadieron 0,02 g de TSC a 2 mL de MilliQ para preparar una solución al 1% en peso de TSC. Añadir la solución de citrato trisódico dihidrato al vial de vidrio (se obtuvo una solución de color rojo vino).

La ecuación de la síntesis es la siguiente:



De estas NPs no hay caracterización en el capítulo de resultados debido a que la estancia se terminó en el momento de esta síntesis.

4.2 GNRs recubiertos y biofuncionalizados

Estos GNRs han sido sintetizados por el grupo de investigación del Prof. Andrés Guerero, perteneciente al Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

4.2.1 Síntesis y caracterización de GNRs recubiertos con PEG

Se prepararon GNRs de diferentes tamaños con LSPR a 800 nm utilizando un método de crecimiento con semillas con algunas modificaciones como se describe en [145].

Semillas de oro. Para preparar la solución de crecimiento, se añadieron 9,111 g de CTAB (50 mM) y 870,5 mg (11 mM) de n-decanol a 500 mL de agua y se agitó a aproximadamente 60 °C durante 30-60 minutos. A continuación, la mezcla se enfrió a 30 °C y se añadieron 250 µl de una solución de HAuCl₄ 0,05 M a 25 mL de la solución de n-decanol/CTAB en un vaso de precipitados de vidrio de 50 mL. La mezcla resultante se agitó a 300 rpm durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 125 µl de una solución 0,1 M de ácido ascórbico, haciendo que la solución de color amarillo anaranjado se volviera lentamente incolora. En este punto, se inyectó una solución de NaBH₄ 20 mM recién preparada (una sola inyección) bajo agitación a 1000 rpm y 30 °C. La inyección dio lugar a soluciones de color amarillo parduzco, y las soluciones semilla se envejecieron durante al menos 60 minutos a 30 °C antes de su uso. Es importante señalar que las dimensiones de la barra de agitación magnética lisa de PTFE (30 × 6 mm) utilizada en el proceso de agitación pueden afectar en gran medida a la calidad de las semillas.

Síntesis de semillas anisótropas. En una síntesis típica, se añadieron 1000 µL de HAuCl₄ 0,05 M, 800 µL de AgNO₃ 0,01 M, 7 mL de HCl 1 M y 1300 µL de ácido ascórbico 0,1 M bajo agitación enérgica a 100 mL de una solución de CTAB 50 mM y n-decanol 13,5 mM a 25 °C exactos. Una vez que la solución se volvió incolora, se añadieron 6 mL de la solución semilla bajo agitación, y la mezcla se dejó sin perturbar durante al menos 4 h. La solución cambió de incolora a gris parduzco oscuro, y la LSPR longitudinal registrada se localizó a 725-730 nm. Las pequeñas semillas anisótropas se centrifugaron a 14 000-15 000 rpm durante 60 minutos en

tubos de 2 mL. Se recogió el precipitado, se volvió a dispersar con 10 mL de una solución de CTAB 10 mM y se centrifugó dos veces en las mismas condiciones. La concentración final de Au₀ se fijó en 4,65 mM (Abs_{400 nm}: 10, paso óptico de 1 cm). Crecimiento de GNRs grandes (LGNR). Brevemente, en una síntesis típica, 3 mL de 0,01 M AgNO₃, 1 mL de 0,05 M HAuCl₄, 3 mL de 1 M HCl, y 800 µL de una solución 0,1 M de ácido ascórbico se añadieron bajo agitación a 100 mL de una solución 50 mM CTAB y 11 mM n-decanol a 35 °C. A continuación, se añadieron bajo agitación 500 µL de la suspensión de semillas anisótropas pequeñas. La mezcla se dejó sin agitar durante 4-6 h. Los GNR se forzaron a sedimentar (por centrifugación a 8000 rpm, 30 min) para eliminar el exceso de tensioactivo y se volvieron a dispersar en 10 mL de una solución de CTAB 10 mM (solución madre de GNRs). Este procedimiento se repitió dos veces para eliminar las trazas de n-decanol. Los GNR resultantes presentaban una longitud media de 68 ± 4 nm y un diámetro de 20 ± 2 nm (Figura suplementaria 4).

Recubrimiento de los GNRs con PEG. Típicamente, se añadió PEG-SH (15 mg) bajo agitación a 5 mL de una suspensión acuosa recién preparada de GNRs (2 mM de Au₀, 1 mM de CTAB). Después de 1 h, se eliminó el exceso de PEG-SH libre mediante un ciclo de centrifugación (8000 rpm, 30 min). A continuación, el precipitado se volvió a dispersar en 5 mL de tampón 10 mM (EBSS).

Se obtuvieron GNRs comerciales (CGNRs) con una longitud media y un diámetro de 41 x 10 nm de Nanopartz (CP12-10-808-3KPA-PBS-50-1, Nanopartz Inc, Colorado, EE.UU.), y se utilizaron para realizar algunas comparaciones y demostrar la alta calidad de los GNRs sintetizados.

Por tanto, con esta síntesis se han obtenido dos tipos de PEG-GNRs de distintos tamaños: *Large* GNRs o LGNRs de dimensiones 20x68 nm y *Small* GNRs o SGNRs de 10x40 nm.

4.2.2 Curvas de temperatura

La eficiencia de conversión luz-calor de PEG-GNRs de distintos tamaños (LGNRs, SGNRs y CGNRs) se determinó irradiando concentraciones crecientes (de 1 a 10 µg/mL) de cada tipo de PEG-GNRs, resuspendido en medio Eagle modificado de

Dulbecco sin rojo de fenol (DMEM-PR), con un láser de 808 nm a 4,5 W durante 10 min. Se utilizó un termómetro digital (indicador digital Dostmann modelo P795, Tempcontrol, NL) con dos sensores de temperatura (Pt-8330, Tempcontrol, NL) y el *software* DE Graph (Tempcontrol, NL) para obtener las curvas de calentamiento correspondientes durante la irradiación láser. Un sensor de temperatura se colocó en DMEM-PR a temperatura ambiente, mientras que el otro en las soluciones que contienen las PEG-GNRs, evitando el contacto directo entre el colimador y el sensor durante la irradiación. Para determinar la estabilidad fototérmica de los PEG-GNRs y excluir una disminución de su eficacia que pudiera evitar la muerte celular durante tratamientos repetidos con láser, cada tipo de PEG-GNRs a 50 µg/mL se sometió a tres ciclos consecutivos de irradiación *on/off* utilizando el láser de 808 nm a 4,5W. Las muestras de PEG-GNRs se irradiaron durante 1 minuto, seguido de la desconexión del láser y dejando enfriar la solución. Este ciclo se repitió tres veces.

4.2.3 Imágenes térmicas

Se capturaron imágenes térmicas utilizando una cámara termográfica (RS PRO-RS 730, RS, Londres, Reino Unido) para demostrar el calentamiento uniforme de una placa multipocillo P96 que contenía PEG-GNRs en DMEM-PR a una concentración de 50 µg/mL. Las muestras se irradiaron con un láser de 808 nm a una densidad de potencia de 4,5 W durante 30 segundos. Se tomaron imágenes cada 10 segundos para controlar la distribución de la temperatura en el pocillo.

4.3 GNRs biofuncionalizados

Estos GNRs se sintetizaron durante el periodo de estancia en el grupo de la Prof. Satriano de la Universidad de Catania. La biofuncionalización de los GNRs se realizó mediante la conjugación de ácido hialurónico (HA) de diferentes pesos moleculares (200 kDa y 700 kDa). El HA es un ligando del receptor CD44 que está presente en tumores sólidos como el glioblastoma y el melanoma.

4.3.1 Síntesis y caracterización de HA-GNRs

Las dispersiones acuosas de GNRs se obtuvieron mediante el método de crecimiento mediado por semillas [146]. Para la preparación de las semillas, se añadieron 25 μL de HAuCl_4 50 mM a 4,7 mL de solución de CTAB 0,1, en baño de agua a 29°C bajo agitación suave. Después de 5 minutos, se añadieron 300 μL de NaBH_4 10 mM recién preparado a dicha la solución y se agitó durante 5 minutos, hasta que el color cambió a marrón-amarillo. Según la solución de crecimiento, se añadieron 100 μL de HAuCl_4 50 mM a 10 mL de solución de CTAB 0,1 M agitando durante 10 min, en un baño de agua a 29°C, seguido de la adición de 76 μL de ácido ascórbico 100 mM (la solución se volvió incolora) y 100 μL de AgNO_3 5 mM. Por último, se añadieron 106 μL de solución de siembra y se dejó la solución en agitación enérgica a 279°C durante 15 min. Se observó un viraje de color al final de este tiempo. La dispersión de GNRs preparada se purificó lavando el exceso de reactivos mediante dos pasos de centrifugación ($8000 \times \text{rpm}$, 30 min, 29°C), con lavado de agua entre medias.

Para la síntesis de los sistemas híbridos HA-GNRs, se utilizó una adición gota a gota de una solución de HA al 0,2 % p/v (dos pesos moleculares diferentes, 200 y 700 kDa) con una relación de volumen HA:GNRs de 1 a 10 de los nanorods purificados (muestra denominada "pellet 2") a una solución acuosa de HA en una proporción de volumen de 1 a 10.

Las características plasmónicas de los sistemas GNRs y HA-GNRs se analizaron mediante espectroscopia visible UV. Los espectros UV-visibles se recogieron utilizando cubetas de cuarzo de 1 y 0,1 cm de longitud de paso óptico en un espectrómetro UV-vis de Perkin Elmer (Lambda 2S, Waltham, MA, EE.UU.).

Con intención de clarificar la experimentación realizada en esta tesis con cada una de los GNRs (recubiertos con PEG o biofuncionalizados con HA para ser dirigidos a las células diana), se añade la Figura 4.1 indicando el uso de cada tipo de GNRs donde se incluyen los experimentos *in vitro* e *in vivo*.

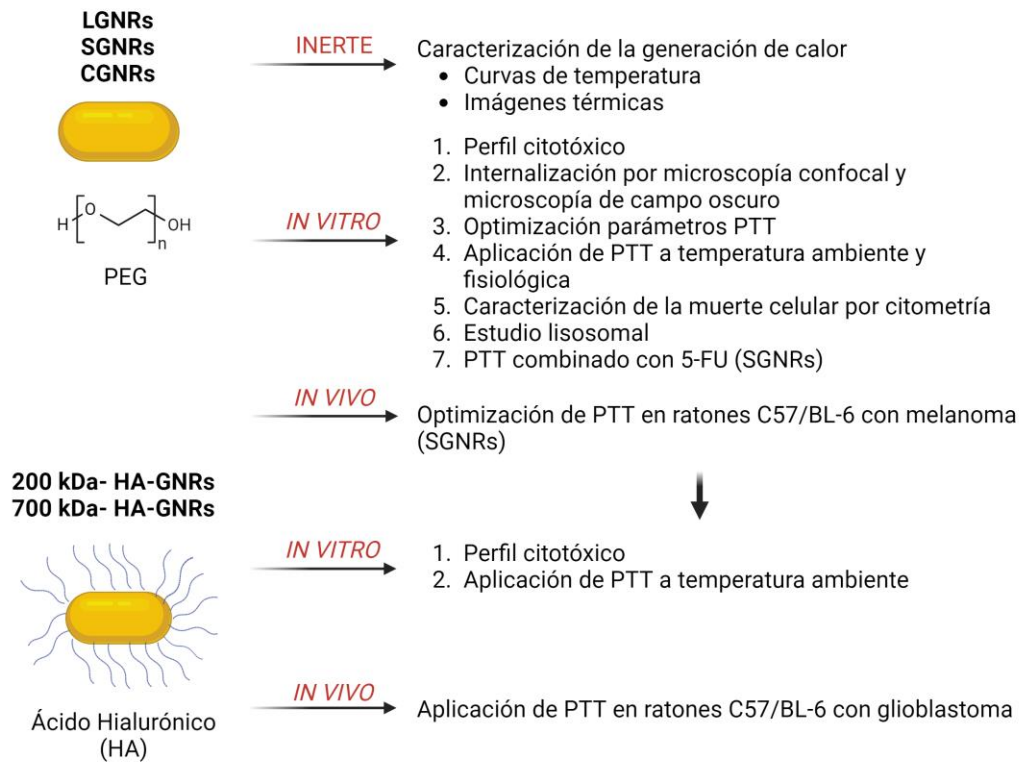


Figura 4.1: Esquemización de cada diseño experimental seguido con cada uno de los GNRs (PEG-GNRs y HA-GNRs).

4.4 Experimentos *in vitro*

4.4.1 Cultivos celulares

Las células de glioma murino (CT2A) y melanoma murino (B16F10) fueron donadas amablemente por el Prof. Ricardo Martínez y el Prof. Lisardo Bosca, respectivamente. Ambas líneas celulares se mantuvieron en DMEM (Gibco, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS), 2mM de glutamina (Gibco, EE.UU.), y 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ y un 95% de aire, y se pasaron dos veces por semana para garantizar su crecimiento óptimo.

4.4.2 Irradiación láser

El láser utilizado es de onda continua a 808 nm con una potencia de salida máxima de 5 W (Fiber Coupled Laser System, HJ Optronics, Inc., San Jose, CA, EE.UU.) que se conectó verticalmente a una lente colimadora (F-C5S3-780, Newport Corporation, Irvine, CA, EE.UU.) a través de una fibra óptica multimodo de un metro de longitud con un diámetro de núcleo de 600 μm y una eficiencia de transmisión de potencia del 90%-99% (Changchun New Industries, China). El colimador se fijó para irradiar las placas multipocillo desde la parte inferior en los estudios *in vitro*. Para determinar la potencia de irradiación exacta, se conectó la fibra a un medidor de potencia (PM USB LM-10, Coherent Inc, Santa Clara, CA, EE.UU.) utilizando un adaptador de fibra SMA (PN 1098589, Coherent Inc, Santa Clara, CA, EE.UU.) y el software PowerMaxPC (Coherent Inc, Santa Clara, CA, EE.UU.).

4.4.3 Estudios de viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular tras la incubación con todos los tipos de GNRs experimentales y la irradiación con láser, se emplearon dos métodos: el ensayo XTT y la tinción con Calceína/yoduro de propidio.

Ensayo XTT: El kit XTT (AppliChem) utiliza la sal 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) que es reducida por enzimas presentes en las células viables, dando lugar a la formación de un colorante soluble en agua [147]. La absorbancia del colorante producido en cada pocillo se midió espectrofotométricamente a 450 nm utilizando un lector de microplacas ELX808 (BioTeK, EE.UU.).

Ensayo de tinción dual con calceína/yoduro de propidio (PI): Se empleó una concentración final de 1 μM de calceína (Invitrogen, Molecular Probes) para teñir las células vivas, produciendo una fluorescencia verde, mientras que se utilizaron 2 μM de PI (Sigma-Aldrich) para teñir las células muertas, produciendo una fluorescencia roja. Estos marcadores se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se evaluó la fluorescencia utilizando un

microscopio invertido Leica DMI300 equipado con una cámara digital Leica DC100 (Leica, Nussloch, Alemania).

4.4.4 Internalización celular de PEG-GNRs

Las células CT2A y B16F10 se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 10 mm de diámetro y se colocaron en un pocillo de una placa de 24 pocillos. Las células se sembraron a una densidad de 5×10^4 células por pocillo. Veinticuatro horas después de la siembra, se añadieron PEG-GNRs (50 $\mu\text{g/mL}$) a las células y se incubaron durante 24 horas más. A continuación, se lavaron las células con PBS para eliminar los PEG-GNRs no unidos y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se tiñeron con Phalloidin-FITC (1:1000; Sigma-Aldrich) durante 3 h a temperatura ambiente en la oscuridad para marcar la actina F de los microfilamentos del citoesqueleto de las células. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (1:500; Invitrogen). Los cubreobjetos se montaron en un portaobjetos de vidrio con ProLongTM Glass Antifade Mountant (Life Technologies Corporation, Eugene, OR, EE.UU.). Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal (Laser Scanning Confocal Stellaris Falcon; Leica Microsystem, Alemania). Los PEG-GNRs intracelulares se visualizaron con un modo de reflectancia confocal. Utilizando este modo, los PEG-GNRs se detectaron por reflexión bajo excitación con una línea láser de 488 nm y recogiendo la emisión en el rango de 480-500 nm (Figura 5.14). Para evaluar la internalización de los PEG-GNRs en las células, se capturaron planos ortogonales en el eje Z cada 40 μm . Para obtener una cuantificación global de la captación de PEG-GNRs por las células, se examinaron las mismas muestras utilizando microscopía de campo oscuro. Para ello se utilizó un microscopio óptico CX43RF (Olympus, Japón) equipado con un condensador de campo oscuro. Las imágenes de las células incubadas con PEG-GNRs se obtuvieron con una cámara CMOS (EP-50, Olympus, Japón). Aunque los PEG-GNRs individuales no pueden visualizarse a este aumento, se detectaron acumulaciones de PEG-GNRs en ambas líneas celulares. Las cantidades relativas de PEG-GNRs de diferentes tamaños unidos a las células o internalizados por ellas se cuantificaron en píxeles utilizando el software ImageJ

(NIH). Se contaron los píxeles coloreados por encima de un umbral de referencia, como se describe en [148], lo que permitió estimar la captación de PEG-GNRs por las células. Este método ha sido validado previamente mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente [149].

4.4.5 Terapia Fototérmica (PTT)

En primer lugar, se analizaron por separado los efectos de la irradiación láser y la concentración de PEG-GNRs y HA-GNRs sobre la viabilidad celular. Se sembraron células CT2A y B16F10 a una densidad de 7×10^3 células/pocillo como se ha explicado anteriormente y se irradiaron a temperatura ambiente durante 10 minutos en ausencia de GNRs, para determinar el efecto de diversas potencias de láser (de 0,5 a 4,5 W) sobre la viabilidad celular. También se irradiaron líneas celulares a 37 °C durante 10 minutos utilizando potencias de láser que oscilaban entre 0,5 y 2,5 W. La viabilidad celular se evaluó 24 h después de la irradiación láser, utilizando los ensayos XTT y de calceína/PI. Del mismo modo, se determinó la concentración óptima de PEG-GNRs probando concentraciones que oscilaban entre 0 y 5 µg/ml, y diluciones 1:10, 1:20, 1:50 y 1:100 de HA-GNRs (a partir de la solución de HA-GNRs a una concentración de 0.02 nM) en ausencia de irradiación láser, y evaluando la viabilidad celular 24 h después.

Para los experimentos de PTT, se sembraron células CT2A y B16F10 a 7×10^3 células/pocillo en una microplaca multipocillo p96 (Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) en un volumen total de 120 µl. Tras 24 h, se retiró el medio inicial de siembra y se añadieron PEG-GNRs a una concentración de 2 µg/mL y HA-GNRs a una dilución de 1:100 a las células en DMEM-PR suplementado con un 1% de FBS. A continuación, se incubaron las células con los GNRs que corresponda durante 24 h más. Tras el periodo de incubación, se lavaron las células con PBS para eliminar los GNRs que no hubieran sido internalizados por las células. La viabilidad celular se evaluó mediante dos ensayos diferentes: XTT y Calceína/IP.

4.4.6 Cuantificación de apoptosis mediante citometría de flujo después de la aplicación de PTT mediada por PEG-GNRs

La apoptosis inducida en las células CT2A y B16F10 por los tratamientos con PTT en presencia de PEG-GNRs se evaluó mediante citometría de flujo a las 24 h posteriores a los tratamientos. Se utilizó Annexin-V (Bionova Científica) para teñir las células apoptóticas, mientras que se utilizó PI (Sigma-Aldrich) para teñir las células necróticas. Las células se tiñeron añadiendo tampón de unión de Anexina-V y Annexin-V conjugado con Cy5 según las instrucciones del fabricante (kit de detección de apoptosis Anexina-V, ABCAM). A continuación, las células se tripsinizaron, se centrifugaron y se resuspendieron en tampón Anexina-V. A continuación, se añadió PI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a las células, que luego se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences), utilizando el canal FL-2 para la detección de PI y el canal FL-4 para la detección de Cy5-Anexina-V. La anexina-V se une al aminofosfolípido de membrana fosfatidilserina, que se trasloca desde la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática en las primeras fases de la apoptosis. Cuando se pierde la integridad de la membrana, como ocurre en la muerte celular necrótica, el PI puede entrar a las células y unirse a los ácidos nucleicos. Por lo tanto, las células apoptóticas se definieron como Anexina-V+/PI- y las células necróticas como Anexina-V+/PI+ y Annexin-V-/PI+. Se adquirieron y analizaron 10.000 eventos utilizando el *software* Flowjo. La Tabla 4.1 recoge los volúmenes utilizados para los experimentos de citometría de flujo.

Tabla 4.1: Volúmenes utilizados de Anexina V e IP en citometría de flujo.

Reactivo utilizado	Volumen (μL)
Anexina-V	1.5
IP	2

4.4.7 Tinción Lisosomal

Las células CT2A y B16F10 se incubaron con LGNRs y SGNRs a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en DMEM-PR suplementado con 1% FBS durante 24h y luego se lavaron para

eliminar el exceso de PEG-GNRs que no fueron internalizados por las células. A continuación, las células tratadas con PEG-GNRs se tiñeron con LysoTracker Red (10 nM; Invitrogen) durante 15 minutos y se lavaron con DMEM-PR. A continuación, se irradiaron las células con un láser de 808 nm a 4,5 W durante 10 minutos y se tiñeron con calceína (1 μ m) durante 15 min. La integridad de los lisosomas en las células vivas positivas a la Calceína se evaluó analizando la intensidad de la fluorescencia roja del LysoTracker utilizando un microscopio invertido Leica DMI300 equipado con una cámara digital Leica DC100 (Leica, Nussloch, Alemania). La intensidad de fluorescencia relativa por célula obtenida en las imágenes de fluorescencia se cuantificó utilizando el *software* ImageJ (NIH).

4.4.8 5-Fluorouracilo

Se ha evaluado la citotoxicidad del fármaco en la línea celular de melanoma B16F10. Para ello se hizo una disolución de 100mg de 5-FU en 10 mL de DMSO con una concentración final del fármaco de 10 mg/mL. De esta concentración, la solución se diluye 1:1000 generando la solución final con una concentración de 10 μ g/mL. Las concentraciones elegidas se han basado en publicaciones recogidas en la bibliografía científica que avalan los efectos no citotóxicos de 5-FU hasta máximo los 2.5 μ g/mL en la misma línea celular B16F10 [150]. Las concentraciones utilizadas con sus respectivos volúmenes están descritas en la Tabla 4.2:

Tabla 4.2: Volúmenes correspondientes a la concentración del fármaco 5-FU en los pocillos para evaluar su citotoxicidad.

Concentración (μ g/mL)	5-FU (μ L)	DMEM (μ L)	Volumen total/pocillo (μ L)
0.25	3	117	120
0.5	6	114	120
1	12	108	120
1.5	18	102	120
2	24	96	120
2.5	30	90	120

La densidad celular utilizada es 7×10^3 células/pocillo, la misma que se utiliza en todos los experimentos anteriores.

4.4.9 Terapia fototérmica en combinación con el fármaco 5-FU

En este caso se utilizan las células de melanoma B16F10 tratadas con los SGNRs a las concentraciones de $1 \mu\text{g/mL}$ y $2 \mu\text{g/mL}$. En cuanto a la concentración del fármaco 5-FU se utilizaron las concentraciones $0.25 \mu\text{g/mL}$ y $0.5 \mu\text{g/mL}$. La potencia del láser utilizada ha sido 4.5 W y 1.2 W . Los experimentos se han realizado en base a la combinación de todos los parámetros descritos en las concentraciones de SGNRs y 5-FU a diferentes potencias de irradiación. El efecto sinérgico entre PTT y la quimioterapia permite la exploración de los límites de la dosis administrada de SGNRs y 5-FU, así como la disminución de la irradiación del láser.

4.5 Experimentos *in vivo*

4.5.1 Modelo murino de melanoma con células B16F10

En este apartado se detalla el procedimiento experimental para generar un modelo animal de melanoma basado en la inyección subcutánea de células de melanoma B16F10 en ratones inmunocompetentes C57/BL-6. La Figura 4.2 describe de forma esquemática el diseño de la inducción del tumor y su tratamiento posterior con PTT, donde se irradia solamente un día, siendo el día 4, 7 u 11 post inyección. Se realiza la inyección subcutánea con 100.000 células B16F10 en un volumen total de 4 μ L y se esperan cuatro días hasta el desarrollo del tumor. Se irradian los tumores después de la inyección local de las SGNRs (volumen total de 4 μ L a una concentración de 1.89 μ g/mL, donde la concentración inicial de SGNRs es de 1.89 $\times 10^3$ μ g/mL y se realiza una dilución 1:1000 con PBS) a una potencia de 450 mW durante 25 minutos. El tumor se mide utilizando un calibre electrónico en diferentes días evaluando el tamaño a lo largo del tiempo, así como su peso después de su extirpación, al finalizar el experimento.

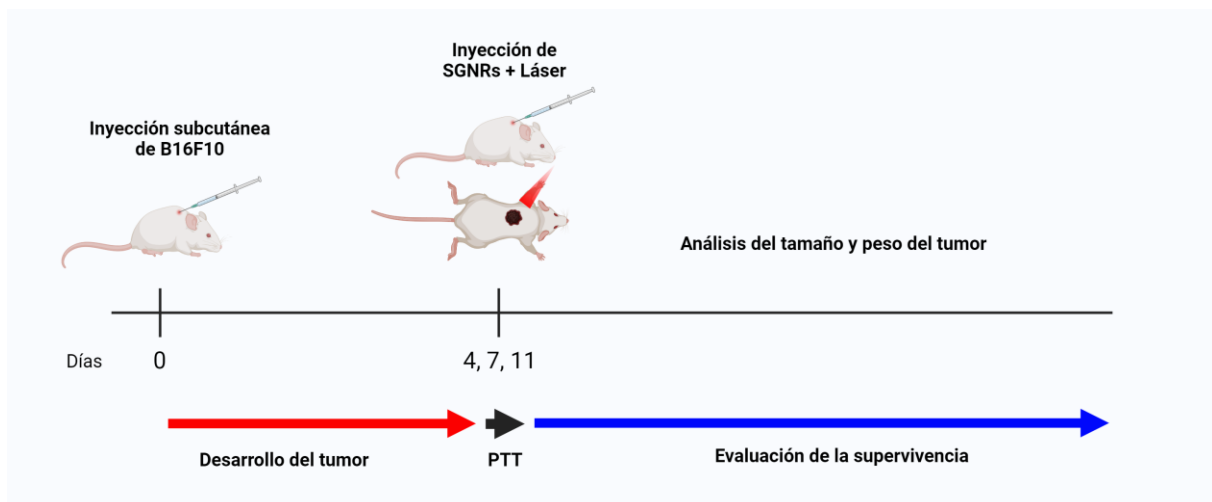


Figura 4.2: Diagrama del flujo de trabajo de inducción del tumor a partir de una inyección subcutánea de células B16F10 en ratones C57/BL-6 y su tratamiento con PTT.

4.5.2 Modelo murino de glioblastoma implantando células CT2A

Se describe la metodología para la inducción del tumor de glioblastoma en el cerebro del ratón y su posterior tratamiento con PTT. La Figura 4.3 indica el flujo

de trabajo seguido a lo largo de la vida del ratón y la evolución del tumor partiendo desde el día 0 correspondiente a la inyección de las células CT2A.

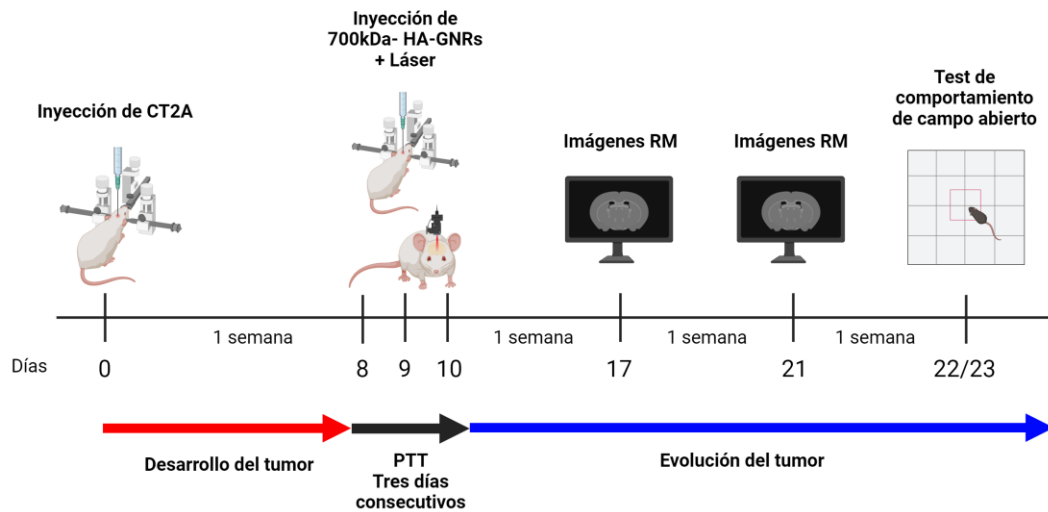


Figura 4.3: Flujo de trabajo para los experimentos in vivo en ratones C57/BL-6 para la inducción del tumor de glioblastoma y su evolución posterior al tratamiento con PTT.

4.5.2.1 Modelo de tumor cerebral en ratón

La línea celular CT2A es altamente tumorigénica, con una tasa de éxito adecuada para desarrollar tumores intracraneales en las 3 a 8 semanas posteriores a la inyección de las células. Los tumores formados por la implantación de células CT2A presentan características no cohesivas, difusas, infiltrativas, altamente proliferativas y hemorrágicas, que se asemejan a las del GBM humano [151], [152]. Todos los procedimientos experimentales con animales se realizaron bajo la Normativa Española y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) para el cuidado de los animales (leyes 53/2013 y ECC/566/2015). Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines. Ratones machos adultos C57/BL-6, de 3-8 meses de edad, fueron alojados en una sala de animales con un ciclo de luz:oscuridad de 12:12, temperatura controlada y con libre acceso a comida y agua. El modelo tumoral CT2A se desarrolló en ratones según lo descrito previamente por Martínez-Murillo [153]. Brevemente, las células cancerosas CT2A (8×10^4 células/ μL en PBS) fueron inyectadas estereotácticamente en el cerebro del ratón

bajo anestesia de isoflurano (Nuzoa, Madrid, España), utilizando una jeringa Hamilton (Hamilton, Reno, NV, USA) y un marco estereotáxico para ratones (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Las células se implantaron en las siguientes coordenadas relativas al bregma: - 6 mm lateral -2,25 mm anteroposterior, y 3 mm de profundidad.

4.5.2.2 Experimentos de PTT *in vivo*

Los ratones con glioblastoma inducido se dividieron aleatoriamente en tres grupos: control (sólo tumor, n=5), tratados con GNRs (tumor + GNRs, n=5) y tratados con PTT (tumor + GNRs + láser, n=7) con un tamaño total de muestra de N=17 animales. La ausencia de cualquier efecto de la irradiación láser sobre el tamaño del tumor se determinó previamente [137]. Se inyectaron gradualmente 4 μ l de los GNRs funcionalizados con HA de alto peso molecular (700-kDa-HA-GNRs) diluidos 1:100 a razón de 1 μ L por minuto en los grupos tratados con GNRs y PTT. Tras la inyección de los GNRs, se irradió a los ratones con láser a 0,98 A (450mW) durante 25 minutos y durante 3 días consecutivos, colocando el láser en el orificio del cráneo donde se inyectaron previamente las células y los GNRs. Durante los procedimientos quirúrgicos, el ratón estuvo en un plano profundo de anestesia bajo los efectos de isofluorano y se utilizó una manta eléctrica para controlar la temperatura de los ratones.

4.5.2.3 Adquisición de imágenes de resonancia magnética.

Para evaluar el tamaño, la localización, la evolución del tumor y por tanto, la eficacia del tratamiento con PTT, se adquirieron imágenes de RM a 7 y 15 días después de la irradiación con láser utilizando un escáner BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Alemania) de 4,7 Teslas equipado con un sistema de gradiente de blindaje activo de 12 cm, en el ICTS Bioimagen Complutense (BioImaC). Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital (10 mg/kg) y atropina (90 mg/kg). Una vez completamente sedados, se inyectó el agente de contraste gadopentetato dimeglumina (0,4 mmol/kg, Gadolinio, Magnevist, Schering, Alemania). Para evitar movimientos inesperados, se colocó a los ratones en decúbito prono dentro

de una cuna. Durante las adquisiciones de las imágenes de RM se utilizó un sensor de respiración para controlar las funciones vitales de los ratones. En primer lugar, se adquirieron imágenes ponderadas en T2 utilizando una secuencia de eco de espín rápido con los siguientes parámetros: TR= 4000 ms, TE efectivo= 60 ms, FOV= 3 cm, grosor de corte=1 mm y matriz= 256x192. Esta matriz se aumentó para obtener imágenes con un tamaño de 256x256 píxeles. A continuación, se tomaron imágenes T1 con los mismos parámetros descritos anteriormente. Se utilizó el *software* ParaVision (Bruker, Ettlingen, Alemania) para determinar el volumen tumoral.

4.5.2.4 Prueba conductual

Los ratones fueron sometidos a la prueba de comportamiento denominada de campo abierto, para evaluar su capacidad exploratoria [154]. Los ratones fueron introducidos en una caja opaca sin tapa de 40x30x30cm durante 5 minutos. Se registró continuamente el movimiento de cada animal para analizar la distancia recorrida y la velocidad. Además, se realizaron mapas térmicos para analizar visualmente las trayectorias de los animales mediante el software Ethovision XT©.

4.5.2.5 Inmunohistoquímica

Al final del experimento, los animales fueron anestesiados con una sobredosis de xilacina/ketamina y perfundidos intracardialmente con paraformaldehído al 4% recién preparado (en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4). Se extrajeron los cerebros, se postfijaron durante 12 h en el mismo fijador a 4 °C y posteriormente se crioprotegieron sumergiéndolos en una solución de sacarosa al 30% a 4 °C hasta su hundimiento. Se realizaron secciones coronales de 35 µm de grosor utilizando un micrótopo de congelación (Leica CM1950). Se utilizaron secciones seriadas para los ensayos de inmunohistoquímica utilizando los siguientes anticuerpos: Nestina 1:200 (Merck), IBA1 1:1000 (Abcam) y Caspasa 3 activada 1:800 (Invitrogen). A continuación, las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios 1:200 anti-conejo Cy3 1:200 y anti-ratón-FITC 1:200 (Invitrogen, Molecular Probes, EE.UU.) durante 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Además, los núcleos

se tiñeron con Hoechst a 1:1000 en PBS durante 30 minutos. Las imágenes se adquirieron con un microscopio invertido Leica DMI300 equipado con una cámara digital Leica DC100 (Leica, Nussloch, Alemania). La Tabla 4.3 recoge las concentraciones de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las inmunohistoquímicas.

Tabla 4.3: Anticuerpos utilizados para la realización de inmunohistoquímicas con sus respectivas diluciones.

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Nestina	1:200	anti-ratón-FITC	1:200
IBA1	1:1000	anti-conejo Cy3	1:200
Caspasa 3 activada	1:800	anti-conejo Cy3	1:200

4.6 Análisis estadístico

Los resultados se muestran como la media \pm error estándar de la media de tres a cuatro experimentos, a menos que se indique lo contrario. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism (San Diego, CA, EE.UU.). La normalidad se ha evaluado con la prueba de Shaphiro-Wilk. Posteriormente, los datos se han analizado mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA-One way) seguido de la prueba post hoc de diferencia honestamente significativa de Tukey para datos paramétricos, o la prueba de Kruskal Wallis para datos no paramétricos. Se ha elegido un nivel de significación de $P < 0,05$. Se han realizado un análisis de supervivencia mediante la prueba de Kaplan-Meier para analizar la eficacia de los tratamientos con PTT en experimentos *in vivo* en el modelo murino de glioblastoma en ratones C57/BL-6.

Capítulo 5. Resultados

5.1. Caracterización de NPs sin biofuncionalizar

5.1.1. Caracterización de Pd@Au NRs

Una vez terminada la síntesis de las Pd@Au NRs, se procede a su purificación como se describe en el apartado 4.1.1.1. Como productos finales tenemos el pellet 2 (NPs listas para ser incubadas con las células), el sobrenadante 1 y el sobrenadante 2. Se realizan dos centrifugaciones sucesivas, y se caracterizan los sobrenadantes y los pellets. Tanto el sobrenadante como el pellet obtenido después de cada centrifugación son sometidos a UV-vis como se observa en las Figura 5.1 y Figura 5.2. La importancia de medir el sobrenadante reside en la calidad de la purificación, por si hay demasiadas NPs en el sobrenadante que no se han conseguido lavar de forma correcta. Como indica la Figura 5.2, la longitud de onda es prácticamente igual en el pellet 1 y en el pellet 2, manteniéndose constante a lo largo del tiempo (Figura 5.2B).

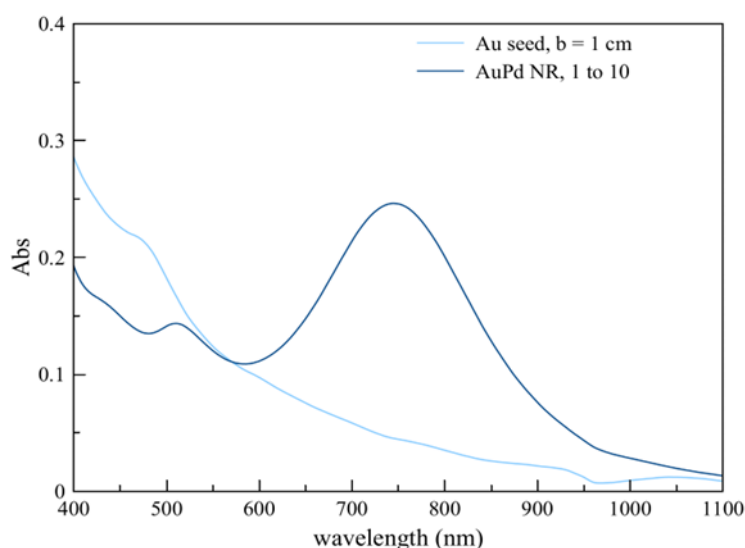


Figura 5.1: Espectros UV-Vis de las semillas Au ($t=0$; $b=1$ cm) y Au@Pd NR (diluido 1:10; $t=0$; $b=1$ cm).

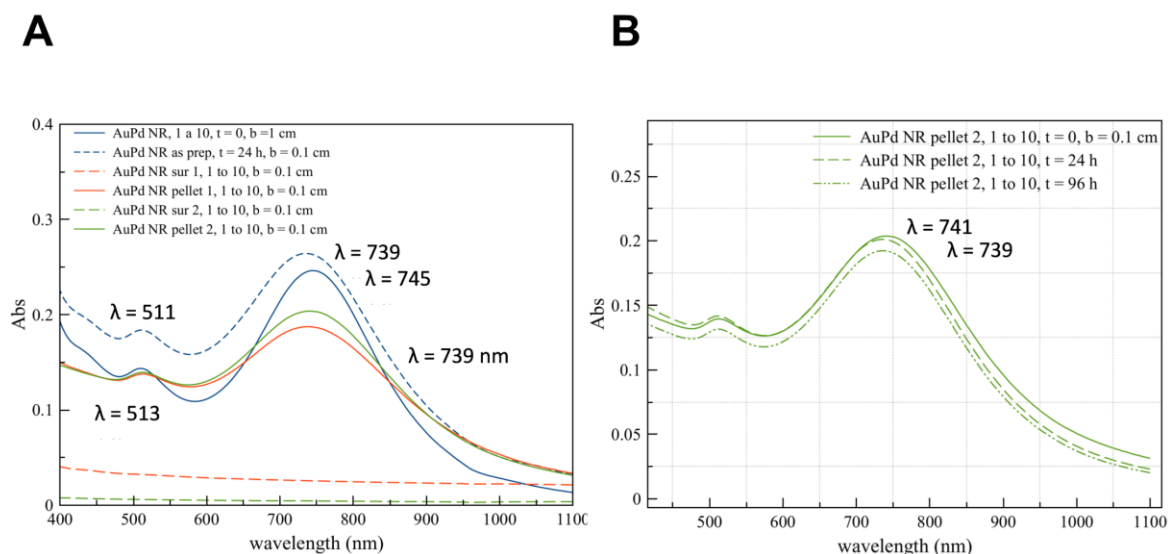


Figura 5.2: Espectros UV-Vis de AuPd NR (diluido 1:10; t=0; b=1 cm) (A), AuPd NR (t=24h; b=0,1cm), sobrenadante 1 (sur 1), pellet 1, sur 2 y pellet 2 (diluido 1:10; t=0; b=0,1 cm). Envejecimiento del pellet 2 de AuPd NR (diluido 1:10; t=0,24,96; b=0,1cm) (B).

Para saber el tamaño de las semillas de Au y Au@Pd NRs se han realizado tres mediciones consecutivas en el equipo de DLS, obteniendo como media $0.0375 \pm 0.0047 \mu\text{m}$ y $0.0287 \pm 0.0013 \mu\text{m}$, respectivamente.

5.1.2. Caracterización de PdNSs

Después de las centrifugaciones, se han realizado las mediciones en el espectro UV-Vis tanto de los sobrenadantes como de los pellets obtenidos después de la purificación (Figura 5.3A). Además, las PdNSs fueron medidas a lo largo del tiempo desde que se sintetizan hasta las 96 h posteriores para verificar su estabilidad a largo plazo (Figura 5.3B). El tamaño se ha determinado por DLS después de 96 h, referenciando un tamaño de $0,03297 \pm 0,0009866 \mu\text{m}$, siendo prácticamente igual que el tamaño inicial.

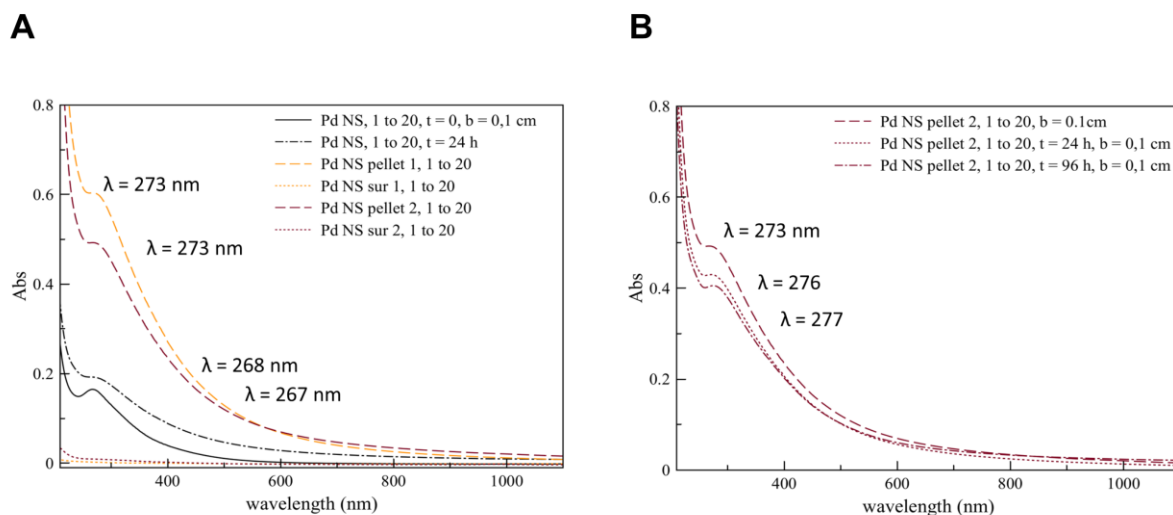


Figura 5.3: Espectros UV-Vis de Pd NS (diluido 1:20; t=0,24; b=1 cm), sur1, pellet 1, sur 2 y pellet 2 (diluido 1:20; t=0; b=0,1 cm) (A). Envejecimiento Pd NS pellet 2 (diluido 1:20; t=0,24,96; b=0,1cm) (B)

5.1.3. Caracterización de AgNSs

Así mismo, en las AgNSs se midieron las AgNSs inmediatamente después de la purificación y a las 24 h de ser sintetizadas teniendo el mismo pico en los 400 nm, verificando que la síntesis es correcta y, estables en el tiempo como se observa en la Figura 5.4. El tamaño de las AgNSs mediante DLS ha sido de 0.0086 ± 0.001015 μm .

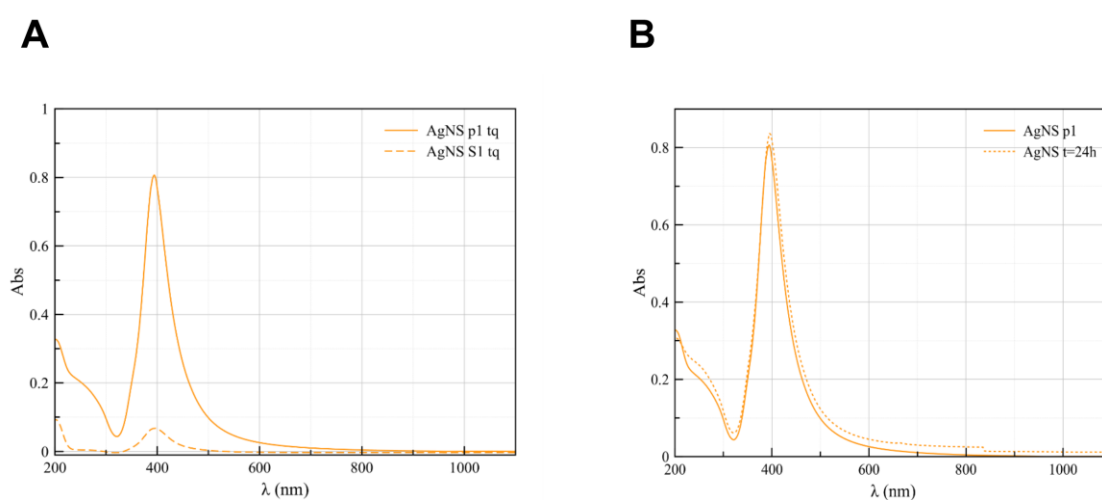


Figura 5.4: Espectros UV-Vis de Ag NS sur1, pellet 1, (diluido 1:20; t=0; b=0,1 cm) (A). Envejecimiento Ag y NS pellet 1 (diluido 1:20; t=24; b=0,1cm) (B).

5.2. Caracterización de GNRs recubiertos con PEG y biofuncionalizados con HA

5.2.1. Caracterización de PEG-GNRs. Curvas de temperatura y fotos térmicas

Se caracteriza la eficiencia de la generación de calor las PEG-GRs para establecer su eficacia en la aplicación de la PTT. En la Figura 5.5 se aprecian la forma y dimensiones de los PEG-GNRs mediante imágenes de microscopía electrónica de transmisión (*transmission electron microscope*, TEM) y la absorbancia de cada una de ellas. La eficacia de los PEG-GNRs (LGNRs y SGNRs) para la PTT se demostró comparándolos con nanopartículas comerciales de las mismas características (CGNRs). Los resultados obtenidos con PEG-GNRs del mismo tamaño, SGNRs y CGNRs, fueron similares en todas las secciones posteriores, indicando que los resultados obtenidos con los PEG-GNRs sintetizados eran perfectamente comparables a los CGNRs. La capacidad de los PEG-GNRs para convertir la luz en calor se determinó inicialmente analizando el aumento de temperatura producido al irradiar concentraciones crecientes de los distintos tipos de PEG-GNRs con un láser de 808 nm a 4,5 W durante 10 minutos (Figura 5.6A). Los LGNRs demostraron la mayor eficiencia en la conversión de luz láser en calor en todas las concentraciones probadas (Figura 5.6A).

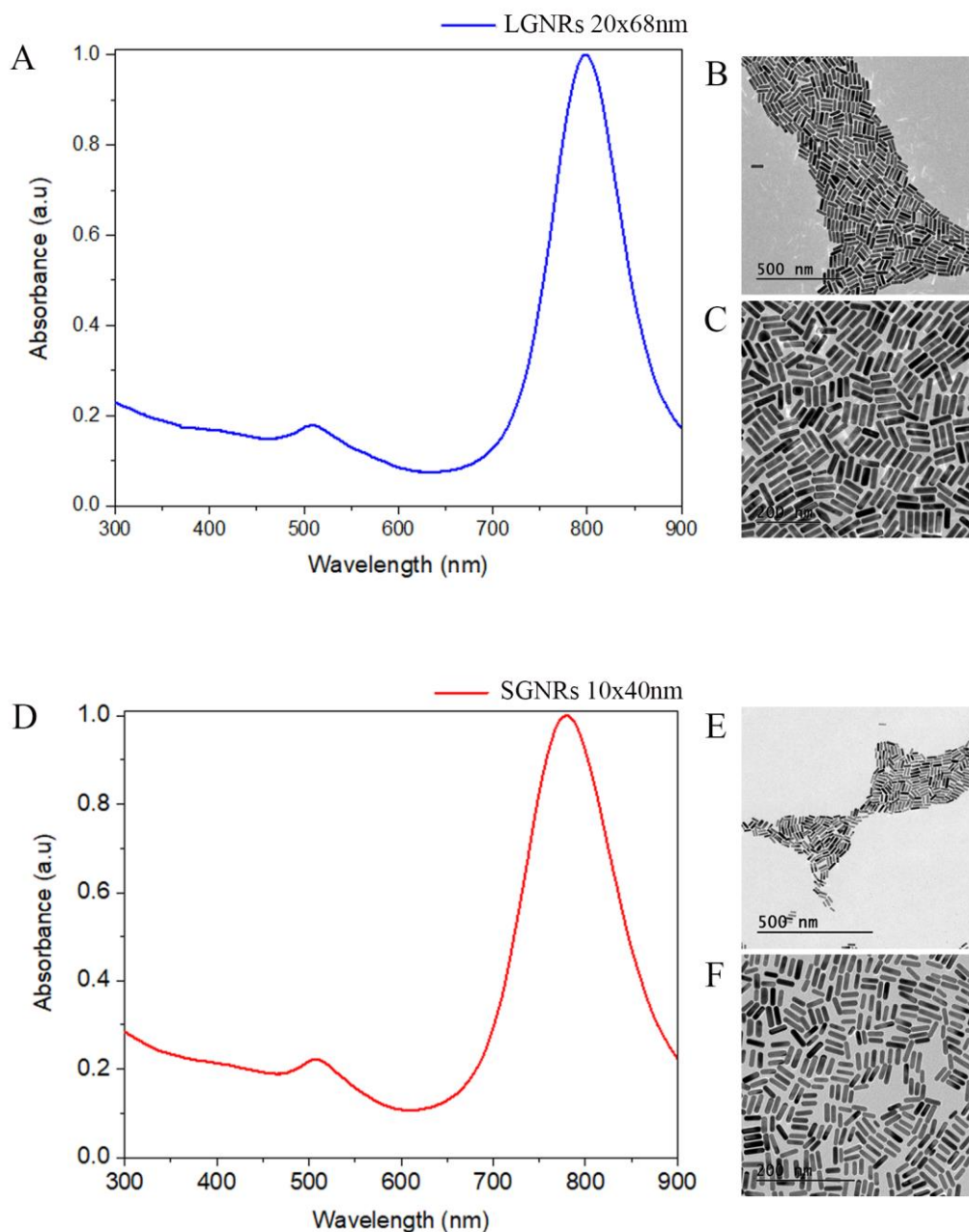


Figura 5.5: Pico de absorbancia a 808 nm de LGNRs (A) y SGNRs (D). Imágenes TEM de LGNRs (B-C) y SGNRs (E-F) con diferentes aumentos.

Los LGNRs fueron capaces de producir un aumento de la temperatura de 25,6 °C en respuesta a la irradiación láser en la concentración más alta probada (10 $\mu\text{g/mL}$) (Tabla 5.1). Además, incluso a 5 $\mu\text{g/mL}$, los LGNRs produjeron un mayor aumento de la temperatura en comparación con los SGNRs y los CGNRs en su concentración más alta (10 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 5.6Ay Tabla 5.1). Los PEG-GNRs más pequeños (SGNRs y CGNRs) mostraron curvas de temperatura similares en respuesta a la aplicación del láser (Figura 5.6A y Tabla 5.1). Estos resultados indicaron que estos

PEG-GNRs, especialmente los LGNRs, pueden utilizarse en concentraciones bajas (1-2 $\mu\text{g/mL}$) para producir condiciones de hipertermia, y que la potencia del láser seleccionada (4,5 W) no indujo hipertermia en ausencia de GNRs, ya que se observó un calentamiento de sólo 2,2 $^{\circ}\text{C}$ cuando el medio sin GNRs fue irradiado con el láser de 808 nm durante 10 minutos (Figura 5.6A).

Tabla 5.1: Incrementos de temperatura obtenidos cuando los PEG-GNRs a las concentraciones indicadas fueron expuestos a un láser de 808nm a 4.5W durante 10 minutos.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Incremento de temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		
	CGNRs	SGNRs	LGNRs
10	17.5	17.7	25.6
5	12.0	9.8	18.9
2	7.3	8.7	14.5
1	7.2	5.5	10.7

Para la aplicación de PTT, es crucial evaluar la estabilidad fototérmica de los PEG-GNRs ya que ciertos GNRs pueden sufrir cambios estructurales tras la absorción del láser [155]. Para evaluar la estabilidad fototérmica de los PEG-GNRs y excluir cambios morfológicos que pudieran producir un cambio en el LSPR, los PEG-GNRs fueron sometidos a tres ciclos de irradiación consecutivos para investigar si las altas temperaturas podrían tener un impacto en su estructura y estabilidad. Los PEG-GNRs se irradiaron a altas concentraciones (50 $\mu\text{g/mL}$) porque la temperatura alcanzada tras los repetidos ciclos de irradiación a esta concentración es mayor que la obtenida a una concentración menor, como la utilizada para los tratamientos con PTT (2 $\mu\text{g/mL}$). Esta elección facilitó la fácil observación de cualquier efecto potencial sobre la estructura de los PEG-GNRs resultante de la irradiación con láser repetida. Cuando la solución que contenía los PEG-GNRs se sometió a tres ciclos de encendido y apagado del láser, la temperatura máxima alcanzada en cada ciclo fue similar para todos los PEG-GNRs (Figura 5.6B). Sólo se observaron ligeras diferencias en los perfiles de enfriamiento de cada tipo de partícula. Por tanto, las eficiencias de conversión de luz en calor se mantuvieron constantes durante tres ciclos consecutivos de calentamiento y enfriamiento, lo que

confirma la estabilidad de la respuesta fototérmica de todos los tipos de PEG-GNRs.

Para evaluar la homogeneidad de la distribución de la temperatura en el medio, se colocó una solución de PEG-GNRs de 50 $\mu\text{g/mL}$ en los mismos pocillos donde se siembran las células para los tratamientos PTT *in vitro*. Para estos experimentos, se eligió una mayor concentración de PEG-GNRs (50 $\mu\text{g/mL}$) en comparación con la utilizada para los tratamientos PTT (2 $\mu\text{g/mL}$) con el fin de discriminar claramente el aumento de temperatura producido en el pocillo tras la irradiación láser. A continuación, se irradió la solución de PEG-GNRs con un láser de 808 nm a 4,5 W durante 30 segundos. Las imágenes de la cámara de infrarrojos del calentamiento fototérmico revelaron que todo el pocillo experimentó un calentamiento uniforme (Figura 5.6C). Por lo tanto, todas las células incubadas con PEG-GNRs dentro del pocillo estarán sometidas a un aumento uniforme de la temperatura durante los tratamientos PTT *in vitro*. Además, las células de control (células sin PEG-GNRs) no estuvieron expuestas a ninguna alteración de la temperatura (Figura 5.6C).

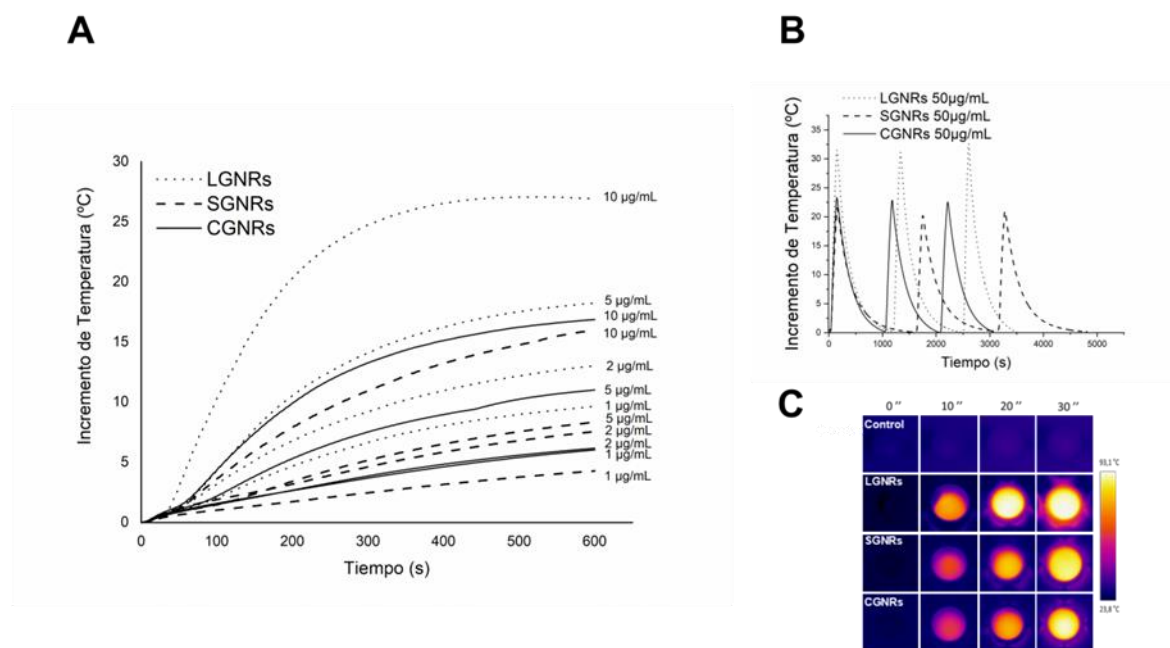


Figura 5.6: Curvas de temperatura obtenidas irradiando LGNRs, SGNRs y CGNRs a concentraciones crecientes (1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$) durante 10 minutos utilizando un láser de 808 nm a 4,5 W (A). Curvas de temperatura obtenidas irradiando

LGNRs, SGNRs, y CGNRs a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ mostrando tres ciclos de encendido/apagado del láser. Los GNRs se irradiaron durante 60 segundos a 4,5 W, después se apagó el láser hasta que la muestra volvió a su temperatura inicial para comenzar el siguiente ciclo de irradiación (B). Imágenes térmicas de LGNRs, SGNRs y CGNRs en una placa p96 multipocillo a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras se irradiaron a 4,5 W durante 30 segundos y las imágenes se tomaron a intervalos de 10 segundos (C).

5.2.2. Caracterización de HA-GNRs

En Figura 5.7, se pueden observar los espectros UV-visibles de los GNRs antes y después de la purificación mediante dos pasos de centrifugación (producto final denominado "pellet 2"). Como era de esperar, tanto los GNRs preparados como los purificados presentan las bandas plasmónicas típicas de las nanopartículas asimétricas en forma de bastones. En concreto, en la Figura 5.7 se aprecian claramente dos bandas de absorción, una banda con mayor absorbancia en la región del NIR (~ 800 nm, banda longitudinal, λ_L), y una banda de menor absorbancia que cae en la región visible (~ 512 nm), generada por la oscilación de los electrones a lo largo del eje transversal (λ_T). La banda plasmónica transversal está centrada en un valor de longitud de onda comparable al de las nanopartículas esféricas de oro de unos 10 nm de tamaño [156].

La Figura 5.8 muestra los espectros de los sistemas híbridos GNR con 200kDa-HA (Figura 5.8A) y 700kDa-HA (Figura 5.8B), y señala una interacción significativa entre las nanopartículas metálicas y las cadenas poliméricas, como demuestra el desplazamiento al rojo de λ_L tanto para 200kDa-HA-GNRs como para los 700kDa-HA-GNRs.

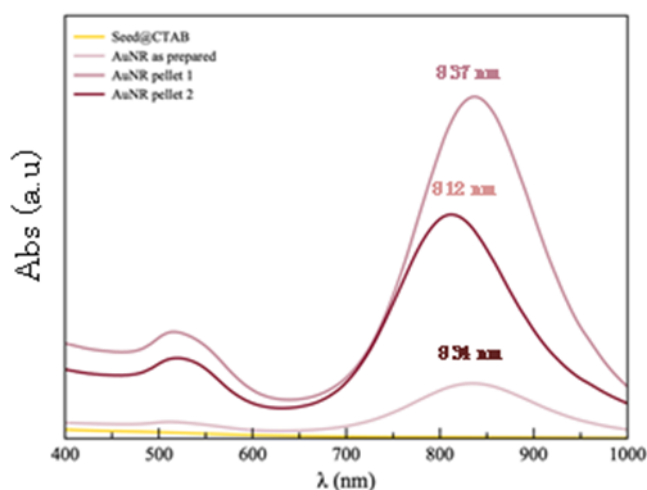


Figura 5.7. Espectros UV-visibles (cubeta $b=0,1$ cm) de GNRs antes (dilución 1:10 de los GNRs preparados) y después de la purificación (dilución 1:10 de las muestras de pellets).

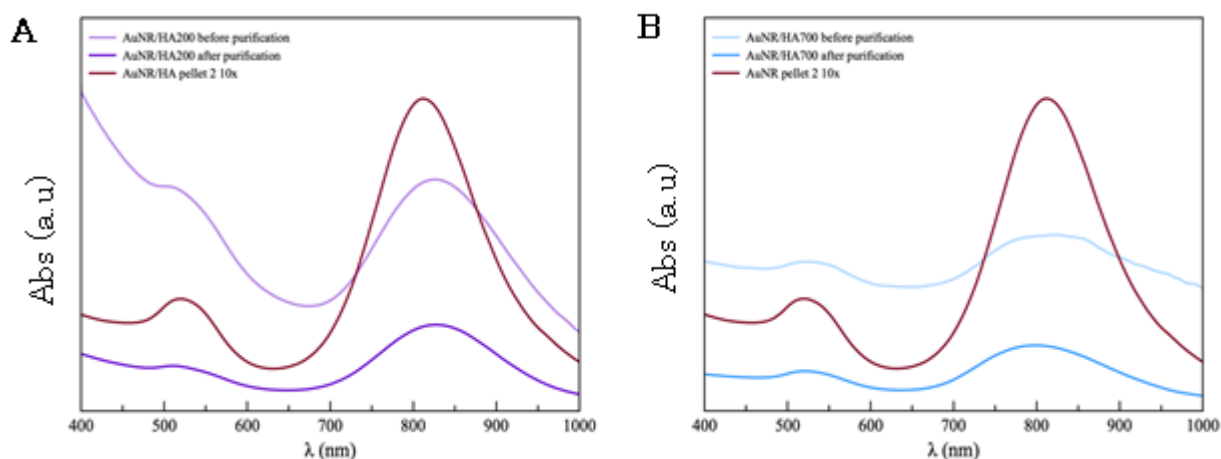


Figura 5.8: Espectros UV-visibles (cubeta $b=1$ cm) de 200kDa-HA-GNRs (A) y 700kDa-HA-GNRs (B) antes y después de la purificación.

El análisis cuantitativo de los parámetros ópticos de los espectros descritos en la Figura 5.8 se presenta en la Tabla 5.2, en términos de λ_T , λ_L y los respectivos valores de absorbancia. De acuerdo con las siguientes ecuaciones (1-2):

$$\varepsilon = 0.01203\lambda_L - 4.79151 \quad (1)$$

$$\lambda_L = (53.71R - 42.29)\varepsilon + 495.14 \quad (2)$$

Se puede calcular la relación de aspecto (R) y la concentración de nanopartículas (C, en nmol/L).

Tabla 5.2: Valores LSPR, relaciones de aspecto calculadas (R) para GNRs, 200kDa-HA-GNRs y 700kDa-HA-GNRs. La última columna informa de la concentración calculada (C) para las muestras no diluidas.

Muestra	λ_T (nm)	AT	λ_L (nm)	AL	R	C (nM)
GNRs preparados (1:10)	512	0.12	834	0.39	4.4	0.7
GNRs pellet 1 (1:10)	516	7.6	837	2.43	4.4	4.6
GNRs pellet 2 (1:10)	516	5.7	812	1.59	4.1	3.2
200kDa-HA-GNRs antes de la purificación	512	1.14	827	1.18	4.3	0.2
200kDa-HA-GNRs después de la purificación	512	0.23	827	0.44	4.3	0.08
700kDa-HA-GNRs antes de la purificación	521	0.76	822	0.9	4.2	0.2
700kDa-HA-GNRs después de la purificación	521	0.2	800	0.33	4.0	0.07

Cabe señalar que, tras la purificación (realizada mediante dos pasos de centrifugación a 8.000 r.p.m, 30 min, con lavado intermedio con agua MilliQ), las GNRs cubiertas con CTAB muestran una relación de aspecto menor, concretamente de R=4,4 a R=4,1. Este hecho se debe probablemente a la eliminación parcial de la cubierta de CTAB alrededor de las GNRs y el consiguiente efecto de agregación parcial.

En cuanto a las muestras híbridas 200kDa-HA-GNRs y 700kDa-HA-GNRs, antes de la purificación, las HA-GNRs muestran, junto con el desplazamiento al rojo en λ_L , una mayor relación de aspecto. Este hallazgo sugiere una interacción preferente de las cadenas de ácido hialurónico con la superficie más "defectuosa" de los planos basales de los bastones en lugar de la superficie lateral de los cilindros.

También para las muestras híbridas 200kDa-HA-GNRs y 700kDa-HA-GNRs se ha intentado la purificación de las mismas. Sin embargo, en este caso, ya después de

un paso de centrifugación (15 minutos a 10.000 r.p.m), se observó una agregación masiva, y las nanopartículas precipitaron sobre las paredes de los tubos Eppendorf (Figura 5.9).



Figura 5.9: Fotografías representativas de las muestras de HA-GNRs tras el procedimiento de purificación. Inmediatamente después de la centrifugación (A), los residuos de agregados en el Eppendorf (B) y el sobrenadante (C).

5.3. Experimentos *in vitro* con PEG-GNRs

A continuación, se describen los resultados obtenidos en la experimentación *in vitro* con los PEG-GNRs en ambas líneas celulares CT2A y B16F10. Principalmente los PEG-GNRs son utilizados en investigación *in vitro* e *in vivo*, que sirve de preámbulo para los experimentos con los HA-GNRs complejos tanto *in vitro* como *in vivo*.

5.3.1. Efectos de la irradiación con láser en células CT2A y B16F10

Para evaluar el impacto de la aplicación del láser en la viabilidad celular, las células CT2A y B16F10 se expusieron a irradiación láser durante 10 minutos a varias potencias del mismo, que oscilaban entre 1 y 4,5 W en ausencia de cualquier tipo de GNRs. Los resultados mostraron que cuando las células se irradiaron a temperatura ambiente (*Room temperature*, RT), ninguna de las potencias de láser probadas causó una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad celular, tanto en la línea celular CT2A como en la B16F10 (Figura 5.10A). No se observaron células muertas mediante ensayos de Calceína-IP 24 h después de la irradiación láser a 4,5 W, aunque se observó un menor número de células probablemente debido a una ralentización de la división celular (Figura 5.11A). Por lo tanto, se seleccionó una potencia láser de 4,5 W para realizar los experimentos de hipertermia *in vitro* a RT. Sin embargo, cuando se aplicó la irradiación láser a células mantenidas a 37 °C para emular las condiciones fisiológicas, las potencias láser de 1,5 W y superiores produjeron una disminución significativa de la viabilidad celular, especialmente en las células CT2A (Figura 5.10B). Por otro lado, las células B16F10 mostraron una reducción significativa de la viabilidad cuando se aplicaron potencias de láser de 2 W y superiores (Figura 5.11B). Por lo tanto, se seleccionó una potencia láser de 1 W para realizar los experimentos de hipertermia *in vitro* a 37 °C, ya que las potencias láser superiores provocaban una disminución significativa de la viabilidad celular.

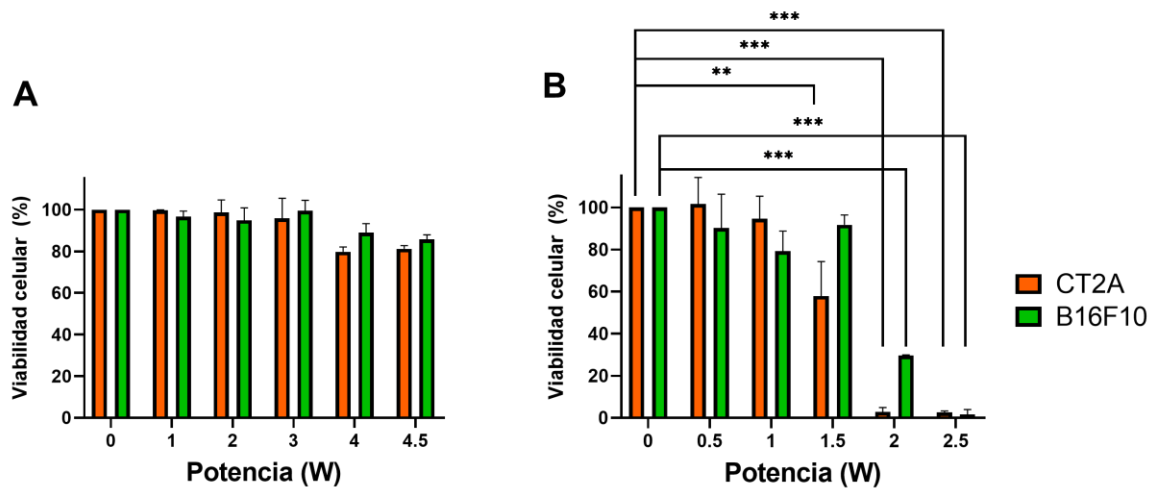
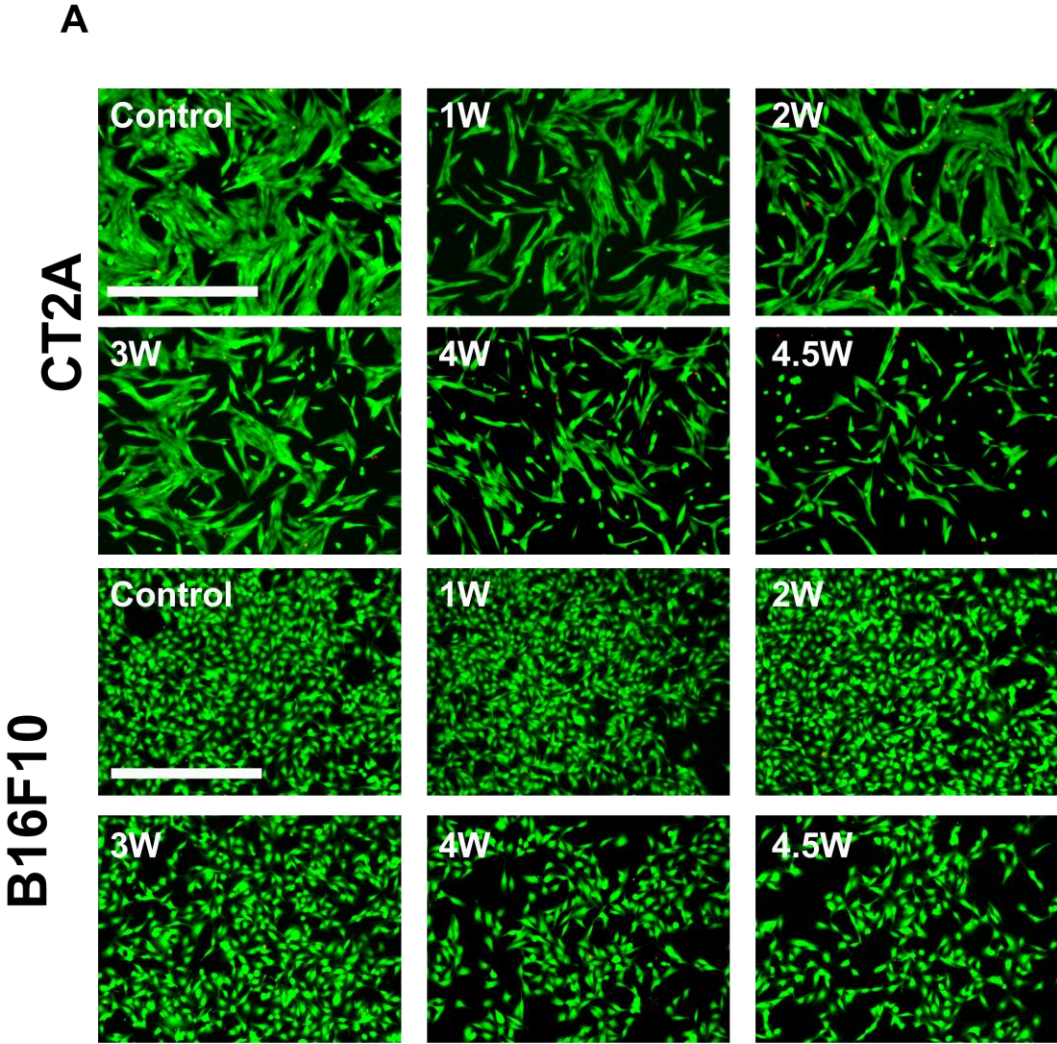


Figura 5.10: Viabilidad de las células CT2A y B16F10 evaluada mediante el ensayo XTT 24 h después de la irradiación con un láser de 808 nm durante 10 minutos a las potencias indicadas. Las células se irradiaron a RT (A) y a 37 °C (B). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



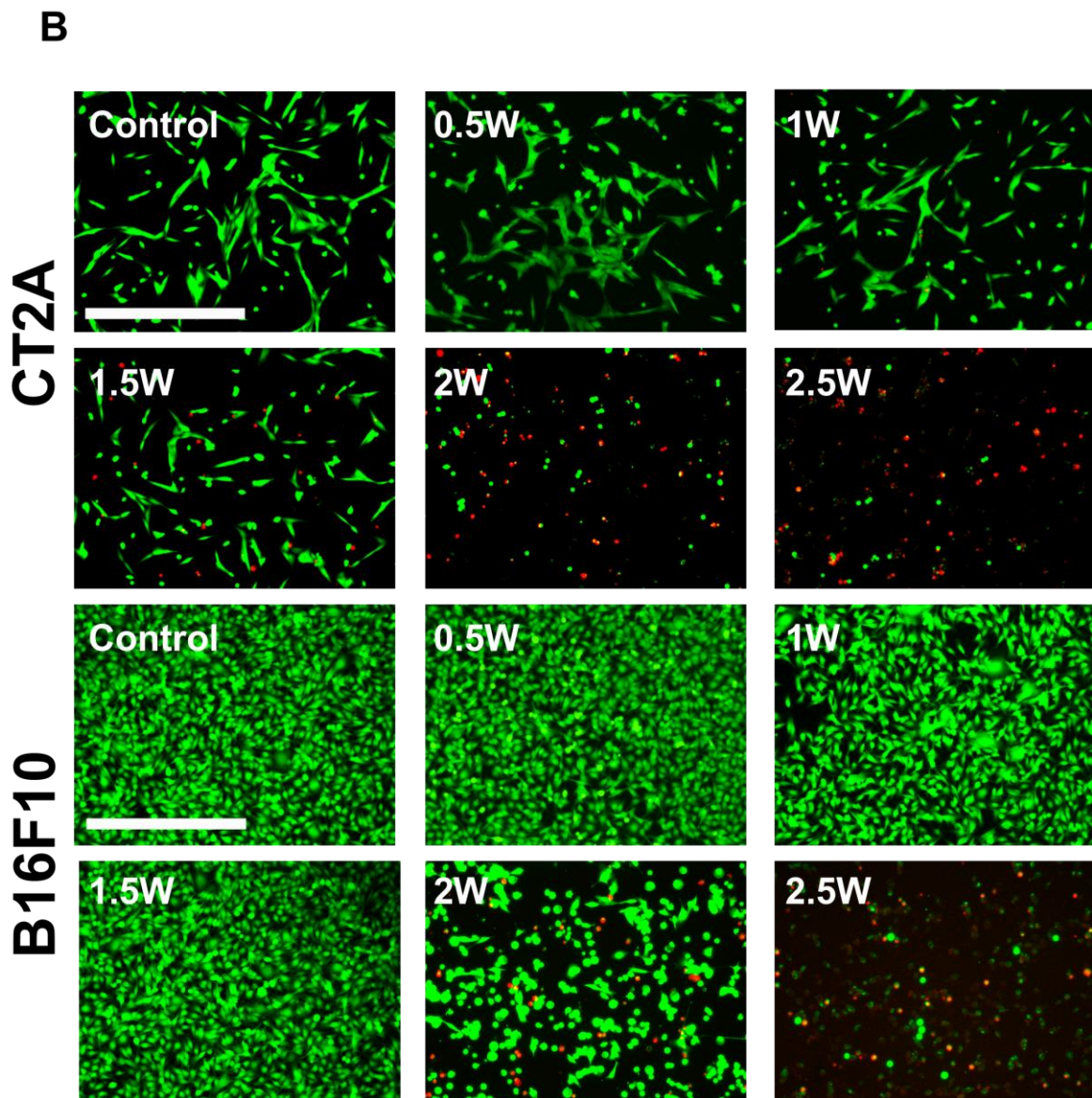


Figura 5.11: Imágenes de microscopía de fluorescencia de las células CT2A y B16F10 marcadas con calceína en verde (células vivas) e IP en rojo (células muertas) tras 24h de la exposición al láser a diferentes potencias (de 1W a 4,5W) durante 10 minutos a RT (A) y (de 0,5W a 2,5W) a 37 °C (B). Barra de escala: 400 μ M

5.3.2. Viabilidad de las células CT2A y B16F10 en presencia de PEG-GNRs

Para determinar el impacto de la concentración de PEG-GNRs en la viabilidad celular y evaluar la citocompatibilidad de los PEG-GNRs empleados en este estudio, se incubaron las líneas celulares CT2A y B16F10 con PEG-GNRs de diferentes tamaños a concentraciones crecientes (de 1 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 h. A continuación, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo XTT (Figura 5.12A y B) y los ensayos de calceína/PI (Figura 5.12C y D y Figura 5.13). En las células CT-2A, los PEG-GNRs no causaron una reducción significativa de la viabilidad celular, solamente a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observa un porcentaje significativo de mortalidad celular, aunque con una viabilidad celular alta aproximada al 80% (Figura 5.12A). Por otro lado, las células B16F10 mostraron una mejor tolerancia a la presencia de LGNRs, incluso a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que los SGNRs y CGNRs a la concentración más alta (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), redujeron significativamente la viabilidad celular en estas células (Figura 5.12B). Estos resultados mostraron que cuando ambas líneas celulares se incubaron con cualquier tipo de PEG-GNRs hasta una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la viabilidad celular no se ve afectada (Figura 5.12). Por lo tanto, se seleccionó una concentración de PEG-GNRs de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como concentración óptima para realizar los tratamientos de hipertermia *in vitro*.

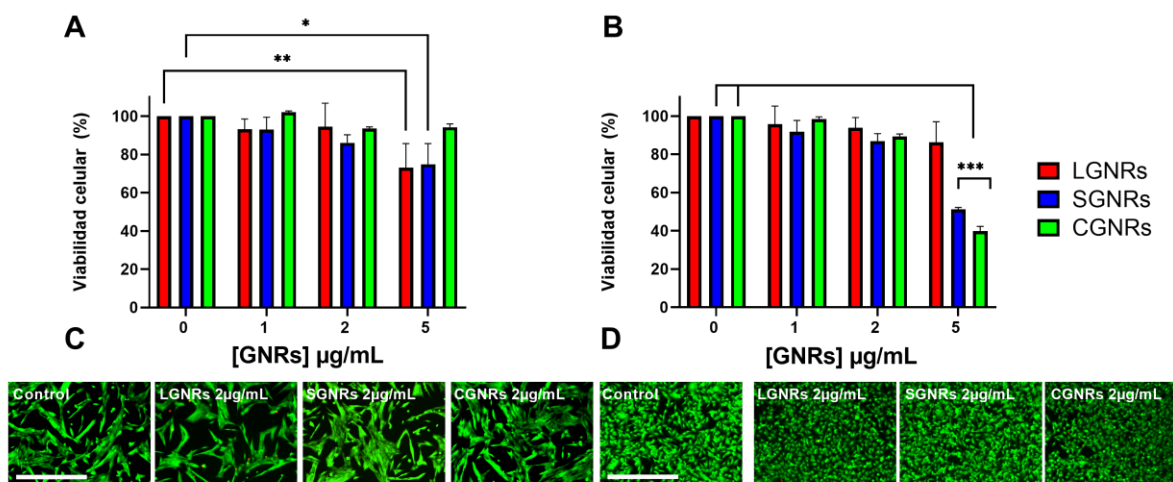
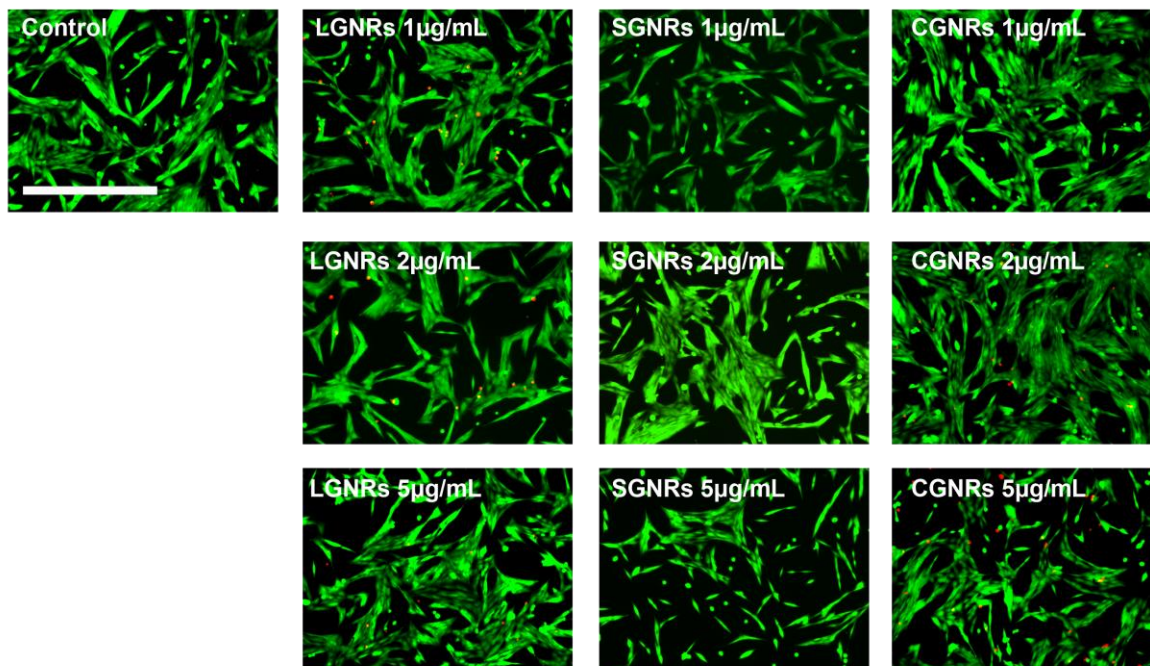


Figura 5.12: Viabilidad de células CT2A (A) y B16F10 (B) determinada mediante el ensayo XTT tras incubación con concentraciones crecientes de LGNRs, SGNRs y CGNRs

durante 24 h. También se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo Calceína-IP en células CT2A (C) y B16F10 (D) incubadas con todos los tipos de GNRs a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 24h. Las células viables se muestran marcadas con calceína en verde y las células muertas marcadas con IP en rojo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barra de escala: 400 μm .

A



B

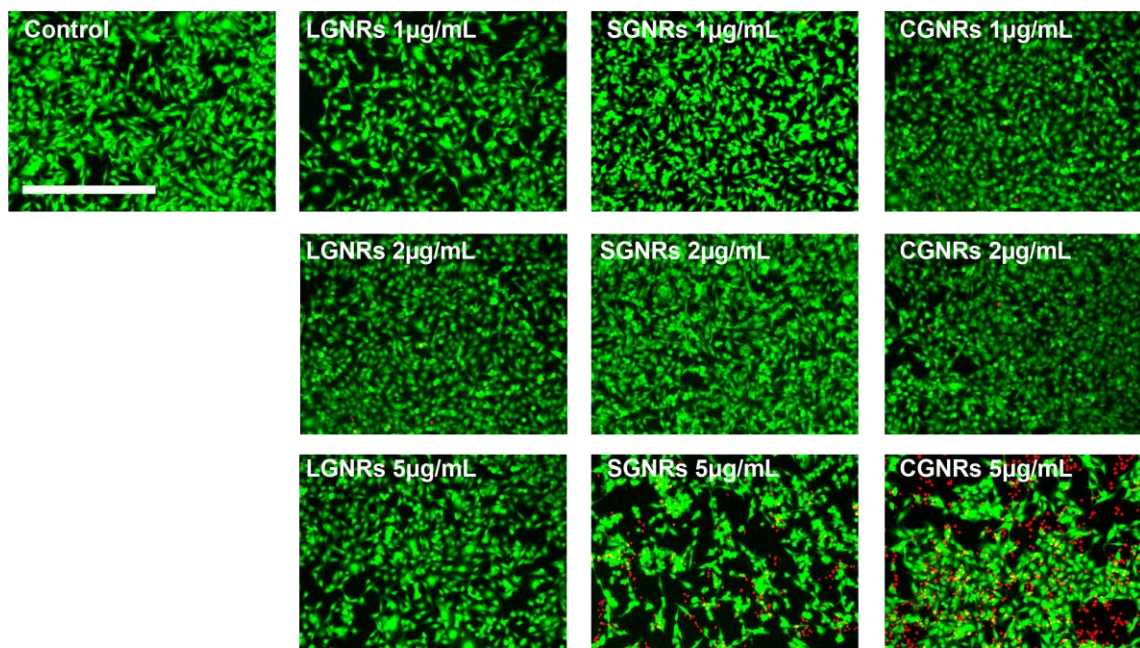


Figura 5.13: Imágenes de microscopía de fluorescencia de las células CT2A (A) y B16F10 (B) marcadas con calceína en verde (células vivas) e IP en rojo (células muertas) tras 24 horas de incubación en presencia de LGNRs, SGNRs y CGNRs a diferentes concentraciones (1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ y 5 $\mu\text{g/mL}$. Barra de escala: 400 μm .

5.3.3. Internalización de PEG-GNRs en CT2A y B16F10

La internalización de los GNRs en células vivas ha sido ampliamente descrita [136]. La absorción de los GNRs por las células depende de varios factores, como el tamaño, la forma, la carga, la química de la superficie de los GNRs y el tipo de célula [148]. Por lo tanto, es importante determinar la absorción de cada tipo de GNRs en diferentes líneas celulares. La capacidad de los PEG-GNRs para ser internalizados por las células CT2A y B16F10 se evaluó mediante microscopía de fluorescencia confocal (Figura 5.15) y microscopía de campo oscuro (Figura 5.16), tras exponer las células CT2A y B16F10 con PEG-GNRs a 2 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 horas. Para la caracterización de la autofluorescencia en las imágenes de microscopía confocal de los PEG-GNRs se realizaron perfiles de 3D de emisión y excitación como se muestra en la Figura 5.14. La presencia de PEG-GNRs en el interior de las células se detectó mediante microscopía confocal utilizando la propiedad de estos GNRs de reflejar la luz incidente (Figura 5.14).

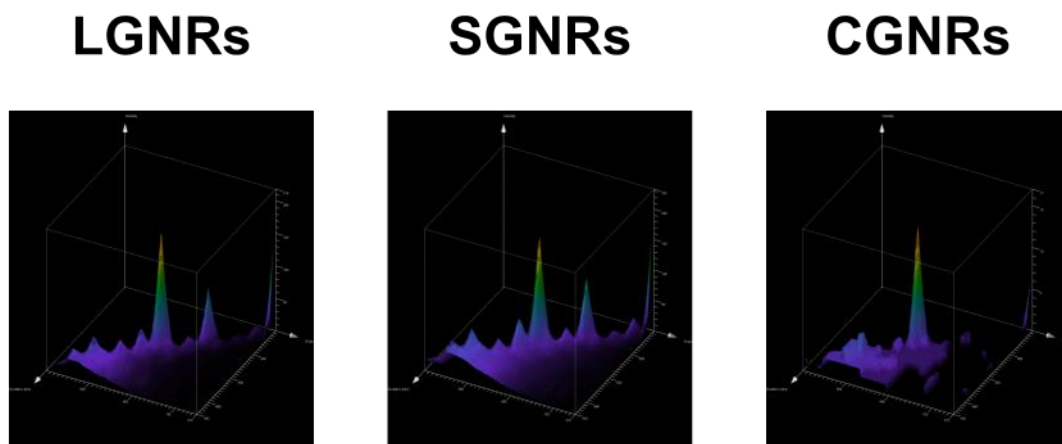


Figura 5.14: Perfiles 3D de emisión y excitación de autofluorescencia de los diferentes PEG-GNRs mediante microscopio confocal.

La presencia intracelular de PEG-GNRs se confirmó seccionando las imágenes confocales apiladas a lo largo de los planos XZ e YZ. Las proyecciones ortogonales realizadas en una sección intermedia del cuerpo celular mostraron la presencia de PEG-GNRs en el interior de ambos tipos celulares (puntos rojos en la Figura 5.15), demostrando que los LGNRs y los SNGRs fueron internalizados por ambos tipos celulares.

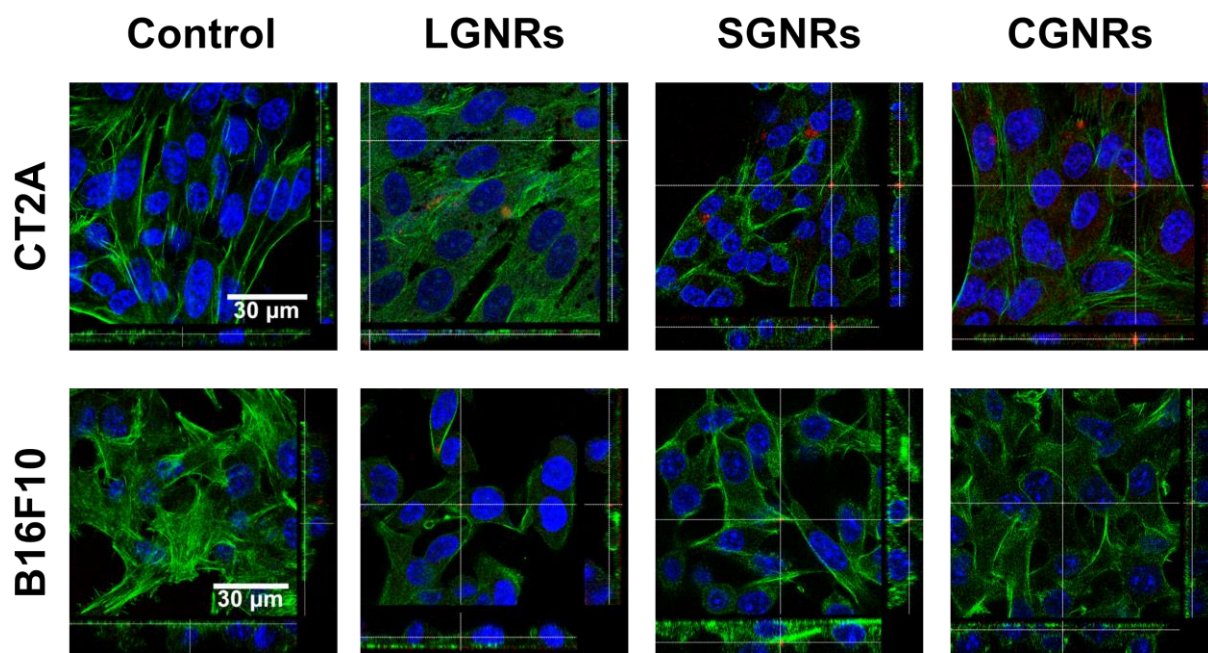


Figura 5.15: Imágenes de microscopía confocal de barrido láser de células CT2A y B16F10 incubadas con LGNRs, SGNRs y CGNRs a $2\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 h. Tras la fijación, las células se tiñeron con faloidina (verde) y los núcleos con Hoechst (azul). Los GNRs se detectaron por autofluorescencia (rojo). Las imágenes muestran que todos los tipos de GNR (rojo) se internalizaron eficazmente en el citosol de las células CT2A y B16F10. Barra de escala: $30\ \mu\text{m}$.

Para comparar y cuantificar la captación de los PEG-GNRs de diferentes tamaños en ambas líneas celulares, se observaron las células incubadas con LGNRs y SGNRs mediante microscopía de campo oscuro, tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los GNRs pueden visualizarse fácilmente en microscopía de campo oscuro debido a su fuerte resonancia plasmónica [158]. Se capturaron imágenes de campo oscuro de ambas líneas celulares incubadas con LGNRs y SGNRs, y las acumulaciones de PEG-GNRs se muestran como puntos amarillos/naranjas (Figura 5.16 D-F y J-L). Los resultados demostraron que en las células B16F10 se unía un número ligeramente superior de PEG-GNR que en las células CT2A (Figura 5.16M). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el número de LGNRs y SGNRs unidos a células B16F10, lo que indica que ambos tipos de PEG-GNRs fueron capaces de unirse a estas células en proporciones similares. Por otra parte, los SGNRs se unieron a las células CT2A

en mayor número que los LGNRs (Figura 5.16M). Las células control (células sin PEG-GNRs) no mostraron ningún punto amarillo/naranja (Figura 5.16Dy J).

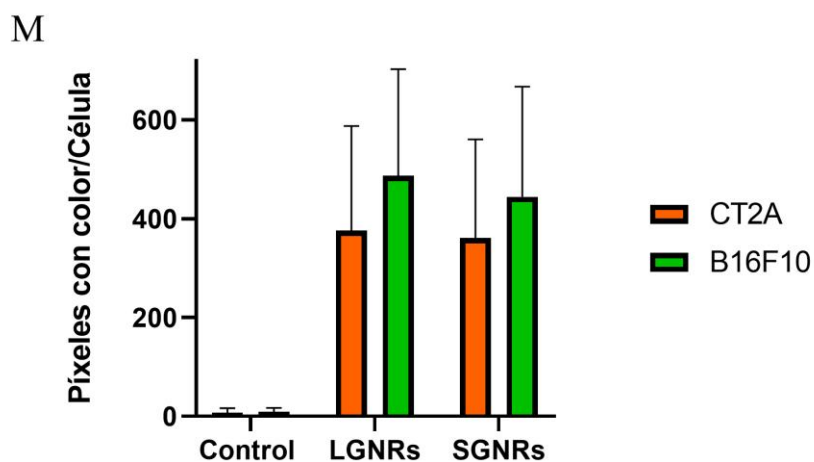
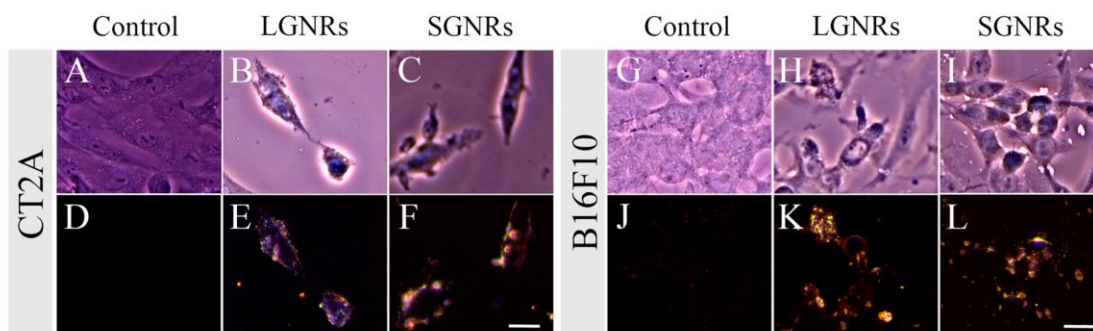


Figura 5.16: Imágenes de microscopía de campo claro (A-C y G-I) y campo oscuro (D-F y J-L) de células CT2A (A-F) y B16F10 (G-L). Ambos tipos celulares se incubaron con LGNRs y SGNRs a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 h, los paneles de control muestran células sin GNRs. La captación de LGNRs y SGNRs por las células CT2A y B16F10 se cuantificó contando los píxeles de color/célula por encima del umbral (células de control) utilizando el software ImageJ. Barras de escala: 15 μm .

5.3.4. Terapia Fototérmica mediada por PEG-GNRs. Efecto de la temperatura basal del cultivo celular

Una vez determinada la concentración óptima de PEG-GNRs y la potencia del láser, se aplicó PTT a las células CT2A y B16F10. Los PEG-GNRs se incubaron con las células durante 24 horas. Tras el periodo de incubación, las células se lavaron

con PBS para eliminar cualquier exceso de PEG-GNRs no unidos a ellas. Estas condiciones experimentales imitan mejor la situación *in vivo*, en la que los PEG-GNRs se expondrían a las células y posteriormente serían lavados por el fluido circundante y la circulación sistémica. Después de incubar las células con los PEG-GNRs durante 24 horas y lavarlas con PBS, se las sometió a irradiación con láser a una longitud de onda de 808 nm a 4,5 W durante 10 minutos. El objetivo de este tratamiento láser era inducir la PTT utilizando la capacidad de conversión de luz en calor de los GNRs. Los tratamientos de PTT se realizaron a RT y a 37 °C, para simular mejor las condiciones fisiológicas y evaluar el impacto de los tratamientos de PTT en un entorno más relevante. Trascurridas 24 h de la irradiación con láser, se evaluó la viabilidad celular mediante los ensayos XTT y Ca/IP. Los resultados obtenidos cuando se aplicó la PTT a RT demostraron que sólo las células que contenían PEG-GNRs presentaban una disminución significativa de la viabilidad celular en respuesta a la irradiación láser tanto en la línea celular CT2A (Figura 5.17A) como en la B16F10 (Figura 5.17B). Además, las células CT2A mostraron una mayor disminución de la viabilidad celular tras la PTT en comparación con las células B16F10 (Figura 5.17A y B, respectivamente). Según los resultados mostrados en la Figura 5.17A y B, los LGNRs fueron ligeramente más eficaces que los otros tipos de PEG-GNRs en la reducción de la viabilidad de las células CT2A y B16F10 cuando se aplicó PTT a RT. Además, ni los PEG-GNRs ni el láser por sí solos produjeron una disminución significativa de la viabilidad celular (Figura 5.17A y B). Los resultados obtenidos cuando la PTT se aplicó a 37 °C fueron similares a los obtenidos a RT, pero los índices de viabilidad celular fueron incluso inferiores en ambas líneas celulares (Figura 5.17C y D). Este tratamiento de PTT aplicado a 37 °C produjo una eliminación completa de las células cancerosas, especialmente en las células B16F10 (Figura 5.17D), que mostraron una mayor resistencia a los tratamientos de PTT aplicados a RT (Figura 5.17B). También en este caso, ni la aplicación de láser ni la incubación con PEG-GNRs por separado dieron lugar a una disminución de la viabilidad celular (Figura 5.17C y D).

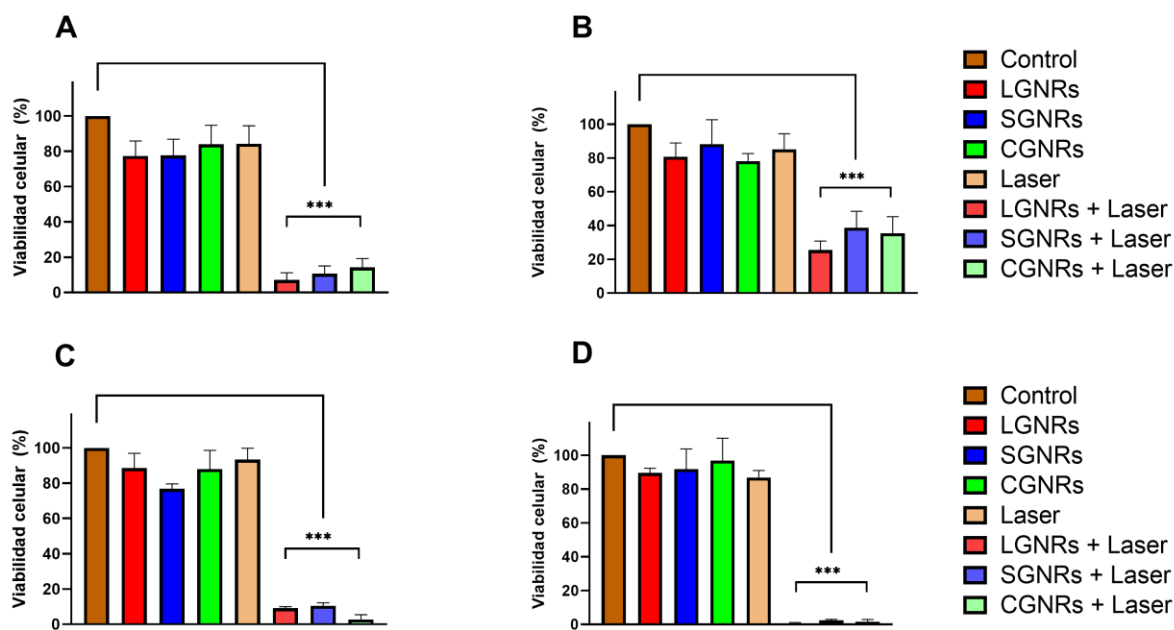


Figura 5.17: Viabilidad de células CT2A (A y C) y B16F10 (B y D) evaluada mediante el ensayo XTT tras tratamientos PTT realizados irradiando células preincubadas con LGNRs, SGNRs y CGNRs a 2 µg/mL durante 24 h y posteriormente irradiadas con un láser de 808 nm a 4,5 W durante 30 minutos a RT (A y B) y a 37°C (C y D). *** $p < 0.001$.

5.3.5. Mecanismos de Muerte celular implicados en la PTT mediada por PEG-GNRs

Tras los tratamientos de hipertermia, la apoptosis y la necrosis pueden producirse de forma secuencial o simultánea, dependiendo de la cantidad de NPs internalizadas por las células y de la cantidad de energía disipada por estas NPs tras la irradiación [159]. Es importante señalar que la necrosis a menudo conduce a la liberación de componentes intracelulares al medio extracelular, lo que puede desencadenar respuestas inflamatorias. Por lo tanto, en numerosas ocasiones se prefiere la muerte celular apoptótica como mecanismo para eliminar las células cancerosas.

En este apartado se pretende establecer el tipo de muerte celular producida tras la aplicación de PTT mediada por los PEG-GNRs experimentales, LGNRs y SGNRs. Las condiciones experimentales son las mismas que se han descrito en el apartado 4.4.5, las células son incubadas 24 h con los LGNRs y SGNRs, posteriormente lavadas para eliminar aquellos PEG-GNRs que no se han internalizado y se aplica

el láser a 4,5W durante 10 minutos. 24 h después de la PTT, las células son evaluadas mediante citometría de flujo en función de la fluorescencia producida por la anexina-V y el IP. De esta manera, se puede caracterizar la muerte celular, diferenciando entre células vivas (anexina-V⁻ / IP⁻), apoptóticas (anexina-V⁺ / IP⁻) o necróticas (anexina-V⁺ / IP⁺ y anexina-V⁻ / IP⁺)

La muerte celular producida en células CT2A preincubadas con LGNRs y SGNRs 24 h después de la aplicación del láser se produjo preferentemente por apoptosis antes que por necrosis (Figura 5.18A). Se observaron tasas de necrosis similares en las células CT2A 24 h después de la irradiación láser en presencia de LGNRs y SGNRs (Figura 5.18A). En las células B16F10, la apoptosis también resultó ser el mecanismo predominante de muerte celular 24 h después de la irradiación láser. La vía apoptótica fue el método predominante de eliminación de estas células cuando se utilizaron ambos tipos de PEG-GNRs, aunque los LGNRs produjeron un porcentaje ligeramente superior de células necróticas en comparación con los SGNRs (Figura 5.18B).

No se observaron diferencias significativas en el número de células apoptóticas al comparar los distintos tipos de PEG-GNRs en ambas líneas celulares (Figura 5.18). Los tratamientos con PTT en presencia de CGNRs produjeron tasas de muerte celular apoptótica comparables a las observadas con LGNRs y SGNRs, resultando en un $49,7 \pm 15,3$ % y un $59,5 \pm 10,2$ % de células apoptóticas en las células CT2A y B16F10, respectivamente (datos no graficados).

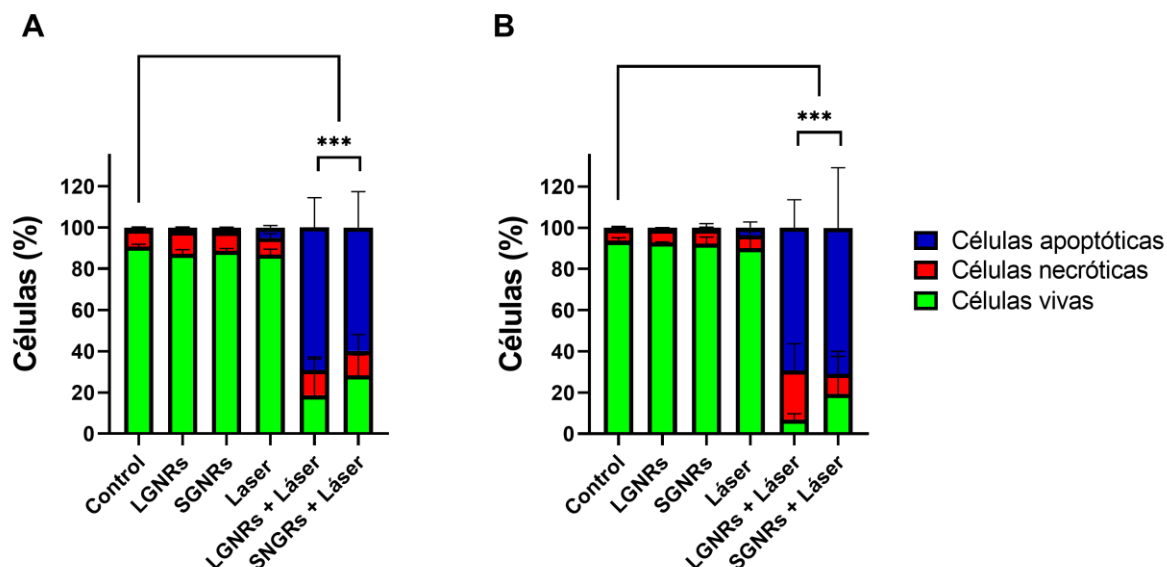


Figura 5.18: Análisis de la muerte celular mediante citometría de flujo (tinción con anexina V y PI) en células CT2A (A) y B16F10 (B) 24 h después de los tratamientos con PTT. Para los tratamientos de PTT, las células se preincubaron con LGNRs y SGNRs a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 h y luego se irradiaron con un láser de 808 nm a 4,5 W durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células apoptóticas se definieron como células Annexin-V⁺/PI⁻ y las células necróticas como células Annexin-V⁺/PI⁺ y Annexin-V⁻/PI⁺. *** $p < 0,001$ (entre grupos de células apoptóticas).

Para investigar la posible implicación de los lisosomas en la muerte celular tras los tratamientos con PTT, se realizó una tinción lisosomal utilizando una sonda acidotrópica fluorescente (Lysotracker), que muestra una alta afinidad por orgánulos ácidos como los lisosomas [160]. La evaluación de la tinción lisosomal se realizó 2 h después de los tratamientos PTT en células CT2A y B16F10, para determinar si los lisosomas desempeñan un papel significativo en el proceso de muerte celular observado.

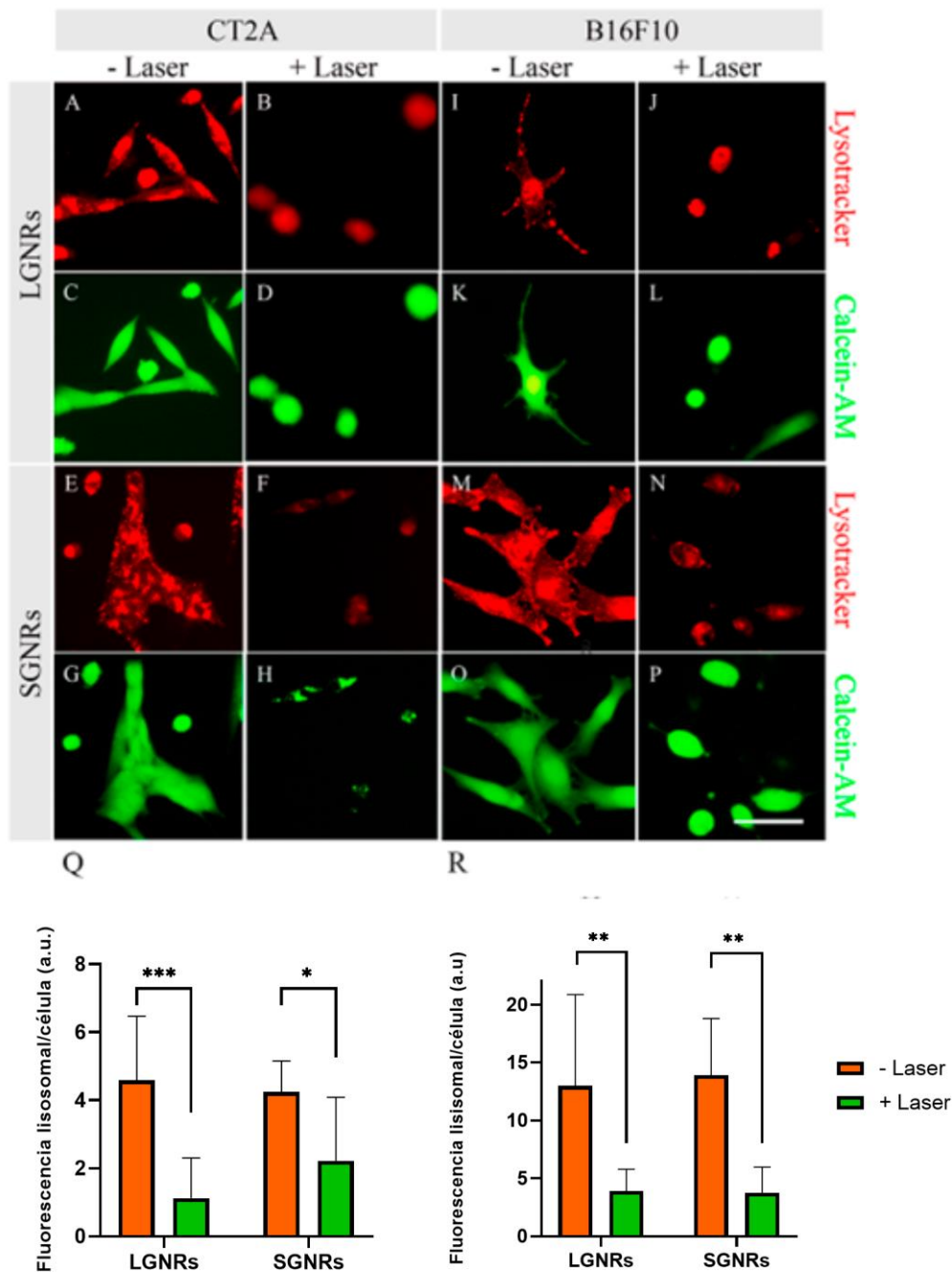


Figura 5.19: Tinción lisosomal y de calceína en células CT2A (A-H) y B16F10 (I-P) incubadas con LGNRs y SGNRs a 2 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h y sometidas después a tratamientos PTT irradiando las células con un láser de 808 nm a 4,5 W durante 30 min. Los lisosomas se tiñeron de rojo con LysoTracker y las células viables de verde con Calcein-AM. La intensidad de fluorescencia de la tinción lisosomal por célula viable se cuantificó en todas las condiciones utilizando ImageJ en células CT2A (Q) y B16F10 (R). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barra de escala: 20 μm .

Lysotracker es un marcador fluorescente que se acumula específicamente en lisosomas intactos dentro de células vivas. Cuando se rompe la membrana lisosomal, la sonda lisosomal fluorescente se libera al citosol, lo que provoca una disminución de la intensidad de la fluorescencia celular y una disminución de la marca fluorescente punteada típica del marcaje lisosomal [160]. La Figura 8 muestra que en las células CT2A y B16F10 no irradiadas (células incubadas con GNRs pero sin tratamiento PTT), el etiquetado lisosomal aparece fuerte y punteado en ambas líneas celulares (Figura 5.19A, E, I y M). Sin embargo, cuando estas células fueron irradiadas con láser tras la incubación con GNRs, la tinción de los lisosomas 2h después de los tratamientos con PTT, se volvió difusa y significativamente menos intensa (Figura 5.19B, F, J, y N). A pesar de este cambio en la tinción de los lisosomas, las células siguieron siendo viables, como indica la tinción positiva con calceína (Figura 5.19D, L, H y P). Estos resultados sugieren que la fuga de lisosomas es uno de los acontecimientos biológicos que se producen junto con la muerte celular inducida por los tratamientos con PTT, en consonancia con los hallazgos anteriores comunicados para otros tratamientos basados en nanopartículas [161].

5.3.6. Efecto de PTT en combinación con el 5-Fluoruracilo

En los experimentos realizados con PTT en combinación con 5-FU se han utilizado las células B16F10 debido a su resistencia a ser eliminadas mediante PTT. Para evaluar el efecto de la citotoxicidad del fármaco 5-FU se incuban las células B16F10 durante 24 horas en presencia del fármaco a concentraciones crecientes (0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1 µg/mL, 1.5 µg/mL, 2 µg/mL y 2.5 µg/mL). Para establecer la concentración de 5-FU que se va a utilizar en combinación con la PTT se analizan los resultados de viabilidad celular obtenidos en presencia de concentraciones crecientes del fármaco, mediante el ensayo XTT (Figura 5.20). Como se muestra en la Figura 5.20A, hay diferencias significativas (***) ($p < 0.001$) en la viabilidad celular entre el control y las concentraciones de 5-FU de 1 µg/mL y 2.5 µg/mL, ambas incluidas. Por tanto, las concentraciones elegidas para los experimentos de PTT son 0.25 µg/mL y 0.5 µg/mL, dosis a las que la viabilidad celular no disminuye más

de un 25% con el objetivo de disminuir la dosis utilizada del fármaco y evitar los efectos secundarios asociados al tratamiento de quimioterapia.

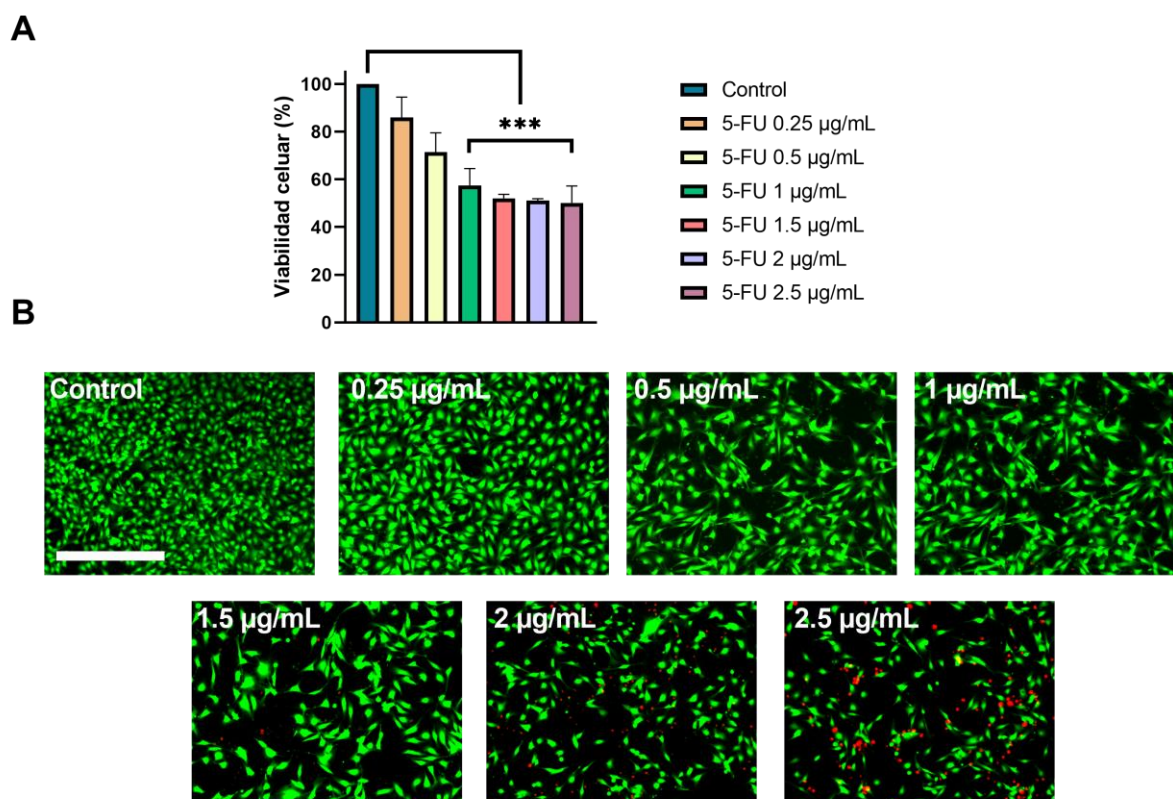
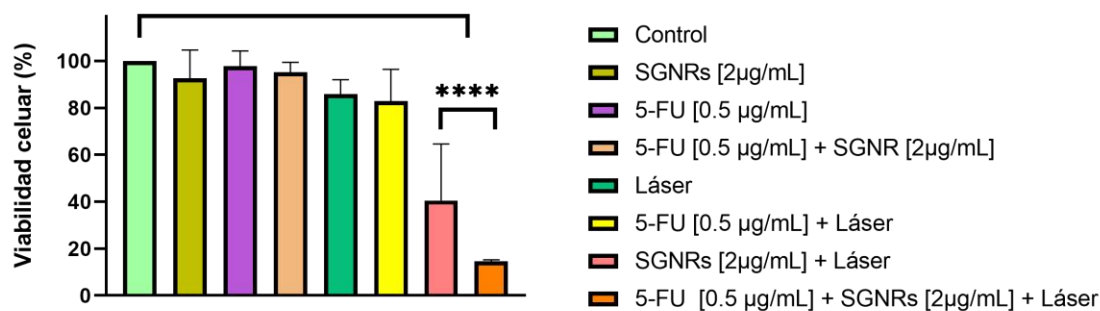


Figura 5.20: Viabilidad de células B16F10 determinada mediante el ensayo XTT (A) y Calceína-IP (B) tras incubación con concentraciones crecientes de 5-FU (0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1 µg/mL, 1.5 µg/mL, 2 µg/mL y 2.5 µg/mL) durante 24 h. ***p<0,001. Barra de escala: 400 µm.

Una vez establecidas las concentraciones del 5-FU que no disminuyen la viabilidad celular más de un 25%, se lleva a cabo la PTT mediada por SGNRs a una concentración de 2 µg/mL, aplicando el láser a una potencia de 4.5W durante 10 minutos y en presencia de 0.5 µg/mL 5-FU. El experimento se realiza con sus correspondientes controles, sin producir ninguno de ellos una disminución de la viabilidad (Figura 5.21). La aplicación de la PTT y la PTT en combinación con quimioterapia produce una reducción significativa (****p<0.0001) de la viabilidad celular con respecto al control (Figura 5.21A). Como se muestra en el gráfico de la Figura 5.21A, la aplicación de la PTT en presencia del fármaco muestra una

tendencia a producir mayor mortalidad que la PTT por si sola, pero no hay diferencias significativas entre dichos grupos.

A



B

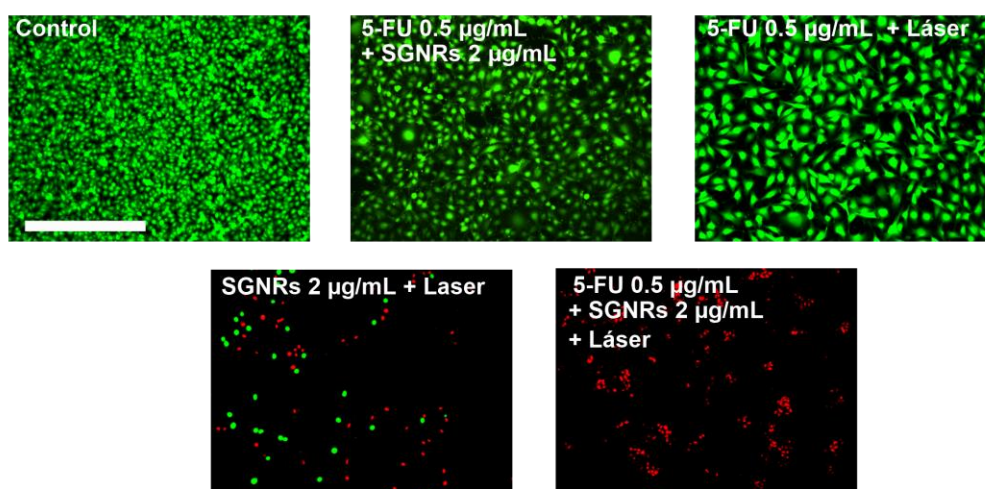


Figura 5.21: Viabilidad de células B16F10 determinada mediante el ensayo XTT (A) y Calceína-IP (B) transcurridas 24h de la aplicación de PTT mediada por SGNRs (2 µg/mL) irradiando con el láser a 4.5W durante 10 minutos en ausencia y presencia de 5-FU (0.5 µg/mL). **** $p < 0,0001$. Barra de escala: 400 µm.

Con el objetivo de determinar si la introducción del fármaco en la aplicación de PTT permite la disminución de las concentraciones de SGNRs (1 µg/mL) manteniéndose la irradiación con el láser a una potencia de 4.5W, se aplicó la PTT y la PTT en combinación con la quimioterapia utilizando el 5-FU a dosis no citotóxicas (0.25 µg/mL y 0.5 µg/mL). Como se observa en la Figura 5.22A, la disminución de la viabilidad celular tras la aplicación de la PTT utilizando una concentración menor de los SGNRs (1 µg/mL) es significativo frente al control (** $p < 0,001$), aun así el 50% de las células son viables. Sin embargo, cuando el 5-

FU está presente, a cualquiera de las concentraciones analizadas, durante la aplicación de la PTT la mortalidad celular aumenta drásticamente e incluso es mayor que la mortalidad conseguida con la PTT utilizando SGNRs a mayor concentración (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La mejoría en la mortalidad celular cuando el fármaco está involucrado es evidente ya que hay una significancia máxima en comparación con el control (**** $p < 0.0001$) (Figura 5.22A). En las imágenes de fluorescencia (Figura 5.22B) con calceína/IP, se observa la mortalidad que se refleja en el XTT (Figura 5.22A) en las condiciones donde se aplica PTT en combinación con el 5-FU.

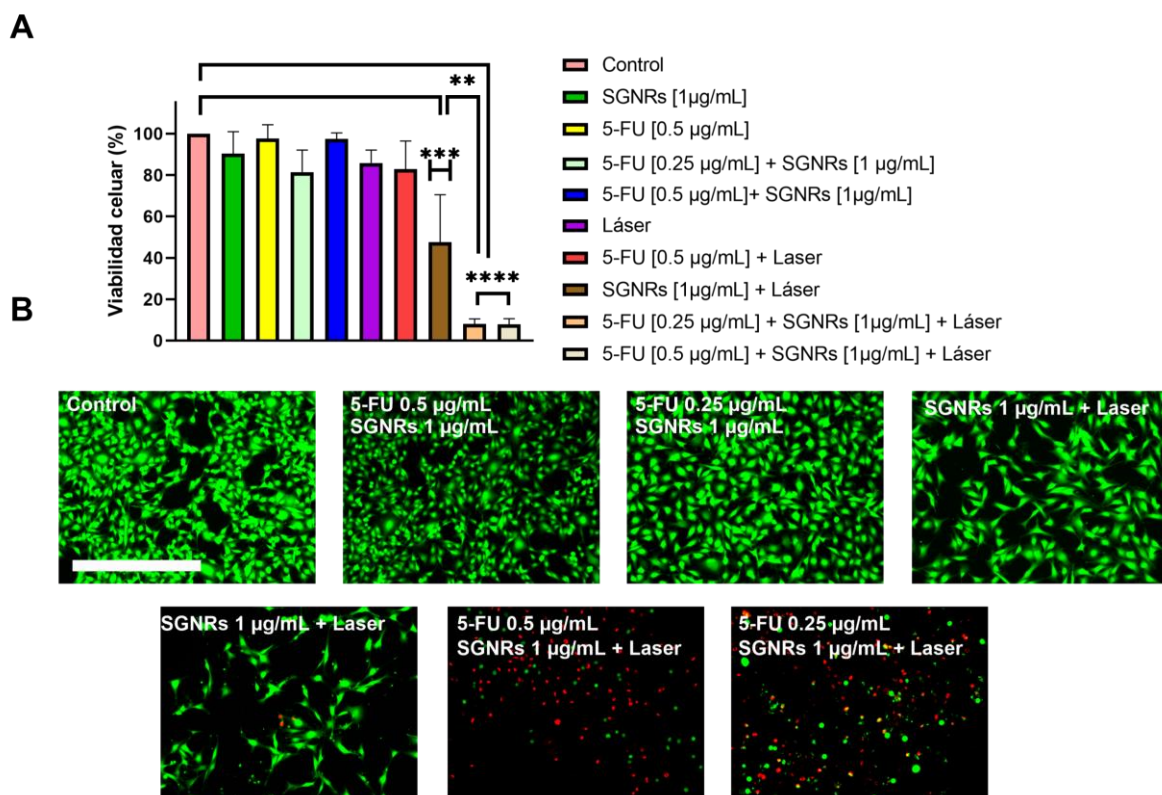


Figura 5.22: Viabilidad de células B16F10 determinada mediante el ensayo XTT (A) y Ca/IP (B) 24h después de la aplicación de PTT mediada por SGNRs (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 5-FU (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a una potencia de 4.5 W durante 10 minutos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Barra de escala: 400 μm .

La aplicación de la PTT con la concentración reducida de SGNRs (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el fármaco 5-FU (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sigue siendo eficaz, produciendo una gran mortalidad de las células B16F10. La mortalidad producida por PTT con SGNRs a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es menor en comparación con la muerte producida por la combinación de la PTT y la quimioterapia, existiendo diferencias significativas entre estos determinados grupos experimentales.

El siguiente paso fue determinar si la combinación de PTT y quimioterapia permite utilizar una menor potencia de láser para conseguir una reducción similar de la viabilidad celular, para ello se utilizó para irradiar las muestras una potencia menor del láser (1.2 W) utilizando también la menor concentración de SGNRs (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se determinó el efecto de la quimioterapia con dosis de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-FU. La aplicación de la PTT a una potencia de 1.2W y una concentración de SGNRs de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no es suficiente para eliminar las células B16F10 a RT ya que la mortalidad es muy baja. Sin embargo, cuando se aplica la PTT en las condiciones mencionadas en presencia del 5-FU la mortalidad aumenta dependiendo de las concentraciones del fármaco. Así mismo, también hay diferencias entre los grupos donde se ha utilizado el 5-FU, aumentando la mortalidad aproximadamente un 20% utilizando una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en comparación con el uso de la concentración 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 5.23). Otro detalle a destacar, es la no significancia entre el control y la PTT mediada solamente por SGNRs sin presencia del fármaco, sin embargo si se encuentran diferencias significativas entre el control y los grupos donde se combina la PTT con la quimioterapia. La combinación entre la PTT y la quimioterapia es mucho más eficaz que las terapias por separado, ya que por si solas no se produce una significativa reducción de la viabilidad celular.

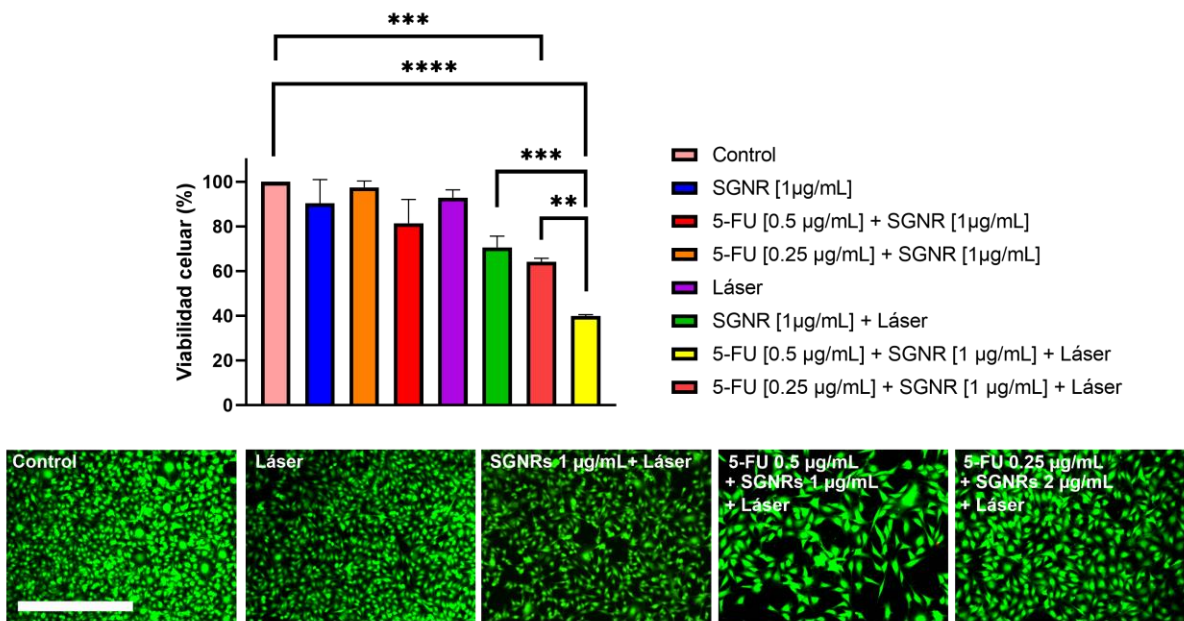


Figura 5.23: Viabilidad de células B16F10 determinada mediante el ensayo XTT (A) y Ca/IP (B) 24h después de la aplicación de PTT mediada por SGNRs (1 µg/mL) y 5-FU (0.25 µg/mL y 0.5 µg/mL) a una potencia de 1.2 W durante 10 minutos. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Barra de escala: 400 µm.

5.4. Experimentos *in vivo* con PEG-GNRs

En lo referente al modelo de melanoma se ha desarrollado el modelo mediante inyección subcutánea de células B16F10 para su posterior tratamiento con PTT mediada por SGNRs y el consecuente seguimiento del tamaño y peso de los tumores de animales tratados con PTT frente a los no tratados.

5.4.1. Modelo murino de melanoma. Evaluación temporal del tamaño del tumor

Se ha explorado la implantación del tumor en diferentes partes del cuerpo del ratón como puede ser el flanco derecho, axila y pecho. Estas y otras zonas del cuerpo como el ojo o espalda, son algunas de las localizaciones del tumor que están descritas en la literatura científica [162], [163], [164], [165], [166]. La inyección subcutánea de 100.000 células B16F10 en un volumen total de 4 μ L se realizó de forma simultánea en ratones C57/BL-6, cada uno en una localización diferente, en este caso pecho, axila y flanco derecho. Se realizó la precisa medida del diámetro del tumor con un calibre electrónico después de 15 días de la inducción del tumor que resultó ser de un diámetro de 8.82 mm en axila y 8 mm en el pecho y el flanco derecho. Al ser una inyección subcutánea, el tumor se queda encapsulado en la piel de forma que se identifica rápidamente independientemente de la zona. En la Figura 5.24 se muestra cómo se mide el diámetro del tumor con el calibre electrónico.



Figura 5.24: Método de medición del tumor de melanoma con un calibre electrónico

Debido a que la implantación de las células en las 3 localizaciones analizadas produjo tumores de tamaño similar, se eligió la implantación en el pecho por ser una localización adecuada para la irradiación con el láser en nuestro diseño experimental. En esta localización se indujeron tumores en un tamaño muestral de $n=3$ animales. Se realizan mediciones del tamaño del tumor en diferentes puntos temporales (4, 7, 11, 15, 23 días) para realizar un seguimiento del tamaño del tumor a lo largo del tiempo. Los resultados se describen en la Figura 5.25. Se observan diferencias significativas en el tamaño del tumor a partir de los 7 días, a medida que aumenta el tamaño del tumor. Después de los 7 días, el tumor suele superar el tamaño de 5 mm de diámetro, y después de los 15 días se sobrepasan los 10 mm de diámetro. A los 23 días post inyección de las células tumorales, el tumor es considerado lo suficientemente grande como para finalizar la evaluación del tamaño del tumor, siendo el día de finalización de todos los siguientes experimentos.

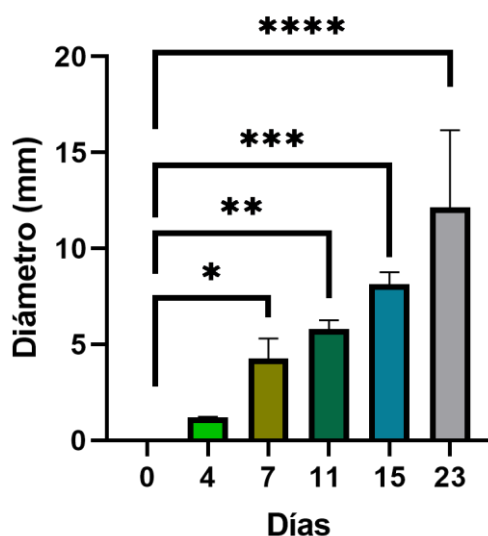


Figura 5.25: Evolución del tamaño del tumor de células de melanoma B16F10 en ratones C57/BL-6 en distintos puntos temporales (4, 7, 11, 15 y 23 días) medidos con calibre electrónico. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$.

5.4.1.1. Tratamiento con PTT en modelos murinos de melanoma.

Se han realizado experimentos con PTT en ratones C57/BL-6 a dos puntos temporales con el fin de optimizar el diseño experimental. Se evalúa tanto la accesibilidad del tumor de diferentes tamaños como el comportamiento del tumor tras la aplicación de la PTT. En los 4 días siguientes a la inyección de las células, el tumor mide $1.193 \text{ mm} \pm 0.021$ como se observa en la Figura 5.25. En ese momento, se realiza la aplicación de PTT inyectando previamente las SGNRs a una concentración de $1.89 \mu\text{g/mL}$ en un volumen total de $4 \mu\text{L}$, en 4 localizaciones diferentes radiales al tumor, e irradiándose inmediatamente después a una potencia de 450 mW durante 25 min . Posteriormente, se ha evaluado la evolución del tumor hasta los 11 días, tiempo en el que se observó que el tumor en los animales tratados con PTT había sido completamente eliminado (Figura 5.26A).

La eficacia de la PTT también se comprobó en un tumor 11 días después de la inyección de las células B16F10. A los 11 días el tumor tiene unas dimensiones de $5.80 \text{ mm} \pm 0.26$. En el ratón donde se ha aplicado la PTT a día 11, el tumor prolifera a día 23 a un ritmo mucho menor que el tumor del ratón control (9.19 mm vs. 16.71 mm), observándose una tendencia bastante notoria de la disminución del tamaño

del tumor (Figura 5.26B). El experimento finaliza a los 23 días como se indica en el anterior apartado 5.4.1. No se realiza estadística al no tener suficientes datos, se recalca que son sólo dos pruebas de optimización para el diseño final del experimento (Figura 5.26B).

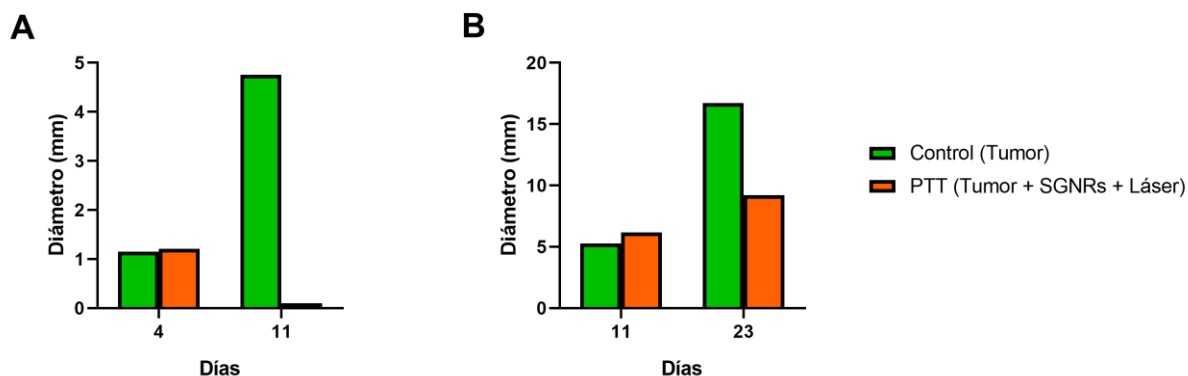


Figura 5.26: Comparación del tamaño del tumor en ratones C57/BL-6 a los que se les ha aplicado PTT a los 4 (A) y 11 días (B) post inyección de células B16F10.

Una vez obtenidos unos resultados muy prometedores y muy eficaces en las anteriores pruebas, se realiza un experimento con un tamaño muestral de $n=6$ dividiéndose los animales en el grupo control y grupo PTT. Para una mejor accesibilidad al tumor y su mejora en la irradiación, se cambia la localización a la espalda. En este caso, se realiza la PTT a los 7 días después de la inyección de las células B16F10, un tamaño de tumor intermedio entre los 4 y 11 días. Independientemente de su localización, se ha observado que el comportamiento y el crecimiento del tumor de melanoma es exactamente el mismo (Figura 5.25). Además de evaluar el diámetro de la masa tumoral, una vez finalizado el experimento, el tumor se disecciona y se pesa la masa tumoral como método de evaluación adicional de la eficacia de la PTT, como se indica en la Figura 5.27.. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas entre el grupo control y el grupo donde se ha realizado la PTT tanto en el diámetro del tumor (Figura 5.27A) como en los pesos de dichos tumores (Figura 5.27B). En este experimento final, queda demostrada la tendencia observada en las dos pruebas realizadas

anteriormente (Figura 5.26) que muestra la eficacia de la PTT para eliminar tumores de diferente tamaño utilizando GNRs recubiertos con PEG.

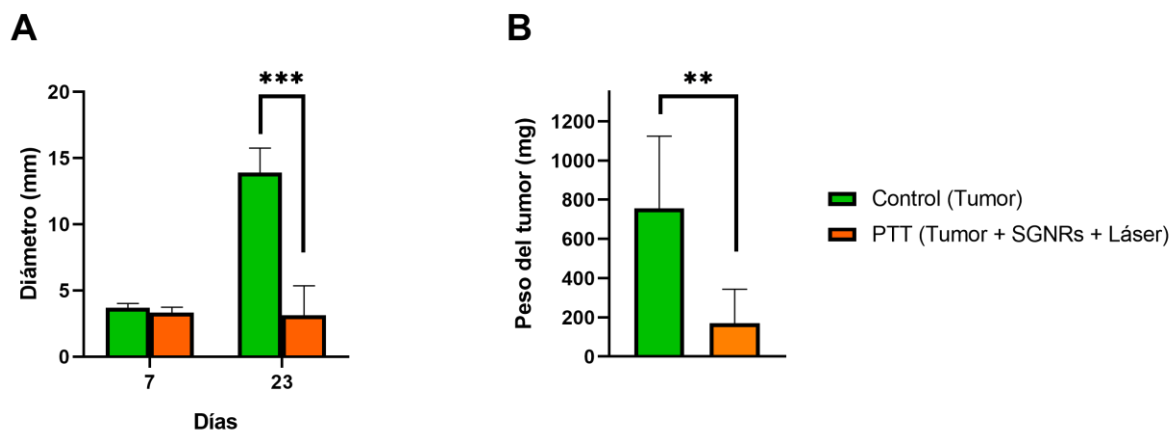


Figura 5.27: Comparación del diámetro del tumor (A) y sus pesos (B) en ratones C57/BL-6 a los que se les ha aplicado PTT a 7 días después de la inyección de las células B16F10. **p<0.01, ***p<0.001.

5.5. Experimentos In vitro con HA-GNRs

5.5.1. Viabilidad de las células CT2A y B16F10 en presencia de HA-GNRs

En este apartado se describe el análisis de la citocompatibilidad de los HA-GNR empleados en este estudio. Para determinar el impacto de la concentración de HA-GNRs en la viabilidad celular, se incubaron ambos tipos de HA-GNRs (200 y 700 kDa) a concentraciones decrecientes con células CT2A y B16F10 durante 24 horas. A continuación, se determinó la viabilidad celular mediante los ensayos XTT (Figura 5.28A y B) y Calceína/IP (Figura 5.28C y D y Figura 5.29). Los resultados mostraron que la viabilidad celular no se vio comprometida a una dilución 1:100 (preparada a partir de una concentración de 0.2 nM de ambas HA-GNRs) con ambos tipos de GNRs, HA-GNRs de 200 y 700 kDa. El perfil de citotoxicidad fue muy similar entre ambos tipos de HA-GNRs, lo cual es coherente ya que la síntesis de los GNRs y su posterior biofuncionalización con HA han compartido las mismas rutas, siendo la única diferencia el peso molecular de la molécula de HA unida al GNRs. En base a estos resultados, se eligió una dilución de 1:100 como concentración óptima de HA-GNRs para realizar ensayos de PTT tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*.

En cuanto a los experimentos de PTT *in vitro*, no se observó ninguna disminución de la viabilidad celular cuando las células CT2A y B16F10 se trataron con láser solo (Figura 5.10A y Figura 5.11A) o se incubaron con HA-GNRs durante 24 horas (Figura 5.28). El láser de longitud de onda 808 nm, se aplicó a 4,5 W durante 10 min, sin inducir ningún efecto tóxico en las células CT2A, como se ha descrito previamente [157].

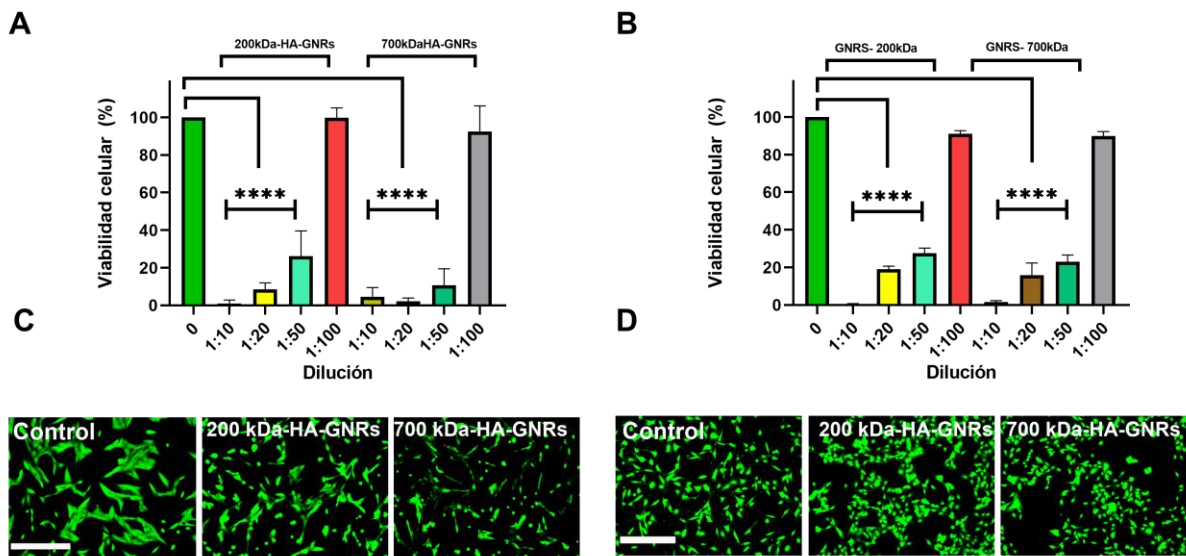
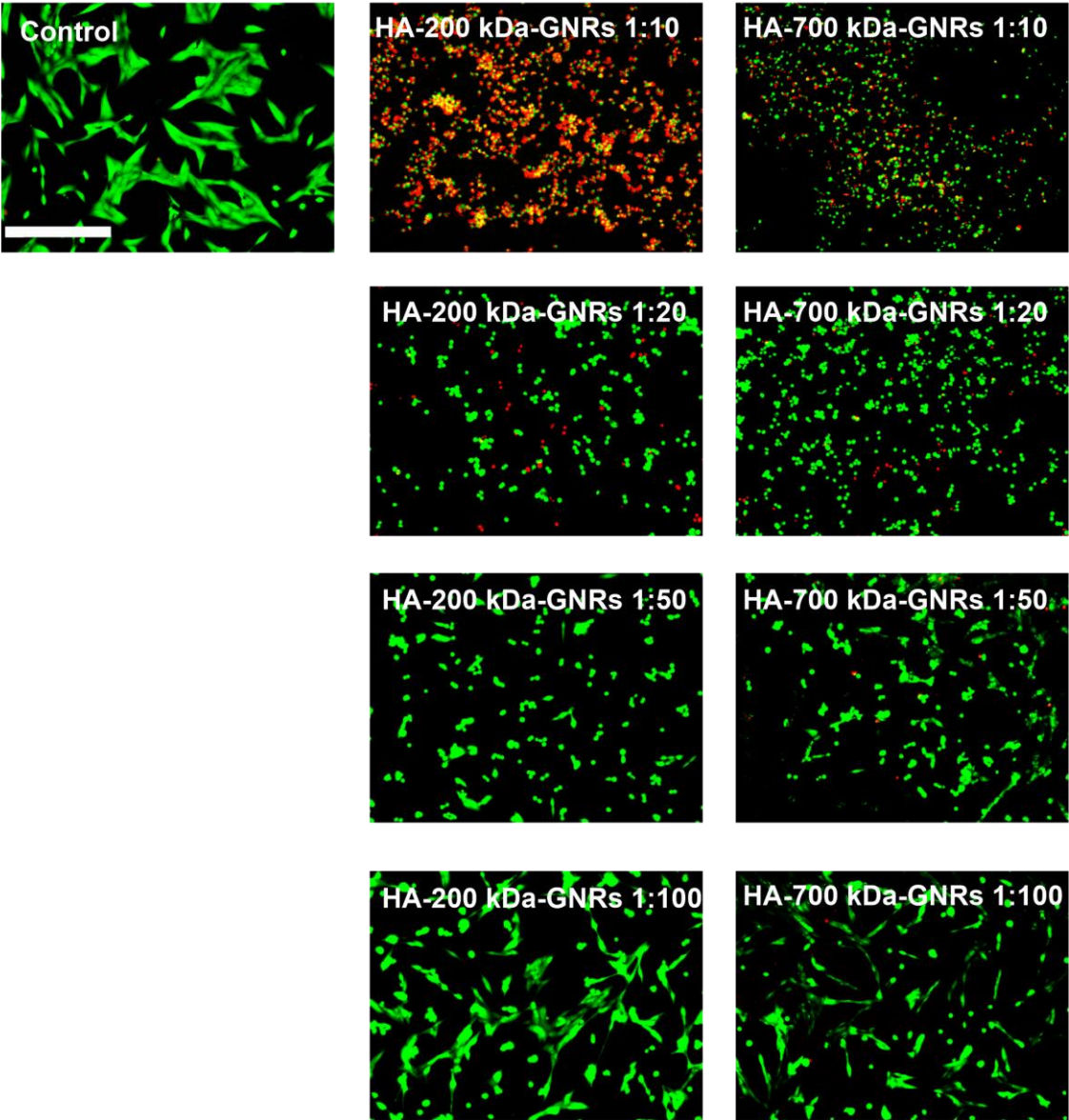


Figura 5.28: Viabilidad de células CT2A (A) y B16F10 (B) determinada mediante el ensayo XTT tras incubación con concentraciones decrecientes (1:10, 1:20, 1:50 y 1:100) de 200kDa-HA-GNRs y 700kDa-HA-GNRs durante 24 h. También se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo Calcein5a-IP en células CT2A (C) y B16F10 (D) incubadas con todos los tipos de HA-GNRs a 1:100 durante 24h. Las células viables se muestran en verde y las células muertas en rojo. **** $p < 0,0001$. Barra de escala: 200 μm .

A



B

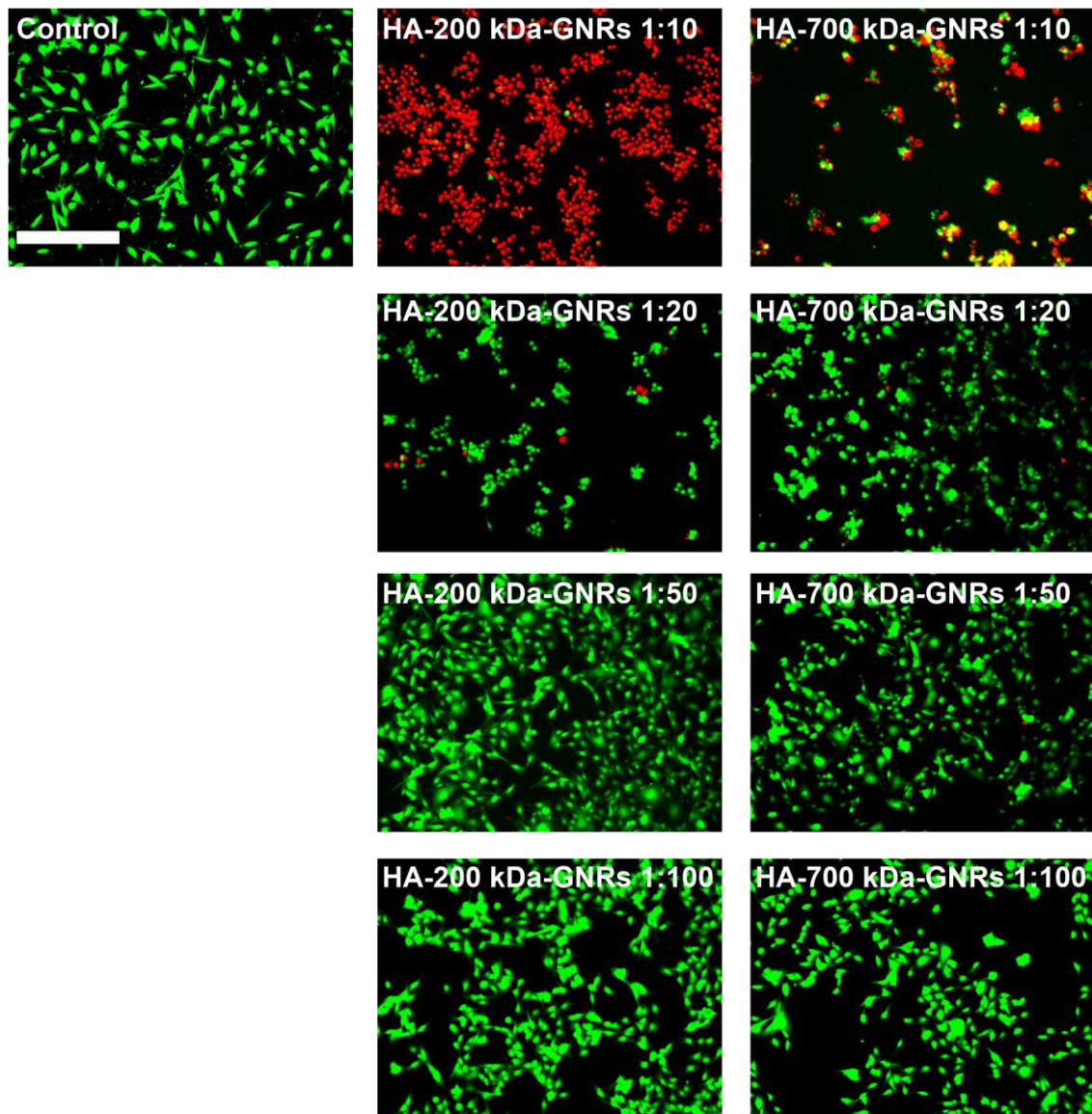


Figura 5.29: Imágenes microscopía de fluorescencia de cels CT2A (A) y B16F10 (B) marcadas con calceína en verde (células vivas) e IP en rojo (células muertas), tras 24 horas de incubación con los tipos de HA-GNRs indicados (200kDa-HA-GNRs y 700kDa-HA-GNRs) a diferentes concentraciones (1:10, 1:20, 1:50, 1:100). Barra de escala: 200 μm .

5.5.2. Terapia Fototérmica mediada por HA-GNRs

En los ensayos realizados para determinar la eficacia de la PTT para eliminar células de las líneas celulares de glioblastoma y melanoma, se han utilizado los HA-GNRs de ambos pesos moleculares: 200 y 700 kDa HA. El láser, se aplicó a una potencia de 4.5W durante 10 minutos sobre las células CT2A y B16F10 previamente incubadas durante 24h con ambos tipos de HA-GNRs y lavadas antes de la irradiación, para eliminar el exceso de GNRs no unidos o incorporados a las células. Los resultados mostraron que la mayoría de las células presentes en el cultivo celular fueron eliminadas, tal y como evidenciaron los ensayos XTT (Figura 5.30A y B) y calceína/PI (Figura 5.30C y D). Estos resultados probaron la eficacia de ambos tipos de HA-GNRs en la inducción de hipertermia tras la irradiación con el láser y demostraron su uso potencial como mediadores para tratamientos PTT en ambos tipos celulares, siendo mucho más eficaces en la línea celular de glioblastoma que en la de melanoma como ya se observó previamente con las PEG-GNRs. Aunque ambos tipos de HA-GNRs fueron eficaces en la promoción de la hipertermia en respuesta a la irradiación láser, sólo los 700 kDa HA-GNRs fueron elegidos para realizar PTT en experimentos *in vivo* debido a las propiedades anticancerígenas de este tipo de HA.

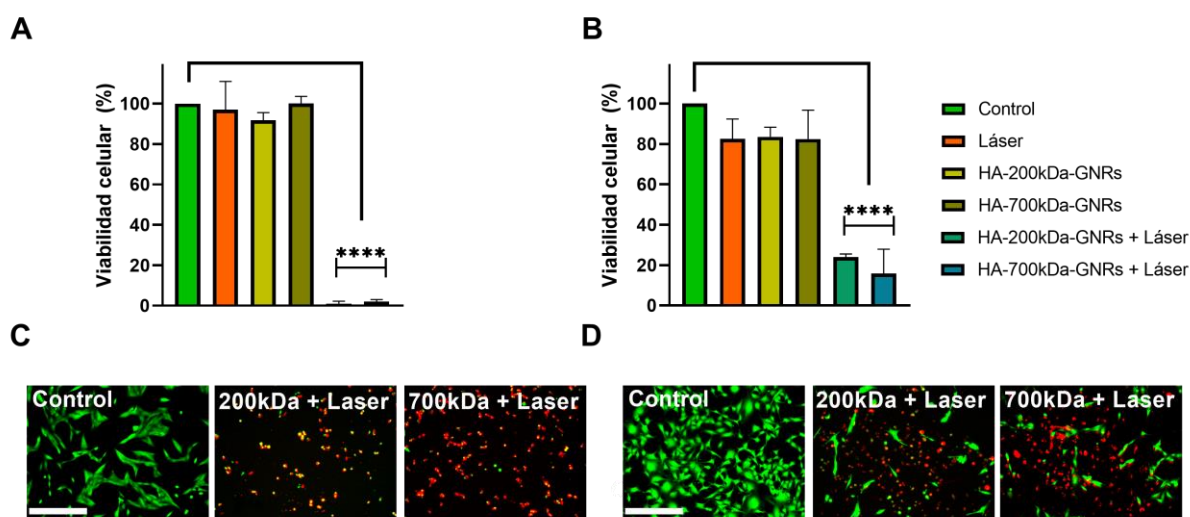


Figura 5.30: Viabilidad de células CT2A (A) y B16F10 (B) evaluada mediante el ensayo XTT tras los tratamientos de PTT realizados en las células preincubadas con 200kDa-HA-GNRs y 700kDa-HA-GNRs a una dilución de 1:100 durante 24 h y luego irradiadas con un láser de 808 nm a 4,5 W durante 10 minutos a temperatura ambiente.

*** $p < 0.001$. También se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo Calceina-IP en células CT2A (C) y B16F10 (D) incubadas con todos los HA-GNRs indicados y aplicando la irradiación del láser a 4.5W después de 24h de la PTT. **** $p < 0,0001$. Barra de escala: 200 μm .

5.6. Experimentos *in vivo* con HA-GNRs

En este apartado de la tesis se recogen los resultados obtenidos en los experimentos realizados *in vivo* en modelo animales de glioblastoma obtenidos mediante la inyección en ratones C57/BL-6 de células CT2A en el cerebro. Se ha realizado un extenso estudio en la progresión del tamaño y localización del tumor a lo largo del tiempo mediante imagen de RM tras la aplicación de la PTT mediada por 700kDa-HA-GNRs. El estado de los animales tratados con PTT utilizando test de comportamiento asociados a la capacidad motora cognitiva. Finalmente se ha realizado un análisis histológico exhaustivo para la identificación de las células específicas de glioblastoma y el comportamiento del sistema inmune a través de la microglía reactiva.

5.6.1. Modelo murino de glioblastoma

4.6.1.1 Tratamientos con PTT. Volumetría tumoral

La eficacia del tratamiento de PTT también se evaluó *in vivo*, en un modelo de glioblastoma de ratón. Se analizaron tres grupos de animales diferentes para establecer la eficacia *in vivo* de la PTT: un grupo de control compuesto por ratones inyectados con células CT2A, un grupo GNRs compuesto por ratones portadores de tumores inyectados con 700-kDa-HA-GNRs, y un grupo tratado con PTT compuesto por ratones portadores de tumores inyectados con HA-GNRs e irradiados con láser. Tal como se describe en la sección 4.5.2., se aplica la PTT con una irradiación del láser a 450 mW durante 25 minutos y 3 días consecutivos una semana después de la inyección de las células CT2A en el cerebro del ratón. Los ratones portadores de tumores irradiados sólo con láser no se incluyeron en los experimentos *in vivo* de PTT para alinearse con el principio de reducción del concepto de las 3R [167], ya que habíamos demostrado anteriormente que la irradiación con láser, utilizando los mismos parámetros que en el presente estudio, no producía ningún efecto sobre

el tamaño del tumor [137]. El tamaño y la localización del tumor se analizaron mediante IRM una y dos semanas después del tratamiento con PTT. Como se muestra en la Figura 5.31C, no todas las células tumorales fueron eliminadas después del tratamiento con PTT (Figura 5.31 indicado por flechas), y por lo tanto, estas células tumorales restantes continuaron creciendo con el tiempo. Aunque una semana después del tratamiento con PTT se observa una clara disminución del tamaño del tumor (Figura 5.31C), dos semanas después de los tratamientos con PTT, los tumores de los ratones tratados volvieron a ser fácilmente detectables mediante IRM (Figura 5.31C). Sin embargo, a pesar de este aumento, el tamaño del tumor de los ratones tratados con PTT era significativamente menor que el de los ratones control 2 semanas después del tratamiento (Figura 5.31 y Figura 5.32B).

Como se observó en el análisis de los tamaños tumorales obtenidos de todas las imágenes de RM, una semana después de los tratamientos con PTT (Figura 5.32A), los animales tratados con láser tras la inyección de HA-GNRs mostraron un tamaño tumoral significativamente menor en comparación con los animales no tratados. Los animales tratados con PTT también mostraron un tamaño tumoral menor en comparación con los animales tratados únicamente con HA-GNRs como se observa en la volumetría y en las IRM (Figura 5.32, A, B, C y D), aunque esta diferencia de tamaño no fue estadísticamente significativa (Figura 5.32A).

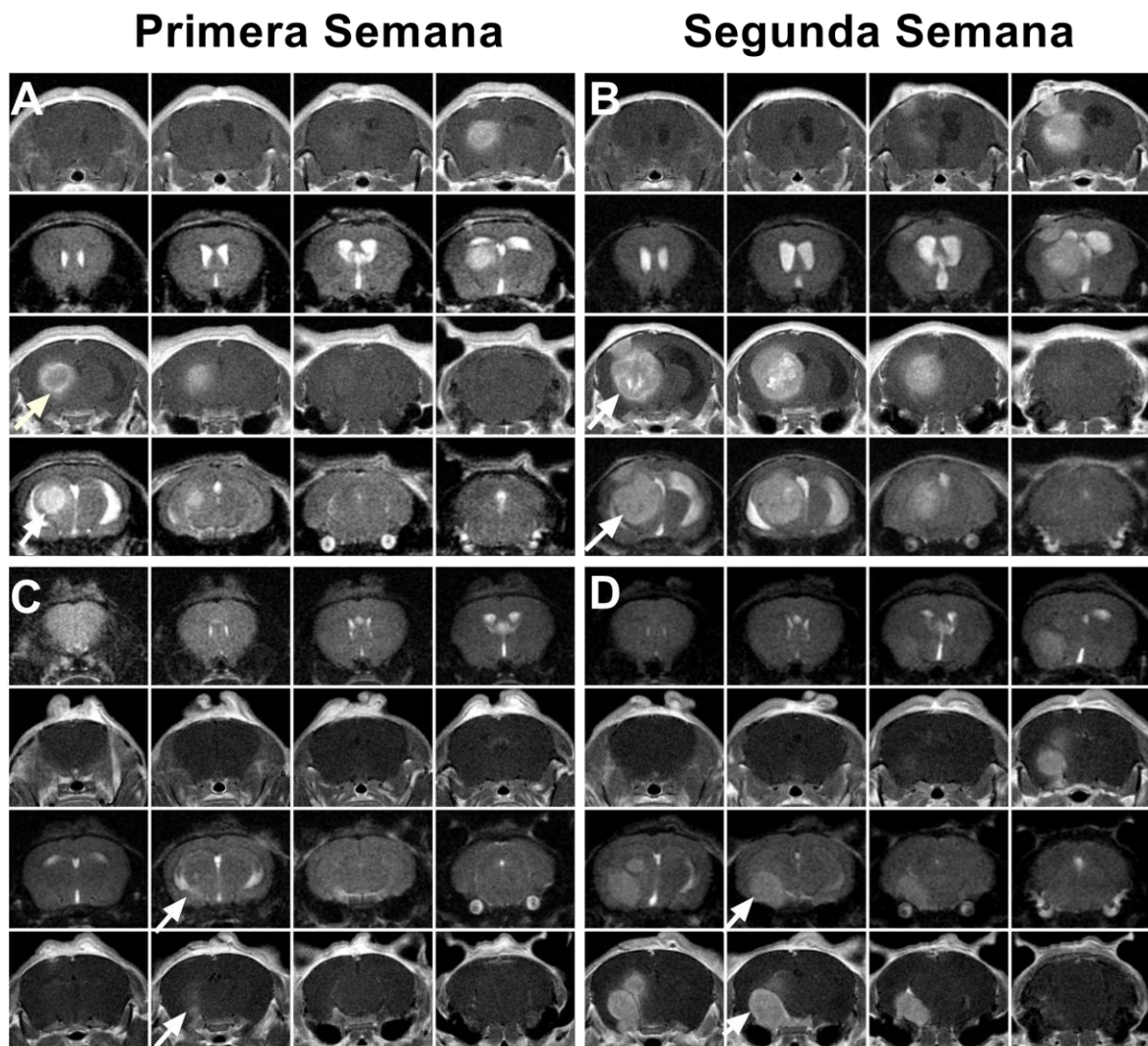


Figura 5.31: IRM de ratones control (A-B) y ratones a los que se aplicó PTT (C-D) adquiridas en dos momentos diferentes: una semana (A y C) y dos semanas (B y D) después del momento en el que se aplicó la PTT. Las flechas blancas indican la masa tumoral en distintas localizaciones.

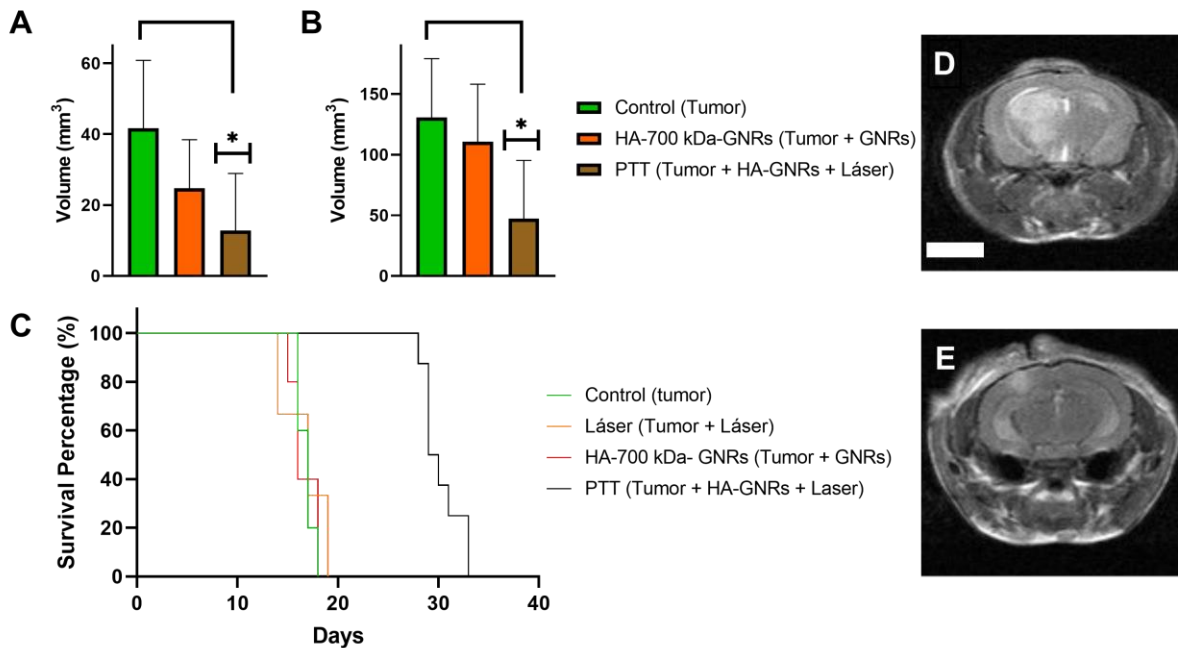


Figura 5.32: Volumen de masa tumoral analizado en los tres grupos de ratones: control, GNRs y PTT una semana (A) y dos semanas (B) después del tratamiento. La curva de supervivencia de Kaplan Meier muestra la evolución de la población de ratones supervivientes en cada grupo a lo largo del tiempo (C). IRM individualizadas una semana después del tratamiento de los ratones de control (D) y de los ratones tratados una semana después de la aplicación de PTT. Barra de escala: 4mm. * $p < 0,05$.

En la segunda semana, como se mencionó anteriormente, el tumor seguía creciendo en todos los grupos experimentales. El crecimiento del tumor en los ratones tratados con PTT mediada por HA-GNRs se debe a las células residuales que no han sido eliminadas durante el tratamiento de PTT y el tumor vuelve a desarrollarse. Sin embargo, debido al tratamiento con PTT, hay diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo de control.

También se realizaron análisis de supervivencia para evaluar la eficacia de la PTT. El diagrama de Kaplan-Meier en la Figura 5.32C ilustra el porcentaje de ratones vivos en cada punto temporal después de los tratamientos de PTT para los tres grupos diferentes. Los animales de todos los grupos fueron eutanasiados tras la aparición de síntomas claros de estrés y angustia, de acuerdo con las directrices para la aplicación de criterios de valoración humanitaria en situaciones de angustia en animales de laboratorio [4]. Los resultados indicaron que los ratones

control no tratados y los tratados con HA-GNRs tuvieron que ser sacrificados por falta de capacidad motora, lo que dificultó su capacidad para comer o beber, o cuando su capacidad exploratoria se vio mermada, como indicaron los resultados de la prueba de comportamiento en campo abierto. Por el contrario, todos los animales tratados con PTT sobrevivieron más allá del punto en el que los animales de los otros dos grupos (Control y HA-GNRs) necesitaron ser sacrificados (Figura 5.32C), demostrando mejores condiciones de salud que pueden atribuirse a la eficacia del tratamiento con PTT. El tiempo medio de supervivencia de los grupos Control y HA-GNRs fue de 17 y 16 días, respectivamente, y ninguno de estos ratones sobrevivió más de 18 días. En comparación, seis de los ocho ratones (75%) del grupo de tratamiento con PTT seguían vivos el día 29 tras la irradiación y cuatro de los ocho (50%) han sobrevivido más de 30 días. El análisis con un logrank test reveló una mejora significativa de la supervivencia tras la aplicación de la PTT mediada por HA-GNRs ($P = 0,0003$. $p < 0,001^{***}$). Puede concluirse que los tratamientos con PTT mediada por HA-GNRs tienen una influencia significativa en el tiempo de supervivencia. Los tumores progresaron rápidamente, especialmente en el grupo de control, en el que ninguno de los 5 ratones pudo mantenerse con vida más allá del día 18 (supervivencia media = 17 días) como se ha mencionado anteriormente. Del mismo modo, los ratones HA-GNRs mostraron una supervivencia media de 16 días, un periodo significativamente inferior al de los ratones tratados con PTT, que mostraron un periodo medio de supervivencia de 29,5 días.

4.6.1.2 Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto es un ensayo sensorimotor sencillo utilizado para determinar los niveles de actividad general, incluyendo la actividad locomotora y los hábitos de exploración, en modelos de ratón patológicos que afectan al sistema nervioso central [154]. Esta prueba conductual se realizó dos semanas después de los tratamientos con PTT. Se analizaron la distancia recorrida y la velocidad media empleada durante un periodo de 10 minutos en el grupo control ($n=4$), el grupo HA-GNRs ($n=4$) y el grupo PTT ($n=7$). Los ratones tratados con PTT mostraron un

comportamiento exploratorio intenso en comparación con los ratones control no tratados, que mostraron una falta de capacidad de exploración (Figura 5.33A y B), aunque estos resultados no mostraron diferencias significativas. Los mapas de calor y de trayectoria mostraron que los ratones del grupo tratado con PTT exhibían una capacidad motora y exploratoria óptima, mientras que los ratones control no tratados permanecieron en el mismo lugar dentro de las jaulas durante periodos de tiempo más largos (Figura 5.33C y D).

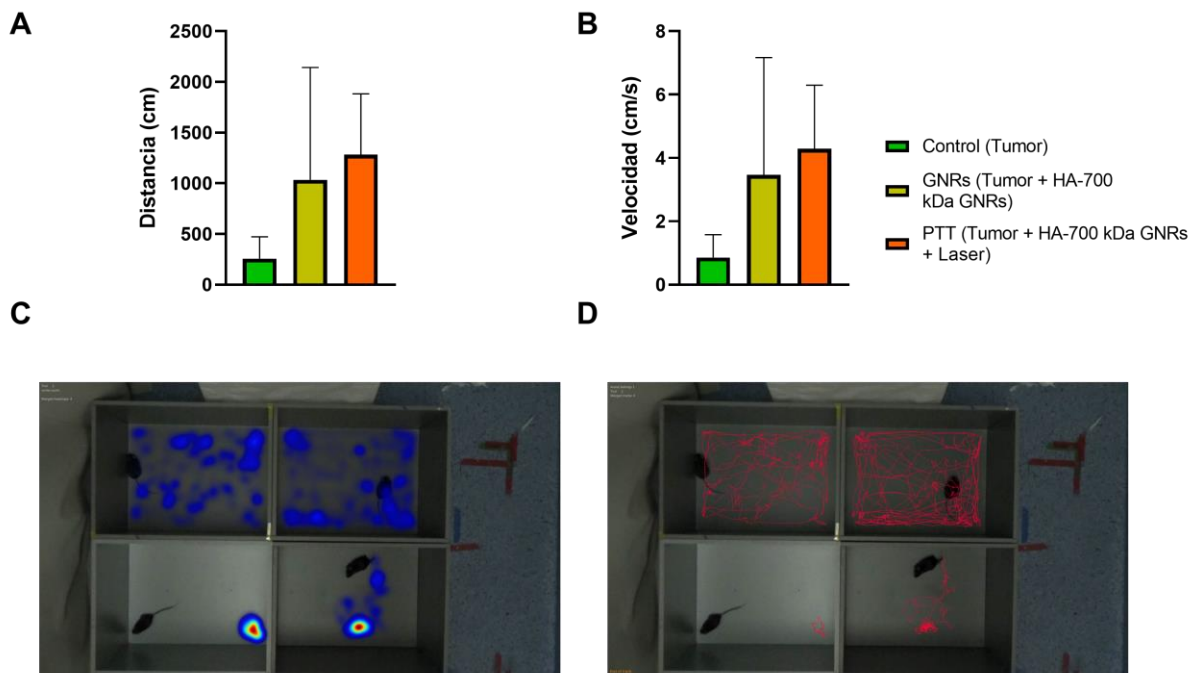


Figura 5.33: Los gráficos muestran los datos analizados de la distancia recorrida (A) y su velocidad (B) de la prueba de comportamiento en campo abierto del grupo de ratones: control, GNR y PTT realizada 2 semanas después del tratamiento con PTT. Mapa de calor (C) que muestra las zonas donde los ratones se encontraban durante el ensayo de comportamiento de campo abierto y la trayectoria recorrida representada por una línea roja (D).

4.6.1.3 Análisis histológico

Para evaluar la eficacia de la PTT a nivel celular, se realizaron análisis histológicos mediante inmunofluorescencia. Las células CT2A implantadas pueden distinguirse fácilmente mediante tinción con nestina. La nestina es un marcador específico expresado por las células CT2A que es importante durante la progresión tumoral [168]. Para observar el comportamiento del sistema inmunitario,

concretamente de la microglía, en presencia de tumor en ratones inmunocompetentes, también se analizó el marcador Iba1, específico de células de microglía [169]. Por último, la forma activa de la Caspasa 3 fue analizada mediante inmunohistoquímica para determinar si existía un mecanismo de muerte celular mediado por apoptosis tras el tratamiento con PTT del tumor.

Los resultados indicaron que la zona tumoral puede identificarse fácilmente mediante tinción positiva para nestina (Figura 5.34A) e Iba1 (Figura 5.34F). La masa tumoral también puede identificarse por una alta densidad de núcleos, marcados con Hoechst, en comparación con el tejido cerebral circundante (Figura 5.34B y G). La señal de fluorescencia de Nestina coincidía con la alta densidad de núcleos revelada por Hoechst delimitando el tumor (Figura 5.34A, B y C).

Iba1 es un marcador bien establecido de microglía y macrófagos, que se regula al alza durante su activación [170]. En este modelo tumoral, las células fuera del tumor marcadas con un anticuerpo anti-Iba1 mostraban una morfología estrellada (Figura 5.35A-C), mientras que las células Iba1-positivas dentro del tejido tumoral presentan un tamaño más pequeño con una morfología redonda o ameboide (Figura 5.35D-F), indicativo de la activación de estas células dentro del tejido tumoral [169]. Las células microgliales son atraídas hacia el tejido tumoral, lo que resulta en una tinción Iba1 aumentada que es muy útil para delinear los límites del tejido tumoral (Figura 5.35G-I).

Debido a todas estas características, el tejido tumoral fue localizado y delineado con precisión mediante el marcaje con Iba1 (microglía que rodea al tumor y se infiltra), el marcaje con nestina y por una mayor densidad celular determinada mediante marcaje nuclear con Hoechst en todas las secciones analizadas (Figura 5.34).

Los efectos de los tratamientos con PTT también pueden determinarse mediante análisis histológicos, como lo demuestra una disminución significativa del tamaño de la masa tumoral delineada por los marcadores antes mencionados, en las secciones de cerebro de ratón tratadas con PTT (Figura 5.36F-J) en comparación con las no tratadas con PTT (Figura 5.36A-E). Además, las células presentes en la zona tumoral de las secciones de cerebro de ratón tratadas con PTT mostraron una

señal intensa cuando se marcaron con un anticuerpo anti-caspasa 3 activada (Figura 5.36F-J), un marcador de muerte celular apoptótica. Esto indica que las células tumorales de CT2A sufrieron procesos apoptóticos en respuesta a la irradiación láser en presencia de HA-GNRs. Sin embargo, no se observaron células apoptóticas en el tejido tumoral de las secciones de cerebro de ratón no tratadas (Figura 5.36A-E).

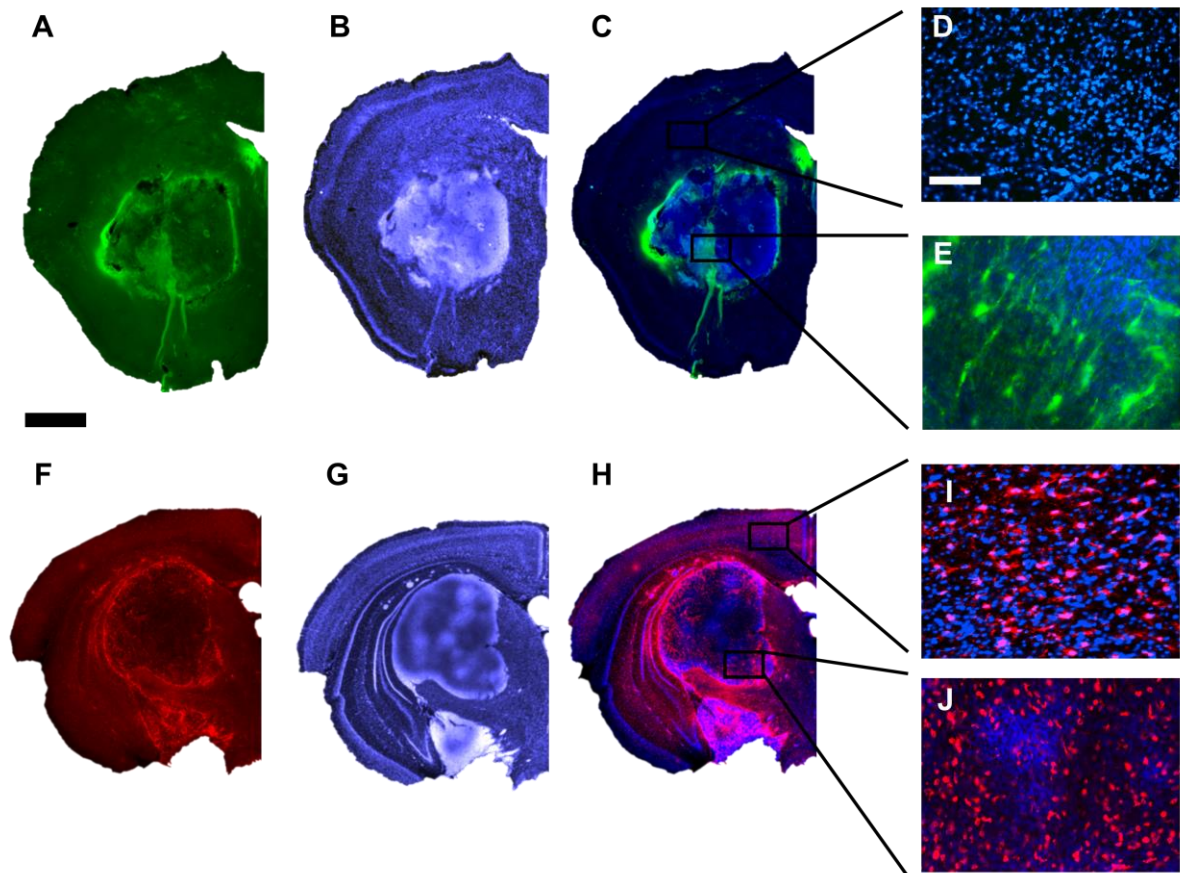


Figura 5.34: Imágenes de fluorescencia de secciones de cerebros de ratones control mostrando el hemisferio derecho (A-C y F-H) donde se localiza el tumor. Las secciones se marcaron con anticuerpos anti- *nestin* en verde (A-E) y anticuerpo anti-Iba1 en rojo (F-J), los núcleos se contrateñieron en todas las secciones con Hoechst. El cuadrado negro indica la zona del cerebro donde se tomaron las imágenes de fluorescencia a mayores aumentos: tejido cerebral normal (D e I) y dentro del tumor (E y J). Barra de escala de las imágenes del hemisferio derecho: 800 μ m. Barra de escala de las imágenes: 100 μ m.

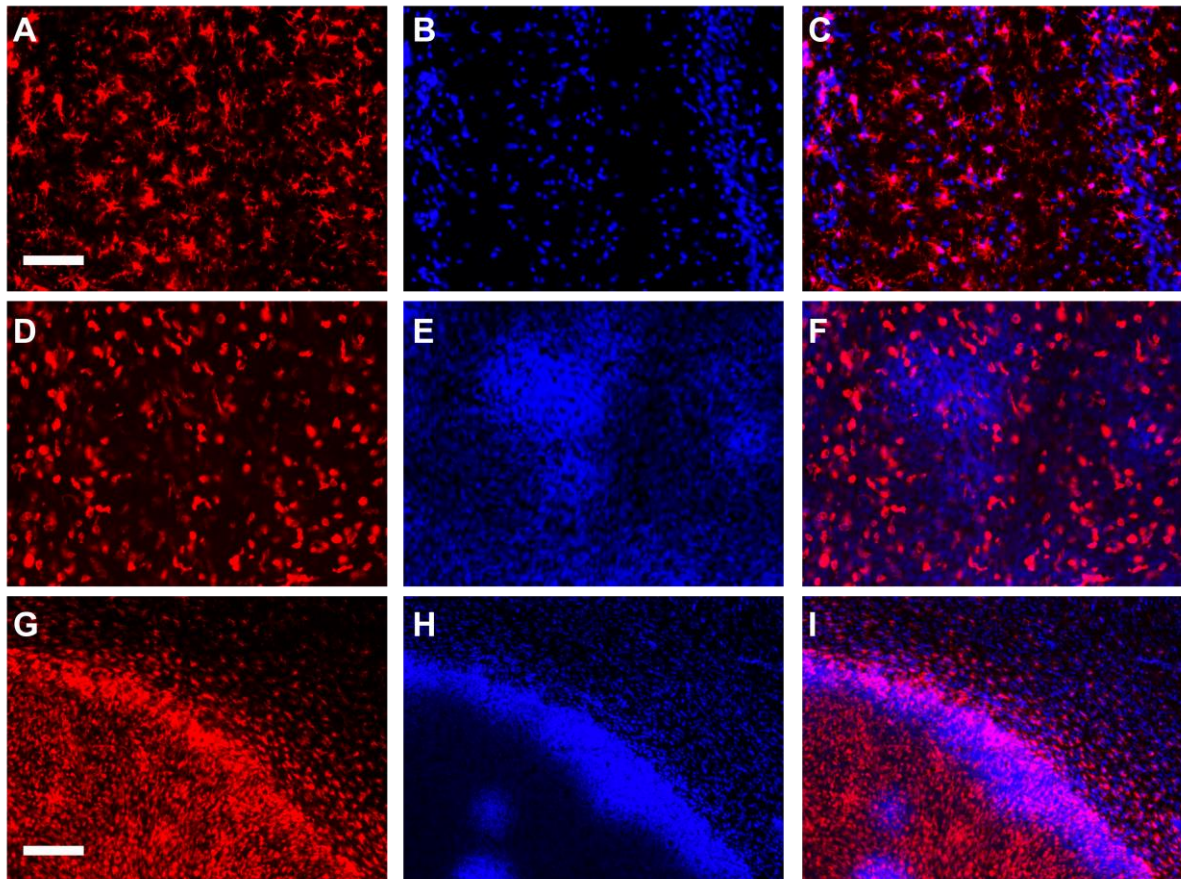


Figura 5.35: Imágenes de fluorescencia de una inmunohistoquímica de Iba1. La población de microglía fuera del tumor (A-C), dentro del tumor (D-F) y en el límite del tumor (G-I) a diferentes aumentos. Primera barra de escala: 100 μm . Segunda barra de escala: 200 μm .

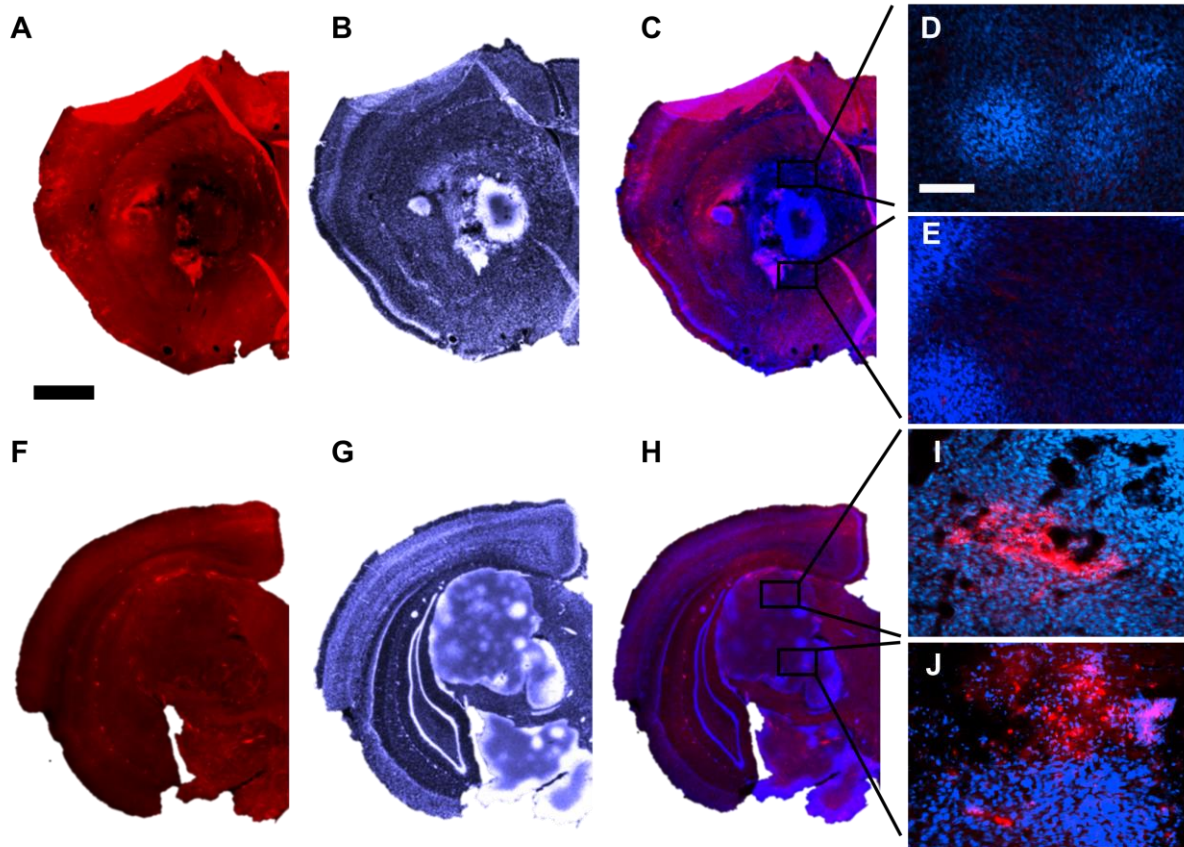


Figura 5.36: Imágenes de fluorescencia del hemisferio derecho (A-C y F-H) e imágenes de fluorescencia (D-E e I-J) de un ratón control (A-E) y tratado con PTT (F-J). Las secciones cerebrales se tiñeron con el anticuerpo primario anti-caspasa 3 activada y con Hoechst. La caspasa 3 activada aparece marcada en rojo y los núcleos en azul. Los cuadrados indican las diferentes zonas tumorales a las que pertenecen las imágenes de fluorescencia de un animal control (D-E) y de ratones con tratamiento de PTT (I-J). Barra de escala de las imágenes del hemisferio derecho: 800 μm Barra de escala: 200 μm .

Capítulo 6. Discusión

6.1. Experimentos *In vitro*

6.1.1. Caracterización y citotoxicidad de los GNRs

Los tratamientos físicos localizados, como la PTT basada en GNRs, utilizan la hipertermia para inducir daños y destruir las células cancerosas y los tejidos tumorales. A diferencia de otros métodos, como la quimioterapia, la PTT no provoca el desarrollo de resistencias en las células, como ocurre con los tratamientos de quimioterapia [171]. Mediante el uso del calentamiento controlado a través de la hipertermia inducida por la luz, la PTT mediada por NPs puede atacar y eliminar eficazmente las células cancerosas sin riesgo de desarrollo de resistencias. La PTT mediada por nanopartículas de oro aumenta localmente la temperatura hasta 41-46 °C provocando sensibilización, respuesta térmica, desnaturalización de proteínas y apoptosis de células cancerosas [63], [172]. Para llevar a cabo este tratamiento, el nanorod es la forma de nanopartícula más eficiente en la conversión de la energía lumínica en calor, debido a su alta absorción en la región del infrarrojo cercano.

El uso de GNRs es muy común en diversas aplicaciones biomédicas, como la administración de fármacos, la bioimagen y la PTT. Los GNRs poseen propiedades ópticas que los hacen perfectamente adecuados para la aplicación de PTT debido a su capacidad para convertir la luz NIR en calor, un fenómeno conocido como SPR. Esta característica es crucial en los GNRs porque poseen dos picos específicos de absorción plasmónica, que vienen determinados por su tamaño. La localización de la SPR depende del tamaño de ambas dimensiones de los GNRs [173]. Los GNRs tienen una mayor eficiencia en la conversión fototérmica en comparación con otras formas de nanopartículas de oro, como las nanoesferas, que sólo presentan una única banda plasmónica [174], [175], [176], [177].

Los GNRs ofrecen varias ventajas sobre las nanopartículas de otras formas, como un mayor tiempo de circulación sistémica, un mayor tiempo de retención dentro del tumor y una mejor orientación hacia las células tumorales. Sin embargo, en el

contexto de los recientes avances en la inmunoterapia mediada por dispositivos, las formas esféricas pueden tener una ventaja, ya que tienden a acumularse más en los órganos inmunitarios, lo que conduce a una mayor eficiencia de entrega a las células inmunitarias [177]. En cuanto a la comparación de los bastones con las formas esféricas, los GNRs tienen una mayor eficiencia de focalización tumoral y un mayor tiempo de retención tumoral, mientras que las nanoesferas tienen un mejor aclaramiento renal. Además, la eficiencia de conversión térmica sigue siendo mejor en los GNRs una vez que son internalizados por las células cancerosas debido a la mayor aproximación entre las nanopartículas. Otra ventaja de los GNRs es su síntesis bien definida para modular su forma y relación de aspecto mediante métodos de crecimiento sembrado. De hecho, debido a su forma anisotrópica, los GNRs son biocompatibles y fotoestables en el tiempo [178].

En nuestro caso, los GNRs recubiertos de PEG resultaron extremadamente eficaces para los tratamientos con PTT. Los LGNRs demostraron ser una mejor opción para elevar la temperatura tras la irradiación láser. Consiguieron un aumento de la temperatura ocho grados superior a la de los SGNRs en la concentración más alta (10 $\mu\text{g/mL}$). Incluso a concentraciones no citotóxicas como 2 $\mu\text{g/mL}$, los LGNRs produjeron un aumento de la temperatura de casi seis grados más que los SGNRs. Por lo tanto, los LGNRs son más eficaces para aplicaciones PTT, ya que pueden utilizarse a concentraciones más bajas. Además, basándose en modelos teóricos, se prevé que los LGNRs ofrezcan ventajas en diversas técnicas de imagen biomédica. Esto se debe al hecho de que los LGNRs tienen mayores secciones transversales de absorción y dispersión en comparación con los SGNRs utilizados habitualmente [179]. Como resultado, los LGNRs tienen el potencial de proporcionar capacidades de imagen mejoradas y detección de señal mejorada en varias aplicaciones de imagen biomédica. Además, la mayor superficie de los LGNRs los hace especialmente atractivos para aplicaciones biomédicas ya que el aumento de su superficie proporciona más sitios para la funcionalización, permitiendo que un mayor número de biomoléculas se adhieran a estos LGNRs [180]. Esta capacidad de funcionalización mejorada permite que los LGNRs se conjuguen con un mayor

número de biomoléculas que se dirigen específicamente a ciertos tipos de células cancerosas, aumentando así la eficacia de la PTT.

Además, hemos demostrado que los GNRs sintetizados permanecieron estructuralmente intactos incluso tras repetidas aplicaciones de láser (Figura 5.6B). Este hallazgo es importante para posibles terapias futuras que impliquen múltiples rondas de tratamiento con láser tras las inyecciones de GNRs. Se ha observado que las altas intensidades de láser pueden inducir cambios estructurales en los GNRs irradiados, transformándolos en nanopartículas más cortas o incluso esféricas, lo que puede alterar significativamente sus propiedades ópticas [159].

La evaluación de la citotoxicidad de los GNRs es un aspecto crucial de los estudios de PTT *in vitro* e *in vivo*. La citotoxicidad de los GNRs se ve influida por la presencia de CTAB, que se utiliza en la síntesis de los GNRs [84], [181]. Sin embargo, cuando los GNRs se modifican con PEG en su superficie, se produce una reducción de la citotoxicidad [182],[183]. La síntesis, la forma, el tamaño, de la partícula, el método de biofuncionalización, el tipo de célula, la concentración y el tiempo de exposición de la partícula son cruciales para determinar la citotoxicidad y la internalización de las nanopartículas por las células [184], [185], [186]. El recubrimiento de los GNRs con PEG no sólo evita el contacto directo con el CTAB, sino que también modifica la carga superficial y proporciona grupos funcionales que facilitan la biofuncionalización de las partículas. La citotoxicidad de los GNRs ha sido ampliamente estudiada en varias líneas celulares de tumores humanos, incluyendo Hep-2 [187] y A549 [188], así como en líneas celulares de roedores como CT2A [137] y B16F10 [189]. Estos estudios han proporcionado información valiosa sobre los efectos citotóxicos de los GNRs en diferentes líneas celulares. De hecho, a la hora de evaluar la citotoxicidad de los GNRs, es esencial tener en cuenta tanto los efectos dependientes de la concentración como las variaciones observadas entre líneas celulares. Se suele observar que la citotoxicidad de los GNRs aumenta con las concentraciones más altas. Sin embargo, es importante señalar que el tipo de línea celular específica puede influir significativamente en la respuesta citotóxica observada, como se ha demostrado en este estudio. En el caso de los LGNRs, las concentraciones altas pueden mostrar toxicidad en las células CT2A, mientras que no son tóxicas en las células B16F10 (Figura 5.12Figura 5.10). Se ha observado que

la captación de GNRs depende del tipo de nanopartícula utilizada, así como del tipo de célula, que desempeña un papel en el proceso de internalización [190]. La química superficial de las nanopartículas tiene un impacto significativo en la citotoxicidad, mientras que la morfología y el tamaño de las nanopartículas sólo afectan ligeramente a la viabilidad celular [185].

En cuanto a los GNRs funcionalizados, en este estudio se ha analizado el efecto de HA-GNRs, biofuncionalizados con HA de 200 y 700kDa, biomolécula utilizada en diferentes estudios debido a sus efectos anticancerígenos y antiproliferativos en tumores sólidos, GBM incluido [191]. En ambos tipos de HA el perfil citotóxico es el mismo tanto en células CT2A como B16F10, siendo no citotóxicos a una dilución de 1:100. Varios estudios [192], [193] han demostrado el efecto no citotóxico sobre las células cancerosas de nanopartículas basadas en HA con diferentes aplicaciones.

En lo que se refiere al perfil citotóxico de las PEG-GNRs, todos los PEG-GNRs probados no tuvieron ningún efecto sobre la viabilidad celular cuando se utilizaron hasta 2 µg/mL. Sin embargo, al aumentar la concentración de PEG-GNRs hasta 5 µg/mL, las células CT2A toleraron mejor los CGNRs, mientras que la viabilidad de las células de melanoma se vio afectada por la presencia de GNRs pequeños. Esto confirma que los distintos tipos celulares muestran sensibilidades disímiles a la presencia de GNRs, siendo los GNRs pequeños más citotóxicos para las células de melanoma, que muestran una mayor susceptibilidad a los SGNRs y CGNRs en comparación con las células CT2A. Por lo tanto, es crucial analizar cuidadosamente los efectos dependientes de la concentración y considerar las características específicas de las diferentes líneas celulares para evaluar con precisión la citotoxicidad de los GNRs. Este conocimiento exhaustivo ayudará a determinar concentraciones seguras y eficaces para diversas aplicaciones y tipos celulares. En cuanto a la toxicidad de los LGNRs, algunos estudios han indicado que estos GNRs se acumulan principalmente en el hígado y el bazo, más que en otros órganos como el corazón, el riñón y el pulmón, donde se han detectado SGNRs [184], [194]. Por otro lado, los SGNRs se acumulan en grandes cantidades en los tejidos [184],

aunque, cabe señalar que los LGNRs se excretan a un ritmo más lento en comparación con los SGNRs [194].

6.1.2. Internalización de los PEG-GNRs

Las nanopartículas metálicas suelen entrar en la célula principalmente a través de endocitosis [195], y su captación se ve influida por factores como la forma, el tamaño, la carga superficial y el tipo de célula [196]. En este estudio, tanto las células de glioblastoma como las de melanoma internalizaron los LGNRs y los SGNRs, tal y como demostró la microscopía confocal (Figura 5.15). Se observó que la unión y la captación de los GNRs presentaban ligeras variaciones en función del tipo celular (Figura 5.16). Las células B16F10 mostraron una captación de GNR ligeramente superior a la de las células CT2A. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la captación entre los LGNR y los SGNR en ambas líneas celulares. Estos resultados concuerdan con hallazgos previos que han descrito variaciones en la capacidad de internalización de partículas en diferentes líneas celulares [197].

6.1.3. Tratamiento con PTT mediado por GNRs

Los resultados del presente estudio demostraron que los tratamientos PTT aplicados a temperatura ambiente fueron eficaces para eliminar de forma significativa tanto las células CT2A como las B16F10. Además, todos los tipos de GNRs fueron eficaces en los tratamientos PTT *in vitro*, aunque los LGNRs fueron sólo ligeramente superiores en la inducción de la muerte celular en ambas líneas celulares. Este hallazgo es coherente con la capacidad de los LGNRs de generar un mayor aumento de temperatura tras la irradiación láser. Cabe señalar que los LGNRs produjeron un aumento de temperatura significativamente mayor tras la irradiación láser en comparación con los SGNRs, como se muestra en la Figura 5.6A. Sin embargo, no provocaron una reducción significativa de la viabilidad celular en comparación con los SGNRs en ningún tipo celular (Figura 5.17). Esta discrepancia puede atribuirse a la disminución de temperatura observada al irradiar los LGNRs en un medio similar a las células, como es la agarosa, en

comparación con una solución acuosa. En una solución acuosa el aumento de la temperatura de los LGNRs es mayor que los SGNRs en la excitación de SPR debido a la mayor dependencia de la longitud de onda de los LGNRs. Por lo tanto, el ligero aumento de la mortalidad celular producido por los LGNRs en comparación con los SGNRs puede atribuirse al cambio sustancial del SPR de los LGNRs en un medio viscoso, lo que provoca una menor absorción y, en consecuencia, una menor generación de calor [178].

Al comparar las células vivas residuales tras los tratamientos con PTT, los resultados revelaron que las células B16F10 mostraron una mayor resistencia a los tratamientos de hipertermia, con tasas de viabilidad celular superiores al 25% para todos los GNRs utilizados. Por el contrario, las células CT2A mostraron tasas de viabilidad celular inferiores para todos los GNRs probados.

El melanoma es ampliamente reconocido como un tumor altamente resistente a los agentes citotóxicos debido a su desarrollada resistencia contra la apoptosis [198], que es la principal forma de muerte celular inducida por los tratamientos PTT, como se muestra en la Figura 5.18. Sin embargo, el rápido aumento de temperatura proporcionado por la aplicación del láser a partir de 37 °C promovió una eliminación completa de las células B16F10, dando lugar a tasas de muerte celular de casi el 100% (Figura 5.17D). Dado que la sobreexpresión de varias proteínas de choque térmico (HSP) se ha propuesto como un mecanismo plausible subyacente a los efectos antitumorales observados en los tratamientos de hipertermia [199], es posible que la temperatura alcanzada durante el tratamiento PTT aplicado a 37 °C, pudiera desempeñar un papel en la alteración de la expresión de estas proteínas. Esta alteración en la expresión de las HSP podría contribuir a un mayor grado de muerte celular cuando las células se exponen a temperaturas más altas en un periodo de tiempo más corto.

Se ha descrito que la mortalidad de las células de melanoma aumentaba al aplicar potencias de láser crecientes utilizando la misma concentración de GNRs [189]. En nuestro caso, las células B16F10 no se eliminaron completamente cuando el láser se aplicó a 4 W a RT. Sin embargo, cuando las células de melanoma se irradiaron a 37 °C, una temperatura más representativa del entorno celular *in vivo*, fue posible lograr una eliminación completa de las células de melanoma.

Sorprendentemente, este resultado se consiguió incluso con una potencia láser reducida de 1 W, utilizando la misma concentración de GNRs, un nivel de potencia más cercano al valor de la exposición máxima recomendada bajo irradiación de luz NIR [200].

En cuanto a los tratamientos con PTT para eliminar células de glioblastoma, existe una importante variabilidad en los resultados descritos en la bibliografía debido a la amplia gama de parámetros que pueden aplicarse. Estos parámetros incluyen la concentración de nanopartículas, la potencia del láser y la duración de la aplicación, así como el tipo de biofuncionalización de las nanopartículas. Las tasas de mortalidad celular utilizando GNRs similares a los SGNRs aquí descritos, aumentaron hasta el 80% utilizando una potencia láser menor (1,5 W) pero con una alta concentración de GNRs presentes en el medio de cultivo celular durante la irradiación láser a 808 nm [136]. Además, se ha probado la PTT utilizando un láser de baja potencia con una alta concentración de nanopartículas, dando como resultado una tasa de mortalidad celular del 60% tras el tratamiento con PTT [201]. Otras estrategias incluían la biofuncionalización de los GNRs para dirigirlos a células de glioblastoma que permitían alcanzar tasas de mortalidad celular que oscilaban entre el 20 y el 60% tras PTT [138], [139]. Por lo tanto, las tasas de mortalidad de células de glioblastoma obtenidas en este estudio tras la aplicación de PTT utilizando LGNRs y SGNRs a baja concentración (2 µg/mL), son superiores a las descritas en la literatura existente para eliminar células de glioblastoma mediante PTT. Además, la aplicación de los tratamientos PTT a 37 °C, que se asemeja mucho a las condiciones fisiológicas, permitió reducir la potencia del láser a 1 W, un valor más cercano a la irradiación láser de baja potencia, para obtener tasas de muerte celular similares o incluso superiores. Este ajuste condujo a una eliminación casi completa de las células CT2A y B16F10 en este estudio.

6.1.4. Caracterización de la muerte celular con PTT mediada por GNRs

La apoptosis y la necrosis son las dos vías de muerte celular más frecuentemente observadas tras los tratamientos con PTT. Los procesos de necrosis y apoptosis en respuesta a la PTT dependen de la potencia del láser y de la temperatura alcanzada

dentro de los tejidos cancerosos durante la irradiación [202], siendo la irradiación de baja energía la que induce la apoptosis en lugar de la necrosis. En la necrosis se produce una pérdida de la integridad de la membrana celular, lo que conduce a una fuga incontrolada del contenido celular al espacio extracelular. Esta fuga puede inducir respuestas inflamatorias que pueden dañar los tejidos adyacentes. Por el contrario, las células apoptóticas mantienen la integridad de su membrana plasmática, evitando así daños inflamatorios a las células y tejidos circundantes [203]. Además, la apoptosis puede estimular la respuesta inmunitaria para inhibir el desarrollo de crecimiento tumoral secundario, ya que las células apoptóticas suelen activar la inmunidad antitumoral mediante un proceso conocido como cebado cruzado de células T [204]. Por lo tanto, la eficacia de los LGNRs y los SGNRs para promover la muerte celular apoptótica en lugar de la necrosis (como se ilustra en la Figura 5.18) demostró que estas nanopartículas son óptimas para los tratamientos de PTT.

Además, cuando las células apoptóticas no se eliminan eficazmente (por ejemplo, debido a su elevado número), pueden progresar a necrosis secundaria y perder la integridad de su membrana (células PI⁺). Este proceso conduce a la liberación de patrones moleculares asociados al peligro (DAMPs), moléculas que estimulan el sistema inmunitario [205]. Teniendo en cuenta que los análisis de citometría se realizaron 24 horas después de los tratamientos con PTT, es posible que algunas de las células apoptóticas iniciales sufrieran necrosis secundaria. Como resultado, en una situación *in vivo*, estas células necróticas podrían estimular potencialmente la respuesta del sistema inmunitario para detectar y eliminar las células cancerosas.

Existe una ligera discrepancia en el número de células vivas obtenido a partir del ensayo XTT y el análisis de citometría de flujo en células B16F10 24 horas después de los tratamientos PTT. El ensayo XTT parece arrojar un mayor índice de células vivas (Figura 5.17B) en comparación con la citometría de flujo (Figura 5.18B), que utiliza marcadores apoptóticos y necróticos. Esta incoherencia puede deberse al uso de diferentes ensayos para evaluar la viabilidad celular, en los que algunas células apoptóticas tempranas (células Anexina V⁺) pueden seguir reduciendo el reactivo XTT, lo que hace que se clasifiquen como células vivas en el ensayo XTT,

mientras que, en la citometría de flujo, estas células pueden teñirse con anexina V. Es posible que las células anexina V-positivas aún mantengan la integridad de su membrana celular y, por lo tanto, las deshidrogenasas necesarias para la reducción del XTT permanezcan activas dentro de estas células, dando lugar a la clasificación de las células apoptóticas tempranas como células vivas en el ensayo XTT.

Estudios previos han demostrado que los GNRs pueden acumularse en el interior de endosomas y lisosomas [206], y que puede producirse una fuga lisosomal tras los tratamientos con PTT promoviendo y desencadenando la muerte celular [207]. La permeabilización de las membranas lisosomales causada por los tratamientos con PTT provocó la liberación de enzimas lisosomales al citosol, desencadenando mecanismos de muerte celular tanto apoptóticos como necróticos. La ruptura de las membranas lisosomales se produjo antes de la muerte celular, como demuestra la disminución de la tinción del marcador lisosomal mientras las células seguían siendo viables (células positivas para la calceína). Esto sugiere que la ruptura de la membrana lisosomal precedió a la de la membrana plasmática. Estos resultados concuerdan con otros estudios que utilizan nanopartículas para la eliminación de células cancerosas [160], [161]. Por lo tanto, dirigir los GNRs a los lisosomas podría mejorar potencialmente los resultados de los tratamientos antitumorales con PTT.

6.1.5. Efecto sinérgico entre PTT mediada por GNRs y quimioterapia

La eficacia del efecto sinérgico entre la PTT y la quimioterapia es mayor que la eficacia de cada terapia por separado. La ayuda auxiliar de una terapia emergente como la PTT junto a un tratamiento antitumoral convencional como la quimioterapia puede tener muchos beneficios, siendo el principal la eliminación de los efectos secundarios producidos por la quimioterapia al permitir reducir la dosis de fármacos utilizados [208]. Los fármacos más utilizados en clínica como la doxorrubicina son cargados en las NPs o en *nanocarriers* en su para sr utilizados en combinación con PTT [209], o con otros compuestos como el quitosan [210], [211]. En nuestro caso, se ha utilizado el 5-FU, fármaco específico para tratar el melanoma [212].

Las células B16F10 son más resistentes al calor que las CT2A independientemente de la temperatura ambiente a la que se realice la PTT (Figura 5.17). Por esta razón, solamente se han realizado los experimentos *in vitro* de PTT en combinación con quimioterapia mediada por 5-FU en esta línea celular en concreto. Los parámetros de la PTT cambian al añadir un elemento externo, siendo en este caso el 5-FU. La citotoxicidad del 5-FU (Figura 5.20) muestra un aumento lógico según aumenta su concentración. Concretamente, hay un gran cambio en la morfología de las células de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, donde estas se ven más alargadas, y es a partir de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, donde la mortalidad se incrementa doble aproximadamente, manteniéndose constante en esa viabilidad celular hasta llegar a la máxima concentración testada, de la cual partimos por la investigación de Kazi et al [150]. No se aprecian efectos citotóxicos ni por separado con el 5-FU a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ni en presencia de las SGNRs e incluso cuando las células están en presencia de los dos componentes, SGNRs y 5-FU.

Los experimentos de PTT en combinación con 5-FU se realizan con las SGNRs a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando el 5-FU en las siguientes concentraciones: 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El tiempo de irradiación no cambia, se mantiene constante a 10 minutos en todos los experimentos donde se ha aplicado la PTT pero sí la potencia, a la que se realiza, 4.5 W y 1.2 W. Los resultados muestran que se consigue eliminar un gran número de células cuando la PTT se aplica en presencia del 5-FU, en todas sus concentraciones con la combinación de las SGNRs tanto a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en comparación con la aplicación de PTT exclusivamente. Por lo tanto, se demuestra el efecto sinérgico entre la PTT y la quimioterapia *in vitro*. Al no haber diferencias significativas de mortalidad entre los grupos SGNRs a ambas concentraciones en combinación con el 5-FU en sus concentraciones mencionadas a 4.5W (Figura 5.21 y Figura 5.22) se realiza el experimento irradiando a 1.2W. En este ensayo, bajan la dosis de SGNRs a la mitad siendo 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y hasta una disminución de cuatro veces la potencia del láser (Figura 5.23). Aun así, se observan diferencias en la viabilidad celular dependiendo de la concentración de 5-FU usada, siendo más eficiente la concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con una mortalidad del 60 % frente al 40% cuando la concentración disminuye 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Comparando los resultados obtenidos con diversos estudios, por ejemplo, en el trabajo de Singh et al [213]; donde las GNRs están conjugadas con el fármaco en un nanocomplejo de polidopamina, observamos que las concentraciones que se usan en ese estudio, son bastante mayores que las utilizadas en esta tesis, donde se ha logrado disminuir la dosis de SGNRs añadidas a las células B16F10 *in vitro*. Los estudios realizados en esta tesis difieren en la estrategia seguida en otras investigaciones, donde la PTT es la que induce la liberación del fármaco de las NPs [214], [215] o la utilización de hidrogeles que son irradiados donde se encuentra tanto el fármaco como las GNPs [216], [217]. La novedad del estudio que se presenta indica que la PTT puede actuar como un efectivo coadyuvante de la quimioterapia, permitiendo utilizar dosis de fármaco mucho menores, que no producirían efectos secundarios indeseados.

6.2. Experimentos *In vivo*

6.2.1. Modelo murino de melanoma

Una vez caracterizada la evolución del tumor a lo largo del tiempo en distintos puntos temporales (4, 7, 11, 15 y 23 días) tras la inyección de 100.000 células B16F10 (Figura 5.25), se determinó la aplicación de la PTT a la semana, cuando el tumor tiene un diámetro aproximado de 5 mm. Teniendo en cuenta el diámetro del tumor, éstos se pueden clasificar en pequeño (<3mm de diámetro), mediano (3-15 mm de diámetro) y grande (>15mm de diámetro). Un tumor de melanoma de dimensiones grandes está asociado con una gran mortalidad, por tanto, una baja supervivencia y con alta probabilidad de producir metástasis hacia otros órganos del cuerpo como pueden ser el hígado o los pulmones [218]. En nuestro modelo, el tamaño del tumor en algunos animales tiene unas dimensiones grandes (>15mm) 23 días después de la inyección de las células, por tanto, se decidió no sobrepasar este punto temporal en ninguno de los estudios. El tumor se caracteriza por una alta vascularización, muy hemorrágico y encapsulado. Las células del melanoma forman diversos patrones arquitectónicos que incluyen nidos, verticilos, trabéculas, láminas, nódulos, rosetas, glándulas y formaciones papilares. Sufren diferenciación schwanniana, fibroblástica, miofibroblástica, rabdoide, osteoide, cartilaginosa, ganglionar y de músculo liso [219]. La tinción inmunohistoquímica se utiliza ampliamente para diferenciar los melanomas, como por ejemplo un melanoma primario o melanoma nevoide [220].

Una vez establecido el modelo tumoral se aplicó la PTT durante 25 minutos a 450 mW inmediatamente después de la inyección de SGNRs y un solo día. Con una sola aplicación de PTT, en tumores pequeños crecidos durante 4 días, el tumor desaparece dejando una pequeña cicatriz. Esto concuerda con otros estudios encontrados en la literatura, como el trabajo de Pandesh *et al* [221], en el que tratan tumores de volúmenes grandes (100 mm³) irradiando durante 6 minutos, pero irradiando con el láser a una potencia de 2.5W/cm² (mucho mayor que la utilizada en esta tesis) y utilizando unas NPs compuestas de óxido de hierro con el

núcleo de oro. En el estudio de Pandesh *et al*, el tumor se localiza en el flanco derecho consiguiendo una disminución drástica del tumor.

Sin embargo, cuando se realiza PTT en tumores medianos (<15 mm), el tumor no desaparece, aunque no prolifera tanto comparado con el control (sin tratar con PTT) como se puede observar en la Figura 5.26.

Según la bibliografía, el número de NPs inyectadas para el tratamiento del tumor, así como la potencia y el tiempo de irradiación varía dependiendo del estudio como se puede encontrar en la literatura científica (Tabla 2.1. Estado del arte de la aplicación de PTT con GNRs para el tratamiento de melanoma.. Lo ideal sería utilizar una dosis baja de NPs y baja potencia del láser junto con una reducción del tiempo de irradiación. Las SGNRs utilizadas en los experimentos de PTT están recubiertas con PEG, el siguiente paso después de toda la optimización y estandarización del modelo murino de melanoma y los parámetros de PTT establecidos debe ser la terapia dirigida. Las estrategias en la aplicación de PTT son muy diversas, como por ejemplo su combinación con la inmunoterapia o la utilización de nanocompuestos [222]. En el estudio de Balakrishnan et al [223]; utilizan NPs conjugadas con *Prussian Blue* inyectadas en el tumor e inmediatamente se irradia durante 10 minutos probando diferentes potencias (0.75, 1, 1.5 y 2W). Posteriormente se inyectan 5 dosis del anticuerpo anti CD37, o anticuerpos contra los *check points* inmunomoduladores como anti PD-L1 y CTLA4. Generan una respuesta inmunogénica mediante la filtración de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y activación sistémica de células dendríticas y linfocitos T con memoria inmunológica. Otro ejemplo es la funcionalización de polidopamina en NPs en el tumor situado en la espalda irradiado durante 5 minutos a 1.8W/cm² y tres dosis de dichas NPs como en el trabajo de Chen et al [224]. Por tanto se encuentran resultados de una gran disparidad de parámetros y estrategias para eliminar el tumor de melanoma.

En nuestro caso, se han tratado tumores pequeños y medianos, con una baja dosis de irradiación (450 mW) en un solo día durante 25 minutos y con una dosis de SGNRs. Los resultados son prometedores y la optimización del modelo murino de

melanoma está realizado, aunque queda por establecer el comportamiento de GNRs biofuncionalizados que reconozcan específicamente a las células tumorales.

6.2.2. Modelo murino de glioblastoma

En cuanto a los experimentos *in vivo* realizados en el modelo murino de glioblastoma, se utilizaron células CT2A para inducir el tumor dentro del cerebro de los ratones. El tumor CT2A es una masa hipercelular homogénea con límites bien definidos. El patrón hemorrágico, angiogénico e infiltrativo del tumor, que conduce a lesiones satélites en el cerebro, fue confirmado por inmunohistoquímica. Los rasgos característicos de un glioma de grado alto, gran actividad mitótica, alta densidad de células, proliferación microvascular y hemorragia espontánea fueron confirmados por estudios previos [153]. Además, las células del glioma CT2A son neoplásicas con pleomorfismo con forma fusiforme grande y redonda pequeña con núcleos prominentes [152]. El abundante espacio intersticial entre las células confirma una alteración intersticial en el interior del tumor, otra característica del tumor CT2A.

Las células utilizadas para producir el modelo de glioma, células CT2A, presentan en su membrana una sobreexpresión de la glicoproteína CD44, siendo el receptor de HA, responsable de muchas funciones en las células tumorales como adhesión, migración y señalización celular implicadas en la respuesta a la lesión e invasión del cáncer cerebral [225], [226], [227]. Esta es la estrategia terapéutica que lidera este trabajo, con el fin de dirigir los GNRs específicamente a las células CT2A y aumentar la eficacia de la PTT. Existen evidencias científicas de la mejora de la circulación sanguínea y la acumulación de nanopartículas biofuncionalizadas con HA en el tumor, mostrando una alta captación celular y baja citotoxicidad, no sólo en tratamientos de PTT, sino también con otras estrategias como sistemas de liberación de fármacos en combinación con PTT [228] o nanodispositivos [229].

Las 700kDa-HA-GNRs se han utilizado en PTT como tratamiento contra el tumor debido a sus propiedades anticancerígenas, tales como su efecto antiangiogénico, antiproliferación de células cancerígenas, activación del sistema inmune y buena captación específica por las células cancerosas [230]. Este trabajo demuestra la

reducción de la masa tumoral en el grupo GNRs y en el grupo PTT en comparación con el control. En los ratones a los que sólo se inyectó GNRs sin irradiación láser, el tumor se redujo casi a la mitad tras una semana de adición de GNRs respecto a los ratones de control. Esto sugiere que el efecto de los propios 700kDa-HA-GNRs podría detener de forma momentánea la proliferación y división de las células CT2A. Un estudio ha demostrado esta reducción con micelas simples de HA donde la masa tumoral de GBM se redujo también sólo con el efecto terapéutico de HA sin ningún otro mecanismo molecular o agente externo [231]. En cuanto al tratamiento con hipertermia, PTT, la reducción del tumor CT2A se evidencia tanto a la semana de aplicación de la PTT como incluso dos semanas después de la irradiación. El efecto positivo de la aplicación de la PTT es demostrable tanto por volumetría del tumor, obtenida a partir de las imágenes por RM, como por la prueba de comportamiento en campo abierto para comprobar el sistema locomotor exploratorio de los ratones, siendo un buen indicador de su estado general (Figura 5.33). Por lo demás, la PTT ha funcionado con bastante éxito, aunque no se eliminaron todas las células cancerosas y no se detuvo la progresión tumoral, muy probablemente debido al tamaño inicial del tumor y a la penetración limitada del láser en el tejido tumoral. Las células supervivientes seguían proliferando, y se desarrolló una masa tumoral secundaria después del tratamiento durante mucho tiempo, como se muestra en Figura 5.32B. La irradiación en este trabajo fue con láser de 450 mW durante 25 minutos, mucho menor que las potencias utilizadas en numerosos estudios donde la potencia de irradiación varía entre 1-2W/cm² en diferentes intervalos de tiempo. Además, la PTT con HA-GNRs se ha aplicado en numerosos cánceres como en el trabajo de Di Gao et al [232]; donde utilizaron esas potencias durante 10 minutos con HA-GNRs en combinación con una quimioterapia obteniendo una casi total eliminación del tumor de ovario, proponiendo un efecto sinérgico entre la PTT y la quimioterapia de tratamiento convencional. Además, en este estudio se muestra una buena relación entre el aumento de temperatura producido por la aplicación de la PTT y la mejora de la captación de los HA-GNRs junto con la sobreexpresión de CD44 en las células cancerosas en comparación con las células humanas no cancerosas. Otro estudio realizado por Xu Weijun et al [233]; utilizó GNRs con HA y HER2 anticuerpo de

doble orientación con alta estabilidad y circulación en sangre a largo plazo. La irradiación fue durante 5 minutos a 2 W/cm^2 con una eliminación del tumor de cáncer de mama en ratones.

Para caracterizar el tumor, las secciones de tejido se tiñeron con anticuerpos para detectar nestina y Hoechst para revelar las células positivas nestina y la densidad celular y la proliferación, respectivamente. La nestina está sobreexpresada en los tejidos de GBM en comparación con los gliomas de grado bajo, por lo que la nestina es una diana prometedora para combatir las células del glioblastoma. En los estudios de Gonçalves et al; [138], [139], se utilizó un péptido de nestina unido a los GNRs para realizar PTT en cultivos celulares 3D basados en hidrogel con células de glioblastoma con alta captación por las células cancerosas y alto porcentaje de células muertas. Estudios recientes, revelan el papel de la nestina en la célula tumoral, como la participación en la progresión mitótica o la respuesta a fármacos. Un déficit de nestina genera un proceso de apoptosis de las células y afecta al huso mitótico [168]. Nuestro trabajo revela que las células CT2A son nestina positivo y que la marca de nestina coincidía perfectamente con la densidad y proliferación de células tumorales mostradas en la Figura 6. Haciendo posible la detección de los límites del tumor mediante este marcador.

La microglía reactiva se analizó mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-Iba1. Fuera del tumor la microglía presentaba un fenotipo ramificado cuya función es la vigilancia y mantenimiento de la homeostasis. Dentro del tumor el fenotipo cambia a forma ameboide que corresponde a células redondeadas activadas sin ramificación relacionadas con procesos de metástasis y hemorragia intracraneal [169], [170]. Una de las características del tumor CT2A es ser un modelo hemorrágico e infiltrativo, como antes se ha mencionado. Las células microgliales que rodean el tumor cambian su fenotipo de forma ramificada a ameboide como se observa en la Figura 5.34 y Figura 5.35, lo que posibilita el uso del marcador Iba1 como otra herramienta para explorar los límites del tumor, la tinción microglial coincide perfectamente con el aumento del marcaje con nestina y el aumento del número de núcleos marcados por la tinción con Hoechst.

En cuanto a la biofuncionalización de los GNRs con HA, se ha demostrado que el HA modula la inflamación en el sistema nervioso central, con efectos antiinflamatorios para las células de alto peso molecular (>500kDa) y proinflamatorios para las células mieloides de bajo peso molecular, incluida la microglía. En estos términos, los astrocitos también modulan la inflamación, pero actualmente no está claro el vínculo entre HA y este tipo celular. La activación de la microglía se produce principalmente a través del receptor Toll-like-4 (TLR4). La activación de las células microgliales se clasifica en macrófagos M1, cuyas funciones son la producción de citoquinas proinflamatorias y actúan como células neurotóxicas y M2, activadas por señales de apoptosis y su papel es la remodelación y reparación [170]. Algunos estudios [234], [235] informan de la activación de la función antiinflamatoria mediante la modulación de los receptores TLR4 con MW-HA como el HA de nuestros GNRs biofuncionalizados. Además, los 700kDa-HA-GNRs dirigidos priorizan específicamente a las células CT2A mediante el receptor sobreexpresado CD44 y no a las células de la microglia o astrocitos mediante los receptores TLR4 como se demuestra en el trabajo de Hayward et al [236]; en el que se utilizan liposomas conjugados con HA en células de glioblastoma en presencia de células de la microglia y astrocitos. La especificidad de los 700kDa-HA-GNRs hacia las células de glioblastoma frente a otros tipos de células y el efecto antiinflamatorio en el cerebro hacen de HW-HA una perfecta candidata para ser biofuncionalizada en los GNRs para la aplicación de PTT.

La PTT genera calor mediante los GNRs para contribuir a la permeabilidad de la vasculatura del tumor y las membranas de las células cancerosas. La PTT puede desencadenar el mecanismo de apoptosis para aumentar potencialmente el efecto antiinflamatorio a través de la activación de los macrófagos que producen citoquinas antiinflamatorias. La inducción de apoptosis en lugar de necrosis depende de los parámetros de la PTT, como la potencia del láser, el tiempo de irradiación y la concentración de GNRs. Si se generan células muertas por necrosis, mediante la ablación del tumor, se generan DAMPS que benefician el crecimiento de los tumores secundarios si los hay o reproducirse el tumor primario nuevamente al quedar células tumorales sin eliminar. Sin embargo, si la muerte ocurre por

mecanismos de apoptosis puede dar lugar a una respuesta inmunogénica [237]. En este estudio se encontraron células apoptóticas en múltiples zonas del cerebro de ratones tratados con PTT mediante la detección de caspasa 3 activada dos semanas después de la aplicación de PTT, como se muestra en la Figura 5.36. Karlsson y colaboradores [238] han demostrado el mecanismo de inducción de la apoptosis mediante la activación de la caspasa 3 en células de glioma resistentes a Fas. Esto demuestra que las células de glioma podrían ser manipuladas por agentes externos como el calor generado por GNRs con irradiación láser para desencadenar la apoptosis, evitando el proceso de inflamación, apoyado en las propiedades de HW-HA y la inducción preferente de la apoptosis como mecanismo de muerte celular. La activación de la apoptosis por PTT también fue demostrada por otros trabajos de este grupo [136], [157] en células de glioblastoma *in vitro*, promovido por la ruptura de la membrana lisosomal, donde los PEG-GNRs de diferentes tamaños pueden encontrarse dentro de las células desencadenando el mecanismo de muerte celular por apoptosis, como se demuestra en esta tesis doctoral.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en los modelos *in vivo* del tratamiento del glioblastoma con PTT mediada por HA-GNRs, indican que la terapia es muy eficaz, lográndose un aumento de la supervivencia de los animales tratados. Aún así, no se ha logrado una eliminación total de las células tumorales, muy probablemente debido al tamaño del tumor y a la poca penetración del láser en los tejidos tumorales, lo que conlleva al crecimiento del tumor a lo largo del tiempo. La PTT podría, por tanto, resultar de gran utilidad para completar los tratamientos quirúrgicos en los que se elimina la mayoría de la masa tumoral. Debido a la gran capacidad infiltrativa del tumor, hay células no visibles que durante la cirugía escapan a la operación. Estas células residuales, responsables de muchas de las recaídas, podrían ser eliminadas mediante el tratamiento de PTT combinada con HA-GNRs durante la cirugía.

Capítulo 7. Conclusiones

1. Se han establecido los parámetros óptimos necesarios para realizar una aplicación eficaz de la PTT tanto *in vitro* como *in vivo*. Los parámetros analizados han sido la potencia del láser, el tiempo de irradiación, el tipo y la concentración de los distintos GNRs utilizados.
2. Se demuestra la eficacia de los PEG-GNRs y los HA-GNRs para promover la muerte celular mediante PTT de forma eficaz en líneas celulares de glioblastoma y melanoma. El uso de tratamientos de PTT basados en GNRs a una temperatura fisiológica de 37 °C ha dado como resultado una mayor eficacia del tratamiento de PTT, que permite disminuir la intensidad del láser utilizado y que condujo a la eliminación total de células de glioblastoma y de células de melanoma. Esto es particularmente significativo, teniendo en cuenta que el melanoma es conocido por su alta resistencia al calor.
3. Se caracteriza que los GNRs son internalizados en las células CT2A y B16F10 y su principal vía de muerte celular producida por los tratamientos de PTT mediados por GNRs es la apoptosis, lo cual es favorable ya que la presencia de células apoptóticas evita la inflamación asociada a los mecanismos de muerte celular producida por necrosis. Además, la tinción lisosomal tras los tratamientos de PTT sugiere que la fuga del contenido lisosomal precedió a la ruptura de la membrana plasmática y podría servir como uno de los desencadenantes de la muerte celular mediada por apoptosis.
4. Debido a la alta eficacia de ambos tipos de PEG-GNRs en la PTT, los LGNR pueden ser útiles para mejorar la biofuncionalización debido a su mayor superficie, lo que puede ser útil para promover una alta sensibilidad y especificidad en el reconocimiento de células o tejidos cancerosos diana.
5. La combinación de la PTT con la quimioterapia permite disminuir la dosis del fármaco utilizada de forma convencional en los tratamientos de quimioterapia, proporcionando una reducción de los efectos secundarios asociados a la quimioterapia (0).

6. Los estudios realizados en modelos animales de melanoma indican que la PTT es capaz de eliminar totalmente el tumor cuando se aplica en tumores de pequeño tamaño (2 mm de diámetro). Al mismo tiempo se observa que el tratamiento de PTT en tumores de diámetros mayores (4.5 mm), disminuye la velocidad con la que se incrementa el tamaño del tumor en comparación con animales sin tratar.
7. Se demuestra el tipo de muerte celular por apoptosis producida en el tumor de glioblastoma inducido en los ratones C57/BL-6 a través del análisis de caspasa 3 activa por inmunohistoquímica incluso más de 20 días después de la aplicación de PTT. Se revela el comportamiento de la microglía reactiva en presencia del tumor de glioblastoma, mostrando la capacidad infiltrativa y activación por cambio de morfología de estas células dentro del tumor.
8. La aplicación de PTT mediada por HA-GNRs en modelos animales de glioblastoma es muy eficiente y disminuye de forma significativa el tamaño del tumor intracraneal, prolongando la vida de los animales tratados con PTT frente a los no tratados a casi el doble de días. Añadir resultados de comportamiento brevemente, por ejemplo: Además, durante todo el tiempo de análisis, los animales tratados con PTT mostraron un comportamiento exploratorio mucho más activo en comparación con los ratones control no tratados.

Capítulo 8. Bibliografía

- [1] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, and F. Rizzolio, “The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine,” *Molecules*, vol. 25, no. 1. MDPI AG, 2020. doi: 10.3390/molecules25010112.
- [2] O. Afzal *et al.*, “Nanoparticles in Drug Delivery: From History to Therapeutic Applications,” *Nanomaterials*, vol. 12, no. 24. MDPI, Dec. 01, 2022. doi: 10.3390/nano12244494.
- [3] A. C. Anselmo and S. Mitragotri, “Nanoparticles in the clinic: An update,” *Bioeng Transl Med*, vol. 4, no. 3, Sep. 2019, doi: 10.1002/btm2.10143.
- [4] F. Allhoff and P. Lin, “What’ s So Special about Nanotechnology and Nanoethics?”
- [5] F. Allhoff, “On the autonomy and justification of nanoethics,” *Nanoethics*, vol. 1, no. 3, pp. 185–210, Dec. 2007, doi: 10.1007/s11569-007-0018-3.
- [6] G. Foladori, N. Invernizzi, and E. Záyago, “Two dimensions of the ethical problems related to nanotechnology,” in *NanoEthics*, 2009, pp. 121–127. doi: 10.1007/s11569-009-0060-4.
- [7] P. Lin and F. Allhoff, “NANOSCIENCE AND NANOETHICS: DEFINING THE DISCIPLINES.”
- [8] A. C. Tan, D. M. Ashley, G. Y. López, M. Malinzak, H. S. Friedman, and M. Khasraw, “Management of glioblastoma: State of the art and future directions,” *CA Cancer J Clin*, vol. 70, no. 4, pp. 299–312, Jul. 2020, doi: 10.3322/caac.21613.
- [9] D. N. Louis *et al.*, “The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary,” *Neuro Oncol*, vol. 23, no. 8, pp. 1231–1251, Aug. 2021, doi: 10.1093/neuonc/noab106.
- [10] S. Gritsch, T. T. Batchelor, and L. N. Gonzalez Castro, “Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health

- Organization classification of tumors of the central nervous system,” *Cancer*, vol. 128, no. 1. John Wiley and Sons Inc, pp. 47–58, Jan. 01, 2022. doi: 10.1002/cncr.33918.
- [11] I. Dimov, D. Tasić-Dimov, I. Conić, and V. Stefanovic, “Glioblastoma multiforme stem cells,” *TheScientificWorldJournal*, vol. 11. pp. 930–958, Apr. 19, 2011. doi: 10.1100/tsw.2011.42.
- [12] M. Weller *et al.*, “Glioma,” *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 1. Nature Publishing Group, Jul. 16, 2015. doi: 10.1038/nrdp.2015.17.
- [13] A. Czarnywojtek *et al.*, “Glioblastoma Multiforme: The Latest Diagnostics and Treatment Techniques,” *Pharmacology*. S. Karger AG, 2023. doi: 10.1159/000531319.
- [14] A. Omuro and L. M. DeAngelis, “Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review,” *JAMA*, vol. 310, no. 17. American Medical Association, pp. 1842–1850, Nov. 06, 2013. doi: 10.1001/jama.2013.280319.
- [15] M. E. Davis, “Epidemiology and Overview of Gliomas,” *Seminars in Oncology Nursing*, vol. 34, no. 5. W.B. Saunders, pp. 420–429, Dec. 01, 2018. doi: 10.1016/j.soncn.2018.10.001.
- [16] C. Alifieris and D. T. Trafalis, “Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 152. Elsevier Inc., pp. 63–82, Jun. 29, 2015. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.005.
- [17] S. Liu *et al.*, “Progress and prospect in tumor treating fields treatment of glioblastoma,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 141. Elsevier Masson s.r.l., Sep. 01, 2021. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111810.
- [18] L. K. P. Regli *et al.*, “Incidence of clinically relevant psychiatric symptoms during glioblastoma treatment: an exploratory study,” *J Neurooncol*, vol. 163, no. 1, pp. 185–194, May 2023, doi: 10.1007/s11060-023-04326-2.
- [19] J. J. Mandel, M. Youssef, E. Ludmir, S. Yust-Katz, A. J. Patel, and J. F. De Groot, “Highlighting the need for reliable clinical trials in glioblastoma,”

- Expert Review of Anticancer Therapy*, vol. 18, no. 10. Taylor and Francis Ltd, pp. 1031–1040, Oct. 03, 2018. doi: 10.1080/14737140.2018.1496824.
- [20] B. Huang, X. Li, Y. Li, J. Zhang, Z. Zong, and H. Zhang, “Current Immunotherapies for Glioblastoma Multiforme,” *Frontiers in Immunology*, vol. 11. Frontiers Media S.A., Mar. 09, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2020.603911.
- [21] A. M. Gawel, R. Singh, and W. Debinski, “Metal-Based Nanostructured Therapeutic Strategies for Glioblastoma Treatment—An Update,” *Biomedicines*, vol. 10, no. 7. MDPI, Jul. 01, 2022. doi: 10.3390/biomedicines10071598.
- [22] S. K. Carlsson, S. P. Brothers, and C. Wahlestedt, “Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme,” *EMBO Mol Med*, vol. 6, no. 11, pp. 1359–1370, Nov. 2014, doi: 10.15252/emmm.201302627.
- [23] S. Strashilov and A. Yordanov, “Aetiology and pathogenesis of cutaneous melanoma: Current concepts and advances,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 12, Jun. 2021, doi: 10.3390/ijms22126395.
- [24] D. E. Brănișteanu *et al.*, “New Treatment Horizons in Uveal and Cutaneous Melanoma,” *Life*, vol. 13, no. 8. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Aug. 01, 2023. doi: 10.3390/life13081666.
- [25] D. Kohoutova, D. Worku, H. Aziz, J. Teare, J. Weir, and J. Larkin, “Malignant melanoma of the gastrointestinal tract: Symptoms, diagnosis, and current treatment options,” *Cells*, vol. 10, no. 2. MDPI, pp. 1–10, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/cells10020327.
- [26] D. K. DePalo, K. M. Elleson, M. J. Carr, P. E. Spiess, and J. S. Zager, “Genitourinary melanoma: An overview for the clinician,” *Asian Journal of Urology*, vol. 9, no. 4. Editorial Office of Asian Journal of Urology, pp. 407–422, Oct. 01, 2022. doi: 10.1016/j.ajur.2022.01.003.
- [27] J. Steininger *et al.*, “Leptomeningeal Metastases in Melanoma Patients: An Update on and Future Perspectives for Diagnosis and Treatment,”

- International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 14. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Jul. 01, 2023. doi: 10.3390/ijms241411443.
- [28] S. Santourlidis *et al.*, “Epigenetics in the Diagnosis and Therapy of Malignant Melanoma,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 3. MDPI, Feb. 01, 2022. doi: 10.3390/ijms23031531.
- [29] M. Chalada, C. A. Ramlogan-Steel, B. P. Dhungel, C. J. Layton, and J. C. Steel, “Radiation on the Aetiology and Development of Uveal Melanoma,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, p. 1700, 2021, doi: 10.3390/cancers.
- [30] M. Watson, D. M. Holman, and M. Maguire-Eisen, “Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk,” *Seminars in Oncology Nursing*, vol. 32, no. 3. W.B. Saunders, pp. 241–254, Aug. 01, 2016. doi: 10.1016/j.soncn.2016.05.005.
- [31] G. C. Leonardi *et al.*, “Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review),” *International Journal of Oncology*, vol. 52, no. 4. Spandidos Publications, pp. 1071–1080, Apr. 01, 2018. doi: 10.3892/ijo.2018.4287.
- [32] J. Tímár and A. Ladányi, “Molecular Pathology of Skin Melanoma: Epidemiology, Differential Diagnostics, Prognosis and Therapy Prediction,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 10. MDPI, May 01, 2022. doi: 10.3390/ijms23105384.
- [33] L. Tagliaferri *et al.*, “Immunotherapy and radiotherapy in melanoma: a multidisciplinary comprehensive review,” *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, vol. 18, no. 3. Taylor and Francis Ltd., 2022. doi: 10.1080/21645515.2021.1903827.
- [34] R. D. Issels, “Hyperthermia adds to chemotherapy,” *Eur J Cancer*, vol. 44, no. 17, pp. 2546–2554, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.ejca.2008.07.038.
- [35] S. K. Calderwood, J. R. Theriault, and J. Gong, “How is the immune response affected by hyperthermia and heat shock proteins?,” in *International Journal of Hyperthermia*, Dec. 2005, pp. 713–716. doi: 10.1080/02656730500340794.

- [36] J. R. Ostberg, B. E. Dayanc, M. Yuan, E. Oflazoglu, and E. A. Repasky, “Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity by fever-range thermal stress is dependent on NKG2D function and is associated with plasma membrane NKG2D clustering and increased expression of MICA on target cells,” *J Leukoc Biol*, vol. 82, no. 5, pp. 1322–1331, Nov. 2007, doi: 10.1189/jlb.1106699.
- [37] M. Harmati *et al.*, “Small extracellular vesicles convey the stress-induced adaptive responses of melanoma cells,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-51778-6.
- [38] V. Vilas-Boas, F. Carvalho, and B. Espiña, “Magnetic hyperthermia for cancer treatment: Main parameters affecting the outcome of in vitro and in vivo studies,” *Molecules*, vol. 25, no. 12. MDPI AG, Jun. 01, 2020. doi: 10.3390/molecules25122874.
- [39] S. Toraya-Brown and S. Fiering, “Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer,” *International Journal of Hyperthermia*, vol. 30, no. 8. Informa Healthcare, pp. 531–539, Dec. 01, 2014. doi: 10.3109/02656736.2014.968640.
- [40] G. Wei, Y. Wang, G. Yang, Y. Wang, and R. Ju, “Recent progress in nanomedicine for enhanced cancer chemotherapy,” *Theranostics*, vol. 11, no. 13. Ivyspring International Publisher, pp. 6370–6392, 2021. doi: 10.7150/thno.57828.
- [41] L. Zhu *et al.*, “Ultrasound Hyperthermia Technology for Radiosensitization,” *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 45, no. 5. Elsevier USA, pp. 1025–1043, May 01, 2019. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.12.007.
- [42] S. Gao, M. Zheng, X. Ren, Y. Tang, and X. Liang, “Local hyperthermia in head and neck cancer: mechanism, application and advance.” [Online]. Available: www.impactjournals.com/oncotarget
- [43] N. R. Datta *et al.*, “Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future,” *Cancer*

- Treatment Reviews*, vol. 41, no. 9. W.B. Saunders Ltd, pp. 742–753, Nov. 01, 2015. doi: 10.1016/j.ctrv.2015.05.009.
- [44] R. W. Y. Habash, D. Krewski, R. Bansal, and H. T. Alhafid, “Principles, applications, risks and benefits of therapeutic hyperthermia,” 2011.
- [45] S. Heckel-Reusser, “Whole-Body Hyperthermia (WBH): Historical Aspects, Current Use, and Future Perspectives,” in *Water-filtered Infrared A (wIRA) Irradiation: From Research to Clinical Settings*, Springer International Publishing, 2022, pp. 143–154. doi: 10.1007/978-3-030-92880-3_11.
- [46] Z. Behrouzkia, Z. Joveini, B. Keshavarzi, N. Eyvazzadeh, and R. Z. Aghdam, “Hyperthermia: How can it be used?,” *Oman Medical Journal*, vol. 31, no. 2. Oman Medical Specialty Board, pp. 89–97, Mar. 01, 2016. doi: 10.5001/omj.2016.19.
- [47] V. S. Bachu, J. Kedda, I. Suk, J. J. Green, and B. Tyler, “High-Intensity Focused Ultrasound: A Review of Mechanisms and Clinical Applications,” *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 49, no. 9. Springer, pp. 1975–1991, Sep. 01, 2021. doi: 10.1007/s10439-021-02833-9.
- [48] A. De Maio, G. Alfieri, M. Mattone, P. Ghanouni, and A. Napoli, “High-Intensity Focused Ultrasound Surgery for Tumor Ablation: A Review of Current Applications,” *Radiology: Imaging Cancer*, vol. 6, no. 1. Radiological Society of North America Inc., Jan. 01, 2024. doi: 10.1148/rycan.230074.
- [49] H. P. Kok *et al.*, “Heating technology for malignant tumors: a review,” *International Journal of Hyperthermia*, vol. 37, no. 1. Taylor and Francis Ltd, pp. 711–741, Jan. 01, 2020. doi: 10.1080/02656736.2020.1779357.
- [50] K. R. Foster, “Dielectric properties of tissues and biological materials: A critical review.” [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/20505222>
- [51] M. Habibi, R. D. Berger, and H. Calkins, “Radiofrequency ablation: Technological trends, challenges, and opportunities,” *Europace*, vol. 23, no.

-
4. Oxford University Press, pp. 511–519, Apr. 01, 2021. doi: 10.1093/europace/euaa328.
- [52] J. Crezee *et al.*, “Combined Use of wIRA and Microwave or Radiofrequency Hyperthermia,” in *Water-filtered Infrared A (wIRA) Irradiation: From Research to Clinical Settings*, Springer International Publishing, 2022, pp. 97–106. doi: 10.1007/978-3-030-92880-3_7.
- [53] F. Izzo *et al.*, “Radiofrequency Ablation and Microwave Ablation in Liver Tumors: An Update,” *Oncologist*, vol. 24, no. 10, pp. e990–e1005, Oct. 2019, doi: 10.1634/theoncologist.2018-0337.
- [54] P. Vaupel, H. Piazena, W. Müller, and M. Notter, “Biophysical and photobiological basics of water-filtered infrared-A hyperthermia of superficial tumors,” *International Journal of Hyperthermia*, vol. 35, no. 1. Taylor and Francis Ltd, pp. 26–36, Jan. 01, 2019. doi: 10.1080/02656736.2018.1469169.
- [55] S. Missios, K. Bekelis, and G. H. Barnett, “Renaissance of laser interstitial thermal ablation,” *Neurosurg Focus*, vol. 38, no. 3, 2015, doi: 10.3171/2014.12.FOCUS14762.
- [56] P. Kaur, M. L. Aliru, A. S. Chadha, A. Asea, and S. Krishnan, “Hyperthermia using nanoparticles - Promises and pitfalls,” *International Journal of Hyperthermia*, vol. 32, no. 1. Taylor and Francis Ltd, pp. 76–88, Jan. 02, 2016. doi: 10.3109/02656736.2015.1120889.
- [57] V. M. Bala *et al.*, “Nanoparticle-Mediated Hyperthermia and Cytotoxicity Mechanisms in Cancer,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, no. 1. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Jan. 01, 2024. doi: 10.3390/ijms25010296.
- [58] A. Włodarczyk, S. Gorgoń, A. Radoń, and K. Bajdak-Rusinek, “Magnetite Nanoparticles in Magnetic Hyperthermia and Cancer Therapies: Challenges and Perspectives,” *Nanomaterials*, vol. 12, no. 11. MDPI, Jun. 01, 2022. doi: 10.3390/nano12111807.

- [59] S. Deger, D. Boehmer, I. T. Èrk, J. Roigas, V. Budach, and S. A. Loening, “Interstitial Hyperthermia using Self-RegulatingThermoseeds Combined with Conformal RadiationTherapy,” 2002.
- [60] H. S. Kim and D. Y. Lee, “Near-infrared-responsive cancer photothermal and photodynamic therapy using gold nanoparticles,” *Polymers*, vol. 10, no. 9. MDPI AG, Aug. 30, 2018. doi: 10.3390/polym10090961.
- [61] J. Estelrich and M. Antònia Busquets, “Iron oxide nanoparticles in photothermal therapy,” *Molecules*, vol. 23, no. 7. MDPI AG, 2018. doi: 10.3390/molecules23071567.
- [62] “A clearer vision for in vivoimaging. Weissleder, Nature, 2001”.
- [63] E. A. Hussein, M. M. Zagho, G. K. Nasrallah, and A. A. Elzatahry, “Recent advances in functional nanostructures as cancer photothermal therapy,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 13. Dove Medical Press Ltd., pp. 2897–2906, May 17, 2018. doi: 10.2147/IJN.S161031.
- [64] B. Ji, M. Wei, and B. Yang, “Recent advances in nanomedicines for photodynamic therapy (PDT)-driven cancer immunotherapy,” *Theranostics*, vol. 12, no. 1. Ivyspring International Publisher, pp. 434–458, 2022. doi: 10.7150/thno.67300.
- [65] J. H. Correia, J. A. Rodrigues, S. Pimenta, T. Dong, and Z. Yang, “Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 9, Sep. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13091332.
- [66] X. Shi *et al.*, “Research Progress of Photothermal Nanomaterials in Multimodal Tumor Therapy,” *Frontiers in Oncology*, vol. 12. Frontiers Media S.A., Jul. 06, 2022. doi: 10.3389/fonc.2022.939365.
- [67] S. Guo, D. Gu, Y. Yang, J. Tian, and X. Chen, “Near-infrared photodynamic and photothermal co-therapy based on organic small molecular dyes,” *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 21, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2023. doi: 10.1186/s12951-023-02111-x.

- [68] T. Dai *et al.*, “Applications of inorganic nanoparticles in the diagnosis and therapy of atherosclerosis,” *Biomaterials Science*, vol. 8, no. 14. Royal Society of Chemistry, pp. 3784–3799, Jul. 21, 2020. doi: 10.1039/d0bm00196a.
- [69] V. Amendola, R. Pilot, M. Frascioni, O. M. Maragò, and M. A. Iatì, “Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review,” *Journal of Physics Condensed Matter*, vol. 29, no. 20. Institute of Physics Publishing, Apr. 20, 2017. doi: 10.1088/1361-648X/aa60f3.
- [70] K. M. Ganesh *et al.*, “Review of Gold Nanoparticles in Surface Plasmon-Coupled Emission Technology: Effect of Shape, Hollow Nanostructures, Nano-Assembly, Metal–Dielectric and Heterometallic Nanohybrids,” *Nanomaterials*, vol. 14, no. 1. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Jan. 01, 2024. doi: 10.3390/nano14010111.
- [71] J. Chen, P. Mela, M. Möller, and M. C. Lensen, “Microcontact deprinting: A technique to pattern gold nanoparticles,” *ACS Nano*, vol. 3, no. 6, pp. 1451–1456, Jun. 2009, doi: 10.1021/nn9002924.
- [72] S. Vijayaram *et al.*, “Applications of Green Synthesized Metal Nanoparticles — a Review,” *Biological Trace Element Research*, vol. 202, no. 1. Springer, pp. 360–386, Jan. 01, 2024. doi: 10.1007/s12011-023-03645-9.
- [73] X. Hu, Y. Zhang, T. Ding, J. Liu, and H. Zhao, “Multifunctional Gold Nanoparticles: A Novel Nanomaterial for Various Medical Applications and Biological Activities,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8. Frontiers Media S.A., Aug. 13, 2020. doi: 10.3389/fbioe.2020.00990.
- [74] Z. Jiang, L. Li, H. Huang, W. He, and W. Ming, “Progress in Laser Ablation and Biological Synthesis Processes: ‘Top-Down’ and ‘Bottom-Up’ Approaches for the Green Synthesis of Au/Ag Nanoparticles,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 23. MDPI, Dec. 01, 2022. doi: 10.3390/ijms232314658.
- [75] B. Uzair *et al.*, “Green and cost-effective synthesis of metallic nanoparticles by algae: Safe methods for translational medicine,” *Bioengineering*, vol. 7,

- no. 4. MDPI AG, pp. 1–22, Dec. 01, 2020. doi: 10.3390/bioengineering7040129.
- [76] B. John Turkevich, P. Cooper Stevenson, and J. Hillier, “A STUDY OF THE NUCLEATION AND GROWTH PROCESSES I N THE SYNTHESIS OF COLLOIDAL GOLD,” Turkevich and Hillier, 1941.
- [77] R. Herizchi, E. Abbasi, M. Milani, and A. Akbarzadeh, “Current methods for synthesis of gold nanoparticles,” *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 44, no. 2, pp. 596–602, Jan. 2016, doi: 10.3109/21691401.2014.971807.
- [78] T. Yonezawa and T. Kunitake, “Practical preparation of anionic mercapto ligand-stabilized gold nanoparticles and their immobilization,” 1999.
- [79] I. Ielo *et al.*, “Synthesis, chemical–physical characterization, and biomedical applications of functional gold nanoparticles: A review,” *Molecules*, vol. 26, no. 19. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/molecules26195823.
- [80] J. Fan, Y. Cheng, and M. Sun, “Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications,” *Chemical Record*, vol. 20, no. 12. John Wiley and Sons Inc, pp. 1474–1504, Dec. 01, 2020. doi: 10.1002/tcr.202000087.
- [81] I. Venditti, “Engineered gold-based nanomaterials: Morphologies and functionalities in biomedical applications. a mini review,” *Bioengineering*, vol. 6, no. 2. MDPI AG, Jun. 01, 2019. doi: 10.3390/bioengineering6020053.
- [82] Y. Xia *et al.*, “Gold nanocages: From synthesis to theranostic applications,” *Acc Chem Res*, vol. 44, no. 10, pp. 914–924, Oct. 2011, doi: 10.1021/ar200061q.
- [83] W. Cai, T. Gao, H. Hong, and J. Sun, “Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology,” 2008. [Online]. Available: <http://www.cdc.gov>
- [84] L. Vigderman, B. P. Khanal, and E. R. Zubarev, “Functional gold nanorods: Synthesis, self-assembly, and sensing applications,” *Advanced Materials*, vol. 24, no. 36. pp. 4811–4841, Sep. 18, 2012. doi: 10.1002/adma.201201690.

-
- [85] K. Xia, L. Zhang, Y. Huang, and Z. Lu, "Preparation of gold nanorods and their applications photothermal therapy," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 15, no. 1. American Scientific Publishers, pp. 63–73, Jan. 01, 2015. doi: 10.1166/jnn.2015.9586.
- [86] D. M. Alshangiti, M. M. Ghobashy, H. A. Alqahtani, T. K. El-Damhougy, and M. Madani, "The energetic and physical concept of gold nanorod-dependent fluorescence in cancer treatment and development of new photonic compounds|review," *RSC Advances*, vol. 13, no. 46. Royal Society of Chemistry, pp. 32223–32265, Nov. 02, 2023. doi: 10.1039/d3ra05487j.
- [87] X. Y. Liu, J. Q. Wang, C. R. Ashby, L. Zeng, Y. F. Fan, and Z. S. Chen, "Gold nanoparticles: synthesis, physiochemical properties and therapeutic applications in cancer," *Drug Discovery Today*, vol. 26, no. 5. Elsevier Ltd, pp. 1284–1292, May 01, 2021. doi: 10.1016/j.drudis.2021.01.030.
- [88] P. Singh, S. Pandit, V. R. S. S. Mokkapati, A. Garg, V. Ravikumar, and I. Mijakovic, "Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 7. MDPI AG, Jul. 06, 2018. doi: 10.3390/ijms19071979.
- [89] D. Chen, S. Ganesh, W. Wang, and M. Amiji, "Plasma protein adsorption and biological identity of systemically administered nanoparticles," *Nanomedicine*, vol. 12, no. 17. Future Medicine Ltd., pp. 2113–2135, Sep. 01, 2017. doi: 10.2217/nnm-2017-0178.
- [90] M. A. Dobrovolskaia *et al.*, "Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles," *Nanomedicine*, vol. 5, no. 2, pp. 106–117, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.nano.2008.08.001.
- [91] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, and L. M. Ensign, "PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 99. Elsevier B.V., pp. 28–51, Apr. 01, 2016. doi: 10.1016/j.addr.2015.09.012.

- [92] D. Shi *et al.*, “To PEGylate or not to PEGylate: Immunological properties of nanomedicine’s most popular component, polyethylene glycol and its alternatives,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 180. Elsevier B.V., Jan. 01, 2022. doi: 10.1016/j.addr.2021.114079.
- [93] * H Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, “Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review a , a a b c,” 2000. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/jconrel
- [94] J. Wu, T. Akaike, K. Hayashida, T. Okamoto, A. Okuyama, and H. Maeda, “Enhanced Vascular Permeability in Solid Tumor Involving Peroxynitrite and Matrix Metalloproteinases,” 2001.
- [95] S. Sindhwani *et al.*, “The entry of nanoparticles into solid tumours,” *Nat Mater*, vol. 19, no. 5, pp. 566–575, May 2020, doi: 10.1038/s41563-019-0566-2.
- [96] Y. Huang, B. Y. S. Kim, C. K. Chan, S. M. Hahn, I. L. Weissman, and W. Jiang, “Improving immune-vascular crosstalk for cancer immunotherapy,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 18, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 195–203, Mar. 01, 2018. doi: 10.1038/nri.2017.145.
- [97] X. Jiang, “Lymphatic vasculature in tumor metastasis and immunobiology,” *Journal of Zhejiang University: Science B*, vol. 21, no. 1. Zhejiang University Press, pp. 3–11, Jan. 01, 2020. doi: 10.1631/jzus.B1800633.
- [98] C. Kong and X. Chen, “Combined Photodynamic and Photothermal Therapy and Immunotherapy for Cancer Treatment: A Review,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 17. Dove Medical Press Ltd, pp. 6427–6446, 2022. doi: 10.2147/IJN.S388996.
- [99] D. Meng, S. Yang, Y. Yang, L. Zhang, and L. Cui, “Synergistic chemotherapy and phototherapy based on red blood cell biomimetic nanomaterials,” *Journal of Controlled Release*, vol. 352. Elsevier B.V., pp. 146–162, Dec. 01, 2022. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.10.019.

- [100] M. Overchuk, R. A. Weersink, B. C. Wilson, and G. Zheng, “Photodynamic and Photothermal Therapies: Synergy Opportunities for Nanomedicine,” *ACS Nano*, vol. 17, no. 9. American Chemical Society, pp. 7979–8003, May 09, 2023. doi: 10.1021/acsnano.3c00891.
- [101] G. Wei, Y. Wang, G. Yang, Y. Wang, and R. Ju, “Recent progress in nanomedicine for enhanced cancer chemotherapy,” *Theranostics*, vol. 11, no. 13. Ivyspring International Publisher, pp. 6370–6392, 2021. doi: 10.7150/thno.57828.
- [102] P. Xu and F. Liang, “Nanomaterial-based tumor photothermal immunotherapy,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 15. Dove Medical Press Ltd, pp. 9159–9180, 2020. doi: 10.2147/IJN.S249252.
- [103] T. Shang, X. Yu, S. Han, and B. Yang, “Nanomedicine-based tumor photothermal therapy synergized immunotherapy,” *Biomaterials Science*, vol. 8, no. 19. Royal Society of Chemistry, pp. 5241–5259, Oct. 07, 2020. doi: 10.1039/d0bm01158d.
- [104] M. Khan *et al.*, “Doxorubicin (Dox) gadolinium–gold-complex: A new way to tune hybrid nanorods as theranostic agent,” *Int J Nanomedicine*, vol. 16, pp. 2219–2236, 2021, doi: 10.2147/IJN.S295809.
- [105] B. Bhargawa *et al.*, “Lysozyme microspheres incorporated with anisotropic gold nanorods for ultrasound activated drug delivery,” *Ultrason Sonochem*, vol. 86, May 2022, doi: 10.1016/j.ultsonch.2022.106016.
- [106] B. Zhou *et al.*, “BSA-bioinspired gold nanorods loaded with immunoadjuvant for the treatment of melanoma by combined photothermal therapy and immunotherapy,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 46, pp. 21640–21647, Dec. 2018, doi: 10.1039/c8nr05323e.
- [107] S. Kumar, A. Mongia, S. Gulati, P. Singh, A. Diwan, and S. Shukla, “Emerging theranostic gold nanostructures to combat cancer: Novel probes for Combinatorial Immunotherapy and Photothermal Therapy,” *Cancer Treatment and Research Communications*, vol. 25. Elsevier Ltd, Jan. 01, 2020. doi: 10.1016/j.ctarc.2020.100258.

- [108] J. Ji, J. Sun, Y. Zhang, and X. Sun, “Cell-Based Metabolomics Approach for Anticipating and Investigating Cytotoxicity of Gold Nanorods,” *Foods*, vol. 11, no. 22, Nov. 2022, doi: 10.3390/foods11223569.
- [109] N. N. Mahmoud, R. Abu-Dahab, L. A. Hamadneh, D. Abuarqoub, H. Jafar, and E. A. Khalil, “Insights into the Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Cellular Death Modality of Phospholipid-Coated Gold Nanorods toward Breast Cancer Cell Lines,” *Mol Pharm*, vol. 16, no. 10, pp. 4149–4164, Apr. 2019, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00470.
- [110] R. Ahijado-Guzmán *et al.*, “Intercellular trafficking of gold nanostars in uveal melanoma cells for plasmonic photothermal therapy,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 3, Mar. 2020, doi: 10.3390/nano10030590.
- [111] X. Du, W. C. Lin, and H. H. Su, “Highly efficient polyethylene glycol-functionalised gold nanorods for photothermal ablation of hepatocellular carcinoma cells,” *IET Nanobiotechnol*, vol. 13, no. 8, pp. 842–849, Oct. 2019, doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5417.
- [112] Á. M. Nunes, P. Falagan-Lotsch, A. Roslind, M. R. Meneghetti, and C. J. Murphy, “Cytotoxicity of mini gold nanorods: intersection with extracellular vesicles,” *Nanoscale Adv*, vol. 5, no. 3, pp. 733–741, Dec. 2022, doi: 10.1039/d2na00694d.
- [113] N. N. Mahmoud, L. M. Al-Kharabsheh, E. A. Khalil, and R. Abu-Dahab, “Interaction of gold nanorods with human dermal fibroblasts: Cytotoxicity, cellular uptake, and wound healing,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 8, Aug. 2019, doi: 10.3390/nano9081131.
- [114] H. A. Andersson, Y. S. Kim, B. E. O’Neill, Z. Z. Shi, and R. E. Serda, “HSP70 promoter-driven activation of gene expression for immunotherapy using gold nanorods and near infrared light,” *Vaccines (Basel)*, vol. 2, no. 2, pp. 216–227, Mar. 2014, doi: 10.3390/vaccines2020216.
- [115] Y. Zhang *et al.*, “Temperature-dependent cell death patterns induced by functionalized gold nanoparticle photothermal therapy in melanoma cells,” *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-26978-1.

- [116] L. F. Freitas *et al.*, “Zinc phthalocyanines attached to gold nanorods for simultaneous hyperthermic and photodynamic therapies against melanoma in vitro,” *J Photochem Photobiol B*, vol. 173, pp. 181–186, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.05.037.
- [117] J. Liu *et al.*, “Gold nanorods with phase-changing polymer corona for remotely near-infrared-triggered drug release,” *Chem Asian J*, vol. 9, no. 1, pp. 275–288, Jan. 2014, doi: 10.1002/asia.201301010.
- [118] N. Wang *et al.*, “Design of DOX-GNRs-PNIPAM@PEG-PLA Micelle With Temperature and Light Dual-Function for Potent Melanoma Therapy,” *Front Chem*, vol. 8, Jan. 2021, doi: 10.3389/fchem.2020.599740.
- [119] F. H. Kao *et al.*, “In Vivo and in Vitro Demonstration of Gold Nanorod Aided Photothermal Presoftening of B16F10 Melanoma for Efficient Chemotherapy Using Doxorubicin Loaded Graphene Oxide,” *ACS Appl Bio Mater*, vol. 2, no. 1, pp. 533–543, Jan. 2019, doi: 10.1021/acsabm.8b00701.
- [120] P. Li *et al.*, “Photo-thermal effect enhances the efficiency of radiotherapy using Arg-Gly-Asp peptides-conjugated gold nanorods that target $\alpha v \beta 3$ in melanoma cancer cells,” *J Nanobiotechnology*, vol. 13, no. 1, Aug. 2015, doi: 10.1186/s12951-015-0113-5.
- [121] R. Marasini, A. Pitchaimani, T. D. T. Nguyen, J. Comer, and S. Aryal, “The influence of polyethylene glycol passivation on the surface plasmon resonance induced photothermal properties of gold nanorods,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 28, pp. 13684–13693, Jul. 2018, doi: 10.1039/c8nr03026j.
- [122] Y. Zhang *et al.*, “Multifunctional CuxS- And DOX-loaded AuNR@mSiO₂ platform for combined melanoma therapy with inspired antitumor immunity,” *Biomater Sci*, vol. 9, no. 11, pp. 4086–4098, Jun. 2021, doi: 10.1039/d1bm00373a.
- [123] Y. P. Jia *et al.*, “Gold Nanorods and Polymer Micelles Mediated Dual TLR Stimulators Delivery System CPG@Au NRs/M-R848 Regulate Macrophages Reprogramming and DC Maturation for Enhanced Photothermal

- Immunotherapy of Melanoma,” *Small Methods*, vol. 7, no. 5, May 2023, doi: 10.1002/smtd.202201087.
- [124] K. Sano *et al.*, “Electrostatically self-assembled gold nanorods with chondroitin sulfate for targeted photothermal therapy for melanoma,” *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 35, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102402.
- [125] S. S. Sankari, R. Urade, C. C. Chiu, and L. F. Wang, “Neuropeptide-Functionalized Gold Nanorod Enhanced Cellular Uptake and Improved In Vitro Photothermal Killing in LRP1-Positive Glioma Cells,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 9, Sep. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14091939.
- [126] A. Agarwal, M. A. MacKey, M. A. El-Sayed, and R. V. Bellamkonda, “Remote triggered release of doxorubicin in tumors by synergistic application of thermosensitive liposomes and gold nanorods,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 6, pp. 4919–4926, Jun. 2011, doi: 10.1021/nn201010q.
- [127] X. Sun *et al.*, “Chelator-free ^{64}Cu -integrated gold nanomaterials for positron emission tomography imaging guided photothermal cancer therapy,” *ACS Nano*, vol. 8, no. 8, pp. 8438–8446, Aug. 2014, doi: 10.1021/nn502950t.
- [128] J. Song *et al.*, “Sequential Drug Release and Enhanced Photothermal and Photoacoustic Effect of Hybrid Reduced Graphene Oxide-Loaded Ultrasmall Gold Nanorod Vesicles for Cancer Therapy,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 9, pp. 9199–9209, Sep. 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b03804.
- [129] W. C. Chien *et al.*, “MCP-1-Functionalized, Core-Shell Gold Nanorod@Iron-Based Metal-Organic Framework (MCP-1/GNR@MIL-100(Fe)) for Photothermal Therapy,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 13, no. 44, pp. 52092–52105, Nov. 2021, doi: 10.1021/acsaami.1c09518.
- [130] B. Seo *et al.*, “Small gold nanorods-loaded hybrid albumin nanoparticles with high photothermal efficacy for tumor ablation,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 179, pp. 340–351, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.03.068.

- [131] B. Newland *et al.*, “Well-Defined Polyethylene Glycol Microscale Hydrogel Blocks Containing Gold Nanorods for Dual Photothermal and Chemotherapeutic Therapy,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 3, Mar. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14030551.
- [132] Y. Zhong *et al.*, “CRGD-directed, NIR-responsive and robust AuNR/PEG-PCL hybrid nanoparticles for targeted chemotherapy of glioblastoma in vivo,” *Journal of Controlled Release*, vol. 195, pp. 63–71, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.07.054.
- [133] C. de la Encarnación *et al.*, “Hybrid core-shell nanoparticles for cell-specific magnetic separation and photothermal heating,” *J Mater Chem B*, vol. 11, no. 24, pp. 5574–5585, Apr. 2023, doi: 10.1039/d3tb00397c.
- [134] A. Chaix *et al.*, “Cell penetrating peptide decorated magnetic porous silicon nanorods for glioblastoma therapy and imaging,” *RSC Adv*, vol. 12, no. 19, pp. 11708–11714, Apr. 2022, doi: 10.1039/d2ra00508e.
- [135] J. M. Lee, H. I. Seo, J. H. Bae, and B. G. Chung, “Hydrogel microfluidic co-culture device for photothermal therapy and cancer migration,” *Electrophoresis*, vol. 38, no. 9–10, pp. 1318–1324, May 2017, doi: 10.1002/elps.201600540.
- [136] T. F. Cabada, C. S. L. de Pablo, A. M. Serrano, F. del P. Guerrero, J. J. S. Olmedo, and M. R. Gomez, “Induction of cell death in a glioblastoma line by hyperthermic therapy based on gold nanorods,” *Int J Nanomedicine*, vol. 7, pp. 1511–1523, 2012, doi: 10.2147/IJN.S28470.
- [137] O. Casanova-Carvajal, A. L. Urbano-Bojorge, M. Ramos, J. J. Serrano-Olmedo, and R. Martínez-Murillo, “Slowdown intracranial glioma progression by optical hyperthermia therapy: Study on a CT-2A mouse astrocytoma model,” *Nanotechnology*, vol. 30, no. 35, Jun. 2019, doi: 10.1088/1361-6528/ab2164.
- [138] D. P. N. Gonçalves, D. M. Park, T. L. Schmidt, and C. Werner, “Modular peptide-functionalized gold nanorods for effective glioblastoma multicellular

- tumor spheroid targeting,” *Biomater Sci*, vol. 6, no. 5, pp. 1140–1146, May 2018, doi: 10.1039/c7bm01107e.
- [139] D. P. N. Gonçalves *et al.*, “Enhanced targeting of invasive glioblastoma cells by peptide-functionalized gold nanorods in hydrogel-based 3D cultures,” *Acta Biomater*, vol. 58, pp. 12–25, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.05.054.
- [140] Y. Zhao *et al.*, “Colloidal Synthesis of Au@Pd Core–Shell Nanorods with Tunable Dimensions and Enhanced Electrocatalytic Activities,” *Top Catal*, vol. 61, no. 9–11, pp. 949–957, Jun. 2018, doi: 10.1007/s11244-018-0956-8.
- [141] L. Xu, X. C. Wu, and J. J. Zhu, “Green preparation and catalytic application of Pd nanoparticles,” *Nanotechnology*, vol. 19, no. 30, Jul. 2008, doi: 10.1088/0957-4484/19/30/305603.
- [142] Y. Liu, J. Li, M. Chen, X. Chen, and N. Zheng, “Palladium-based nanomaterials for cancer imaging and therapy,” *Theranostics*, vol. 10, no. 22, pp. 10057–10077, 2020, doi: 10.7150/thno.45990.
- [143] K. Mavani, “Synthesis of Silver Nanoparticles by using Sodium Borohydride as a Reducing Agent Related papers.” [Online]. Available: www.ijert.org
- [144] L. Vigdeman, B. P. Khanal, and E. R. Zubarev, “Functional gold nanorods: Synthesis, self-assembly, and sensing applications,” *Advanced Materials*, vol. 24, no. 36, pp. 4811–4841, Sep. 18, 2012. doi: 10.1002/adma.201201690.
- [145] S. González-Rubio *et al.*, “Tunable gold nanorod/NAO conjugates for selective drug delivery in mitochondria-targeted cancer therapy,” *Nanoscale*, vol. 14, no. 22, pp. 8028–8040, May 2022, doi: 10.1039/d2nr02353a.
- [146] P. Tomasella *et al.*, “Theranostic nanoplatfoms of thiolated reduced graphene oxide nanosheets and gold nanoparticles,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 10, no. 16, Aug. 2020, doi: 10.3390/app10165529.
- [147] M. V. Berridge, P. M. Herst, and A. S. Tan, “Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction,” *Biotechnology Annual Review*, vol. 11, no. SUPPL, pp. 127–152, Sep. 28, 2005. doi: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7.

- [148] R. Robinson, W. Gerlach, and H. Ghandehari, “Comparative effect of gold nanorods and nanocages for prostate tumor hyperthermia,” *Journal of Controlled Release*, vol. 220, pp. 245–252, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.10.036.
- [149] A. J. Gormley, A. Malugin, A. Ray, R. Robinson, and H. Ghandehari, “Biological evaluation of RGDfK-gold nanorod conjugates for prostate cancer treatment,” *J Drug Target*, vol. 19, no. 10, pp. 915–924, Dec. 2011, doi: 10.3109/1061186X.2011.623701.
- [150] J. Kazi, R. Mukhopadhyay, R. Sen, T. Jha, S. Ganguly, and M. C. Debnath, “Design of 5-fluorouracil (5-FU) loaded, folate conjugated peptide linked nanoparticles, a potential new drug carrier for selective targeting of tumor cells,” *Medchemcomm*, vol. 10, no. 4, pp. 559–572, 2019, doi: 10.1039/c8md00565f.
- [151] V. Letchuman, L. Ampie, A. H. Shah, D. A. Brown, J. D. Heiss, and P. Chittiboina, “Syngeneic murine glioblastoma models: reactionary immune changes and immunotherapy intervention outcomes,” *Neurosurg Focus*, vol. 52, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3171/2021.11.FOCUS21556.
- [152] E. Binello, Z. A. Qadeer, H. P. Kothari, L. Emdad, and I. M. Germano, “Stemness of the CT-2A immunocompetent mouse brain tumor model: Characterization in vitro,” *J Cancer*, vol. 3, no. 1, pp. 166–174, 2012, doi: 10.7150/jca.4149.
- [153] R. Martínez-Murillo and A. Martínez, “Standardization of an orthotopic mouse brain tumor model following transplantation of CT-2A astrocytoma cells,” *Histol Histopathol*, vol. 22, no. 10–12, pp. 1309–1326, Oct. 2007, doi: 10.14670/HH-22.1309.
- [154] A. K. Kraeuter, P. C. Guest, and Z. Sarnyai, “The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1916, Humana Press Inc., 2019, pp. 99–103. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_9.

- [155] H. Takahashi, T. Niidome, A. Nariai, Y. Niidome, and S. Yamada, “Photothermal reshaping of gold nanorods prevents further cell death,” *Nanotechnology*, vol. 17, no. 17, pp. 4431–4435, Aug. 2006, doi: 10.1088/0957-4484/17/17/024.
- [156] A. Foti, L. Cali, S. Petralia, and C. Satriano, “Green Nanoformulations of Polyvinylpyrrolidone-Capped Metal Nanoparticles: A Study at the Hybrid Interface with Biomimetic Cell Membranes and In Vitro Cell Models,” *Nanomaterials*, vol. 13, no. 10, May 2023, doi: 10.3390/nano13101624.
- [157] J. Domingo-Diez *et al.*, “Effectiveness of Gold Nanorods of Different Sizes in Photothermal Therapy to Eliminate Melanoma and Glioblastoma Cells,” *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 17, Sep. 2023, doi: 10.3390/ijms241713306.
- [158] Y. Mi, Q. Liu, P. Li, J. Xu, Q. Yang, and J. Tang, “Targeted gold nanorods combined with low-intensity nsPEFs enhance antimelanoma efficacy in vitro,” *Nanotechnology*, vol. 31, no. 35, Aug. 2020, doi: 10.1088/1361-6528/ab925f.
- [159] Z. Qin and J. C. Bischof, “Thermophysical and biological responses of gold nanoparticle laser heating,” *Chem Soc Rev*, vol. 41, no. 3, pp. 1191–1217, Jan. 2012, doi: 10.1039/c1cs15184c.
- [160] S. Lopez *et al.*, “Magneto-mechanical destruction of cancer-associated fibroblasts using ultra-small iron oxide nanoparticles and low frequency rotating magnetic fields,” *Nanoscale Adv*, vol. 4, no. 2, pp. 421–436, Jan. 2022, doi: 10.1039/d1na00474c.
- [161] V. Connord *et al.*, “Real-time analysis of magnetic hyperthermia experiments on living cells under a confocal microscope,” *Small*, vol. 11, no. 20, pp. 2437–2445, May 2015, doi: 10.1002/sml.201402669.
- [162] A. Chakraborty, G. Roy, F. Fatima, B. Swami, and S. Bhaskar, “Mycobacterium indicus pranii therapy suppresses systemic dissemination of tumor cells in B16F10 murine model of melanoma,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 160, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.biopha.2023.114307.

- [163] E. Stoyanova *et al.*, “Antitumor Properties of Epitope-Specific Engineered Vaccine in Murine Model of Melanoma,” *Mar Drugs*, vol. 20, no. 6, Jun. 2022, doi: 10.3390/md20060392.
- [164] Y. yuan Wang, S. ying Li, S. qian Chen, L. liang Wang, and Z. qiang Han, “Myeloid-derived Suppressor Cells Activate Liver Natural Killer Cells in a Murine Model in Uveal Melanoma,” *Curr Med Sci*, vol. 42, no. 5, pp. 1071–1078, Oct. 2022, doi: 10.1007/s11596-022-2623-3.
- [165] J. Wang *et al.*, “Post-irradiation intratumoral heterogeneity modulates response to immune checkpoint inhibition therapy in a murine melanoma model,” *Neoplasia (United States)*, vol. 36, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.neo.2022.100864.
- [166] T. Numata, S. Kiryu, T. Maeda, C. Egusa, R. Tsuboi, and K. Harada, “A pulmonary metastatic model of murine melanoma assessed by magnetic resonance imaging,” *Experimental Dermatology*, vol. 26, no. 7. Blackwell Publishing Ltd, pp. 619–621, Jul. 01, 2017. doi: 10.1111/exd.13327.
- [167] P. Rinwa, M. Eriksson, I. Cotgreave, and M. Bäckberg, “3R-Refinement principles: elevating rodent well-being and research quality,” *Laboratory Animal Research*, vol. 40, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2024. doi: 10.1186/s42826-024-00198-3.
- [168] Q. Wang *et al.*, “Nestin is required for spindle assembly and cell cycle progression in glioblastoma cells,” *Molecular Cancer Research*, vol. 19, no. 10, Oct. 2021, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0994.
- [169] J. Lier, W. J. Streit, and I. Bechmann, “Beyond activation: Characterizing microglial functional phenotypes,” *Cells*, vol. 10, no. 9. MDPI, Sep. 01, 2021. doi: 10.3390/cells10092236.
- [170] I. C. M. Hoogland, C. Houbolt, D. J. van Westerloo, W. A. van Gool, and D. van de Beek, “Systemic inflammation and microglial activation: Systematic review of animal experiments,” *Journal of Neuroinflammation*, vol. 12, no. 1. BioMed Central Ltd., Jun. 06, 2015. doi: 10.1186/s12974-015-0332-6.

- [171] K. F. Chu and D. E. Dupuy, “Thermal ablation of tumours: Biological mechanisms and advances in therapy,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 14, no. 3, pp. 199–208, Mar. 2014. doi: 10.1038/nrc3672.
- [172] J. B. Vines, J. H. Yoon, N. E. Ryu, D. J. Lim, and H. Park, “Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy,” *Frontiers in Chemistry*, vol. 7, no. APR. Frontiers Media S.A., 2019. doi: 10.3389/fchem.2019.00167.
- [173] A. Woźniak *et al.*, “Size and shape-dependent cytotoxicity profile of gold nanoparticles for biomedical applications,” *J Mater Sci Mater Med*, vol. 28, no. 6, Jun. 2017, doi: 10.1007/s10856-017-5902-y.
- [174] V. Juvé *et al.*, “Size-dependent surface plasmon resonance broadening in nonspherical nanoparticles: Single gold nanorods,” *Nano Lett*, vol. 13, no. 5, pp. 2234–2240, May 2013, doi: 10.1021/nl400777y.
- [175] V. P. Pattani and J. W. Tunnell, “Nanoparticle-mediated photothermal therapy: A comparative study of heating for different particle types,” *Lasers Surg Med*, vol. 44, no. 8, pp. 675–684, Oct. 2012, doi: 10.1002/lsm.22072.
- [176] A. Plan Sangnier *et al.*, “Endosomal Confinement of Gold Nanospheres, Nanorods, and Nanoraspberries Governs Their Photothermal Identity and Is Beneficial for Cancer Cell Therapy,” *Adv Biosyst*, vol. 4, no. 4, Apr. 2020, doi: 10.1002/adbi.201900284.
- [177] W. Mao, Y. J. Son, and H. S. Yoo, “Gold nanospheres and nanorods for anti-cancer therapy: Comparative studies of fabrication, surface-decoration, and anti-cancer treatments,” *Nanoscale*, vol. 12, no. 28. Royal Society of Chemistry, pp. 14996–15020, Jul. 28, 2020. doi: 10.1039/d0nr01690j.
- [178] Z. S. Mbalaha, D. J. S. Birch, and Y. Chen, “Photothermal effects of gold nanorods in aqueous solution and gel media: Influence of particle size and excitation wavelength,” *IET Nanobiotechnol*, vol. 17, no. 2, pp. 103–111, Apr. 2023, doi: 10.1049/nbt2.12110.
- [179] E. D. SoRelle, O. Liba, Z. Hussain, M. Gambhir, and A. De La Zerda, “Biofunctionalization of Large Gold Nanorods Realizes Ultrahigh-Sensitivity

- Optical Imaging Agents,” *Langmuir*, vol. 31, no. 45, pp. 12339–12347, Oct. 2015, doi: 10.1021/acs.langmuir.5b02902.
- [180] C. Ungureanu, G. A. Koning, T. G. Van Leeuwen, and S. Manohar, “The nanobig rod class of gold nanorods: Optimized dimensions for improved in vivo therapeutic and imaging efficacy,” *Nanotechnology*, vol. 24, no. 21, May 2013, doi: 10.1088/0957-4484/24/21/215102.
- [181] C. J. Murphy and N. R. Jana, “Controlling the Aspect Ratio of Inorganic Nanorods and Nanowires.”
- [182] T. Niidome *et al.*, “PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications,” *Journal of Controlled Release*, vol. 114, no. 3, pp. 343–347, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.jconrel.2006.06.017.
- [183] C. Paviolo and P. R. Stoddart, “Gold nanoparticles for modulating neuronal behavior,” *Nanomaterials*, vol. 7, no. 4. MDPI AG, Apr. 24, 2017. doi: 10.3390/nano7040092.
- [184] I. Ozcicek, N. Aysit, C. Cakici, and A. Aydeger, “The effects of surface functionality and size of gold nanoparticles on neuronal toxicity, apoptosis, ROS production and cellular/suborgan biodistribution,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 128, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112308.
- [185] M. Bhamidipati and L. Fabris, “Multiparametric Assessment of Gold Nanoparticle Cytotoxicity in Cancerous and Healthy Cells: The Role of Size, Shape, and Surface Chemistry,” *Bioconjug Chem*, vol. 28, no. 2, pp. 449–460, Feb. 2017, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00605.
- [186] E. Yasun *et al.*, “BSA Modification to Reduce CTAB Induced Nonspecificity and Cytotoxicity of Aptamer-Conjugated Gold Nanorods Graphical Abstract HHS Public Access,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 22, pp. 10240–10248, 2015, doi: 10.1039/b000000x/HHS.
- [187] Y. Zhang, D. Xu, W. Li, J. Yu, and Y. Chen, “Effect of size, shape, and surface modification on cytotoxicity of gold nanoparticles to human HEp-2 and

- Canine MDCK Cells,” *J Nanomater*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/375496.
- [188] Y. Tang *et al.*, “In vitro cytotoxicity of gold nanorods in A549 cells,” *Environ Toxicol Pharmacol*, vol. 39, no. 2, pp. 871–878, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.etap.2015.02.003.
- [189] Y. Zhang *et al.*, “Temperature-dependent cell death patterns induced by functionalized gold nanoparticle photothermal therapy in melanoma cells,” *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-26978-1.
- [190] H. Villuendas, C. Vilches, and R. Quidant, “Influence of Cell Type on the Efficacy of Plasmonic Photothermal Therapy,” *ACS Nanoscience Au*, vol. 2, no. 6, pp. 494–502, Dec. 2022, doi: 10.1021/acsnanoscienceau.2c00023.
- [191] M. H. Safdar, Z. Hussain, M. A. S. Abourehab, H. Hasan, S. Afzal, and H. E. Thu, “New developments and clinical transition of hyaluronic acid-based nanotherapeutics for treatment of cancer: reversing multidrug resistance, tumour-specific targetability and improved anticancer efficacy,” *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, vol. 46, no. 8. Taylor and Francis Ltd., pp. 1967–1980, Nov. 17, 2018. doi: 10.1080/21691401.2017.1397001.
- [192] X. Zeng, H. Wang, Y. Zhang, X. Xu, X. Yuan, and J. Li, “pH-Responsive Hyaluronic Acid Nanoparticles for Enhanced Triple Negative Breast Cancer Therapy,” *Int J Nanomedicine*, vol. 17, pp. 1437–1457, 2022, doi: 10.2147/IJN.S360500.
- [193] R. Edelman, Y. G. Assaraf, I. Levitzky, T. Shahar, and Y. D. Livney, “Hyaluronic acid-serum albumin conjugate-based nanoparticles for targeted cancer therapy,” 2017. [Online]. Available: www.impactjournals.com/oncotarget/
- [194] X. Li *et al.*, “The systematic evaluation of size-dependent toxicity and multi-time biodistribution of gold nanoparticles,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 167, pp. 260–266, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.04.005.

- [195] E. Panzarini, S. Mariano, E. Carata, F. Mura, M. Rossi, and L. Dini, "Intracellular transport of silver and gold nanoparticles and biological responses: An update," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 5. MDPI AG, May 01, 2018. doi: 10.3390/ijms19051305.
- [196] Y. Yang, L. Ren, and H. Wang, "Strategies in the design of gold nanoparticles for intracellular targeting: Opportunities and challenges," *Therapeutic Delivery*, vol. 8, no. 10. Future Medicine Ltd., pp. 879–897, Oct. 01, 2017. doi: 10.4155/tde-2017-0049.
- [197] B. E. White, M. K. White, Z. A. Nima Alsudani, F. Watanabe, A. S. Biris, and N. Ali, "Cellular Uptake of Gold Nanorods in Breast Cancer Cell Lines," *Nanomaterials*, vol. 12, no. 6, Mar. 2022, doi: 10.3390/nano12060937.
- [198] A. M. Elliott and M. A. Al-Hajj, "ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome," *Molecular Cancer Research*, vol. 7, no. 1, pp. 79–87, Jan. 2009, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0235.
- [199] X. Wang, C. Kang, Y. Pan, and R. Jiang, "Photothermal effects of $\text{Yb}^{3+}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ superparamagnetic nanoprobes in the treatment of melanoma," *Int J Nanomedicine*, vol. 14, pp. 4319–4331, 2019, doi: 10.2147/IJN.S203077.
- [200] M. F. Wang *et al.*, "In vivo Realization of Dual Photodynamic and Photothermal Therapy for Melanoma by Mitochondria Targeting Dinuclear Ruthenium Complexes under Civil Infrared Low-power Laser," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 61, no. 38, Sep. 2022, doi: 10.1002/anie.202208721.
- [201] B. K. Jalali, S. S. Shik, L. Karimzadeh-Bardeei, E. Heydari, and M. H. M. Ara, "Photothermal treatment of glioblastoma cells based on plasmonic nanoparticles," *Lasers Med Sci*, vol. 38, no. 1, p. 122, Dec. 2023, doi: 10.1007/s10103-023-03783-5.
- [202] N. Gupta and R. Malviya, "Understanding and advancement in gold nanoparticle targeted photothermal therapy of cancer," *Biochimica et*

- Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, vol. 1875, no. 2. Elsevier B.V., Apr. 01, 2021. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188532.
- [203] Y. Xing, T. Kang, X. Luo, J. Zhu, P. Wu, and C. Cai, “Coral-shaped Au nanostructures for selective apoptosis induction during photothermal therapy,” *J Mater Chem B*, vol. 7, no. 40, pp. 6224–6231, 2019, doi: 10.1039/c9tb01503e.
- [204] V. Groh *et al.*, “Efficient cross-priming of tumor antigen-specific T cells by dendritic cells sensitized with diverse anti-MICA opsonized tumor cells,” 2005. [Online]. Available: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0501953102
- [205] M. Sacht, Y. Y. Liang, and R. Oehler, “The immune response to secondary necrotic cells,” *Apoptosis*, vol. 22, no. 10. Springer New York LLC, pp. 1189–1204, Oct. 01, 2017. doi: 10.1007/s10495-017-1413-z.
- [206] R. Mohammadinejad *et al.*, “Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles,” *Autophagy*, vol. 15, no. 1. Taylor and Francis Inc., pp. 4–33, Jan. 02, 2019. doi: 10.1080/15548627.2018.1509171.
- [207] P. Clerc *et al.*, “Targeted Magnetic Intra-Lysosomal Hyperthermia produces lysosomal reactive oxygen species and causes Caspase-1 dependent cell death,” *Journal of Controlled Release*, vol. 270, pp. 120–134, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.11.050.
- [208] Q. Ban, T. Bai, X. Duan, and J. Kong, “Noninvasive photothermal cancer therapy nanoplatforms: Via integrating nanomaterials and functional polymers,” *Biomaterials Science*, vol. 5, no. 2. Royal Society of Chemistry, pp. 190–210, Feb. 01, 2017. doi: 10.1039/c6bm00600k.
- [209] Y. Zang, Y. Wei, Y. Shi, Q. Chen, and D. Xing, “Chemo/Photoacoustic Dual Therapy with mRNA-Triggered DOX Release and Photoinduced Shockwave Based on a DNA-Gold Nanoplatform,” *Small*, vol. 12, no. 6, pp. 756–769, Feb. 2016, doi: 10.1002/sml.201502857.
- [210] F. Wang, J. Li, C. Chen, H. Qi, K. Huang, and S. Hu, “Preparation and synergistic chemo-photothermal therapy of redox-responsive carboxymethyl

- cellulose/chitosan complex nanoparticles,” *Carbohydr Polym*, vol. 275, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118714.
- [211] D. S. Salem, M. A. Sliem, M. El-Sesy, S. A. Shouman, and Y. Badr, “Improved chemo-photothermal therapy of hepatocellular carcinoma using chitosan-coated gold nanoparticles,” *J Photochem Photobiol B*, vol. 182, pp. 92–99, May 2018, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.03.024.
- [212] M. A. González-Ayón, J. A. Sañudo-Barajas, L. A. Picos-Corrales, and A. Licea-Claverie, “PNVCL-PEGMA nanohydrogels with tailored transition temperature for controlled delivery of 5-fluorouracil,” *J Polym Sci A Polym Chem*, vol. 53, no. 22, pp. 2662–2672, Nov. 2015, doi: 10.1002/pola.27766.
- [213] S. Singh and K. Pal, “Actively targeted gold-polydopamine (PDA@Au) nanocomplex for sequential drug release and combined synergistic chemo-photothermal therapeutic effects,” *Int J Pharm*, vol. 645, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.123374.
- [214] J. Keyvan Rad, Z. Alinejad, S. Khoei, and A. R. Mahdavian, “Controlled Release and Photothermal Behavior of Multipurpose Nanocomposite Particles Containing Encapsulated Gold-Decorated Magnetite and 5-FU in Poly(lactide-co-glycolide),” *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 5, no. 9, pp. 4425–4434, Sep. 2019, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b00790.
- [215] H. Jin, X. Liu, R. Gui, and Z. Wang, “Facile synthesis of gold nanorods/hydrogels core/shell nanospheres for pH and near-infrared-light induced release of 5-fluorouracil and chemo-photothermal therapy,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 128, pp. 498–505, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.049.
- [216] M. A. González-Ayón, A. Rochin-Galaviz, A. Zizumbo-López, and A. Licea-Claverie, “Poly(N-vinylcaprolactam)–Gold Nanorods–5 Fluorouracil Hydrogels: In the Quest of a Material for Topical Therapies against Melanoma Skin Cancer,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15041097.

- [217] S. Yao *et al.*, “ICG/5-Fu coencapsulated temperature stimulus response nanogel drug delivery platform for chemo-photothermal/photodynamic synergetic therapy,” *J Biomater Appl*, vol. 36, no. 4, pp. 565–578, Oct. 2021, doi: 10.1177/0885328220988419.
- [218] E. E. Nichols, A. Richmond, and A. B. Daniels, “Tumor Characteristics, Genetics, Management, and the Risk of Metastasis in Uveal Melanoma,” *Seminars in Ophthalmology*, vol. 31, no. 4. Taylor and Francis Ltd, pp. 304–309, Jul. 03, 2016. doi: 10.3109/08820538.2016.1154175.
- [219] S. S. Banerjee and M. Harris, “Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma,” *Histopathology*, vol. 36, no. 5. pp. 387–402, 2000. doi: 10.1046/j.1365-2559.2000.00894.x.
- [220] S. J. Ohsie, G. P. Sarantopoulos, A. J. Cochran, and S. W. Binder, “Immunohistochemical characteristics of melanoma,” *Journal of Cutaneous Pathology*, vol. 35, no. 5. pp. 433–444, May 2008. doi: 10.1111/j.1600-0560.2007.00891.x.
- [221] S. Pandesh, S. Haghjooy Javanmard, A. Shakeri-Zadeh, and P. Shokrani, “Targeted photothermal therapy of melanoma in C57bl/6 mice using Fe₃O₄@Au core-shell nanoparticles and near-infrared laser,” *J Biomed Phys Eng*, vol. 11, no. 1, pp. 29–38, 2021, doi: 10.31661/jbpe.v0i0.736.
- [222] E. Soratijahromi, S. Mohammadi, R. Dehdari Vais, N. Azarpira, and N. Sattarahmady, “Photothermal/sonodynamic therapy of melanoma tumor by a gold/manganese dioxide nanocomposite: In vitro and in vivo studies,” *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 31, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101846.
- [223] P. B. Balakrishnan *et al.*, “CD137 agonist potentiates the abscopal efficacy of nanoparticle-based photothermal therapy for melanoma,” *Nano Res*, vol. 15, no. 3, pp. 2300–2314, Mar. 2022, doi: 10.1007/s12274-021-3813-1.
- [224] W. Chen, M. Qin, X. Chen, Q. Wang, Z. Zhang, and X. Sun, “Combining photothermal therapy and immunotherapy against melanoma by

- polydopamine-coated Al₂O₃ nanoparticles,” *Theranostics*, vol. 8, no. 8, pp. 2229–2241, 2018, doi: 10.7150/thno.24073.
- [225] J. M. Gudbergsson *et al.*, “Conventional Treatment of Glioblastoma Reveals Persistent CD44+ Subpopulations,” *Mol Neurobiol*, vol. 57, no. 9, pp. 3943–3955, Sep. 2020, doi: 10.1007/s12035-020-02004-2.
- [226] K. L. Mooney *et al.*, “The role of CD44 in glioblastoma multiforme,” *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 34. Churchill Livingstone, pp. 1–5, Dec. 01, 2016. doi: 10.1016/j.jocn.2016.05.012.
- [227] D. V. Brown *et al.*, “Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intratumor heterogeneity,” *PLoS One*, vol. 12, no. 2, Feb. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0172791.
- [228] W. Xu *et al.*, “Hyaluronic Acid-Functionalized Gold Nanorods with pH/NIR Dual-Responsive Drug Release for Synergetic Targeted Photothermal Chemotherapy of Breast Cancer,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 9, no. 42, pp. 36533–36547, Oct. 2017, doi: 10.1021/acsami.7b08700.
- [229] T. Li *et al.*, “A versatile nanoplatform for synergistic chemo-photothermal therapy and multimodal imaging against breast cancer,” *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 17, no. 5, pp. 725–733, May 2020, doi: 10.1080/17425247.2020.1736033.
- [230] V. Sanfilippo, V. C. L. Caruso, L. M. Cucci, R. Inturri, S. Vaccaro, and C. Satriano, “Hyaluronan-metal gold nanoparticle hybrids for targeted tumor cell therapy,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 9, May 2020, doi: 10.3390/ijms21093085.
- [231] X. Liu *et al.*, “Hyaluronic Acid-Modified Micelles Encapsulating Gem-C 12 and HNK for Glioblastoma Multiforme Chemotherapy,” *Mol Pharm*, vol. 15, no. 3, pp. 1203–1214, Mar. 2018, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01035.
- [232] D. Gao, R. C. H. Wong, Y. Wang, X. Guo, Z. Yang, and P. C. Lo, “Shifting the absorption to the near-infrared region and inducing a strong photothermal

- effect by encapsulating zinc(II) phthalocyanine in poly(lactic-co-glycolic acid)-hyaluronic acid nanoparticles,” *Acta Biomater*, vol. 116, pp. 329–343, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.actbio.2020.08.042.
- [233] W. Xu *et al.*, “A dual-targeted hyaluronic acid-gold nanorod platform with triple-stimuli responsiveness for photodynamic/photothermal therapy of breast cancer,” *Acta Biomater*, vol. 83, pp. 400–413, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2018.11.026.
- [234] J. W. Austin, C. Gilchrist, and M. G. Fehlings, “High molecular weight hyaluronan reduces lipopolysaccharide mediated microglial activation,” *J Neurochem*, vol. 122, no. 2, pp. 344–355, Jul. 2012, doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07789.x.
- [235] D. V. Chistyakov, A. A. Astakhova, N. V. Azbukina, S. V. Goriainov, V. V. Chistyakov, and M. G. Sergeeva, “High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influences oxylipins synthesis in course of neuroinflammation,” *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 16, Aug. 2019, doi: 10.3390/ijms20163894.
- [236] S. L. Hayward, C. L. Wilson, and S. Kidambi, “Oncotarget 34158 www.impactjournals.com/oncotarget Hyaluronic acid-conjugated liposome nanoparticles for targeted delivery to CD44 overexpressing glioblastoma cells.” [Online]. Available: www.impactjournals.com/oncotarget/
- [237] R. S. Riley and E. S. Day, “Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment,” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 9, no. 4. Wiley-Blackwell, Jul. 01, 2017. doi: 10.1002/wnan.1449.
- [238] T. Karlsson, R. Henriksson, and H. Hedman, “Induction of apoptosis in resistant glioma cells by synthetic caspase-activation,” 2004.

