



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS S.C.**

DEPARTAMENTO DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“DESARROLLO DE LIPOSOMAS COMO NANOACARREADORES DE  
VERDE DE INDOCIANINA CON POSIBLE APLICACIÓN EN  
TERAPIA FOTODINÁMICA”**

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS DE MATERIALES**

**PRESENTA**

Ing. Clara Lucía Guzmán Barba

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Manuel Román Aguirre

**CO-DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Natanael Cuando Espitia



## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se sintetizaron liposomas por medio de la técnica de película fina, haciendo modificaciones para lograr la encapsulación de nanopartículas de oro (NPs de Au) y el fotosensibilizador verde de indocianina (ICG). Este material se caracterizó y se evaluó para determinar su capacidad como transportador y sus propiedades fotodinámicas al implementar la terapia fotodinámica (TFD). La caracterización empleando la espectroscopía UV-Vis determinó el porcentaje de encapsulamiento del ICG en los liposomas integrando NPs de Au y sin su incorporación, encontrando que, se encapsuló 75% del ICG total en ambos casos. Por otro lado, por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se determinó la morfología de los liposomas, corroborando su correcta síntesis, al igual que la determinación de la encapsulación de las NPs de Au. Las propiedades fotodinámicas de este material se evaluaron en el protozoario ciliado: *Paramecium*. Comparando con variantes de estos materiales, se evaluó la acción fotodinámica al integrarse los materiales en el *Paramecium* e irradiar con láser de 808 nm a 500 mW en un área de 0.1 mm<sup>2</sup>, se determinó este efecto al observar la motilidad del protozoario en un microscopio óptico en diferentes periodos de tiempo de irradiación. Con base en lo anterior se observó que, la muestra de *Paramecium* que presentaba los liposomas cargados con ICG y NPs de Au, presentó un efecto nocivo para la población de *Paramecium* después de 40 minutos de irradiación láser. Para las otras alternativas estudiadas, el efecto nocivo hacia el protozoario fue menor en el mismo tiempo a pesar de usar las mismas condiciones de irradiación.



## CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>11</b>
<b>RECONOCIMIENTOS .....</b>	<b>13</b>
<b>I INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>II ANTECEDENTES.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Fotosensibilizadores .....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Verde de Indocianina .....	21
<b>2.2 Nanopartículas como medio de transporte .....</b>	<b>22</b>
2.2.1 Liposomas .....	23
2.2.2 Nanopartículas de oro .....	24
2.2.2.1 Nanopartículas de oro esféricas.....	25
<b>2.3 Experimentación <i>in vivo</i>.....</b>	<b>26</b>
2.3.1 Paramecium.....	26
2.3.1.1 Morfología.....	27
2.3.1.2 Motilidad.....	27
<b>III JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>IV HIPÓTESIS.....</b>	<b>29</b>
<b>V OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Objetivo general .....</b>	<b>29</b>
<b>5.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>29</b>
<b>VI METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>30</b>
<b>6.1 Materiales .....</b>	<b>30</b>

<b>6.2</b>	<b>Método de Síntesis .....</b>	<b>30</b>
6.2.1	Síntesis de liposomas .....	31
6.2.2	Síntesis de liposomas cargados con ICG .....	31
6.2.3	Síntesis de liposomas cargados con NPs de Au.....	31
6.2.4	Síntesis de liposomas cargados con ICG y NPs de Au .....	33
<b>6.3</b>	<b>Método de Caracterización .....</b>	<b>33</b>
6.3.1	Espectroscopía UV-Vis .....	33
6.3.2	Porcentaje de encapsulamiento .....	33
6.3.3	Microscopía electrónica de transmisión .....	34
<b>6.4</b>	<b>Métodos de evaluación de las propiedades de los materiales .....</b>	<b>34</b>
6.4.1	Morfología del Paramecium. ....	34
6.4.2	Motilidad del Paramecium.....	35
6.4.3	Internalización de materiales cargados con ICG en Paramecium .....	35
6.4.4	Efecto de los materiales en Paramecium sin irradiación láser.....	35
6.4.5	Efecto de los materiales en Paramecium al irradiar con láser. ....	36
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
<b>7.1</b>	<b>Síntesis de Materiales .....</b>	<b>38</b>
<b>7.2</b>	<b>Caracterización .....</b>	<b>38</b>
7.2.1	Espectroscopía UV-Vis .....	38
7.2.2	Porcentaje de encapsulamiento .....	39
7.2.3	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) .....	40
7.2.3.1	Liposomas .....	40
7.2.3.2	Liposomas cargados con ICG.....	40
7.2.3.3	Nanopartículas de Oro .....	41
7.2.3.4	Liposomas cargados con NPs de Au .....	42
7.2.3.5	Liposomas cargados con ICG y NPs de Au .....	43
<b>7.3</b>	<b>Evaluación de las propiedades de los materiales .....</b>	<b>44</b>
7.3.1	Morfología del Paramecium .....	44
7.3.2	Motilidad del Paramecium.....	45
7.3.3	Internalización de materiales cargados con ICG en Paramecium. ....	45
7.3.4	Efecto de los materiales sin irradiar con láser .....	46
7.3.5	Efecto de los materiales al irradiar con láser .....	47

**VIII CONCLUSIONES..... 51**

**IX REFERENCIAS ..... 52**

**X ANEXOS ..... 57**

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA GENERAL DEL PROCESO DE LA TFD. ....	15
FIGURA 2. ESQUEMA GENERAL DE LA ACCIÓN DEL FS PARA QUE SE LLEVE A CABO LA TFD.....	18
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ICG. ....	21
FIGURA 4. ESTRUCTURA INTERNA DEL PARAMECIUM: <b>MC</b> , MEMBRANA CELULAR; <b>CI</b> , CILIOS; <b>VA</b> , VACUOLA ALIMENTICIA; <b>MA</b> , MACRONÚCLEO; <b>MI</b> , MICRONÚCLEO; <b>VC</b> , VACUOLA CONTRÁCTIL; <b>CS</b> , CITOSTOMA; <b>PA</b> , PORO ANAL. ....	27
FIGURA 5. ARREGLO IMPLEMENTADO PARA LA SÍNTESIS DE NPAU. ....	32
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS EMPLEADAS PARA LA IRRADIACIÓN CON LÁSER. ....	36
FIGURA 7. SUSPENCIÓN DEL SEDIMENTO DE LOS MATERIALES SINTETIZADOS. A) ICG. ....	38
FIGURA 8. ESPECTROSCOPÍA UV-VIS DE LP+ICG. ....	39
FIGURA 9. MICROGRAFÍAS DE TEM DE LP SINTETIZADOS EN ESTE TRABAJO. A) LIPOSOMA EN EL CUÁL SE PUEDE OBSERVAR SU NUCLEO Y LA PERIFERIA EN LA QUE SE PUEDE OBSERVAR LAS CAPAS LAMELARES. B) LIPOSOMA CON UN NUCLEO MÁS PEQUEÑO QUE EL B) PERO CON MAYORES CAPAS LAMELARES. ....	40
FIGURA 10 MICROGRAFÍAS DE TEM DE LP+ICG SINTETIZADOS EN ESTE TRABAJO A) EL DIÁMETRO APROXIMADO DEL LIPOSOMA ES DE 60NM. B) LIPOSOMA DE 120NM DE DIÁMETRO APROXIMADAMENTE. EN ESTA ÚLTIMA IMAGEN SE OBSERVA CON CLARIDAD UNA ESTRUCTURA DE VARIAS CAPAS LAMELARES. ....	41
FIGURA 11 MICROGRAFÍAS DE TEM A DIFERENTES MAGNIFICACIONES DE NPs DE AU SINTETIZADAS EN ESTE TRABAJO. ....	42
FIGURA 12 MICROGRAFÍA DE TEM DE LP+NPAU SINTETIZADOS EN ESTE TRABAJO. LAS PARTÍCULAS DE ORO SE DISTINGUEN POR UN COLOR MÁS COLOR OSCURO QUE EL RESTO DE LA MUESTRA Y SE ENCUENTRAN EN AL INTERIOR DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS LIPOSOMAS. .	43
FIGURA 13. ANÁLISIS ELEMENTAL DE LP+NPAU. ....	43
FIGURA 14. MICROGRAFÍA DE TEM DE LP+ICG+NPAU SINTETIZADOS EN ESTE TRABAJO. A) LIPOSOMA ENCAPSULANDO NP DE AU EN EL NÚCLEO. B) LIPOSOMA ENCAPSULANDO NP DE AU EN LAS CAPAS LAMELARES. ....	44
FIGURA 15. ANÁLISIS ELEMENTAL DE LP+ICG+NPAU. ....	44
FIGURA 16. MORFOLOGÍA DE PARAMECIUM OBSERVADA EN MICROSCOPIO ÓPTICO A DIFERENTES AMPLIFICACIONES. ....	45
FIGURA 17. PARAMECIUM OBSERVADO EN MICROSCOPIO ÓPTICO CON EL OBJETIVO DE 100X. A) PARAMECIUM SIN MATERIAL, NO SE OBSERVAN VACUOLAS COLOREADAS. B) PARAMECIUM CON LP+ICG+NPAU, SE SEÑALA EL ÁREA DONDE SE ENCUENTRA EL MATERIAL ENDOCITADO CON EL COLOR VERDE DE LAS PARTÍCULAS. ....	46

FIGURA 18. GRÁFICO COMPARATIVO DE LA POBLACIÓN TOTAL DE PARAMECIUM AL FINALIZAR 15, 30 Y 45 MIN DE CADA MATERIAL AL NO SER EXPUESTO AL LÁSER. ....	47
FIGURA 19. GRÁFICO COMPARATIVO DE LA POBLACIÓN TOTAL DE PARAMECIUM AL FINALIZAR 15, 30 Y 45 MIN DE CADA MATERIAL AL SER EXPUESTO AL LÁSER. ....	48
FIGURA 20. GRÁFICO COMPARATIVO DEL EFECTO DEL MATERIAL ICG, LP+ICG, LP+ICG+NPAU, EN LA POBLACIÓN DE PARAMECIUM AL IRRADIAR CON LÁSER. ....	49
FIGURA 21 TAMAÑO DE PÁRTICULA DE NPS DE AU SINTETIZADAS EN ESTE TRABAJO.....	57
FIGURA 22. REPRESENTACIÓN DEL CONTEO DE PARAMECIUM.....	58
FIGURA 23. MUESTRAS DE PARAMECIUM IMPLEMENTANDO DIFERENTES MATERIALES AL SER EXPUESTOS CON LÁSER DE 808 NM. LOS CIRCULOS ROJOS SEÑALAN PARAMECIUM MUERTO Y LOS CIRCULOS VERDES CON LINEA PUNTEADA PARAMECIUM VIVOS. A) ICG. B) LP+ICG. c) LP+ICG+NPAU.....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. NOMENCLATURA DE LOS MATERIALES. ....	30
TABLA 2. PERIODO DE TIEMPO EN EL QUE SE CUANTIFICÓ LA POBLACIÓN TOTAL DE PARAMECIUM VIVA EN LA MUESTRA DE CADA MATERIAL INCORPORADO.....	36
TABLA 3. POBLACIÓN TOTAL DE PARAMECIUM DURANTE 15, 20 Y 30 MIN AL USAR CADA MATERIAL SIN IRRADIAR LÁSER. ....	46
TABLA 4. POBLACIÓN TOTAL DE PARAMECIUM DURANTE 15, 20 Y 30 MIN AL USAR CADA MATERIAL AL IRRADIAR CON LÁSER. ....	47
TABLA 5. PROMEDIO EN PORCENTAJE Y DESVIACIÓN ESTANDAR DE LA SUPERVIVENCIA DE PARAMECIUM INTERACTUANDO CON LOS MATERIALES ICG, LP+ICG, LP+ICG+NPAU E IRRADIAR CON LÁSER EN DISTINTOS TIEMPOS. ....	50
TABLA 6. DATOS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN USADOS EN EL CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE ENCAPSULAMIENTO .....	57

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
FDA	Food Drug Administration
FS	Fotosensibilizador
NIR	Infrarojo cercano
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
ml	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanómetro
NPs de Au	Nanopartículas de Oro
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica
SPR	Resonancia Plasmónica Superficial
TFD	Terapia Fotodinámica
TFT	Terapia Fototérmica
ICG	Verde de Indocianina

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mis padres**

Carlos Guzmán Castañón y María del Carmen Yolanda Barba Romo, por su apoyo incondicional y todo su amor. Por las enseñanzas y valores que lograron desarrollar en mí en el transcurso de mi vida.

### **A mis hermanos**

Ing. Pablo Daniel Guzmán Barba y el Lic. Carlos Francisco Guzmán Barba, quienes siempre están al pendiente de mis necesidades y han sido cómplices de mis logros.

### **A mi familia**

Abuelitas, tías, tíos, primas y primos, los cuales siempre me están incentivando y motivando a crecer como persona y han sido parte fundamental de mi desarrollo.

### **A mi mejor amiga**

Lic. Daniela Martínez Godínez, quien es y ha sido cómplice de todo lo que he vivido en estos últimos 9 años y que gracias a ella he sido capaz de sobrellevar tiempos difíciles, por escucharme, entenderme, quererme y hacer mucho más feliz mi vida.

### **A mis amistades**

De Aguascalientes, por estar al pendiente de mi bienestar y por su apoyo moral e incondicional.

De Chihuahua, con las cuales hicieron que esta etapa de mi vida fuera menos caótica y por mostrarme Chihuahua.



## RECONOCIMIENTOS

### **A Dr. Manuel Román Aguirre**

Por su gran trabajo como asesor y mentor, quien me motivó a dar lo mejor de mí en la investigación y es parte fundamental de que este trabajo resultara lo mejor posible. . Y por la confianza otorgada al momento de relizar las experimentaciones en su laboratorio.

### **A Dr. Natanael Cuando Espitia**

Por sus asesorías y apoyo durante mi periodo en la maestría con lo cual fue posible culminar con esta etapa.

### **A mis sinodales**

Al Dr. Erasmo Orrantia Borunda, por todas las sugerencias y consejos que hicieron que mi trabajo de investigación mejorara durante su elaboración.

A la Dra. Claudia Ramírez Valdespino, por tener la disposición de resolver mis dudas durante la investigación y por la confianza de permitirme estar en su laboratorio para realizar parte de mi experimentación.

### **Al Concejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)**

Por el apoyo económico otorgado durante mi periodo en la maestría.

### **Al Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV)**

Por las atenciones recibidas por parte de todo el personal docente, administrativo y todos los trabajadores que estuvieron presentes durante mi estancia.

### **Al Centro de Investigación en Óptica A. C. (CIO)**

Por permitirme realizar parte de mi trabajo en sus laboratorios.

### **En memoria del Dr. Juan Bernal Martínez**

Quien fue un gran investigador y promotor de la ciencia, que gracias a él fue posible que yo desarrollara mi lado profesional en el ámbito científico. Y la mente maestra detrás de esta investigación



## I INTRODUCCIÓN

En general, la terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento médico el cual comienza con la administración de un agente fotosensibilizador (FS). Este agente suele acumularse en un órgano o células objetivo para que después se realice la activación del FS mediante luz láser de longitudes de onda específicas y determinadas por la estructura del material usado como FS.<sup>1</sup> Por ejemplo, existen FSs que son activados por luz de 630 nm o bien en el espectro infrarrojo cercano (NIR).<sup>2</sup> La idea básica detrás de la TFD es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) una vez que el agente FS interacciona con luz láser (efecto fotodinámico), esto a diferencia de la terapia fototérmica, la cual usa la excitación con el láser para generar alta temperatura en el FS destruyendo a la célula por efecto térmico. Cuando este efecto ocurre en un órgano o células las cuales presentan el agente FS, el estrés oxidativo que se desencadena puede causar la muerte de estas células.<sup>1</sup> El proceso de este tratamiento se ilustra de manera general en la Figura 1.

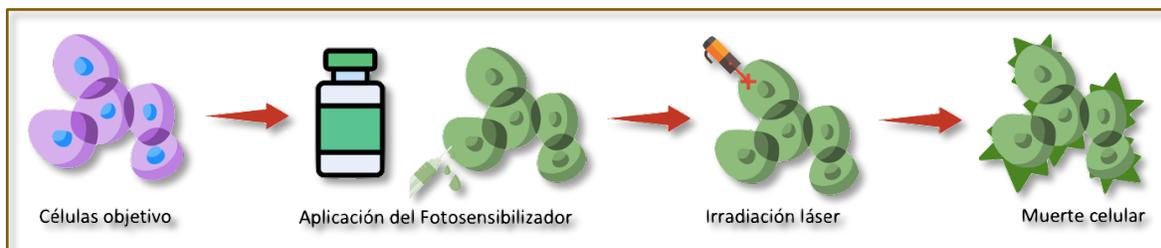


Figura 1. Esquema general del proceso de la TFD.

Desde 1995, la TFD está aprobada por la *Federal Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento paliativo de cánceres obstructivos del esófago, y desde 1998 en el tratamiento exclusivo de lesiones bronquiales en etapas iniciales.<sup>3</sup> Los resultados de los estudios preclínicos y clínicos realizados en todo el mundo durante un periodo de 25 años han demostrado que la TFD es un método de tratamiento eficaz para varios tipos de cáncer.<sup>1</sup>

Un ejemplo de estos estudios está demostrado en el trabajo realizado por Hopper *et al.* y Hur *et al.* En ellos, se comparó el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello, respectivamente, empleando TFD, con la intervención quirúrgica o la quimioterapia. Los resultados demostraron que la TFD proporciona una evolución positiva para el paciente, reduciendo significativamente el tumor sin causar efectos secundarios, esto supone una opción de tratamiento menos costosa y eficaz en comparación con otras opciones terapéuticas.<sup>4,5</sup>

Por otro lado la TFD también se ha implementado en la erradicación de bacterias, esto se analiza en el trabajo de Balhaddad *et al.* dónde se menciona que, “*la TFD antimicrobiana ofrece la ventaja de una reducción bacteriana inmediata tanto de bacterias gram-positivas como gram-negativas, específicamente en el tratamiento de la placa bacteriana*”, en el mismo trabajo se compararon las recientes investigaciones de la integración de nanopartículas al FS para aumentar las propiedades de biocompatibilidad y las ventajas que esto tenía. Concluyendo que, “*existe un alcance prometedor para emplear nanopartículas en la TFD para tratar biopelículas orales patógenas las cuales no se han podido erradicar en su totalidad*”.<sup>6</sup>

Una de las grandes ventajas de emplear la TFD es que, los FSs utilizados son mínimamente perjudiciales en ausencia de luz, por lo que su acumulación en zonas no específicas o no irradiadas no suele presentar una toxicidad sistémica.<sup>7</sup> Otro beneficio, se obtiene cuando se usan longitudes de onda NIR, porque la activación del FS puede darse a una mayor profundidad en los tejidos en comparación con la implementación de la luz visible, de igual manera se sabe que, al emplear estas longitudes de onda en los tejidos no provocan un daño significativo en los tejidos.<sup>8</sup> A pesar de todo esto, actualmente se utilizan pocos FS que estén aprobados por las agencias reguladoras para este tipo de terapia y los que se emplean se activan con luz a longitudes de onda de 630 nm, perdiendo así sus ventajas de penetración y cuidado del tejido.<sup>9</sup>

Como cualquier otra terapia en investigación, se ha vuelto necesario el uso de animales de laboratorio para la experimentación *in vivo*, esto para determinar la eficacia de los procedimientos terapéuticos y de ahí partir al estudio en el ser vivo deseado.<sup>10</sup> En la actualidad, las alternativas a la experimentación animal se utilizan con mayor frecuencia debido a consideraciones éticas, la necesidad de personal especializado, los elevados costos de producción y mantenimiento o los requisitos de los protocolos experimentales.<sup>10</sup>

El *Paramecium* es un organismo unicelular el cual ha evolucionado a lo largo del tiempo hasta convertirse en el organismo modelo de referencia para una amplia gama de estudios. Debido a su manipulabilidad y facilidad de uso en investigación, Denis Lyn ha apodado al *Paramecium* el "ratón blanco" de los Ciliophora.<sup>11,12</sup>

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente proyecto propone el uso de TFD en combinación con nanopartículas metálicas para incrementar los efectos del agente FS al incrementar la temperatura intracelular y aumentar la interacción de la luz láser con el FS. Más aún, se propone usar liposomas como plataforma que permita el transporte tanto de las nanopartículas metálicas como del FS por

medio de la encapsulación y fomentar la internalización en su respectiva aplicación. La selección del agente FS se basa tanto en la disponibilidad comercial, la aprobación de la FDA y su activación por medio de longitudes de onda en el NIR. El presente proyecto busca diseñar y sintetizar una plataforma para TFD que consista en liposomas, nanopartículas metálicas y agente FS que sea relevante para su potencial uso en terapias contra el cáncer, terapias antimicrobinas, o cualquier otro tipo de terapia en la cuál se requiera implementar las propiedades fotodinámicas del FS. Una vez sintetizados y caracterizados, los materiales propuestos serán probados en organismos unicelulares mediante experimentos de irradiación láser. En particular se usará el microorganismo ciliado *Paramecium*. Como se puntualizará en las siguientes secciones, el uso de *Paramecium* como modelo biológico de primera aproximación ofrece ventajas en su manejo, cultivo y observación. En las siguientes secciones se describen los aspectos generales de cada uno de los elementos fundamentales propuestos en este proyecto incluyendo la síntesis y uso de nanopartículas en terapias médicas y las particularidades del microorganismo ciliado *Paramecium*.

## II ANTECEDENTES

### 2.1 Fotosensibilizadores

Uno de los componentes esenciales para que se realice la TFD adecuadamente es la presencia del FS. El trabajo de Comini y Montoya define al FS como "un grupo de compuestos que derivan tanto de fuentes inorgánicas como naturales y exhiben un amplio rango de complejidad química". Del mismo modo, se menciona que "las propiedades particulares que poseen reflejan un interés particular en el campo de las ciencias farmacéuticas debido a su potencial y rango de aplicaciones terapéuticas."<sup>13</sup>

Robinson-Duggon *et al.* describen el comportamiento de los FSs al irradiarse con luz láser a determinada longitud de onda. Este mecanismo se inicia con el FS absorbiendo luz y creando un estado singlete de excitación. A partir de este estado, la molécula puede decaer de nuevo al estado básico emitiendo un fotón, decender por vías no radiativas o puede pasar por el cruce intersistema, dando lugar a la generación de un estado de excitación triplete. Las reacciones más importantes para la TFD son aquellas en las que el fotosensibilizador interactúa con: biomoléculas o con el oxígeno molecular. En el primer caso, denominado mecanismo de tipo I, la reacción se produce principalmente mediante la transferencia de electrones a sustratos relevantes en presencia de ROS generadoras de oxígeno, como aniones radicales superóxido ( $O_2^-$ ), peróxidos de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilo ( $-OH$ ). Por otra parte, en los mecanismos de tipo II, los FSs de estado excitado triplete pueden interactuar directamente con el oxígeno molecular mediante transferencia de energía para generar oxígeno singlete, una forma altamente reactiva del oxígeno. Cualquier de los dos casos, el resultado final provoca la muerte celular.<sup>14</sup> El proceso en términos generales se ilustra en la Figura 2.

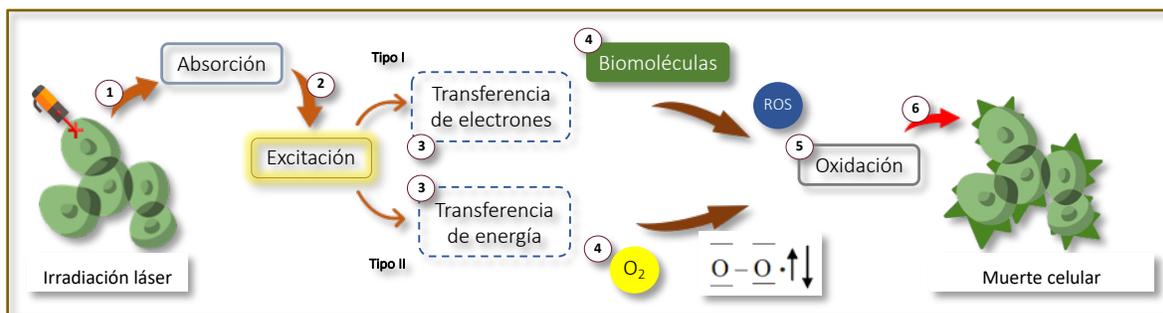


Figura 2. Esquema general de la acción del FS para que se lleve a cabo la TFD.

Por otro lado, como ocurre con cada grupo de fármacos, es posible identificar un conjunto de características y condiciones que describen el FS ideal.<sup>15</sup> Se espera que un FS pueda acumularse con

mayor facilidad en el tejido tumoral y eliminarse rápidamente del tejido sano. Otra propiedad que debe tener un FS idóneo es la anfifilia. Esto significa que, cuando se administra sistémicamente se desplace hasta el tejido objetivo sin “obstáculos”, lo que requiere un cierto nivel de hidrofilia antes de que pueda unirse a las células de interés. Del mismo modo, debe haber una toxicidad mínima en ausencia de luz. Y finalmente, debe considerarse activar el FS con luz en longitudes de onda superiores a 700 nm. Ésta última condición permite atravesar distintos tejidos y elementos que componen al organismo, como por ejemplo, la hemoglobina ya que esta tienen una fuerte absorción de la luz por debajo de 700 nm. En otras palabras, si en el tratamiento se emplea luz a longitudes de onda menores a 700 nm la acción de la terapia estria restringida a los tejidos superficiales.<sup>16</sup>

Una de las principales ventajas de los FSs es que las reacciones fototóxicas se producen con frecuencia sólo en los tejidos patológicos en los que se irradia la luz y está presente el FS, lo que permite su destrucción selectiva. Otra de sus ventajas, con respecto a las terapias contra el cáncer, es que las concentraciones de FS son significativamente mayores en las células cancerosas con respecto a las sanas. Esta biodistribución puede deberse a la tendencia de los FSs a unirse a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), esto es debido a que la finalidad de las LDL es proporcionar a los tejidos el colesterol que necesitan para formar membranas durante la división celular. Cuando las células cancerosas se dividen, presentan un aumento de la captación de lipoproteínas LDL, por lo que esto sirve de "transportador" del FS a los tejidos cancerosos.<sup>15</sup>

En la investigación elaborada por Jori *et al.* se discute el posible uso de sistemas de entrega específicos de lipoproteínas para la administración *in vivo* de fotosensibilizadores tumorales. En particular se plantea el uso de LDL para mejorar la eficacia y la selectividad del etiquetado de tumores. En esta investigación se concluye que las LDL juegan un papel importante en el transporte, en la deposición y retención de sintetizadores hidrofóbicos en tumores. Además se hace mención que, los tejidos con una mayor actividad mitótica revelan una excesiva expresión de receptores de LDL en la superficie celular con afinidad a los FSs.<sup>17</sup>

Actualmente, los FSs aprobados por la FDA para emplearse en la TFD son cinco, estos se describen a continuación:

- Porfímero sódico (Photofrin®) es el fotosensibilizador más utilizado y estudiado. Empleado para el tratamiento de pacientes con ciertos tipos de cáncer de esófago, pulmón, vejiga, cuello uterino. Activación del FS a 630-660 nm.<sup>9</sup>

- Ácido aminolevulínico (Levulan<sup>®</sup>) es un medicamento que se aplica de forma tópica. Se utiliza para tratar la queratosis actínica (AK), una afección de la piel que puede convertirse en cáncer. Activación del FS a 630-660 nm.<sup>9</sup>
- Verteporfina (Visudyne<sup>®</sup>) utilizada para para tratar la degeneración macular asociada con la edad (DMAE). Activación del FS a 680 nm.<sup>18</sup>
- Temoporfina (Foscan<sup>®</sup>) empleado para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello. Activación del FS a 652 nm.<sup>19</sup>
- Aminolevulinato de metilo (Metvix<sup>®</sup>) se utiliza para el tratamiento de las lesiones cutáneas pre-cancerosas en la cara y en el cuero cabelludo (queratosis actínica). Activación del FS a 570-670 nm.<sup>20</sup>

Teniendo en cuenta lo anterior, a pesar de que hay bastantes estudios empleando FS para tratar diferentes enfermedades, los FSs aprobados son pocos, por lo que no se tienen alternativas para este tipo de tratamiento. Actualmente se están investigando nuevos FSs que puedan ser capaces de usarse en la TFD y que sean lo más biocompatible posible.

Los FSs más estudiados como alternativa de los ya aprobados por la FDA se enlistan a continuación:

- Rosa de Bengala, usado en oftalmología para el diagnóstico de enfermedades y contra bacterias gram-positivas. Banda de absorción en el rango 480-550 nm.<sup>2</sup>
- Curcumina, empleado para tratar heridas superficiales. Banda de absorción en el rango 300-500 nm.<sup>2</sup>
- Azul de metileno, eficaz contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, utilizado en tratamiento contra ciertos tipos de cáncer. Banda de absorción en la región 600-700 nm.<sup>2</sup>
- Verde de indocianina, diagnóstico por imagen como agente de contraste, para tratamiento de tumores y eficaz contra bacterias gram-positivas. Banda de absorción en el rango 700-800 nm.<sup>2</sup>

La selección del FS va a depender del objetivo del tratamiento y la región o condiciones en las que se va a aplicar el tratamiento, esto debido a que bandas de absorciones mayores conllevan a una mayor penetración en tejido facilitando la activación del FS en regiones profundas.

### 2.1.1 Verde de Indocianina

Uno de los FSs que se ha investigado como alternativa para emplearse en la TFD es el Verde de Indocianina (ICG). El ICG es un colorante anfifílico de tricarbocianina (Figura 3), utilizado en el campo biomédico desde hace casi seis décadas con diferentes fines.

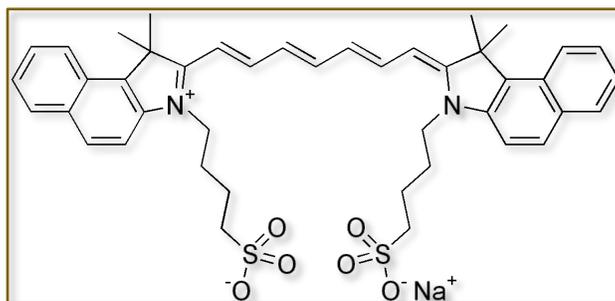


Figura 3. Representación esquemática de la estructura química del ICG.

En el artículo de revisión de Jarmo *et al.* se hace una recopilación dando a conocer distintas aplicaciones relacionadas con el ICG, como son: cirugías en hígado, cirugías en retina, tratamiento del cáncer, en laparoscopia, entre otras. Analizando lo anterior, la aplicación del ICG en su mayoría ha sido en el área clínica para tratar o ayudar a diagnosticar diferentes tipos de enfermedades.<sup>21</sup>

El ICG presenta las siguientes características: al estar en el organismo tiene una vida media de 2 a 4 minutos.<sup>22</sup> Su peso molecular es de 774,96 gramos mol<sup>-1</sup>, presenta una baja incidencia de reacciones adversas y exhibe una fuerte banda de absorción alrededor de 800 nm.<sup>23</sup> Estas características permiten su fácil incorporación y minimizan la interferencia de la autofluorescencia de los tejidos, lo que lo hace adecuado para su uso en bioimagen. Además de ser un colorante autorizado por la FDA como agente de contraste de fluorescencia y se ha investigado tanto en la TFD como en la terapia fototérmica (TFT)<sup>23</sup>, eso hace que su introducción en nuevas aplicaciones clínicas se simplifique enormemente.<sup>22</sup>

Con respecto a su uso en distintas terapias, la investigación que se ha llevado a cabo en el trabajo de Chen *et al.* se demuestra que la inyección de ICG en un tumor, puede utilizarse en TFT y terapias fotoinmunológicas asistidas por láser, esto aplicado a un modelo de rata. Los primeros ensayos clínicos de este tipo de terapia han sido realizados con éxito por el mismo grupo.<sup>24</sup>

Por otro lado, en el trabajo de Shinoda *et al.* se emplea el ICG conjugado con fosfolípidos, formulados liposómicamente y se evaluó su acción fotodinámica en regiones tumorales. En esta investigación se

obtuvieron resultados satisfactorios concluyendo que la reacción fotodinámica por parte del ICG en conjunto con liposomas representa un enfoque prometedor para la terapia no invasiva del cáncer.<sup>25</sup>

Es preciso señalar que, al igual que ocurre con cualquier otro fármaco, un tratamiento adecuado requiere una comprensión clara de la relación entre la dosis y el efecto. Es posible mejorar la capacidad del ICG para dirigirse a los tejidos deseados combinando químicamente el ICG con un ligando específico. Por otra parte, una alternativa reciente que se está investigando es la síntesis de partículas que puedan encapsular fármacos, protegiéndolos de la degradación y llevándolos al tejidos deseado.<sup>26</sup>

## 2.2 Nanopartículas como medio de transporte

Hablando de la posibilidad de encapsulación, como ya se ha mencionado, en los últimos años se han desarrollado numerosos sistemas de administración de fármacos empleando nanoestructuras como el óxido de grafeno, los nanotubos de carbono y las nanopartículas poliméricas para potenciar los efectos de distintos fármacos.<sup>26</sup>

Existen múltiples tipos de nanopartículas (NPs) que pueden ser utilizadas como medio de transporte, algunas de ellas con propiedades específicas que son muy prometedoras como sistema de administración de FSs y como componentes adicionales para la TFD. Tienen la capacidad de superar gran parte de las limitaciones de los FSs convencionales y ampliar las posibilidades de uso de la TFD.<sup>27</sup> Una característica destacable de las NPs es su superficie modificable, esto es útil para proporcionar un suministro dirigido, ya que, mediante modificaciones en las NPs, pueden adherirse a la superficie moléculas pequeñas, péptidos o anticuerpos. Además, el tamaño de las NPs puede variar entre 1 y 100 nm. Es bien sabido que las moléculas pequeñas de este tamaño pueden dirigirse específicamente a la vasculatura tumoral al tener una permeabilidad y una retención mejoradas (EPR).<sup>27</sup>

Según la revisión de Bertrand *et al.*, la razón principal de la EPR es que, en los tejidos normales, el líquido extracelular fluye constantemente hacia los vasos linfáticos. Esto permite la continua renovación del líquido intersticial y el retorno a la circulación de las sustancias extraídas. La falta de función linfática en los tumores da lugar a una captación mínima de líquido intersticial, provocando que los coloides no puedan depender de las fuerzas convectivas para volver a la circulación. Mientras que las moléculas menores de 4 nm pueden volver al torrente sanguíneo y ser reabsorbidas, las moléculas que superan este tamaño, como las NPs, dificultan su difusión. Como resultado, las NPs

que han entrado en el espacio que rodea al tumor, no se eliminan por completo y se acumulan en el espacio intersticial del tumor.<sup>28</sup>

Como ya se ha mencionado, el tamaño de las partículas es fundamental para diseñar un transporte selectivo de las sustancias. Sin embargo, la morfología de las NPs también es de relevancia. Se pueden obtener altos niveles de carga de fármacos diseñando el tamaño y la morfología de las NPs.<sup>29</sup> Es posible controlar el proceso de síntesis con el fin de obtener desde estructuras lineales hasta esferas, en función de los materiales y las aplicaciones de las NPs. Por otro lado, la liberación de los fármacos, puede lograrse mediante difusión, cambios de pH, utilizando luz o calor, entre otros métodos. Además, las NPs pueden cumplir una doble función al administrar medicamentos en la TFD y actuar como FS al mismo tiempo.<sup>27</sup>

La revisión de Rizvi *et al.* sobre las aplicaciones de los sistemas de NPs a la tecnología de administración de fármacos, expone las características que tienen estos materiales que los hacen capaces de transportar fármacos, basándose en investigaciones anteriores. Esta revisión llega a la siguiente conclusión: *“Mediante la manipulación del tamaño, las características de la superficie y el material utilizado, las nanopartículas pueden convertirse en sistemas inteligentes, los cuales pueden contener agentes terapéuticos y/o de imagen, además de tener propiedades de sigilo. Estos sistemas pueden suministrar fármacos a tejidos específicos y proporcionar una terapia de liberación controlada.”*<sup>29</sup>

### **2.2.1 Liposomas**

Las vesículas artificiales conocidas como liposomas están hechas de una bicapa de fosfolípidos. Li *et al.* describe su diseño de la siguiente manera: *“Las cabezas hidrófilas de las moléculas lipídicas pueden dividirse en tres tipos en función de su carga: catiónica, neutra y aniónica. En primer lugar, la cabeza catiónica ayuda a atraer el liposoma a la membrana celular cargada negativamente, aumentando así la tasa de incorporación celular. Por otro lado, la cabeza catiónica que contiene aminos primarias y secundarias puede escapar del lisosoma a través del “efecto de esponja de protones” para evitar que el lisosoma degrade el agente terapéutico.”*<sup>30</sup> Según la composición del liposoma, la carga superficial, el tamaño y el método de preparación, sus propiedades pueden diferir significativamente.<sup>31</sup>

Debido a su biocompatibilidad y a su capacidad para administrar agentes terapéuticos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, los liposomas han sido objeto de numerosas investigaciones como portadores de fármacos.<sup>31</sup> La administración oral o sistémica es más habitual, y los medicamentos tienden a acumularse pasivamente en las zonas afectadas. Durante el tratamiento del cáncer, se

acumulan en la zona circundante del tumor a causa del efecto EPR.<sup>31</sup> Este es el caso del estudio de Rashighi *et al.*, en el que se encapsulan Doxorubicina en liposomas y se lleva a cabo la liberación del fármaco por medio de la luz de manera efectiva, aumentando la eficiencia del medicamento en el lugar deseado en comparación con la administración libre de la Doxorubicina.<sup>32</sup>

La estabilidad de los liposomas se estudió en el trabajo de Lajunen *et al.* en donde se desarrollaron liposomas con ICG activados por luz. Este estudio se centró en las interacciones de la bicapa lipídica, el FS y el recubrimiento de PEG en la estabilidad del liposoma. Los resultados mostraron que la localización del agente activador de la luz altera significativamente la estructura de los liposomas por lo que importante tener en cuenta estos aspectos en el diseño de sistemas de administración de fármacos.<sup>33</sup>

Por otro lado, cuando se funcionalizan correctamente, los liposomas son capaces de formar una barrera alrededor de su contenido que es resistente tanto a los radicales libres como al tracto gastrointestinal de los seres humanos. Como resultado, el contenido liposomal queda protegido de la oxidación y la degradación. Este "escudo" o "barrera protectora" de los fosfolípidos permanece intacto hasta que el contenido liposomal llega a la glándula, el órgano o el sistema donde se pretende utilizar.<sup>34</sup>

A continuación se enlistan las principales ventajas de los liposomas como vehículos de administración de fármacos, tal y como se menciona en la revisión de Li *et al.*<sup>30</sup>

- Aumentan la solubilidad de los fármacos hidrófobos.
- Incrementa la estabilidad de los fármacos *in vivo*.
- Prolongan el tiempo de liberación de los agentes terapéuticos.
- Reducen la absorción de fármacos por los tejidos normales y reducen en cierta medida los efectos secundarios de los agentes terapéuticos.
- Mediante la modificación funcional de los liposomas se aumenta la sensibilidad de los fármacos a la localización de enfermedades, la liberación de fármacos en puntos fijos y la fagocitosis celular.

### **2.2.2 Nanopartículas de oro**

Las Nanopartículas de oro (NPs de Au) han evolucionado hasta convertirse en un sistema versátil para la administración de fármacos. Debido a su gran afinidad con las biomoléculas, estas NPs pueden emplearse para transportar péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Se ha investigado que estas NPs deben ser lo bastante pequeñas para atravesar las barreras fisiológicas o penetrar en las células

objetivo y lo suficientemente grandes para transportar una cantidad adecuada de compuestos terapéuticos al lugar de acción.<sup>35</sup> Por otro lado, las NPs de Au son capaces de generar suficiente calor para elevar la temperatura local y provocar daño a las células que las contengan cuando se exponen a la luz NIR específica.

### 2.2.2.1 Nanopartículas de oro esféricas

Sztandera Krzysztof *et al.* describen la resonancia plasmónica superficial (SPR) y la consideran una propiedad física fundamental de las NPs de Au. Explican que este fenómeno particular se produce cuando la frecuencia de oscilación de los electrones libres en la superficie de la nanopartícula coincide con la frecuencia de la luz entrante, creando una banda plasmónica. Como resultado, aparece un campo magnético en la superficie de las NPs de Au, lo que permite aumentar las propiedades ópticas.<sup>35</sup>

Las propiedades de las NPs de Au varían en función de su tamaño y geometría. El pico de absorbancia SPR aparece en el rango de 500-550 nm para las NPs de Au esféricas con tamaños inferiores a 60 nm, lo que contribuye a su color rojo.<sup>35</sup> Esta característica se ha utilizado en TFT debido a que la luz convertida en calor daña permanentemente el tejido circundante.<sup>36</sup>

El tamaño de las NPs de Au esféricas puede modificarse ajustando el pH, la temperatura de reacción y el tiempo necesario para la síntesis. Es vital tener en cuenta el tamaño de la partícula, no sólo por las propiedades ópticas, sino también para tratar de evitar una toxicidad elevada. Se ha informado que, en particular, las NPs de Au esféricas con diámetros de 1-2 nm pueden ser más dañinas, ya que pueden formar un enlace irreversible con los biopolímeros celulares. Sin embargo, en numerosos estudios en los que se utilizaron cultivos celulares no se encontró ninguna toxicidad perceptible de las partículas coloidales de entre 3 nm y 100 nm siempre que el límite superior de la dosis fuera alrededor de 10 partículas por mililitro.<sup>37</sup>

Las NPs de Au se han implementado en tratamientos contra el cáncer, este es el caso del trabajo de Fathy *et al.* en donde desarrollan NPs de Au recubiertas de quitosano, estas nanopartículas transportan doxorrubicina y se evalúan en células tumorales. Los resultados de esta investigación señalan que, con este material se puede proporcionar una solución combinada para el tratamiento del cáncer, con la que puede administrar doxorrubicina de forma eficaz a las células tumorales y potenciar la actividad de radiosensibilización, reduciendo así la dosis necesaria para la radioterapia convencional.<sup>38</sup>

En el caso de la TFD, cuando los FSs se incorporan a NPs de Au han mostrado un gran potencial ya que se integran la TFD y la TFT, por ello, la terapia combinada se ha considerado una estrategia prometedora para mejorar la eficacia terapéutica y minimizar los efectos secundarios.<sup>39</sup>

Se evaluó la efectividad de las NPs de Au como transporte de FS en el trabajo de Cheng *et al.* En este trabajo, emplearon NPs de Au esféricas PEGiladas, esto para mejorar la solubilidad y la acumulación tumoral de Silicon phthalocyanine 4 (Pc 4) el cuál es un FS hidrofóbico. Estos estudios concluyen que se reduce considerablemente el tiempo de acumulación máxima del fármaco en el tumor a 2 horas en comparación con la aplicación del FS libre, el cual tardaba 2 días aproximadamente.<sup>40</sup>

En el trabajo de Zhang *et al.* emplean NPs de Au recubiertas de quitosano para el transporte de curcumina, evaluando su efecto fotodinámico hacia *S. aureus* y *E. coli*. Los resultados obtenidos de esta investigación señalan que bajo condiciones de luz, este material puede producir una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno y calor para matar *S. aureus* y *E. coli*, esto en comparación con la TFD empleando curcumina libre. De igual manera la estabilidad de este fotosensibilizador al integrarlo a NPs de Au evitó el rápido deterioro de las propiedades fotoquímicas de la curcumina.<sup>41</sup>

### 2.3 Experimentación *in vivo*

La TFD ya se ha utilizado en procedimientos terapéuticos con seres humanos, de forma similar a los liposomas, las NPs de Au y el ICG utilizados de forma independiente. A pesar de esto, no debe descartarse el proceso experimental, ya sea *in vivo* o *in vitro*, para determinar si los materiales sintetizados tienen o no la funcionalidad deseada.

De acuerdo con el trabajo de Romero-Fernández *et al.*, definen como animal de laboratorio a “*todo aquel ser vivo no humano, vertebrado o invertebrado, usado para la experimentación y otros fines científicos, su uso se basa, fundamentalmente, en la analogía fisiológica con la especie humana.*” Los primates no humanos, prosimios, gatos, perros, reptiles, anfibios, ovejas, cerdos, cabras, peces, insectos y roedores son algunos de los animales utilizados en investigación. Cuando no hay otra opción y el objetivo de la experimentación es obtener un bien mayor, utilizar animales está justificado desde el punto de vista ético.<sup>10,42</sup>

#### 2.3.1 *Paramecium*

El *Paramecium* es un organismo unicelular del género Phylum Ciliophora, de vida libre, se alimenta de bacterias y es fácil de cultivar en el laboratorio.<sup>11,12</sup>

### 2.3.1.1 Morfología

El tamaño de las especies de *Paramecium* se encuentra en el rango de 50  $\mu\text{m}$  a 300  $\mu\text{m}$  de largo, siendo notables a simple vista. Es una célula asimétrica (Figura 4), en ella se realizan numerosos procesos fisiológicos como la fagocitosis, la digestión, la secreción, la excreción, la contracción y la osmorregulación, estos mecanismos son llevados a cabo por distintas estructuras presentes en él, como lo son las vacuolas contráctiles en forma de estrella, las vacuolas alimenticias que se forman en el fondo del citostoma, el poro anal y dos tipos de núcleos: macronúcleos y micronúcleos, todo esto encapsulado en una membrana celular revestida por cilios móviles, estos controlan el movimiento celular, la actividad alimenticia, así como la capacidad de respuesta frente a las parejas sexuales y el medio ambiente.<sup>11,12</sup> La superficie de los *Paramecium* se encuentra recubierta por una envoltura glicoprotéica, denominada glucocálix, una capa activa que protege a la membrana y que está formada por glucoproteínas, glucolípidos y polisacáridos.<sup>43</sup>

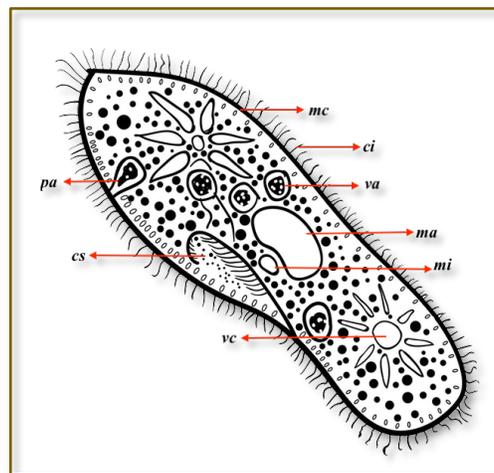


Figura 4. Estructura interna del *Paramecium*: **mc**, membrana celular; **ci**, cilios; **va**, vacuola alimenticia; **ma**, macronúcleo; **mi**, micronúcleo; **vc**, vacuola contráctil; **cs**, citostoma; **pa**, poro anal.

### 2.3.1.2 Motilidad

Ya se ha mencionado que los cilios son los responsables de la movilidad del *Paramecium*. No obstante, nadan de un lado a otro mientras cambian aleatoriamente de dirección.<sup>44</sup> Su nado se ha estudiado en la investigación de Eckert. donde señala que el *Paramecium* responde a campos eléctricos externos, provocando que nade hacia el cátodo; éste mecanismo es conocido como galvanotaxis.<sup>45</sup> Riedel-Kruse *et al.* desarrollaron lo que denominan "*biotic games*" utilizando esta particularidad. En este caso, utilizan un campo magnético para controlar la dirección de nado del *Paramecium* con el fin de alcanzar el objetivo de los juegos programados.<sup>44</sup>

El uso de protozoos, como lo es el *Paramecium*, puede emplearse, en ciertos casos, como paso previo a la experimentación animal o cultivos celulares, esto considerando el tipo de experimento y los resultados que se quisiera analizar. Esto debido a que la experimentación empleando animales o líneas celulares conllevan a procesos más elaborados y regularizados en comparación con el manejo del *Paramecium* ya que no es necesario un conocimiento riguroso para su mantenimiento ni son necesarias instalaciones con ambientes controlados o el uso de equipo especializado.<sup>46</sup>

El *Paramecium* fue el microorganismo empleado inicialmente para poder analizar los efectos tóxicos de ciertas sustancias. En 1987, Oscar Raab inició una investigación sobre la toxicidad de la acridina para el *Paramecium*. Raab comprobó que la toxicidad aparente de concentraciones bajas de acridina variaba significativamente de un día para otro; sin embargo, pronto observó que la toxicidad dependía de la intensidad de la luz solar en el laboratorio. A partir de este trabajo, se comenzaron las investigaciones para poder explicar la acción que presentaban ciertos colorantes y sustancias al ser expuestos a la luz.<sup>47</sup>

Considerando lo anterior, emplear este protozoario, puede ser una alternativa para descartar materiales (ya sea FS o acarreadores) que no den una respuesta fotodinámica adecuada, considerando el tamaño del *Paramecium* se podrían observar los efectos que se produce en el a través de un microscopio óptico. En el caso de la TFD, estas características aportarían un punto de partida para determinar si los materiales sintetizados funcionan adecuadamente realizando el efecto fotodinámico y a partir de ello continuar con su estudio en medios más complejos.

### III JUSTIFICACIÓN

Se sabe, por investigaciones previas, que la TFD es un recurso importante para el tratamiento contra el cáncer, infecciones bacterianas, entre otras.<sup>3,6</sup> Teniendo como ventajas principales una invasión mínima al paciente, es un tratamiento local, de bajo costo y con efectos secundarios poco severos en comparación a otras terapias. El ICG ha sido utilizado para estos fines y se han dado resultados satisfactorios. Además es un material aprobado por la FDA en otros tratamientos. Sin embargo, para la TFD es necesario buscar la manera de transportar este material, para lograr que el FS llegue y actúe en las células o bacterias que se requiera tratar, incrementando así su especificidad y funcionamiento. Lo anterior se podría lograr con liposomas y NPs de Au, los cuales han sido probados como transportadores de distintas drogas en el organismo.

El presente trabajo de investigación busca dar nuevas alternativas para el tratamiento con TFD, usando acarreadores como liposomas y NPs de Au, capaces de transportar el ICG para su aplicación, y con esto tener una alternativa de tratamiento en diferentes padecimientos.

### IV HIPÓTESIS

Los liposomas cargados con NPs de Au pueden ser acarreadores adecuados del ICG, para promover la acción fotodinámica al interactuar con láser a longitud de onda de 808 nm.

### V OBJETIVOS

#### 5.1 Objetivo general

---

Desarrollar liposomas cargados con NPs de Au, con los cuales se pueda encapsular o acarrear el fotosensibilizador ICG y estudiar sus efectos fotodinámicos en un microorganismo.

#### 5.2 Objetivos específicos

- 
- I. Sintetizar liposomas cargados con ICG, NPs de Au y el conjunto de ambos.
  - II. Analizar el porcentaje de encapsulamiento de ICG en cada caso.
  - III. Caracterizar la morfología de los materiales por microscopía electrónica de transmisión (TEM).
  - IV. Estudiar la motilidad del *Paramecium* expuestos a los materiales sintetizados antes y después de irradiación con láser de longitud de onda de 808 nm.

## VI METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En esta sección se describen los materiales usados al igual que la síntesis que se llevó a cabo para cada material, seguido de la metodología para la caracterización de estos materiales y finalizando con los métodos empleados para la evaluación de sus propiedades.

### 6.1 Materiales

- Verde de Indocianina, polvo para solución inyectable, Diagnostic Green.
- Lecitina purificada.
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH) 99.9 %, J.T.Baker.
- Cloruro de Metileno (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 99.8%, J.T.Baker.
- Fosfato de Sodio Monobásico (H<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>P), Sigma-Aldrich.
- Hidróxido de Sodio (NaOH), Sigma-Aldrich.
- Citrato de Sodio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) ≥99%, FG, Sigma-Aldrich.
- Ácido Cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) 99.99%, Sigma-Aldrich.
- Molibdato de Amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) 99.98%, Sigma-Aldrich.
- Agua desionizada (H<sub>2</sub>O), J.T.Baker.
- *Paramecium*, cultivado en laboratorio.

### 6.2 Método de Síntesis

Se preparó una solución de ICG y se sintetizaron un total de 5 materiales, los cuales para fines prácticos se nombraron de la siguiente manera:

*Tabla 1. Nomenclatura de los materiales.*

MATERIAL	NOMBRE
Liposomas	<b>Lp</b>
Solución de Verde de Indocianina	<b>ICG</b>
Solución coloidal de Nanopartículas de Oro	<b>NpAu</b>
Liposomas cargados con Verde de Indocianina	<b>Lp+ICG</b>
Liposomas cargados con Nanopartículas de Oro	<b>Lp+NpAu</b>
Liposomas cargados con Verde de Indocianina y Nanopartículas de Oro	<b>Lp+ICG+NpAu</b>

### **6.2.1 Síntesis de liposomas**

Para su elaboración se usó el procedimiento de hidratación de película fina planteado por Hao *et al.*<sup>48</sup>, con ciertas modificaciones. Para ello se realizó una solución amortiguadora con un pH de 7.4. Esta solución se elaboró de la siguiente manera:

Se pesó 1.38 g de  $H_2NaO_4P$ , se le adicionó a 900 ml de agua desionizada, esto se agitó constantemente y se le añadió NaOH 0.1 M hasta que se obtuvo como resultado final un pH de 7.4. Teniendo esto, se realizó la síntesis de los liposomas descrita a continuación:

Se pesó en un cristizador 0.06 g de lecitina, enseguida se disolvió en 10 ml de  $CH_2Cl_2$ , después de disolverse, se le integró 5 ml de  $CH_3OH$  y se agitó por 5 min. La solución resultante se secó en un horno (SHEL LAB, SVAC) a 24°C por 24 h al vacío. Transcurrido este tiempo se resuspendió la película fina con 15 ml de la solución amortiguadora y se mezcló hasta verse lo más homogénea posible. Por último, se sonicó con una sonda (Fisher Scientific, FB120) a 120 s en pulsos de 10 s con una amplitud de 55%, esto se realizó en baño con hielo para favorecer el autoensamble de liposomas de tamaño nanométrico. La suspensión resultante se centrifugó a 12 800 rpm, por 10 min, a una temperatura de 4°C, esto para obtener la mayor concentración de liposomas los cuales se sedimentan a estas condiciones. Finalmente, se separó el sobrenadante del material sedimentado y ambos se almacenaron en refrigeración a 4°C.

### **6.2.2 Síntesis de liposomas cargados con ICG**

Para la síntesis de Lp+ICG, se realizó una solución de ICG con una concentración de 40 mg/L. Para ello, se pesó 0.004 g de ICG y se aforó a 100 ml con solución amortiguadora pH 7.4 (esta solución es empleada a la misma concentración para todas las síntesis y pruebas que usen ICG). A partir de esto, los pasos para iniciar la elaboración de Lp+ICG fueron los mismos que la síntesis anterior, sin embargo, para resuspender la película fina, se usaron 15 ml de la solución de ICG. Después de esto, se sonicó y se centrifugó a las mismas condiciones mencionadas en el apartado 6.2.1.

### **6.2.3 Síntesis de liposomas cargados con NPs de Au**

Para esta síntesis, se elaboraron NPs de Au con simetría esférica. La técnica empleada para realizarlas fue la de Turkevich *et al.*, la cual se lleva a cabo a partir de la reducción de  $HAuCl_4$  por medio de la adición de  $Na_3C_6H_5O_7$ .<sup>49</sup> Se le realizaron cambios en cantidades y concentraciones para obtener un tamaño de partícula entre 20 y 25 nm, ya que a este tamaño son lo suficientemente pequeñas para poder encapsularse en liposomas y presentan mínima toxicidad en el organismo. De igual manera, se

implementó el arreglo que se muestra en la Figura 5, con el cual fue posible regular la temperatura de reacción mientras estaba en constante agitación.

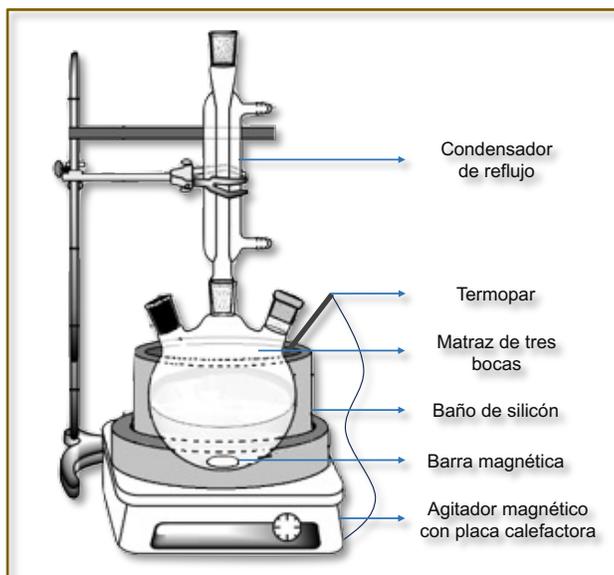


Figura 5. Arreglo implementado para la síntesis de NpAu.

Para comenzar con la síntesis de NpAu, se elaboraron las siguientes soluciones:  $\text{HAuCl}_4$  a una concentración de 10 mM y  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  a una concentración de 1% *m/m*. Teniendo lo anterior, se inició con la síntesis de NpAu la cual se describe a continuación:

En un matraz de tres bocas, se añadió 9.3 ml de agua desionizada, se comenzó a agitar constantemente con ayuda de la barra magnética y se calentó la solución a 100°C. Al estar a esta temperatura, se le incorporaron 0.7 ml de  $\text{HAuCl}_4$ , se dejó reaccionar por 3 min a las mismas condiciones y transcurrido este tiempo se disminuyó la temperatura a 65°C. Al llegar a este punto, se le agregó 0.7 ml de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  y se dejó reaccionar por 15 min sin dejar de agitar. En el transcurso de este periodo, se observó el cambio de coloración de la mezcla, tornándose a un color “rubí”. Finalizando los 15 min, se dejó a temperatura ambiente por 5 min.

Teniendo la síntesis anterior, se inició con la preparación de Lp+NpAu. Para esto, se pesó 0.1 g de lecitina en un cristallizador y se mezcló con 1 ml de NpAu. Se llevó a calentamiento a 60°C y estando a esta temperatura se sonicó con una sonda (Fisher Scientific, FB120) por 2 min a una amplitud de 55%. Se dejó secar en un horno (SHEL LAB, SVAC) a 40°C al vacío por 4 h. Después de esto, se realizó el mismo procedimiento que la síntesis 6.2.1 desde la incorporación de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  hasta finalizar la síntesis.

#### **6.2.4 Síntesis de liposomas cargados con ICG y NPs de Au**

Esta síntesis se realizó partiendo de la metodología descrita en el apartado 0, no obstante, lo único que se modificó fue al momento de resuspender la película fina, ya que para ello se empleó 15 ml de la solución ICG en vez de la solución amortiguadora.

### **6.3 Método de Caracterización**

En este apartado se describen las técnicas implementadas para la caracterización de los materiales que se usaron en la experimentación, las cuales fueron: espectroscopía UV-Vis, determinación del porcentaje de encapsulamiento y microscopía electrónica de transmisión. En esta última técnica se incluye el análisis elemental de algunos materiales.

#### **6.3.1 Espectroscopía UV-Vis**

Se implementó la espectroscopía UV-Vis para determinar la longitud de onda a la cual absorbe el ICG cuando está interactuando con los liposomas, gracias a esto, se eligió el láser ideal que activa las propiedades fotodinámicas del FS. Para esto, se tomó 2 ml de Lp+ICG sin centrifugar y se llevó a cabo el análisis en el UV-Vis (Perkinelmer, Lambda 10) entre 300-1100 nm y como blanco de muestra la solución amortiguadora.

Esta técnica también se usó para obtener la absorbancia del sobrenadante de las muestras de Lp+ICG y Lp+ICG+Au, a la longitud de onda que absorbe el ICG. Las absorbancias de los materiales analizados, se usaron para determinar el porcentaje de encapsulamiento descrito en el apartado siguiente.

#### **6.3.2 Porcentaje de encapsulamiento**

Para evaluar la capacidad de encapsulamiento de los liposomas se implementó inicialmente la Ley de Lambert-Beer. Esta ley establece una relación entre la concentración de una sustancia disuelta en una solución y la absorción de luz que ocurre cuando la luz atraviesa esa solución.<sup>50</sup> La relación se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$A = \varepsilon * c * d \quad (1)$$

Donde:

**A:** Absorbancia de la solución.

**$\varepsilon$ :** Coeficiente de absorción molar.

**c:** Concentración de la sustancia en mol/L.

**d:** Longitud del camino óptico

Con esta ecuación se determinó la concentración del sobrenadante de Lp+ICG y Lp+ICG+NpAu. En esta metodología sólo se analizaron estos materiales, debido a que son los que contienen el agente fotoactivo. Teniendo estas concentraciones, se usó la ecuación 2 y se calculó el porcentaje de encapsulamiento en dichos materiales.

$$\%E = \frac{\text{Concentración inicial} - \text{Concentración del sobrenadante}}{\text{Concentración inicial}} \times 100 \quad (2)$$

### 6.3.3 Microscopía electrónica de transmisión

La caracterización de la morfología de los materiales sintetizados se realizó en el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) Hitachi 7700. En este mismo equipo se hizo el análisis elemental para las muestras Lp+NpAu y Lp+ICG+NpAu.

Para poder observar los liposomas en el TEM, se tiñó la muestra con molibdato de amonio al 2%, para ello, se tomó 1 ml de la muestra a analizar y se colocó en una probeta, se aforó a 25 ml con solución amortiguadora y se mezcló por 3 min. Teniendo lo anterior, se colocó 1 ml de la muestra diluida y 1 ml de la solución de molibdato de amonio. Finalmente, con ayuda de un capilar, se colocó una gota de la mezcla elaborada sobre una rejilla para TEM y se secó en un horno a 24°C al vacío por 2 min.

En el caso de la muestra de NpAu, la preparación se llevó a cabo de la siguiente manera: Inicialmente se sonicó la muestra a una amplitud de 55% por 3 min, esto para dispersar las partículas, para finalizar, se usó un capilar para colocar la muestra sonicada sobre una rejilla para TEM, esta rejilla se llevó a un horno a 24°C al vacío por 2 min.

## 6.4 Métodos de evaluación de las propiedades de los materiales

Para poder evaluar las propiedades de los materiales sintetizados se analizó lo siguiente: la morfología del *Paramecium*, la motilidad del *Paramecium*, la internalización de los materiales en el *Paramecium* y el efecto de los materiales en *Paramecium* sin irradiar láser e irradiando láser. La metodología de estos apartados se describen a continuación.

### 6.4.1 Morfología del *Paramecium*.

Para observar la morfología del *Paramecium* se centrifugó 2 ml de la solución que contiene al protozoo a 3500 rpm por 5 min, esto para sedimentar la mayor cantidad de elementos ajenos al *Paramecium* como su alimento y sus desechos. Una vez centrifugada, se dejó reposar por 10 min para tener una mayor concentración de *Paramecium* en la superficie. Se tomó 10 µl del sobrenadante

y se colocó en un portaobjetos. Esta muestra se observó en un microscopio óptico (OLYMPUS, BX53) empleando el objetivo de 10x y 40x.

#### **6.4.2 Motilidad del *Paramecium***

Por medio de un microscopio óptico se visualizó la motilidad que suele tener el *Paramecium* en condiciones normales. Para esto se tomó una muestra de 15  $\mu$ l de *Paramecium* previamente centrifugada, en las condiciones que se menciona en el punto 6.4.1, se colocó en un portaobjetos y se observó al microscopio usando el objetivo de 10x.

#### **6.4.3 Internalización de materiales cargados con ICG en *Paramecium***

La internalización de los materiales en el *Paramecium* fue posible observarse mediante técnicas de microscopía óptica. Para ello, se tomaron 15  $\mu$ l de cultivo de *Paramecium* previamente resuspendido y se colocó en un portaobjetos. A esta muestra se le añadió 15  $\mu$ l de Lp+ICG+NpAu, teniendo esto se mezcló cuidadosamente y se dejó reposar por 5 min. Transcurrido este tiempo, se observó en un microscopio óptico a 40x y 100x, se visualizó la coloración al interior de un *Paramecium*. La aparición de color verde en el interior de los *Paramecium* confirmó la internalización del material en el protozoario.

#### **6.4.4 Efecto de los materiales en *Paramecium* sin irradiación láser**

Para evaluar la acción de los materiales en el *Paramecium* sin estar interactuando con luz láser se realizó lo siguiente:

Con ayuda de una micropipeta, se tomó 1  $\mu$ l de muestra de *Paramecium* y se colocó en un portaobjetos. Se observó en un microscopio óptico a 10x y se cuantificó la cantidad de *Paramecium* presente en la muestra empleando el programa ImageJ. Si la muestra presentaba una población total de  $20 \pm 2$  *Paramecium* se prosiguió con los siguientes pasos. De no tener esta cantidad se repitió este proceso.

Teniendo la muestra, se le añadió 20  $\mu$ l de solución amortiguadora y enseguida se incorporó 20  $\mu$ l de material a analizar y se mezcló por 5 min. Se establecieron períodos de tiempo (Tabla 2), en los cuales, al finalizar cada uno de éstos, se cuantificó en el microscopio óptico la cantidad de *Paramecium* vivos en la muestra. Esta metodología se realizó 4 veces por material, se sacó un promedio de los resultados obtenidos y se reportaron en porcentajes, empleando la ecuación 3.

Tabla 2. Periodo de tiempo en el que se cuantificó la población total de Paramecium viva en la muestra de cada material incorporado.

MATERIAL	TIEMPO (min)					
S/Material	15	20	25	30	35	40
ICG						
NpAu						
Lp						
Lp+ICG						
Lp+NpAu						
Lp+ICG+NpAu						

$$\% \text{ de Paramecium vivos} = \frac{\text{Promedio de población viva de cada tiempo}}{\text{Promedio de población total}} * 100 \quad (3)$$

Para cada material se calculó la desviación estándar, teniendo en cuenta los resultados obtenidos porcentualmente de cada período de tiempo.

#### 6.4.5 Efecto de los materiales en Paramecium al irradiar con láser.

Para esta etapa de la metodología experimental se implementó luz láser de 808 nm a una potencia de 500 mW. Este láser se colocó a 3 cm de distancia de la muestra y se ajustó el área de irradiación a 0.1 mm<sup>2</sup> (Figura 6).

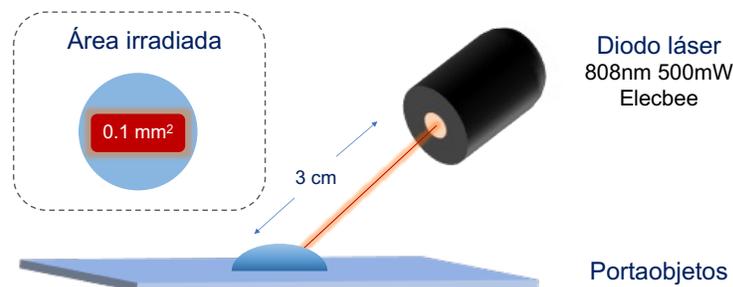


Figura 6. Representación de las características empleadas para la irradiación con láser.

Los efectos del láser en los protozoarios se evaluaron empleando la metodología mencionada en el apartado 6.4.4 sin embargo, al finalizar los 5 min de mezcla se añadieron 40  $\mu$ l de solución amortiguadora, se agitó cuidadosamente y se posicionó para empezar la irradiación con el láser. Se emplearon los mismos tiempos descritos en la Tabla 2 para la observación en el microscopio óptico, se contó la población total de *Paramecium* viva al finalizar cada período. Esta metodología se realizó 4 veces por material, se sacó un promedio de los resultados obtenidos, se reportaron en porcentajes y se calculó la desviación estándar, esto se calculó de la misma manera como se menciona en el apartado 6.4.4.

## VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Síntesis de Materiales

Se sintetizaron liposomas encapsulando ICG, Np de Au y la combinación de ambos materiales. De igual manera se sintetizaron liposomas los cuales no tenían encapsulado ningún material. De cada material se obtuvo un total de 15 ml de muestra y con esto 1 ml de concentrado de liposomas, el cual se determinó a través del sedimento al momento de centrifugar las muestras. Las suspensiones de estos materiales concentrados se muestran en la Figura 7.

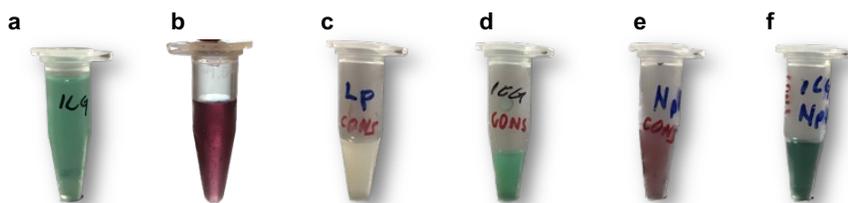


Figura 7. Suspensión del sedimento de los materiales sintetizados. a) ICG.

b) NpAu c) Lp. d) Lp+ICG. e) Lp+NpAu. f) Lp+ICG+NpAu.

### 7.2 Caracterización

#### 7.2.1 Espectroscopía UV-Vis

Al analizar la muestra Lp+ICG por medio de Espectroscopía UV-Vis se determinó la absorbancia. El valor máximo de absorbancia fue observado a 800 nm como se muestra en la Figura 8, esto indica que el ICG en conjunto con los liposomas puede activar sus propiedades fotosensibles aplicando láser de longitud de onda de 808 nm. En medicina, el uso de esta longitud de onda tiene varias ventajas debido a su capacidad para penetrar tejidos biológicos sin causar daño significativo, esto en comparación con longitudes de onda más cortas, como la luz visible y la luz ultravioleta.<sup>16</sup>

Los resultados obtenidos de las absorbancias de los sobrenadantes de los materiales Lp+ICG y Lp+ICG+NpAu a la longitud de onda de 800 nm se muestran a continuación:

Absorbancia de Lp+ICG: 3.49544

Absorbancia de Lp+ICG+NpAu: 3.44869

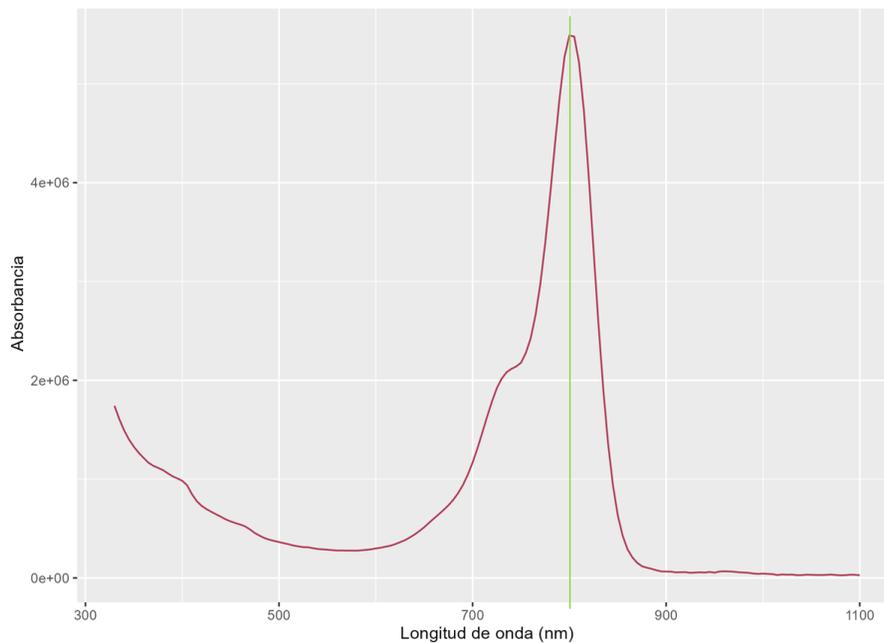


Figura 8. Espectroscopía UV-Vis de Lp+ICG

### 7.2.2 Porcentaje de encapsulamiento

Con la fórmula de la Ley de Beer se calcularon las concentraciones de las muestras Lp+ICG y Lp+ICG+NpAu. Los resultados se muestran a continuación:

Concentración inicial de la solución de ICG:  $5.16 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

Concentración del sobrenadante de Lp+ICG:  $1.29 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

Concentración del sobrenadante de Lp+ICG+NpAu:  $1.27 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

Teniendo esto, se calculó el porcentaje de encapsulamiento dando los resultados siguientes:

$$\%E \text{ de } Lp + ICG \sim 75\%$$

$$\%E \text{ de } Lp + ICG + NpAu \sim 75\%$$

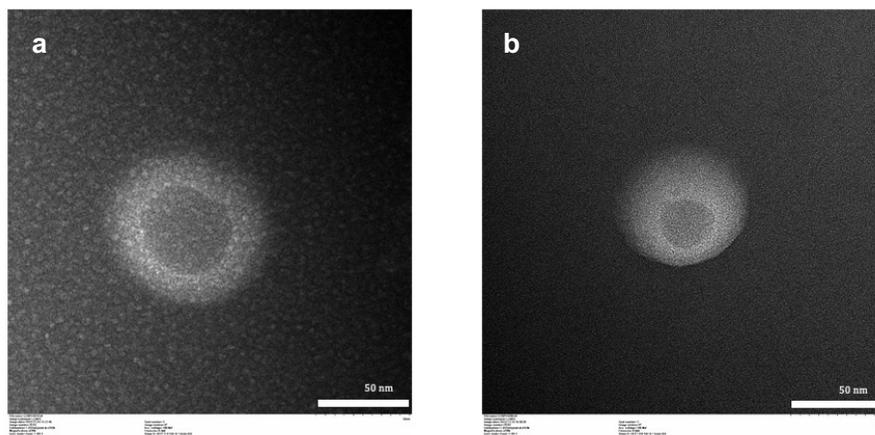
Estos valores representan, en porcentaje, la cantidad de ICG que se encapsuló en los liposomas. Estudios en dónde se reportó la encapsulación del ICG en liposomas implementado la técnica de película fina y sonicación, informaron de eficiencias de encapsulación liposomal entre el 64% y el 75%.<sup>51-53</sup> En este caso, se obtuvo un porcentaje de encapsulamiento aproximado del 75% tanto en la muestra Lp+ICG y en Lp+ICG+NpAu. Estos resultados están en el rango mayor de lo reportado, por

lo que la técnica de síntesis se respalda ya que se obtiene la mayor parte de concentración de ICG en los liposomas.

### 7.2.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

#### 7.2.3.1 *Liposomas*

La morfología de los liposomas se puede observar en las micrografías que se muestran en la Figura 9. En estas imágenes se observa que los liposomas se suelen formar de manera esférica. Esta característica es importante ya que el material encapsulado es envuelto de una manera regular. Se puede observar como se distingue el centro del liposoma de su periferia, la cuál se observa en tonos más claros que el núcleo. Estos liposomas tienen un diámetro aproximado de 70 nm, según lo observado en las micrografías, lo que los hace ideales para aplicaciones médicas ya que se sabe que los liposomas que presentan tamaños entre 40-200 nm tienen una mayor retención en sangre, y por tanto una mayor acumulación en los tejidos tumorales, que los que están fuera de este margen.<sup>54</sup>

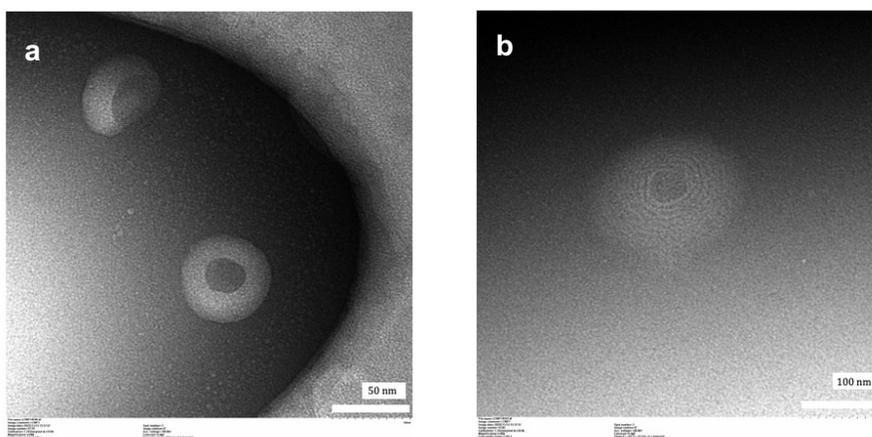


*Figura 9. Micrografías de TEM de Lp sintetizados en este trabajo. a) Liposoma en el cuál se puede observar su núcleo y la periferia en la que se puede observar las capas lamelares. b) Liposoma con un núcleo más pequeño que el b) pero con mayores capas lamelares*

#### 7.2.3.2 *Liposomas cargados con ICG*

En la Figura 10 es posible apreciar la morfología de los liposomas al igual que su tamaño aproximado. Su forma es esférica, lo que nos indica que al integrarse con el ICG no afecta en su síntesis ya que es similar a los liposomas a los cuales no se le encapsula ningún tipo de material. Esto se compara con otras investigaciones en dónde los liposomas de fosfolípidos se han utilizado ampliamente para encapsular ICG.<sup>52,55</sup> En la Figura 10a se muestra la formación de liposomas con sus partes características mencionadas en apartados anteriores. Los liposomas mostrados presentan un tamaño

aproximado de 60 nm y sus multicapas son más compactas a comparación de la micrografía de la Figura 10b. En esta última figura puede observarse con claridad cada una de las capas concéntricas de uno de los liposomas sintetizados. Estas capas son identificables en la Figura 10b como estructuras circulares que alternan en colores oscuros y claros. Es importante notar que la estructura de multicapas del liposoma mostrado en la Figura 10b no modifica su estructura esférica y permite que este liposoma en particular tenga un diámetro de 120 nm. Cualquiera de las dos morfologías es útil para la aplicación en esta investigación.



*Figura 10 Micrografías de TEM de Lp+ICG sintetizados en este trabajo a) El diámetro aproximado del liposoma es de 60nm. b) Liposoma de 120nm de diámetro aproximadamente. En esta última imagen se observa con claridad una estructura de varias capas lamelares.*

### 7.2.3.3 Nanopartículas de Oro

Fue posible observar las NPs de Au sintetizadas, como se muestra en la Figura 11, en donde se aprecia, a diferentes escalas, la morfología de estas partículas. Estas partículas presentan una morfología con bordes redondeados y suaves, con un diámetro de aproximadamente 20 nm, lo que de acuerdo con la bibliografía <sup>49</sup> era el tamaño esperado con la metodología seguida. Esta morfología ayuda a que se pueda integrar mejor a la célula y de igual manera provoca una menor deformación en los liposomas los cuales estarán encapsulando estas partículas. <sup>35</sup>

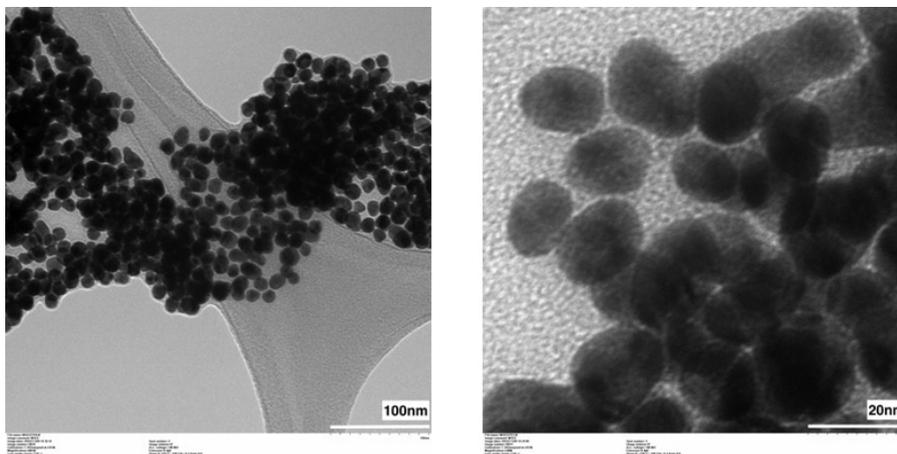


Figura 11 Micrografías de TEM a diferentes magnificaciones de NPs de Au sintetizadas en este trabajo.

#### 7.2.3.4 Liposomas cargados con NPs de Au

Se observó el encapsulamiento de NPs de Au en liposomas como se muestra en la Figura 12. Es posible observar la estructura multicapa característica de los liposomas y las NPs de Au en su interior. Existen investigaciones en las que se incorporan las NPs de Au en liposomas pero implementando otro tipo de síntesis, en dónde de igual manera la es posible observar como las NPs están presentes en el liposoma.<sup>56</sup> El tamaño de los liposomas no superó los 120 nm, sin embargo, al encapsular las NPs se tenía cierta asimetría en comparación con los liposomas previamente analizados. Esta morfología no es relevante en esta investigación ya que lo importante fue que se encapsularan las NPs de Au en los liposomas.

El análisis elemental que se realizó en esta muestra fue puntual, empleando lo observado en la Figura 12a, los resultados se muestra en la Figura 13. En este análisis se muestra la presencia de Oro, por lo que podemos determinar que, lo que contiene el liposoma son las NPs de Au que se deseaban encapsular.

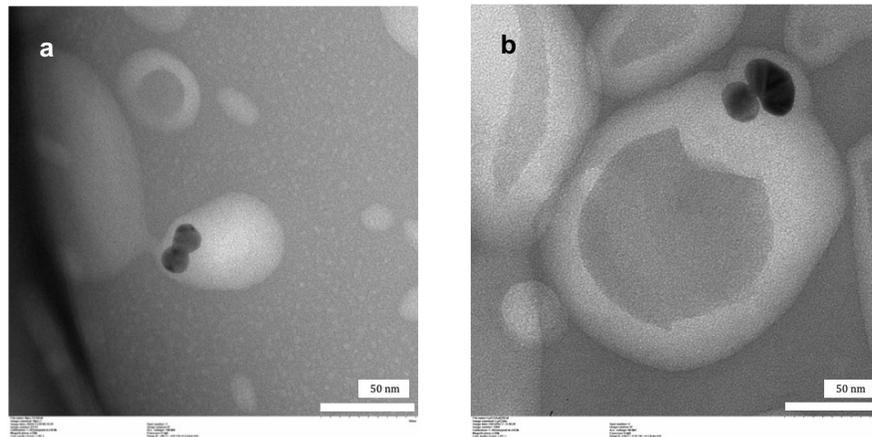


Figura 12 Micrografía de TEM de Lp+NpAu sintetizados en este trabajo. Las partículas de oro se distinguen por un color más oscuro que el resto de la muestra y se encuentran en el interior de las estructuras de los liposomas.

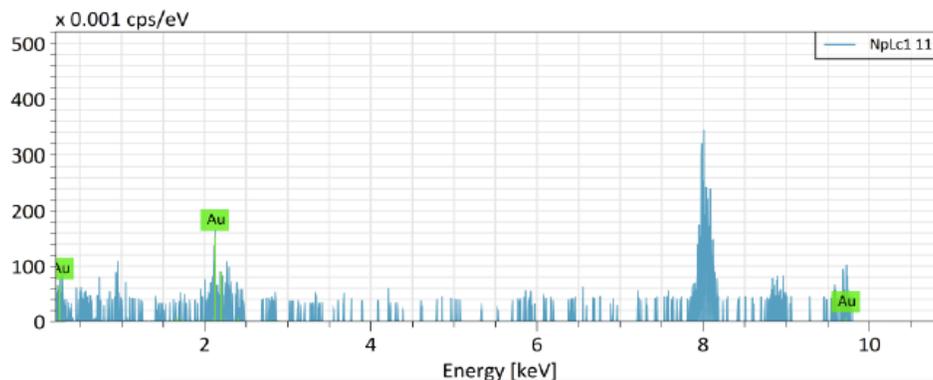


Figura 13. Análisis elemental de Lp+NpAu.

### 7.2.3.5 Liposomas cargados con ICG y NPs de Au

La capacidad de los liposomas de encapsular materiales tanto en las capas lamelares como en el núcleo se muestra en las micrografías de la Figura 14. En la Figura 14a se logra apreciar que la NP de Au se encuentra en el núcleo del liposoma. Por otro lado, en la Figura 14b la NP de Au está presente en las capas lamelares del liposoma.<sup>30</sup>

Al igual que la muestra de Lp+NpAu, el análisis elemental de Lp+ICG+NpAu fue puntual. Este análisis elemental se muestra en la Figura 15 empleando lo observado en la Figura 14b. Los resultados mostrados en la Figura 15 confirman la presencia de las NPs de Au en las muestras sintetizadas de Lp+ICG+NpAu.

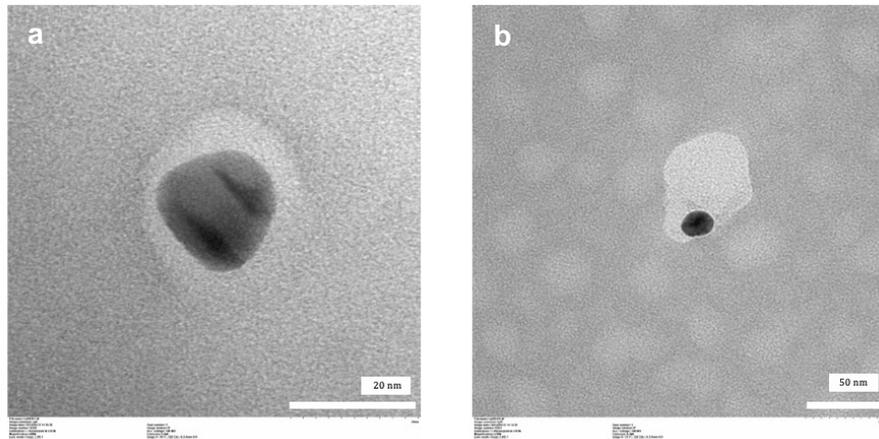


Figura 14. Micrografía de TEM de Lp+ICG+NpAu sintetizados en este trabajo. a) Liposoma encapsulando NP de Au en el núcleo. b) Liposoma encapsulando NP de Au en las capas lamelares.

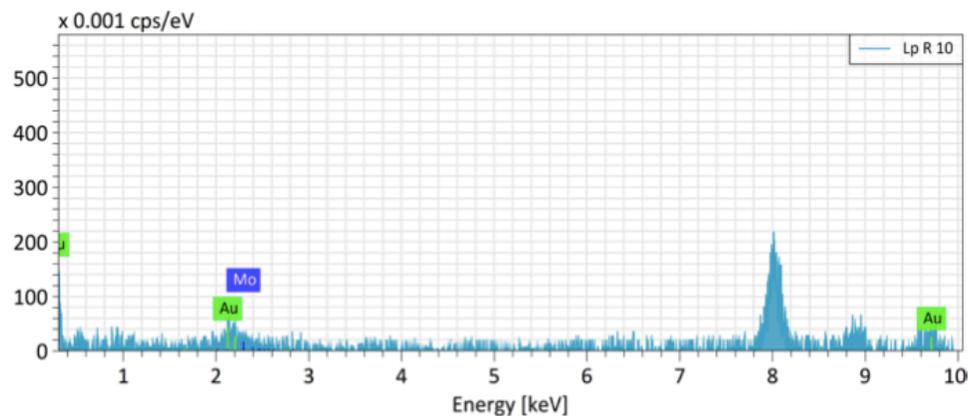


Figura 15. Análisis elemental de Lp+ICG+NpAu.

## 7.3 Evaluación de las propiedades de los materiales

### 7.3.1 Morfología del Paramecium

La morfología del *Paramecium* se puede apreciar en la Figura 16 a diferentes ampliaciones. En estas imágenes, es posible identificar su forma alargada y cómo su membrana delimita toda su estructura morfológica. Se puede observar lo que se encuentra al interior del *Paramecium* debido a la transparencia del citoplasma, permitiendo una visualización lo que sucede dentro de su sistema.<sup>43</sup>

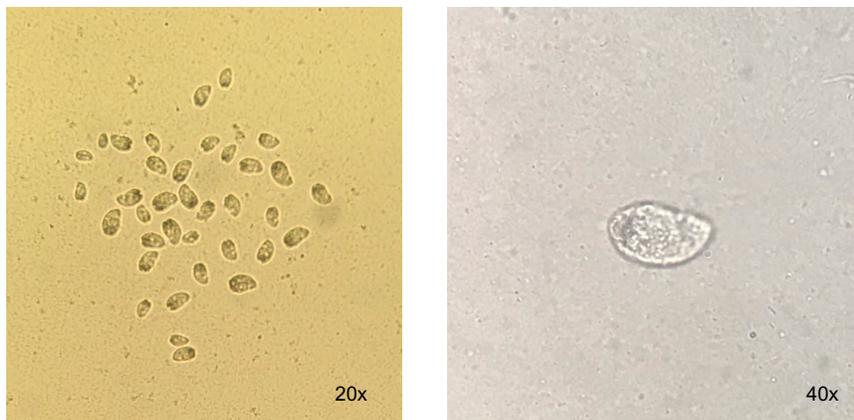


Figura 16. Morfología de *Paramecium* observada en microscopio óptico a diferentes ampliaciones

### 7.3.2 *Motilidad del Paramecium*

Al analizar el movimiento del *Paramecium* podemos determinar lo siguiente: su nado es continuo, según lo observado, no tiene momentos en los que esté completamente inmóvil, por lo que es muy fácil identificar cuando están vivos. Puede disminuir o aumentar su velocidad de nado pero suele tener una velocidad constante. También se observó que no tienen un nado preferente, la dirección de traslado se daba aleatoriamente en cada *Paramecium*.

### 7.3.3 *Internalización de materiales cargados con ICG en Paramecium.*

Gracias a que es posible observar el interior del *Paramecium*, como se mencionó anteriormente, un cambio de coloración podría ser indicador de que el *Paramecium* contiene algo ajeno a él.

Después de 5 min de aplicarse el material a la muestra con *Paramecium* y teniendo en cuenta que la coloración del ICG es verde, se observó que en una parte del *Paramecium* se acumularon vacuolas las cuales tenían esta coloración. Esto se aprecia en la Figura 17b. Al observar esto, se determinó que el material aplicado se estaba internalizando en la muestra de *Paramecium*.

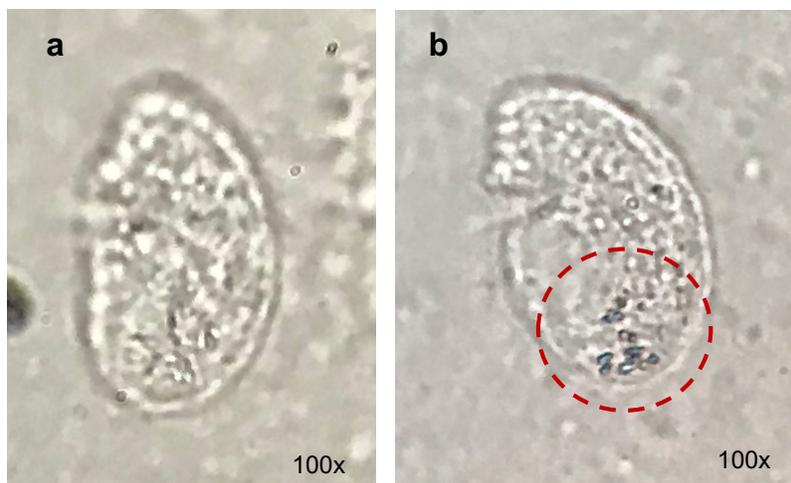


Figura 17. *Paramecium* observado en microscopio óptico con el objetivo de 100x. a) *Paramecium* sin material, no se observan vacuolas coloreadas. b) *Paramecium* con Lp+ICG+NpAu, se señala el área donde se encuentra el material endocitado con el color verde de las partículas.

### 7.3.4 Efecto de los materiales sin irradiar con láser

Se realizó la experimentación de las propiedades fotodinámicas de los materiales en el *Paramecium* sin aplicar láser. Sin embargo, al momento de analizar los resultados se optó por reportar solo tres periodos de tiempo (15, 30 y 40 min) ya que durante estos tiempos fue posible representar el comportamiento de los tiempos analizados (Tabla 3). Los datos que se muestran son el porcentaje de población viva de *Paramecium*

Tabla 3. Población total de *Paramecium* durante 15, 20 y 30 min al usar cada material sin irradiar láser.

	S/Material	Lp	ICG	NpAu	Lp+ICG	Lp+NpAu	Lp+ICG+NpAu
Inicio	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
15 minutos	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
30 minutos	100%	100%	98%	99%	99%	98%	100%
40 minutos	98%	95%	96%	98%	96%	98%	96%

Los resultados obtenidos nos indican que ninguno de los materiales implementados tuvo un efecto nocivo significativo en el *Paramecium*. Esto se afirma ya que la población total de *Paramecium* al finalizar los 40 min no tuvo un cambio crucial. Durante la experimentación se llegaba a tener al menos 1 *Paramecium* muerto, esto debido a las condiciones naturales del mismo protozooario durante su manejo. En la Figura 18 se observa el gráfico comparativo de estos datos, en dónde se aprecia que en ausencia del láser las reacciones fotodinámicas no se hacen presentes. Este comportamiento era un

efecto esperado y está en línea con terapias en las que solo los tejidos y órganos con irradiación láser presentan un efecto de muerte celular.<sup>1</sup>

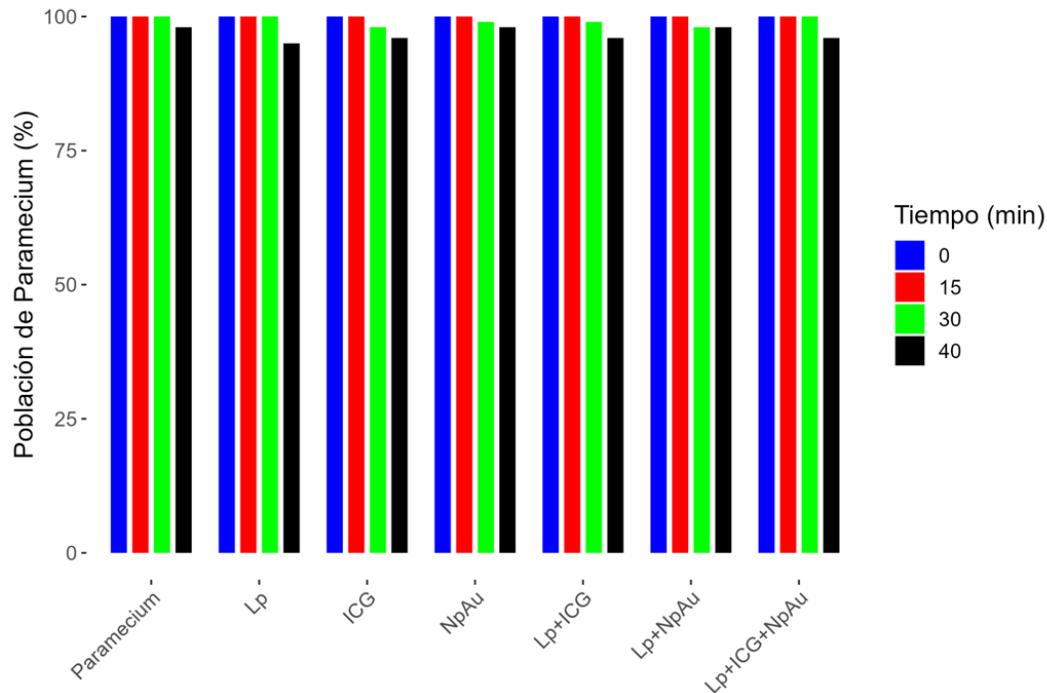


Figura 18. Gráfico comparativo de la población total de *Paramecium* al finalizar 15, 30 y 45 min de cada material al no ser expuesto al láser.

### 7.3.5 Efecto de los materiales al irradiar con láser

Para estudiar los efectos de los materiales sintetizados cuando se exponen a luz láser, se realizaron experimentos usando un láser emitiendo luz láser a 808nm. Se realizó la experimentación de los materiales en el *Paramecium* aplicando láser de 808 nm a las muestras y se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 4) en donde se muestra el porcentaje de población viva de *Paramecium*. Estos resultados también se representaron gráficamente (Figura 19).

Tabla 4. Población total de *Paramecium* durante 15, 20 y 30 min al usar cada material al irradiar con láser.

	S/Material	Lp	ICG	NpAu	Lp+ICG	Lp+NpAu	Lp+ICG+NpAu
Inicio	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
15 minutos	100%	100%	62%	100%	100%	100%	98%
30 minutos	100%	99%	0%	99%	94%	99%	17%
40 minutos	97%	97%	0%	99%	86%	96%	0%

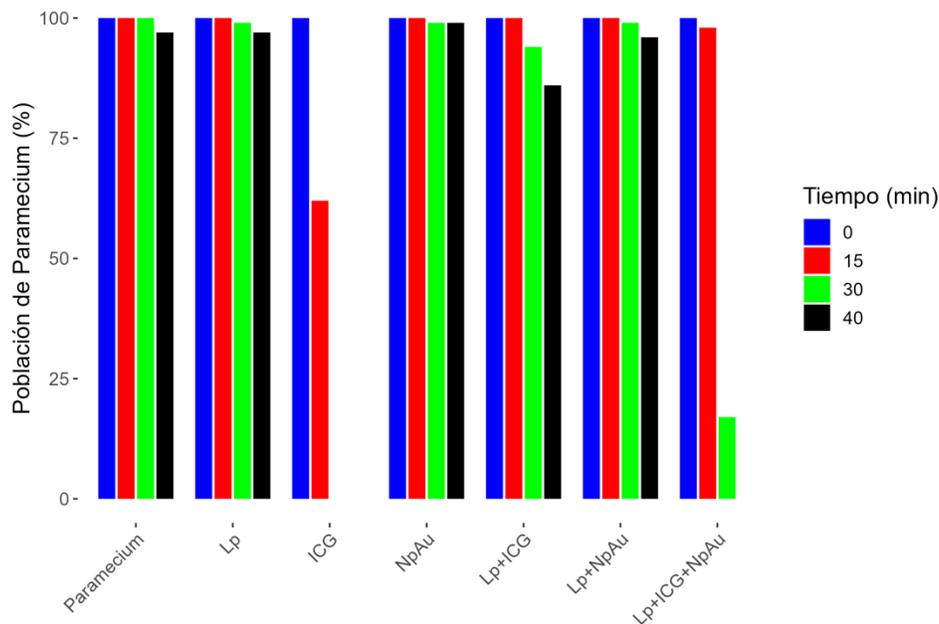


Figura 19. Gráfico comparativo de la población total de *Paramecium* al finalizar 15, 30 y 45 min de cada material al ser expuesto al láser.

Al analizar los resultados se puede concluir lo siguiente: el láser al interactuar con el *Paramecium* no provoca un efecto nocivo hacia este, lo mismo sucede con los materiales Lp, NpAu y Lp+NpAu, en dónde la población final de los protozoarios al finalizar los 40 min no presenta daños significativos en ella, esto respalda la teoría en donde se menciona que en ausencia del FS los efectos fotodinámicos no se hacen presentes y como consecuencia no existe ningún tipo de daño celular. Por otro lado, el ICG, Lp+ICG y Lp+ICG+NpAu presentaron un cambio importante en la población de *Paramecium*. Se puede observar que el ICG tienen una acción nociva en el *Paramecium*, eliminando la población al 100% desde los 30 min, esto era de esperarse ya que los efectos del ICG libre desencadenan reacciones inmediatas que perjudican a las células al momento de aplicar láser de 808 nm.<sup>15</sup> Por otro lado los Lp+ICG y los Lp+ICG+NpAu al estar encapsulando el material, el tiempo de reacción disminuye, ya que debe liberarse del liposoma el ICG y hasta entonces producir efecto. En el trabajo realizado por Chase *et al.* miden la temperatura que se incrementa en liposomas cargados con ICG, mencionan que la temperatura aumenta hasta 5 grados al irradiar con láser, por lo que no llega rápidamente a la temperatura necesaria para desintegrar el liposoma y liberar el ICG.<sup>56</sup>

La comparación entre el ICG, el Lp+ICG y el Lp+ICG+NpAu se puede apreciar mejor en la

Figura 20, donde se comparan sólo estos tres materiales en función del tiempo de irradiación. El ICG provoca un cambio importante en la población de *Paramecium* desde 0 a 15 min, por otro lado el material Lp+ICG y Lp+ICG+NpAu no muestran cambios significativos en ese mismo periodo. En el tiempo de 15 y 20 min, el Lp+ICG sigue sin tener efectos relevantes en la población de *Paramecium*, sin embargo, el Lp+ICG+NpAu disminuyen la población a un 75%, mientras tanto el ICG mantiene un total de 20% de la población. Para lograr que la población final de *Paramecium* se reduzca a 0%, en el ICG tuvo que transcurrir un total de 30 min de irradiación, por otro lado con el Lp+ICG+NpAu se requirieron 40 min. El Lp+ICG después de transcurrir los 40 min aún presentaba una población de 86% de *Paramecium*.

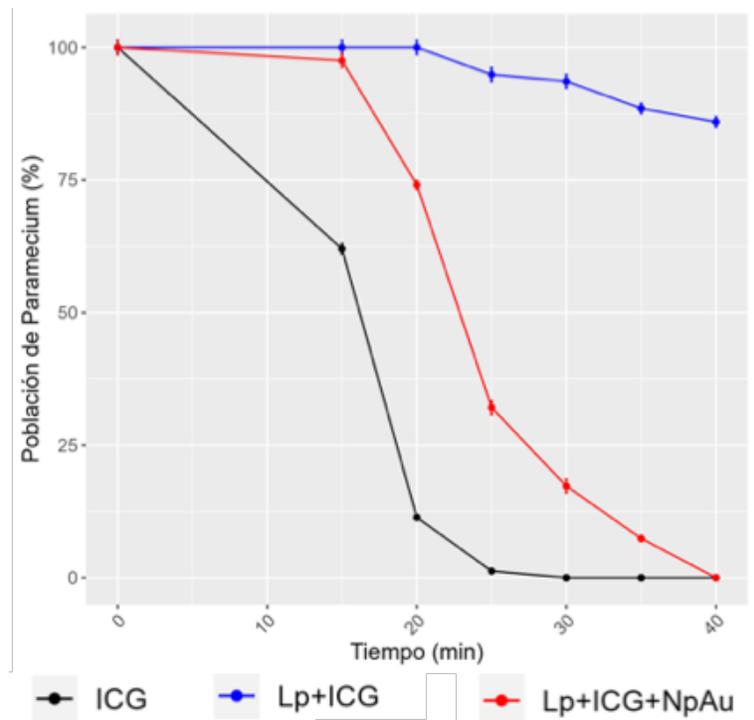


Figura 20. Gráfico comparativo del efecto del material ICG, Lp+ICG, Lp+ICG+NpAu, en la población de *Paramecium* al irradiar con láser.

SUPERVIVENCIA DE <i>PARAMECIUM</i> (%)								
Tiempo (min)		0	15	20	25	30	35	40
ICG	PROM	100	62	11	1	0	0	0
	+/- SD	1.26	0.96	0.50	0.50	0.00	0.00	0.00
Lp+ICG	PROM	100	100	100	95	94	88	86
	+/- SD	1.29	1.29	1.29	1.29	1.26	0.96	0.96
Lp+ICG+NpAu	PROM	100	98	74	32	17	7	0
	+/- SD	1.26	1.26	0.82	1.29	1.29	0.58	0.00

*Tabla 5. Promedio en porcentaje y desviación estandar de la supervivencia de Paramecium interactuando con los materiales ICG, Lp+ICG, Lp+ICG+NpAu e irradiar con láser en distintos tiempos.*

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y las propiedades de los materiales implementados, se deduce que la efectividad del Lp+ICG+NpAu en comparación con el Lp+ICG recae en la acción dual entre ICG y las NPs de Au al estar interactuando con láser. A pesar de que las NPs de Au libres o encapsuladas en liposomas no produce un efecto nocivo, integrarlas con ICG puede aumenta el tiempo de liberación de los liposomas al interactuar con láser de 808 nm, esto en comparación con los materiales que no presentan NPs de Au, promoviendo así su acción fotodinámica.

## VIII CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación, fue posible sintetizar liposomas con multicapas lamelares, los cuales presentaban un tamaño de partícula de  $\sim 100$  nm. En estos liposomas se logró encapsular el fotosensibilizador verde de indocianina y nanopartículas de oro de aproximadamente 20 nm, las cuáles tienden a ser esféricas.

Fue posible internalizar los materiales en el microorganismo unicelular *Paramecium* sin provocar efectos nocivos hacia este.

El porcentaje de encapsulamiento de ICG fue el mismo tanto en los materiales Lp+ICG y Lp+ICG+NpAu, teniendo un 75% en ambos, por lo que en este caso, la acción fotodinámica de los materiales no dependió de la concentración presente del FS al momento de comparar sus efectos.

Al evaluar las propiedades fotodinámicas de los materiales en el *Paramecium*, se demostró que el conjunto de NPs de Au con ICG en liposomas mejoró la acción fotodinámica al aplicar láser de 808 nm, en comparación con implementar el ICG por sí solo en los liposomas.

La implementación del *Paramecium* como modelo experimental fue de gran utilidad para determinar el material que mejor desempeñara un efecto fotodinámico.

La liberación del ICG por parte de Lp+ICG+NpAu dentro del *Paramecium* ha permitido iniciar la acción fotodinámica del ICG utilizando la irradiación láser. Estos hallazgos indican que los liposomas cargados con NPs de Au muestran un gran potencial como vehículos para la administración y activación específica de ICG en terapias fotodinámicas, lo que puede tener importantes implicaciones clínicas en el tratamiento de ciertas condiciones médicas.

Los resultados obtenidos en esta investigación respaldan la hipótesis planteada inicialmente, demostrando que los liposomas cargados con NPs de Au actúan efectivamente como acarreadores adecuados de ICG y promueve su acción fotodinámica.

Finalmente, esta investigación contribuye en la innovación de materiales fotodinámicos, con ella se espera que en futuras investigaciones se analice el factor específico por el cual se promueve la acción fotodinámica en el material Lp+ICG al incorporarle NpAu. De igual manera, se propone funcionalizar el material Lp+ICG+NpAu para mejorar sus propiedades selectivas y así pueda ser implementado en terapia fotodinámica dirigida para después estudiar su efecto fotodinámico en otros modelos experimentales.

## IX REFERENCIAS

1. Maehara, S. & Ikeda, N. Photodynamic Therapy. *Kyobu Geka* **71**, 858–861 (2018).
2. Bescós Torcal, I., Sebastián Cabeza, V. & Arruebo Gordo, M. *Síntesis de nanopartículas de PLGA con verde de indocianina para terapia fotodinámica antimicrobiana*. (Universidad de Zaragoza, 2021).
3. Caviedes S., I., Badínez V., L., Córdova B., A., Goset P., K. & Zelada S., G. Terapia fotodinámica: aplicación en dos pacientes con metástasis endobronquiales de adenocarcinoma extrapulmonar. *Rev. Chil. Enfermedades Respir.* **19**, 38–42 (2003).
4. Hopper, C., Niziol, C. & Sidhu, M. The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. *Oral Oncol.* **40**, 372–382 (2004).
5. Hur, C., Nishioka, N. S. & Gazelle, G. S. Cost-effectiveness of photodynamic therapy for treatment of Barrett's esophagus with high grade dysplasia. *Dig. Dis. Sci.* **48**, 1273–1283 (2003).
6. Balhaddad, A. A. *et al.* Prospects on Nano-Based Platforms for Antimicrobial Photodynamic Therapy Against Oral Biofilms. *Photobiomodulation Photomed. Laser Surg.* **38**, 481–496 (2020).
7. Li, W. *et al.* Gold nanospheres-stabilized indocyanine green as a synchronous photodynamic-photothermal therapy platform that inhibits tumor growth and metastasis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 3354–3367 (2017).
8. Stalmans, P., Aken, E. H. V., Veckeneer, M., Feron, E. J. & Stalmans, I. Toxic Effect of Indocyanine Green on Retinal Pigment Epithelium Related to Osmotic Effects of the Solvent. *Am. J. Ophthalmol.* **134**, (2002).
9. Inicio | American Cancer Society. <https://www.cancer.org/es.html>.
10. Romero-Fernandez, W. *et al.* El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública* **33**, 288 (2016).
11. Beisson, J. *et al.* *Paramecium tetraurelia*: The Renaissance of an Early Unicellular Model. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, pdb.emo140 (2010).
12. *Evo-Devo: Non-model Species in Cell and Developmental Biology*. vol. 68 (Springer International Publishing, 2019).

13. Comini, L. & Montoya, S. N. Fotosensibilizadores naturales activos en terapia fotodinámica. *Bitácora Digit.* **3**, (2016).
14. Robinson-Duggon, J., Pérez-Mora, F., Dibona-Villanueva, L. & Fuentealba, D. Potential Applications of Cucurbit[n]urils Inclusion Complexes in Photodynamic Therapy. *Isr. J. Chem.* **58**, 199–214 (2018).
15. Kwiatkowski, S. *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed. Pharmacother.* **106**, 1098–1107 (2018).
16. Lucky, S. S., Soo, K. C. & Zhang, Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chem. Rev.* **115**, 1990–2042 (2015).
17. Jori, G. & Reddi, E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers. *Int. J. Biochem.* **25**, 1369–1375 (1993).
18. Visudyne®. *Laboratorios Rubió* <https://www.laboratoriosrubio.com/producto/visudyne/>.
19. :: CIMA :: PROSPECTO FOSCAN 1 mg/ml SOLUCION INYECTABLE. [https://cima.aemps.es/cima/dohtml/p/01197003/P\\_01197003.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/p/01197003/P_01197003.html).
20. :: CIMA :: PROSPECTO METVIX 160 mg/g CREMA. [https://cima.aemps.es/cima/dohtml/p/64968/P\\_64968.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/p/64968/P_64968.html).
21. Alander, J. T. *et al.* A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery. *Int. J. Biomed. Imaging* **2012**, (2012).
22. Sevieri, M. *et al.* Indocyanine Green Nanoparticles: Are They Compelling for Cancer Treatment? *Front. Chem.* **8**, 1–9 (2020).
23. Gowsalya, K., Yasothamani, V. & Vivek, R. Emerging indocyanine green-integrated nanocarriers for multimodal cancer therapy: a review. *Nanoscale Adv.* **3**, 3332–3352 (2021).
24. Onoyama, M. *et al.* Effects of photodynamic hyperthermal therapy with indocyanine green on tumor growth in a colon 26 tumor-bearing mouse model. *Oncol. Lett.* **7**, 1147–1150 (2014).
25. Shinoda, K. *et al.* Indocyanine green conjugated phototheranostic nanoparticle for photodiagnosis and photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **39**, 103041 (2022).
26. Gao, W. *et al.* Nanomagnetic liposome-encapsulated parthenolide and indocyanine green for

- targeting and chemo-photothermal antitumor therapy. *Nanomed.* **15**, 871–890 (2020).
27. Cheng, Y. & Burda, C. Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Compr. Nanosci. Technol.* **1–5**, 1–28 (2011).
  28. Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. & Farokhzad, O. C. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **66**, 2–25 (2014).
  29. Rizvi, S. A. A. & Saleh, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm. J.* **26**, 64–70 (2018).
  30. Li, M. *et al.* Composition design and medical application of liposomes. *Eur. J. Med. Chem.* **164**, 640–653 (2019).
  31. Mathiyazhakan, M., Wiraja, C. & Xu, C. A concise review of gold nanoparticles-based photo-responsive liposomes for controlled drug delivery. *Nano-Micro Lett.* **10**, 1–10 (2018).
  32. Rashighi, M. & Harris, J. E. Doxorubicin Encapsulated in Stealth Liposomes Conferred with Light-Triggered Drug Release. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
  33. Lajunen, T. *et al.* The effect of light sensitizer localization on the stability of indocyanine green liposomes. *J. Controlled Release* **284**, 213–223 (2018).
  34. Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W. & Zarghami, N. Liposome : classification , preparation , and applications. 1–9 (2013).
  35. Sztandera, K., Gorzkiewicz, M. & Klajnert-Maculewicz, B. Gold Nanoparticles in Cancer Treatment. *Mol. Pharm.* **16**, 1–23 (2019).
  36. Riley, R. S. & Day, E. S. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **9**, (2017).
  37. Dykman, L. & Khlebtsov, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: Recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2256–2282 (2012).
  38. Fathy, M. M., Mohamed, F. S., Elbially, N. & Elshemey, W. M. Multifunctional Chitosan-Capped Gold Nanoparticles for enhanced cancer chemo-radiotherapy: An invitro study. *Phys. Medica PM Int. J. Devoted Appl. Phys. Med. Biol. Off. J. Ital. Assoc. Biomed. Phys. AIFB* **48**, 76–83 (2018).

39. Gong, B. *et al.* Thermo-responsive polymer encapsulated gold nanorods for single continuous wave laser-induced photodynamic/photothermal tumour therapy. *J. Nanobiotechnology* **19**, 1–14 (2021).
40. Cheng, Y. *et al.* Highly Efficient Drug Delivery with Gold Nanoparticle Vectors for in Vivo Photodynamic Therapy of Cancer. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 10643–10647 (2008).
41. Zhang, Y. *et al.* Curcumin-loaded multifunctional chitosan gold nanoparticles: An enhanced PDT/PTT dual-modal phototherapeutic and pH-responsive antimicrobial agent. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **39**, 103011 (2022).
42. *Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research*. 1098 (National Academies Press, 1988). doi:10.17226/1098.
43. ULPGC - Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. <https://www.ulpgc.es/>.
44. Riedel-Kruse, I. H., Chung, A. M., Dura, B., Hamilton, A. L. & Lee, B. C. Design, engineering and utility of biotic games. *Lab Chip* **11**, 14–22 (2011).
45. Eckert, R. Bioelectric Control of Ciliary Activity: Locomotion in the ciliated protozoa is regulated by membrane-limited calcium fluxes. *Science* **176**, 473–481 (1972).
46. INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR.
47. Spikes, J. D. The origin and meaning of the term “photodynamic” (as used in “photodynamic therapy”, for example). *J. Photochem. Photobiol. B* **9**, 369–371 (1991).
48. Hao, J. *et al.* Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. *LWT - Food Sci. Technol.* **85**, 37–44 (2017).
49. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55–75 (1951).
50. Ley\_de\_Beer-Lambert. [https://www.quimica.es/enciclopedia/Ley\\_de\\_Beer-Lambert.html](https://www.quimica.es/enciclopedia/Ley_de_Beer-Lambert.html).
51. Saxena, V., Sadoqi, M. & Shao, J. Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro release. *Int. J. Pharm.* **278**, 293–301 (2004).
52. Linsley, C. S., Zhu, M., Quach, V. Y. & Wu, B. M. Preparation of photothermal palmitic acid/cholesterol liposomes. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **107**, 1384–1392 (2019).
53. Gomes, A. J., Lunardi, L. O., Marchetti, J. M., Lunardi, C. N. & Tedesco, A. C. Indocyanine green

nanoparticles useful for photomedicine. *Photomed. Laser Surg.* **24**, 514–521 (2006).

54. Immordino, M. L., Dosio, F. & Cattell, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomedicine* **1**, 297–315 (2006).

55. Navarro, F. P. *et al.* Lipid nanoparticle vectorization of indocyanine green improves fluorescence imaging for tumor diagnosis and lymph node resection. *J. Biomed. Nanotechnol.* **8**, 730–741 (2012).

56. Dichello, G. A. *et al.* Preparation of liposomes containing small gold nanoparticles using electrostatic interactions. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **105**, 55–63 (2017).

## X ANEXOS

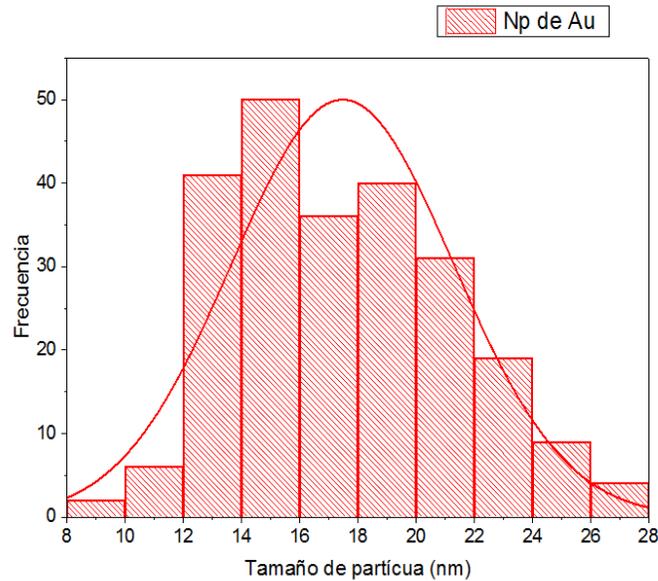


Figura 21 Tamaño de partícula de NPs de Au sintetizadas en este trabajo

Tabla 6. Datos para la curva de calibración usados en el cálculo del porcentaje de encapsulamiento

800 nm		
	Concentración	Absorbancia
	5.17E-07	0.11071
	6.50E-07	0.13013
	7.74E-07	0.17268
	1.03E-06	0.2456

$c = A / (\epsilon * d)$		
	$\epsilon$	270769
Lp+ICG	A	3.49544
Lp+ICG+NpAu	A	3.44869

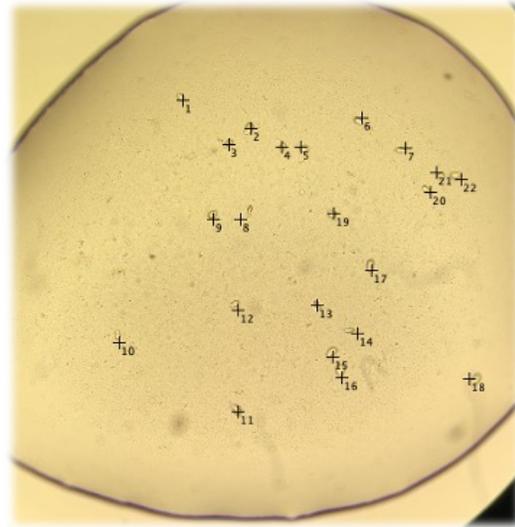
Lp+ICG	c	1.29093E-05
Lp+ICG+NpAu	c	1.27367E-05

Lp+ICG	%	74.98
Lp+ICG+NpAu	%	75.32



Objetivo 10x  
Microscopio óptico



ImageJ  
Multi-point

Figura 22. Representación del conteo de Paramecium

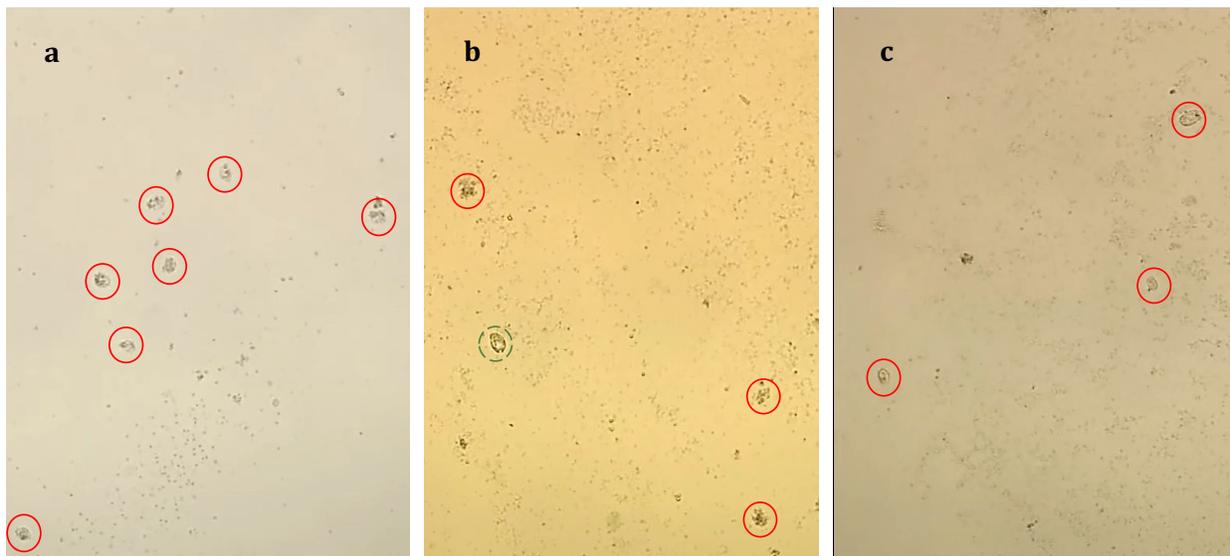


Figura 23. Muestras de Paramecium implementando diferentes materiales al ser expuestos con láser de 808 nm. Los círculos rojos señalan Paramecium muerto y los círculos verdes con línea punteada Paramecium vivos. a) ICG. b) Lp+ICG. c) Lp+ICG+NpAu.