

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Nanopartícules como moduladores de los efectos de las radiaciones ionizantes

Memoria presentada por
Miguel Ángel Pérez Amor

Para optar al Grado de
Doctor en Biodiversidad

Tesis realizada bajo la dirección de
Dr. Joan Francesc Barquinero Estruch

en el Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia
Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona

Miguel Ángel Pérez Amor

Universitat Autònoma de Barcelona
Cerdanyola del Vallès, abril de 2023

*A mi familia,
la que ha estado desde el primer paso,
la que apareció a mitad del camino
y la que no ha llegado hasta su final.*

“Dicen que un poco de conocimiento es peligroso, pero no tanto como mucha ignorancia”.

Sir Terry Pratchett



AGRADECIMIENTOS

Cuando Odiseo partió hacia Troya, ni de lejos podría haber imaginado que pasarían veinte años hasta que volvería a ver las costas de Ítaca, ni las maravillas y horrores de las que sería testigo en ese tiempo. Yo no soy ningún héroe griego, ni he pasado veinte años alejado de mi hogar, pero, en cierto modo esta tesis marca el final de una Odisea personal. Una Odisea en la que he estado a punto de fracasar en más ocasiones de las que puedo contar o quiero recordar. Pero lo que sí quiero recordar es a las personas gracias a la que he llegado hasta aquí, porque os aseguro que sin ellas y ellos no tendríais esta tesis en vuestras manos (o en vuestras pantallas, ya me entendéis).

Primeramente, dar las gracias a mis directores de tesis: el doctor Joan Francesc Barquineró Estruch (porque la ocasión merece título y nombre completo) y el doctor Lleonard Barrios Sanromà (director oficialmente hasta su jubilación en septiembre de 2019 y, extraoficialmente, en todo momento). Gracias a ellos por darme la oportunidad de embarcarme en esta aventura y, sobre todo, por haber sido los capitanes que han llevado este barco a buen puerto.

Gracias también a las componentes de la comisión de seguimiento del doctorado: las doctoras Gemma Armengol, Maria Rosa Caballín y Assumpció Malgosa. Sus críticas y consejos han sido imprescindibles para que este trabajo, año a año, haya ido prosperando y tomando forma.

Infinitas gracias a las técnicas de laboratorio Núria, Pilar y, sobre todo, a Jèssica, que desde que hice las prácticas de Grado hace ya casi diez años (¡diez años!) lleva enseñándome todo lo que sé hacer cuando llevo puestos bata y guantes o tengo los ojos clavados en los oculares de un microscopio.

Dar las gracias también al profesorado de la Unidad: Maria Pilar, Eulàlia, Cristina y Iolanda, que me acompañó mientras daba los primeros pasos en el mundo de la docencia y ayudó a que no me volviera loco o sufriera un infarto durante las primeras prácticas.

En un plano más personal, tengo que darle las gracias a todos los amigos y amigas que han estado ahí cuando se les necesitaba, ya fuese para un abrazo o unas risas; a Ana, compañera de fatigas y presencia constante a través del cristal entre despachos. Si alguien entiende lo que llegar hasta aquí supone, esa eres tú. A toda la gente del Cayado (¡que se alzaré de nuevo!): Siscu (hermano de metal, changos y corridos), los Campeones Maravillosos Fran y Llop (que no sería Llop sin su risa cuando absolutamente todo se está yendo al garete), Kalebr (plástico, dulce plástico), Angy, Miki, Lorena, Carles, Arnau, Irene, Laia, Adrià, Lautaro, Sun, Joan, Martí, Christian, Edgar y, evidentemente, al Mago *himself*, Víctor, el hombre que lo empezó todo, *my brother from another mother*, el que tiene tantos epítetos que ya no le caben más en mi contacto del móvil (no, en serio, no caben más, lo he intentado). Gracias a Mar y Adim, porque, aunque parece que el continuo espaciotiempo se empeña en que no nos veamos, ni de lejos, tanto como nos gustaría, siempre estáis cerca. Y no, no me olvido de ti, que sé lo que estás pensando. Gracias, Sandra, por aparecer en mi vida cuando lo hiciste, por haber sido una constante desde entonces y por quererme cuando yo no lo hacía.

Por último, infinitas gracias a los miembros de mi familia, con los que comparto sangre y con los que no, que han estado conmigo a las duras y a las maduras. Al resto no les dedico ni un pie de página.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Radiaciones ionizantes	13
1.2. Efecto de las radiaciones ionizantes sobre los organismos vivos	14
1.3. Efectos de las radiaciones ionizantes sobre el DNA	16
1.3.1. Respuesta celular al daño en el DNA	17
1.3.2. Control del ciclo celular en respuesta a daños en el DNA	20
1.4. Biomarcadores de exposición a RI.....	22
1.5. Radioterapia.....	24
1.5.1. Radiosensibilización y radioprotección	26
1.5.1.1. Nanopartículas como radiosensibilizadores	27
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Líneas celulares	37
3.2. Expresión de receptores	38
3.3. Caracterización citogenética	39
3.4. Nanopartículas e internalización	40
3.5. Irradiación	41
3.6. Detección del daño en el DNA mediante el análisis de foci de γ -H2AX	42
3.7. Ensayo de viabilidad celular con MTT.....	43
3.8. Análisis estadístico.....	43
4. RESULTADOS	45
4.1. Caracterización celular.....	47
4.1.1. Expresión de receptores de membrana	47
4.1.2. Caracterización citogenética.....	47
4.1.3. Internalización de nanopartículas	49
4.1.3.1. Nanopartículas de 50 nm.....	49
4.1.3.2. Nanopartículas de 100 nm.....	52
4.2. Potencial ζ de nanopartículas	54
4.3. Inducción y cinética de foci de γ -H2AX	56

4.3.1. Nanopartículas de 50 nm.....	57
4.3.2. Nanopartículas de 100 nm.....	60
4.4. Ensayo de viabilidad celular con MTT.....	64
4.4.1. Nanopartículas de 50 nm.....	65
4.4.2. Nanopartículas de 100 nm.....	66
5. DISCUSIÓN	69
5.1. Caracterización de las líneas celulares y nanopartículas.....	74
5.2. Evaluación del efecto radiosensibilizador de las nanopartículas	80
6. CONCLUSIONES	87
7. BIBLIOGRAFÍA	91
8. ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS	117

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Radiaciones ionizantes

La radiación es una forma de energía que viaja a través del espacio y/o a través de un medio material. Esta forma de energía puede clasificarse de dos formas en función de su capacidad para eliminar electrones de un átomo al interactuar con él, de manera que existen las radiaciones no ionizantes (RNI) y las radiaciones ionizantes (RI) (Mu et al., 2018).

La energía de las RNI puede ser capaz de mover átomos o hacerlos vibrar, sin provocar ninguna interacción con los electrones. Esta forma de radiación incluye la infrarroja, las microondas o las ondas de radio. Por otro lado, las RI tienen energía suficiente para provocar la eliminación de un electrón de un átomo, dando lugar a la formación de un ion. Las RI pueden subclasificarse en función de si la energía se propaga en forma de partículas (como son las partículas α , β o los neutrones) o en forma de onda electromagnética (como los rayos γ o los rayos X) (Ver Christensen et al., 2014).

El impacto de las RI en un organismo depende de diversos factores. Uno de ellos es la dosis de radiación absorbida, que se mide en Grays (Gy), la unidad del Sistema Internacional que equivale a la absorción de 1 Joule de energía por kilogramo de materia ($\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}$). Otro factor a considerar es la manera en que se deposita la energía. Para ello es de utilidad el concepto de transferencia lineal de energía (LET), que es la cantidad media de energía depositada por unidad de longitud y sus unidades son los kiloelectronvoltios por micrómetro ($\text{keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$). Las RI se pueden clasificar en RI de alta o de baja LET. Las primeras muestran un patrón de ionizaciones generalmente linear y producen una gran cantidad de eventos de ionización por unidad de longitud recorrida y engloban las radiaciones cuya energía proviene de partículas, mientras que las segundas, entre las que encontramos las radiaciones cuya energía proviene de fotones (rayos X y γ), producen un patrón de ionizaciones más disperso con un menor número de ionizaciones por unidad de longitud (Figura 1).

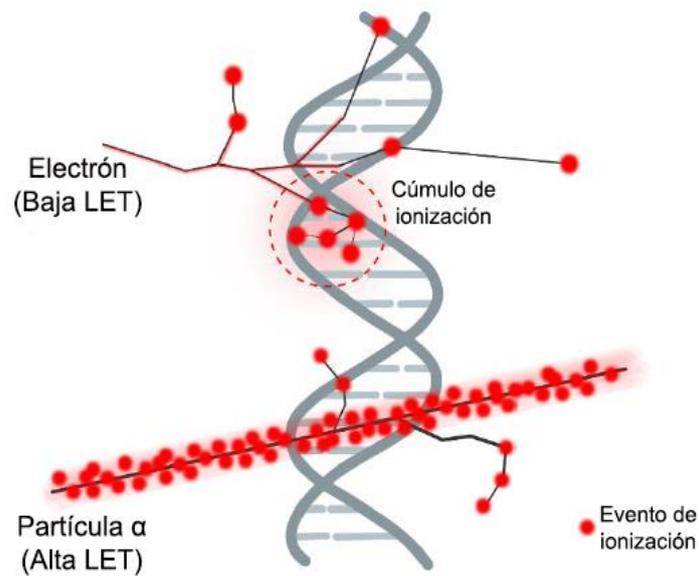


Figura 1. Representación gráfica del patrón de ionizaciones producidas por las radiaciones de alta y baja LET. Adaptado de Iliakis et al., 2019.

1.2. Efecto de las radiaciones ionizantes sobre los organismos vivos

Son de especial relevancia los efectos que estas radiaciones tienen sobre las biomoléculas debido a su potencial dañino sobre los organismos vivos. Si el daño provocado conduce a la muerte de células, y la subsiguiente lesión de un tejido, hablamos de efecto determinístico o reacción tisular, mientras que, si el daño provoca cambios mutacionales en las células, sin provocar su muerte, nos referimos a un efecto estocástico. Estos efectos además se diferencian en su relación con la dosis. Por un lado, los efectos determinísticos aparecen a partir de una dosis umbral de radiación, de manera que la probabilidad de padecer estos efectos tiende al 100% al sobrepasar ese umbral y a incrementar su severidad al aumentar la dosis. Por otro lado, los efectos estocásticos carecen de una dosis umbral y su severidad no es dependiente de la dosis de radiación, por lo que lo único que aumenta con la dosis es su probabilidad de aparición (Figura 2) (Hall y Giaccia, 2019).

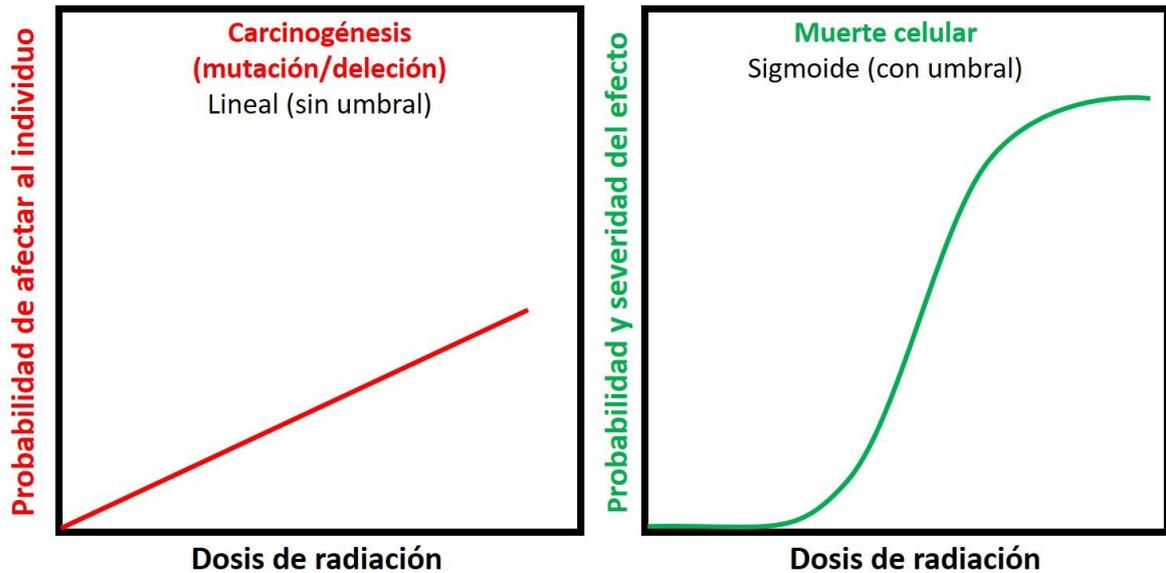


Figura 2. Representación gráfica de la relación entre dosis y los efectos determinísticos (en verde) y estocástico (en rojo). El efecto determinístico presenta una función umbral-sigmoide, mientras que el estocástico sigue una función lineal sin umbral. En ambos casos la probabilidad

El daño producido por la interacción de las RI con la materia viva puede darse de manera directa, cuando la radiación ioniza directamente a la molécula diana (provocando desde roturas de DNA, a la oxidación de proteínas o lípidos), o de manera indirecta, cuando la RI provoca la formación de radicales libres que a su vez interaccionan químicamente con las biomoléculas. Debido a que el mayor constituyente celular es el agua, mayoritariamente la interacción de la radiación se da con el agua. La radiolisis del agua da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que interaccionan químicamente con las biomoléculas modificándolas, lo que es especialmente importante en el caso de la molécula de DNA (Figura 3) (Bolus, 2017). Se ha descrito que, cuantitativamente, aproximadamente el 70% de las alteraciones moleculares inducidas en el DNA por las RI se deben al efecto indirecto (Roots y Okada, 1972).

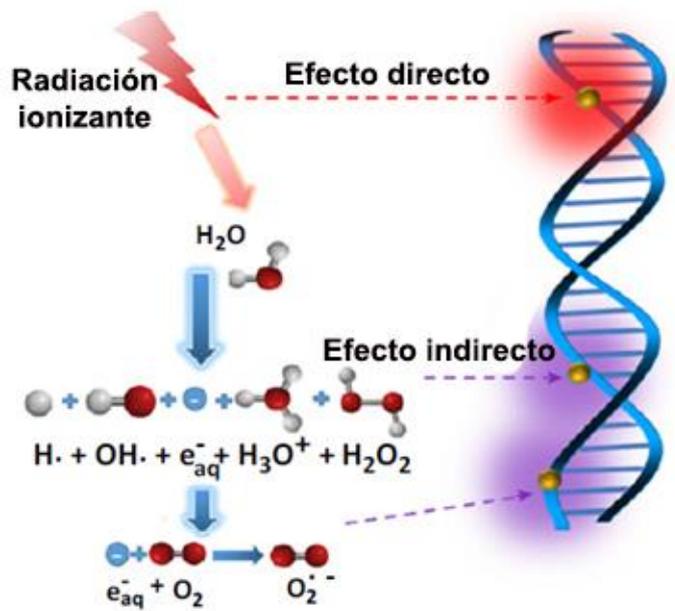


Figura 3. Ilustración representativa de los daños directo e indirecto de la RI sobre el DNA. El daño indirecto se genera a partir de la formación de ROS tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) o el superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). Adaptado de Wang et al., 2018.

1.3. Efectos de las radiaciones ionizantes sobre el DNA

Como acabamos de comentar, de las alteraciones en biomoléculas celulares inducidas por las RI, las más importantes son las que se inducen en el DNA (Figura 4). Por un lado, pueden producirse roturas de cadena, ya sea en ambas (rotura de doble cadena, DBS) o sólo en una de ellas (rotura de cadena simple, SSB). También pueden producirse daños en las bases nitrogenadas (BD), formando lugaresapurínicos y apirimidínicos (*AP-sites*) e incluso puede dar lugar al establecimiento de enlaces cruzados (*crosslinks*) intracatenarios o intercatenarios entre nucleótidos, que forman enlaces covalentes diferentes a los que muestra la molécula de DNA inicial. Los enlaces covalentes también pueden dar lugar a la formación de enlaces cruzados DNA-proteínas. Estos tipos de daño pueden presentarse de manera aislada, pero a veces pueden darse también de manera simultánea en una misma región del DNA, dando lugar a lesiones complejas, resultando en una mayor dificultad de reparación (Kavanagh et al., 2013).

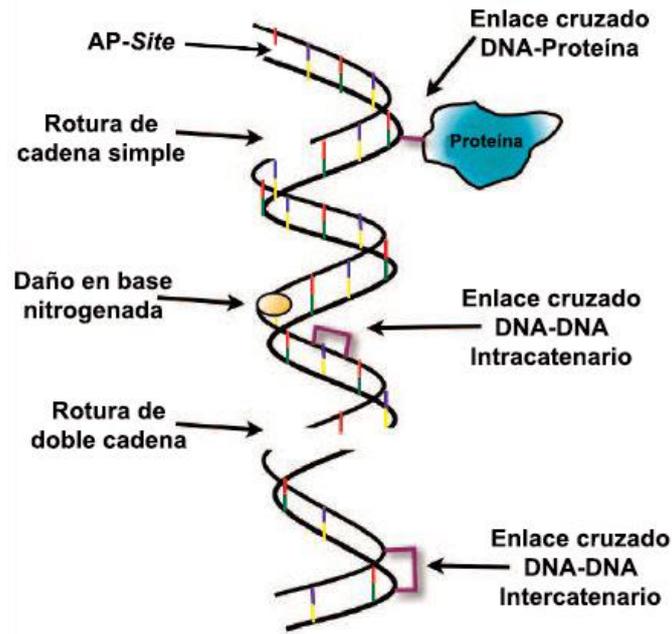


Figura 4. Representación de los distintos tipos de daño provocados en la molécula de DNA por las RI. (Adaptado de Kavanagh et al., 2013).

1.3.1. Respuesta celular al daño en el DNA

Cuando se producen daños en el DNA, las células activan mecanismos de reparación con el fin de restaurar la molécula a un estado lo más similar posible al original o, al menos, a uno con mayor integridad estructural y funcional. Los distintos tipos de daño requieren distintos tipos de reparación, de manera que cuando se producen daños como los BD o los AP-sites se activan mecanismos de reparación por escisión de base o nucleótido (BER y NER, respectivamente), mientras que si la lesión implica SSB se lleva a cabo un proceso de detección de la secuencia dañada, rellenado del hueco en la cadena rota utilizando como molde la cadena intacta y ligación del DNA (Caldecott, 2014). Los DSB al afectar a ambas cadenas de la molécula de DNA requieren de mecanismos de reparación específicos. La reparación de DSB implica dos vías principales, la reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR) (Figura 5).

La NHEJ es la principal vía que actúa en la reparación de DSB radioinducidos, debido a su capacidad de actuación independientemente de la fase del ciclo celular

en que se produzca el daño. La NHEJ requiere de la formación de un heterodímero de proteínas Ku70/80 en los extremos de la zona de la DSB, que a su vez se encarga de reclutar y activar proteínas cinasas dependientes de DNA (DNA-PKcs). A continuación, varios complejos de procesamiento de DNA como MRN, PNKP y APLF se unen con el fin de obtener extremos 3' y 5' con capacidad de ser unidos. Por último, las proteínas XRCC4 y XLF forman un complejo con la DNA Ligasa IV, que completa la unión de los dos extremos (Figura 5). A pesar de poder actuar en cualquier fase del ciclo celular, la NHEJ es un mecanismo de reparación de baja fidelidad ya que por una parte los extremos de la rotura son procesados, lo que puede provocar modificaciones respecto a la secuencia original, y por otra parte la unión errónea de los extremos puede originar alteraciones cromosómicas tipo intercambio (Lomax et al., 2013).

La reparación del DNA por HR, al contrario que NHEJ, se trata de una vía cuya capacidad de actuación queda limitada a las fases S y G2 del ciclo celular dada la necesidad de una cromátide hermana intacta que sirva de molde de la secuencia dañada. La vía de la HR, implica un procesamiento inicial de la región dañada mediante el complejo MRN, al que se añaden CtIP y BRCA1, dando lugar a regiones de cadena simple flanqueando ambos lados del DSB (Santivasi y Xia, 2014). La exonucleasa EXO1 se encarga de extender estas regiones, permitiendo la unión de hSSB1 y del complejo RPA, que evita la degradación de los extremos libres de las cadenas. Posteriormente, RPA es sustituido por RAD51-BRCA2, encargados de encontrar una cromátide hermana utilizada como molde para poder sintetizar la secuencia dañada mediante la acción de la DNA polimerasa γ . En contraste con NHEJ, se considera que la HR es un mecanismo de reparación de mayor fidelidad, resultando en una secuencia de DNA mucho menos propensa a presentar diferencias respecto a la secuencia original (Borrego-Soto et al., 2015).

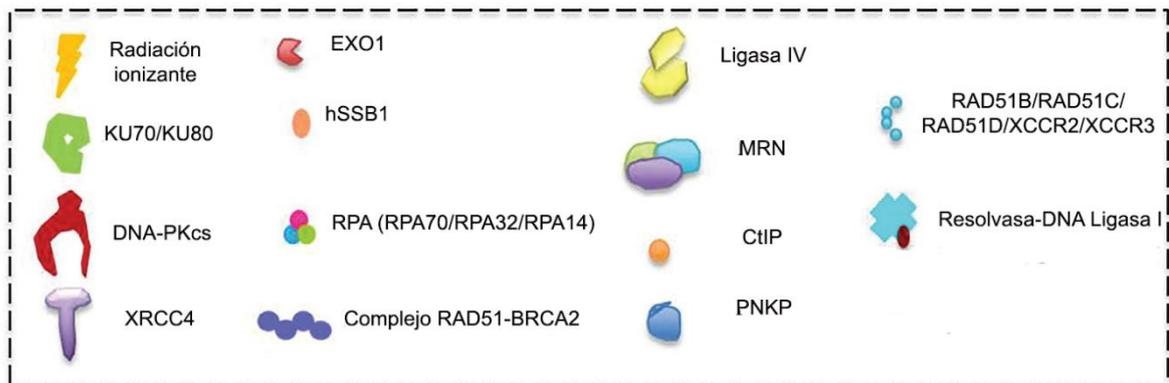
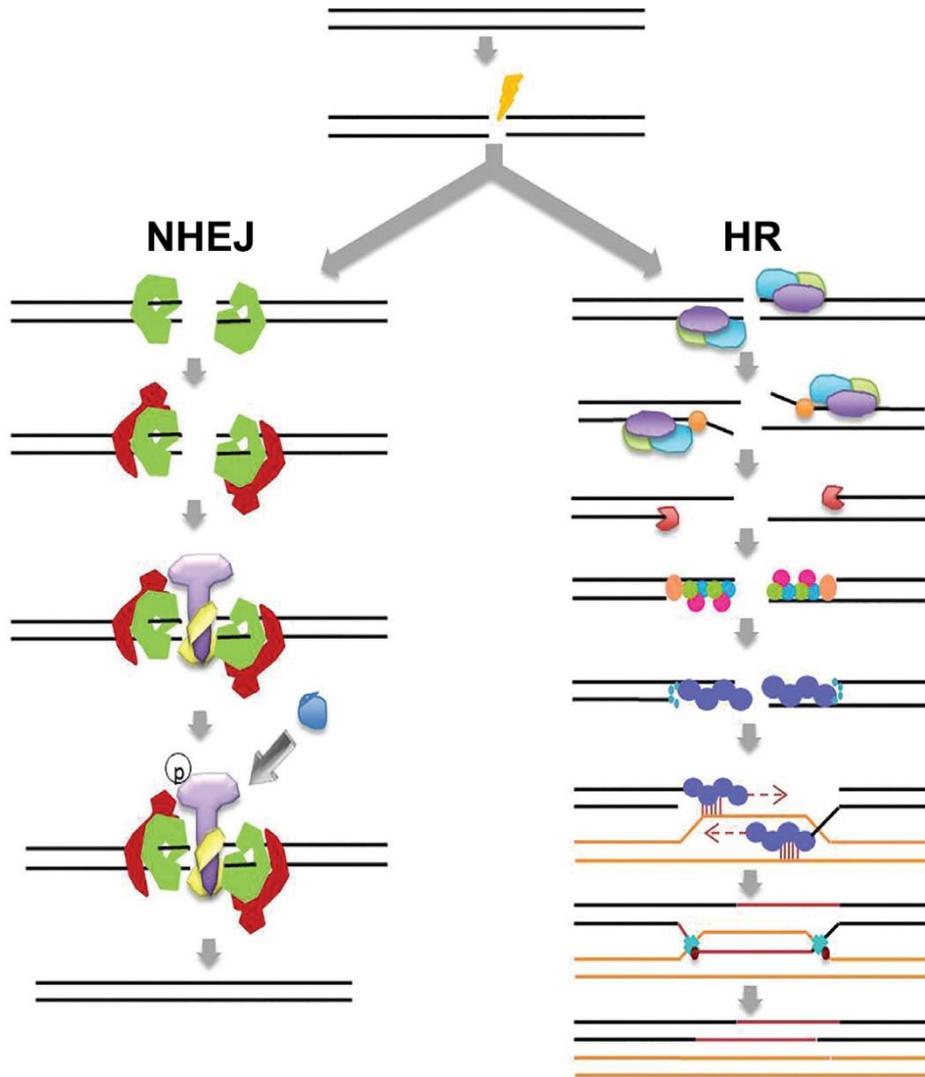


Figura 5. Representación gráfica de las dos principales vías de reparación de DSB: NHEJ y HR. Adaptado de Borrego-Soto et al., 2015.

1.3.2. Control del ciclo celular en respuesta a daños en el DNA

El ciclo celular es un proceso continuo, que atendiendo a razones morfológicas dividimos en cuatro fases (G1 o gap 1, S o síntesis, G2 o gap 2 y M o mitosis). El progreso celular a través de estas fases se regula por la activación e inactivación sucesiva de diferentes quinasas dependientes de ciclina (CDKs), que controlan el paso entre las diferentes fases (Figura 6).

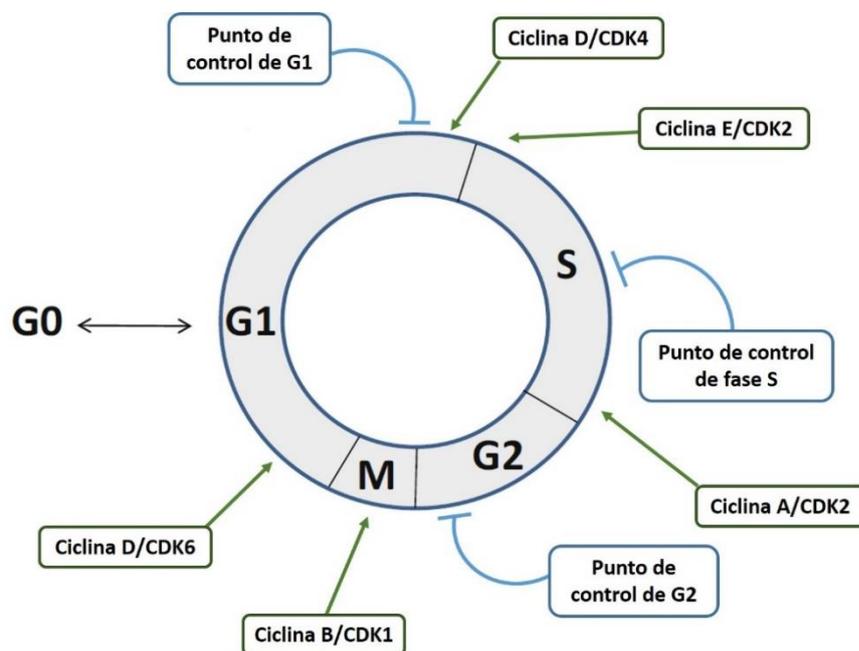


Figura 6. Representación gráfica de las distintas fases del ciclo celular. El avance por la fase G1 está mediado por complejos de ciclina D y CDKs 4 y 6, mientras que la entrada en la fase S queda regulada por el complejo ciclina E/CDK2. Los complejos de ciclina A y CDKs 1 y 2 son los responsables de controlar el progreso de la fase S y el paso a G2. Finalmente, el complejo ciclina B/CDK1 se encarga de la entrada en fase M (mitosis) de la célula. Adaptado de Syljuasen, 2019.

El progreso del ciclo celular puede ser alterado por la acción de agentes externos, como las RI (Little, 1968). La acción de las RI en una célula puede retrasar o incluso detener el avance de algunas de las fases del ciclo en los denominados puntos de control (Iliakis et al., 2003).

En el caso del punto de control de G1, la acción de la proteína supresora tumoral p53 evita que las células con daños no reparados en el DNA puedan pasar a la fase

S. Los daños en el DNA provocan la activación de p53 (Figura 7), que a su vez activa la producción de p21, proteína inhibidora de la actividad CDK/ciclina. Esta respuesta celular frente las alteraciones no reparadas del DNA, evita que la célula entre en la fase S y permite que puedan actuar los mecanismos de reparación del DNA antes de la replicación. Por lo que respecta al punto de control de fase S, mediado por Wee1 y ATR-Chk1, se ha descrito que los daños en el DNA inducidos por las RI en células en fase S, no provocan la detención total de la progresión del ciclo, pero sí que disminuyen la velocidad de replicación del DNA, lo que a su vez permite una actuación más larga de los mecanismos de reparación del DNA. Por último, la presencia de daños en el DNA en células cuyo ciclo celular llega al punto de control de G2, el último antes de que la célula entre en mitosis, puede conllevar detenciones del avance del ciclo de 2 a 3 h por Gy absorbido. Este último punto de control, de manera similar al de fase S, está mediado por las vías ATR-Chk1 y Wee1, aunque durante las dos primeras horas post-irradiación muestra dependencia de ATM quinasa (Syljausen, 2019).

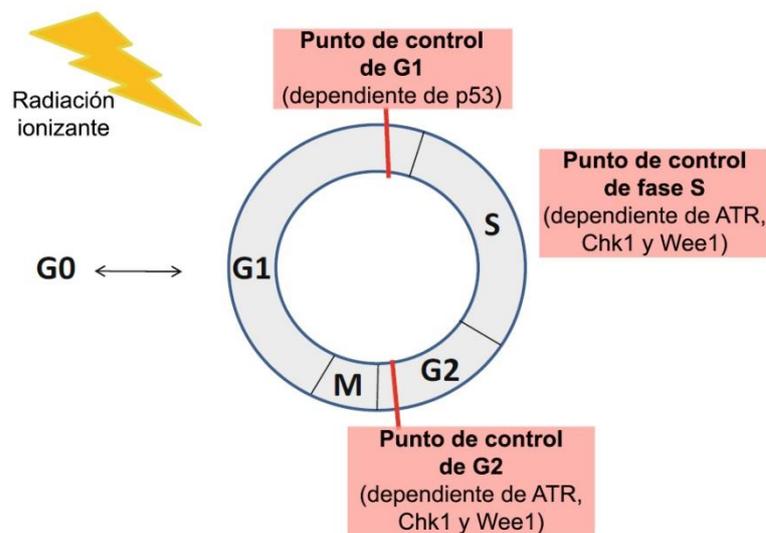


Figura 7. Representación gráfica de los puntos de control del ciclo celular y de las proteínas encargadas de su regulación tras la irradiación. Adaptado de Syljausen, 2019.

Los puntos de control del ciclo celular son un elemento clave a la hora de proporcionarle tiempo suficiente a las células para reparar posibles daños en el DNA antes de la replicación y de la mitosis. Cabe destacar también que, si los daños en el DNA son muy elevados, el bloqueo del ciclo celular en los puntos de control

puede llegar a ser permanente, resultando en la activación de las vías de muerte celular por senescencia (Hauge et al., 2021).

1.4. Biomarcadores de exposición a RI

Existen diversos biomarcadores de exposición a las RI. Entre ellos, los que muestran una mejor correlación con la dosis son aquellos que se basan en el daño genético radio-inducido. El análisis citogenético de cromosomas dicéntricos (Figura 8) se considera como la técnica de referencia para estimar la dosis en casos de sobreexposición a las RI (IAEA, 2011).

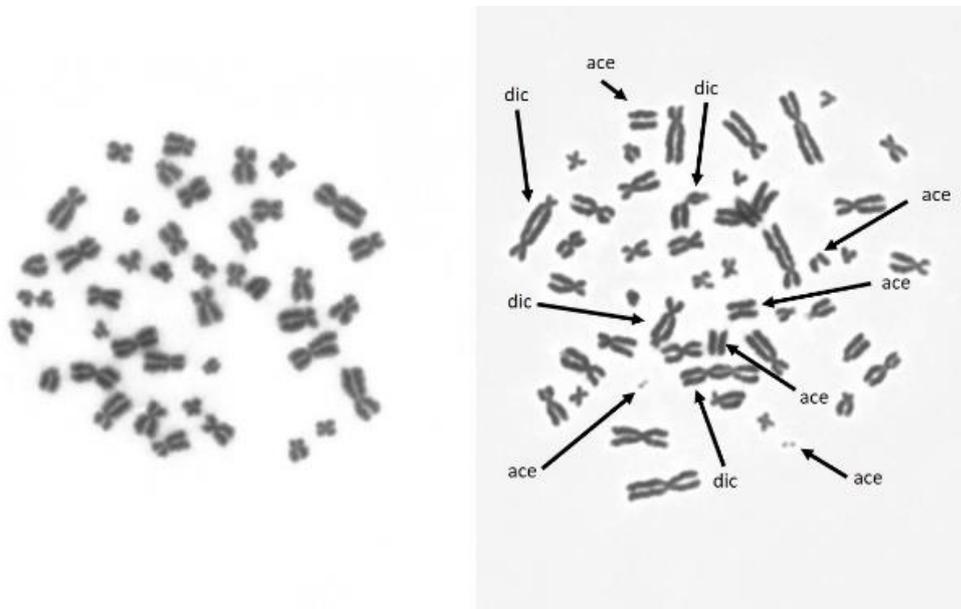


Figura 8. Comparación de una metafase normal y una con presencia de cromosomas dicéntricos (dic) y fragmentos acéntricos (ace). La aparición de este tipo de anomalía cromosómica se correlaciona con las reorganizaciones de cromosomas que han sufrido DSB tras una exposición a RI.

Dado que el análisis de alteraciones cromosómicas, como los dicéntricos, requiere del cultivo de linfocitos de al menos 48h, se han desarrollado e implementado técnicas alternativas, aunque también muestran limitaciones. La proteína de unión a p53 53BP1 o la histona γ -H2AX se consideran buenas opciones como biomarcadores de la respuesta inmediata a las RI, por la mayor facilidad de

obtención de las muestras y el menor tiempo de espera hasta la obtención de los resultados (Rothkamm et al., 2015).

La histona γ -H2AX es la variante fosforilada de la histona H2AX. Ante la inducción de DSB, las histonas H2AX que rodean la lesión (en un orden de cientos de miles) se ven fosforiladas en el residuo serina 139 y forman cúmulos, llamados foci (Figura 9), que pueden ser detectados mediante técnicas de citometría de flujo e inmunofluorescencia (Rothkamm y Löbrich, 2003).

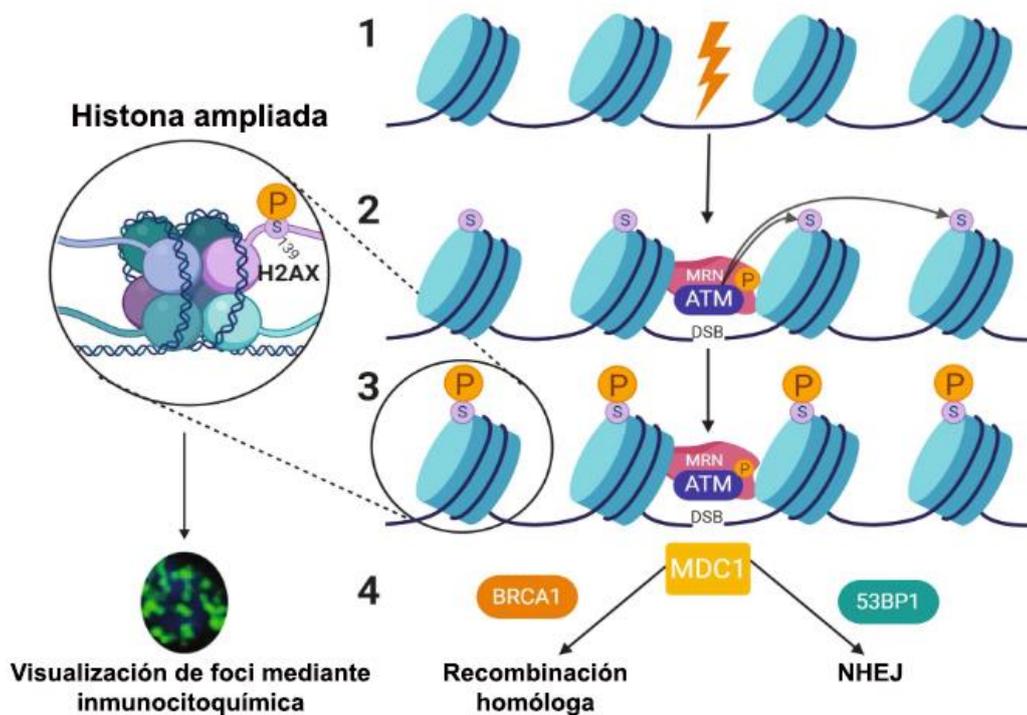


Figura 9. Representación gráfica de la vía de fosforilación de la histona H2AX. Tras la aparición de un DSB provocado por un agente externo, como puede ser la RI, el complejo proteico MRN es reclutado en la zona de la lesión. MRN a su vez recluta y activa ATM quinasa, que se encarga de fosforilar las histonas H2AX en la serina 139, dando lugar a la variante γ -H2AX. Después de la fosforilación la proteína MDC1 es añadida al DSB y se encarga del reclutamiento de proteínas implicadas en los procesos de reparación celular como BRCA1 o 53BP1. Adaptado de Noubissi et al., 2021.

Una de las principales ventajas que presenta γ -H2AX como biomarcador es su rápida aparición tras una exposición a RI (con un pico de recuento de foci que suele aparecer entre 30 min y 1 h post-irradiación), así como una buena correlación con el número de DSB formados, lo cual permite establecer con precisión una relación

lineal dosis-efecto. Además de esto, y al contrario que sucedía con los biomarcadores basados en citogenética, el análisis de foci no requiere de largos cultivos de las muestras obtenidas antes de poder ser analizadas. También cabe destacar que el recuento de foci es un proceso que puede ser altamente automatizado, eliminando la necesidad de personal especialmente entrenado para su detección y la variabilidad en el criterio de conteo que pueda tener uno o más investigadores (Raavi et al., 2021). Entre las limitaciones de esta técnica está que su aplicación está solo indicada a análisis realizados inmediatamente después de la exposición a RI.

Por último, se pueden considerar como marcadores de exposición a las RI, las variaciones en la capacidad de proliferación (es decir, la capacidad reproductiva de las células) y la viabilidad celular (medida en porcentaje de células supervivientes y metabólicamente activas después de una exposición). La proliferación post-irradiación se suele analizar mediante la aplicación del ensayo clonogénico, aunque los resultados de éste se pueden ver afectados por las diferencias en radiosensibilidad intrínsecas que pueden mostrar diferentes líneas celulares, además de requerir células diferenciadas para poder llevarse a cabo (Stewart y Dörr, 2009). Por lo que respecta a la viabilidad celular, puede ser evaluada mediante el uso de técnicas tales como el ensayo con MTT, una técnica de aplicación rápida que permite la cuantificación de la viabilidad celular mediante el uso de espectrofotometría (Murad et al., 2018).

1.5. Radioterapia

En la actualidad, el cáncer es una de las principales causas de defunción a nivel mundial, con una estimación en el 2020 de 9,89 millones de fallecidos y 18,09 millones de nuevos casos informados a nivel mundial según datos de la International Agency for Research on Cancer (IARC, 2021). Con el fin de tratar neoplasias, ya sea con un objetivo curativo o paliativo, aproximadamente un 60% de los pacientes se someten a tratamiento con radioterapia, ya sea aplicado de manera individual o en conjunción con cirugía o quimioterapia (Atun et al., 2015). Los principales métodos de administración de radioterapia son la braquiterapia

(cuando la radiación es aplicada en el interior del organismo, como en el caso de neoplasias de próstata o de origen ginecológico) y la irradiación externa mediante haces de alta energía dirigidos a la zona de localización del tumor (Baskar et al., 2012).

Desde el descubrimiento en 1895 de los rayos X por parte de Wilhelm Röntgen y su primer uso terapéutico un año más tarde por parte de Emil Grubbe, el campo de la radioterapia ha estado en constante evolución. No fue, sin embargo, hasta la década de los 30 del siglo XX que su aplicación, especialmente en forma de radiación interna (braquiterapia), se fue extendiendo. Las décadas de los 60, 70 y 80 trajeron consigo avances en el tratamiento del cáncer de tejidos internos, con máquinas capaces de emitir rayos X o γ de mayor energía. No obstante, el avance más importante de los 70 y 80 fue la llegada de dispositivos capaces de hacer uso de haces de protones gracias al uso de aceleradores asistidos por ordenador, permitiendo un mayor control de la aplicación estos haces sobre tejidos tumorales. Los 90 y la llegada del siglo XXI fueron el marco de la introducción de nuevas técnicas como la radioterapia estereotáctica, de alta precisión, y la radioterapia adaptativa, guiada por imágenes (Gianfaldoni et al., 2017). Los últimos avances en radioterapia permiten la aplicación del tratamiento con precisión milimétrica gracias a técnicas tales como la visualización por resonancia magnética o la tomografía por emisión de positrones, anexadas a aceleradores lineales, o las unidades de tratamiento mediante el denominado "bisturi" de rayos gamma, que mediante una técnica llamada radiocirugía estereotáctica, que emplea múltiples haces de radiación, permiten administrar dosis elevadas de radiación en volúmenes pequeños (Chandra et al., 2021).

A pesar de los numerosos avances en el campo de la radioterapia, tanto en su efectividad como en su precisión, existe un problema intrínseco a la naturaleza de este tipo de tratamiento que no ha podido ser erradicado, la aparición de efectos secundarios. Estos pueden variar desde la dermatitis, la fatiga y la depresión hasta enfermedades cardiovasculares (Berkey, 2010) o la aparición con el tiempo de tumores secundarios radioinducidos.

1.5.1. Radiosensibilización y radioprotección

Con el objetivo de minimizar la aparición de efectos secundarios adversos, o de aumentar el efecto de la radiación sobre tejidos tumorales, se han desarrollado agentes con efectos radioprotectores o radiosensibilizadores que se pueden administrar en concomitancia con la radioterapia. Aunque estos agentes muestran resultados cada vez más prometedores todavía no son aplicados de manera extensiva.

Los agentes radioprotectores actúan reduciendo el daño producido a las células sanas tras la irradiación, limitando los efectos de las RI sobre el DNA, principalmente provocados por la aparición de ROS al interactuar la radiación con el agua intracelular. La acción de este tipo de agentes no es un descubrimiento reciente; ya en 1972 Roots y Okada publicaron un estudio pionero en el que describieron que el uso de algunos alcoholes y tioles podía proteger una fracción de hasta el 70% del DNA de los efectos de las RI (Roots y Okada, 1972). Sin embargo, mostrar dicha capacidad de protección del DNA no es suficiente para utilizar un compuesto como agente radioprotector, también debe cumplir con una serie de requisitos. El agente debe ser capaz de proteger los tejidos sanos sin proporcionar protección a los tejidos tumorales objetivo del tratamiento, de manera que el potencial terapéutico no se vea afectado. Además, el agente debe poder ser administrado de manera mínimamente intrusiva y con la menor toxicidad derivada posible (Citrin et al., 2010). A pesar de que la aplicación de los radioprotectores no forme todavía parte del protocolo estándar del tratamiento con radioterapia, hay agentes tales como la amifostina que ya están usando en un ámbito clínico de manera limitada (Xunclà et al., 2008; Kamran et al., 2016), mientras que otros como el resveratrol, los nitróxidos o el CBLB502 están mostrando resultados positivos en estudios preliminares (Smith et al., 2017).

Al contrario que los radioprotectores, los agentes radiosensibilizadores actúan aumentando el nivel de ROS producidos por la radiación para causar daño al DNA de los tejidos tumorales. Agentes como el oxígeno hiperbárico (Bennett et al., 2005), la nicotinamida y el carbógeno (Raviraj et al., 2014) se han estudiado en ensayos clínicos. No obstante, los radiosensibilizadores tienen una limitación

importante. Su distribución inespecífica por todo el organismo puede comportar que el efecto sensibilizador no se limite sólo al área del tejido tumor, sino que afecte también a tejidos sanos. Es por este motivo que el desarrollo de nuevas estrategias que faciliten la distribución y acumulación de los radiosensibilizadores en el tejido objetivo es necesario.

1.5.1.1. Nanopartículas como radiosensibilizadores

Una posible estrategia para radiosensibilizar de manera específica el tejido tumoral es el uso de nanopartículas. Las nanopartículas se acumulan de manera natural en tejidos tumorales gracias a la mayor permeabilidad y capacidad de retención provocada por la formación imperfecta del endotelio de los vasos sanguíneos durante la angiogénesis tumoral (Fang et al., 2011). La acumulación de estas partículas en los tejidos tumorales puede además potenciarse mediante la aplicación de metodologías de “targeting” activo, como puede ser la funcionalización de la superficie de las partículas con moléculas que puedan ser reconocidas por los receptores de membrana de las células diana (Li, 2014). La importancia de las nanopartículas como agente radiosensibilizador ha ido creciendo con el paso del tiempo, y su potencial terapéutico ha sido descrito extensamente (Mi et al., 2016; Rosa et al., 2017; Borran et al., 2018; Chen et al., 2020; Penninckx et al., 2020).

No todos los materiales con que se pueden hacer nanopartículas presentan la misma eficiencia como radiosensibilizadores ni reaccionan de igual manera ante la radiación. Los materiales formados por elementos con un número atómico (Z) elevado, al ser irradiados tienen una capacidad de absorción energética superior a la del agua (Penninckx et al., 2020). La potencialidad de utilizar este tipo de materiales no es algo nuevo, pues hay estudios, publicados hace más de 40 años, describiendo sus efectos (Matsudaira et al., 1980). En ese estudio, Matsudaira y su equipo observaron cómo la aplicación de un medio de contraste de yodo ($Z=53$) en los cultivos celulares pre-irradiación con rayos X inducía un efecto radiosensibilizador al aumentar la capacidad de absorción energética, provocando

un aumento en la aparición de anomalías cromosómicas y una disminución en la viabilidad celular.

El oro, con un número atómico de 79, es uno de los principales materiales utilizados en el desarrollo de nanopartículas con fines radiosensibilizadores. El uso de las partículas de oro con este objetivo fue descrito por primera vez in vivo por James Hainfeld y colaboradores en 2004. Al inyectar por vía intravenosa partículas de 1,9 nm de diámetro en ratones portadores de carcinomas mamarios subcutáneos consiguió que el volumen de los tumores al cabo de un mes disminuyese hasta ser casi imperceptible, mientras que los tumores de los ratones que sólo habían sido tratados con radiación, al cabo de un mes y medio, siguieron aumentando su tamaño hasta una media de 5 veces el tamaño anterior al tratamiento. Además de la reducción del volumen tumoral, se observó un aumento del 60% en la supervivencia al cabo de un año en los ratones tratados con nanopartículas y radiación respecto a aquellos ratones que sólo habían sido tratados con radiación. (Hainfeld et al., 2004).

Una de las principales características del oro al interaccionar con radiaciones es su alta capacidad de absorción fotónica, 100 veces superior a la del agua, lo cual provoca una emisión de electrones de baja energía con el potencial de maximizar el daño provocado por las RI en el DNA. El incremento en el efecto de una dosis concreta de radiación en presencia de nanopartículas de oro (GNPs) recibe el nombre tasa de aumento de sensibilización (SER, por sus iniciales anglosajonas), de manera que la acumulación de GNPs en tejidos tumorales tiene el potencial de inducir un efecto de mejora diferencial (Rosa et al., 2017), permitiendo que dosis más bajas de radiación den lugar al mismo efecto que normalmente sólo se podría conseguir con dosis más altas (Herold et al., 2000; Regulla et al., 2002). Se ha descrito que la SER inducida por las GNPs es mayor a la esperada teniendo en cuenta sus características físicas (Penninckx et al., 2020; Butterworth et al., 2012; Schuemann et al., 2020). Además, el efecto radiosensibilizador de las GNPs parece estar influenciado por diversos factores, tales como pueden ser su tamaño y forma. Precisamente el tamaño de las partículas afecta a la capacidad de emisión de electrones de baja energía, habiéndose descrito que cuanto mayor es el diámetro de GNPs esféricas, menor es esta emisión (McMahon et al., 2011). También debe

tenerse en cuenta que el diámetro de las partículas no sólo afecta a nivel energético, sino que puede influir en la capacidad de internalización de éstas por parte de las células, habiéndose descrito que las GNPs de 50 nm de diámetro presentan mayor internalización que aquéllas de 14 o 74 nm (Chithrani et al., 2010).

Es de especial consideración la capacidad de acumulación de las GNPs en el tejido diana, donde el efecto radiosensibilizador pueda ser más pronunciado, discriminando los tejidos sanos. Para ello, como hemos comentado, no solo es importante aprovechar las deficiencias del tejido vascular que permiten un mayor acúmulo de GNPs en tejidos tumorales, sino que también es importante que sean internalizadas por estas células. Además, dado que el efecto radiosensibilizador de las GNPs es debido a la mayor formación de ROS en comparación a la que se obtendría con un tratamiento de radioterapia en su ausencia, es de esperar que la presencia intracelular de GNPs propicie un mayor efecto radiosensibilizador que si se encontrasen en el medio extracelular, por la mayor facilidad de las ROS a interaccionar con el DNA e inducir DSB (Taggart et al., 2016; Penninckx et al., 2018; Penninckx et al., 2019).

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis doctoral es determinar el efecto radiosensibilizador de nanopartículas de oro esféricas de 50 y 100 nm de diámetro funcionalizadas de manera específica para interactuar con células de las líneas Caco2 y SKBR3.

Este objetivo queda concretado en los siguientes:

1. Determinar las características de las líneas celulares que puedan influenciar el análisis de la radiosensibilización.

- 1.1. Comprobar la expresión de receptores de membrana específicos de las células de las líneas Caco2 y SKBR3, que puedan utilizarse como diana de las funcionalizaciones de superficie de las nanopartículas de oro.
- 1.2. Analizar la ploidía y la estabilidad cromosómica estructural de las líneas celulares Caco2 y SKBR3.
- 1.3. Determinar el potencial ζ de las nanopartículas de 50 y 100 nm para evaluar el posible efecto de las cargas superficiales en la internalización.
- 1.4. Evaluar cualitativamente la internalización de las nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar de 50 y 100 nm por las células Caco2 y SKBR3.

2. Evaluar el efecto radiosensibilizador de las nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar

- 2.1. Evaluar la inducción de roturas de doble cadena del DNA a diferentes tiempos post-irradiación y diferentes tratamientos con nanopartículas de oro (funcionalizadas, sin funcionalizar y sin ellas), mediante el análisis de foci de γ -H2AX.
- 2.2. Evaluar la viabilidad celular y la tasa de mejora de sensibilización tras la irradiación a una dosis de 3 Gy en ausencia o presencia de tratamiento con nanopartículas de oro (funcionalizadas o no) de 50 y 100 nm.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Líneas celulares

Para la realización de la presente investigación, se utilizaron dos líneas celulares diferentes: Caco2, derivada de células de adenocarcinoma de colon (ATCC, Manassas, VA, EEUU), y SKBR3, derivada de adenocarcinoma de mama (ATCC). Cada una de ellas fue cultivada con un medio de cultivo concreto: Eagle's Modified Enriched Medium (EMEM, ATCC) para Caco2 y McCoy's 5A Medium (ATCC) para SKBR3, suplementados con suero bovino fetal (SBF, Biowest, Nuaille, Francia) al 20 y 10%, respectivamente. Los cultivos celulares, siempre de 5 mL, fueron mantenidos en incubador en unas condiciones de 37°C a una concentración de CO₂ del 5%.

Para el cálculo del *population doubling time* (PDT), se realizaron 2 cultivos distintos por línea celular, sembrados a una concentración inicial conocida ($1 \cdot 10^5$ células·mL⁻¹). En ambas líneas, con el primer cultivo se realizó un recuento celular a las 24 h, mientras que el segundo se mantuvo en crecimiento hasta alcanzar una confluencia de, aproximadamente, el 80%, momento en el que se realizó el recuento celular final. El PDT medio de cada línea fue calculado después de realizar 3 réplicas distintas del procedimiento para cada línea celular. En todos los casos, el proceso de manipulación para realizar el recuento fue el siguiente: a los cultivos se les retiró el medio de cultivo y se lavaron con 10 mL de solución salina HBSS (Biowest) sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ durante 1 min. Una vez eliminada la solución salina, los cultivos se tripsinizaron con 1 mL de tripsina-EDTA 1X (Biowest) durante 3 min, tras los cuales se añadieron 10 mL de medio de cultivo para detener el proceso de tripsinización. Las células fueron teñidas con azul de tripano (Sigma-Aldrich, Madrid, España) para distinguir las viables de las no viables y se realizó el recuento con microscopía óptica con la ayuda de un hemocitómetro (Sigma-Aldrich). Los PDT obtenidos fueron de 68 para Caco2 y de 63 h para SKBR3.

3.2. Expresión de receptores

Las líneas celulares utilizadas en el presente estudio fueron escogidas debido a la expresión de receptores de membrana EpCam en Caco2, y TfR en SKBR3. Estos receptores son buenas dianas para la direccionalización de nanopartículas específicamente funcionalizadas. Para comprobar la expresión de estos receptores, inicialmente se llevó a cabo una detección de estos mediante inmunofluorescencia. Los anticuerpos primarios utilizados fueron Rabbit Anti-EpCam (cat. Ab71916, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y Mouse Anti-TfR (cat. ab9179, Abcam) para Caco2 y SKBR3 respectivamente. Los anticuerpos secundarios empleados, marcados con señales fluorescentes, fueron Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor® 488 (cat. ab150077, Abcam) y Goat Anti-Mouse IgG H&L Alexa Fluor® 488 (cat. ab150113, Abcam) para Caco2 y SKBR3 respectivamente.

Para realizar la inmunodetección, los cultivos celulares fueron lavados y tripsinizados siguiendo el mismo proceso descrito en el anterior apartado. A continuación, las células fueron centrifugadas y, tras el descarte del medio de cultivo, resuspendidas en 1X PBS. En un citocontenedor (Shandon, Thermo Scientific, Madrid, España), se colocó el volumen necesario para tener aproximadamente 35.000 células y se centrifugaron usando una centrífuga Cytospin (Cytospin 3, Shandon, Thermo Scientific), utilizando un portaobjetos con recubrimiento de polilisina. Tras la centrifugación las células se fijaron aplicando formaldehído al 2%. Tras 10 min de actuación del formaldehído, los portaobjetos se lavaron con 1X PBS y las células fijadas se permeabilizaron durante 15 min utilizando una solución de 1X PBS/0,5% Triton-100 a 4°C. Tras la permeabilización las muestras se lavaron con 1X PBS y posteriormente fueron tratadas con una solución bloqueadora (1X PBS/0,1% Tween20/2% SBF) durante 30 min. Los anticuerpos primarios se diluyeron hasta alcanzar una proporción 1:200 en la solución de bloqueo anteriormente descrita. 10 µL de los anticuerpos diluidos se aplicaron a las respectivas muestras, que se incubaron durante la noche en una cámara húmeda a 4°C. Una vez finalizada la incubación, las muestras se lavaron por triplicado en una solución de 1X PBS/0,1% Tween20 en cubeta de tinción

vertical durante 5 min con el fin de eliminar cualquier posible exceso de anticuerpo primario. Tras los lavados, 10 μL de los anticuerpos secundarios se aplicaron, diluidos en solución de bloqueo a una concentración de 1:500 en el caso del anticuerpo Goat Anti-Rabbit, y 1:1000 en el caso del Goat Anti-Mouse. Las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se lavaron en PBS/0,1% Tween20, tal y como se ha descrito en el paso anterior. Por último, a las muestras se les añadió 5 μL de Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Barcelona, España) con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) como contratinción a una concentración de 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las muestras se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Axiolmager.Z2, Zeiss, Oberkochen, Alemania).

3.3. Caracterización citogenética

Con el fin de determinar la estabilidad genómica de las líneas celulares empleadas, se realizaron dos técnicas de caracterización citogenética. En primer lugar, se analizó el número de cromosomas en 100 células de cada línea y, para comprobar si había presencia de aberraciones cromosómicas inestables, se llevó a cabo una hibridación *in situ* fluorescente con sondas PNA pancentromérica y pantelomérica. En ambos casos se utilizaron cultivos en fase de crecimiento exponencial tratados con colcemid a una concentración final de 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ durante 4 h a 37°C. Tras este tiempo, los cultivos fueron centrifugados y tratados con una solución hipotónica de KCl a una concentración de 0,075 M durante 10 min a 37°C. Tras el tratamiento con la solución hipotónica las células fueron fijadas con solución Carnoy (1 ácido acético:3 metanol) y colocadas en portaobjetos. Para el análisis del número de cromosomas se llevó a cabo una tinción uniforme aplicando colorante de Leishman (Sigma-Aldrich) diluido al 20% en 1X PBS (Sigma-Aldrich).

En el caso de la hibridación *in situ*, las muestras se trataron con una solución de HCl-Pepsina al 0,025% (Sigma-Aldrich) durante 10 min a temperatura ambiente, lavadas dos veces con 1X PBS durante 5 min, fijadas con formaldehído 4%-1X PBS, y lavadas de nuevo con 1X PBS tres veces, 5 min cada vez. A continuación, las muestras se deshidrataron en una serie de etanoles a diferentes

concentraciones (70%, 85% y 100%, 5 min en cada uno) y secadas al aire. Paralelamente se prepararon las sondas de DNA. Para cada portaobjeto se prepararon 20 μL de solución de hibridación (1% TRIS 1 M/8,56% Tampón MgCl_2 /70% Formamida desionizada/5% Agente bloqueador NEN/1,44% H_2O destilada) a la que se le añadió sonda PNA pancentromérica (marcada con FITC) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) a concentración final de 0,6 μM y sonda PNA pantelomérica (marcada con Cy3) (Applied Biosystems) a concentración final 0,4 μM . Una vez concluida la preparación de las sondas, 20 μL de solución se aplicaron sobre las muestras, a las que se colocó un cubreobjetos. El DNA de las células y el de las sondas se desnaturalizó durante 3 min a 80 °C y se hibridó durante 2 h a 37°C. Tanto para la desnaturalización como para la hibridación se utilizó el sistema Vysis HYBrite Hybridization (Abbott, Abbott Park, IL, EEUU). Al finalizar la hibridación, las muestras se lavaron dos veces en 70%formamida-1X PBS durante 15 min cada vez, y tres veces en una solución salina con Tris como buffer, 1X TBS/5% Tween20 (ambos compuestos de Sigma-Aldrich), durante 5 min cada vez. Por último, las muestras se deshidrataron en la misma serie de etanoles descrita con anterioridad y se les aplicó 20 μL de solución DAPI, descrita en el apartado 2.2, a modo de contratinción. Las muestras se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Axiomager.Z2, Zeiss).

3.4. Nanopartículas e internalización

En la realización de este estudio, se utilizaron GNPs de dos tamaños diferentes, 50 y 100 nm de diámetro. Las dos líneas celulares se trataron con GNPs estabilizadas con ácido cítrico (cat. BG-50 y BG-100, CD Bioparticles, Shirley, NY, EEUU), a partir de ahora referidas como nanopartículas de oro no funcionalizadas (NF-GNPs). Además, la línea celular SKBR3 también se trató con nanopartículas de oro funcionalizadas con transferrina (TfGNPs) (cat. GCT-50 y GCT-100, CD Bioparticles) y la línea Caco2 con nanopartículas de oro funcionalizadas con anticuerpo anti-EpCam (AntiEpCamGNPs), funcionalizadas con el kit de conjugación (cat. GCK-50 y GCK-100, CD Bioparticles) siguiendo el protocolo suministrado por la casa comercial.

Con el fin de medir el potencial ζ de las GNPs, estas se resuspendieron en agua y en medio de cultivo EMEM (antiEpCamGNPs) y McCoy's 5A (TfGNP). Antes de proceder al análisis, las soluciones se sonicaron durante 5 min (Fisherbrand FB15047, Fisher Scientific, Alemania) para conseguir muestras monodispersas. El potencial ζ fue medido mediante un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido).

El tratamiento con las GNPs se realizó incubando durante 24 h los cultivos celulares, en fase de crecimiento exponencial, con las partículas diluidas en 1X PBS a una concentración final de 7×10^5 nanopartículas·mL⁻¹. Ambas líneas se trataron con NF-GNP; las células Caco2 con AntiEpCamGNPs; y células SKBR3 con TfGNPs. En todos los casos utilizando partículas de 50 y 100 nm por separado. Pasadas las 24 h de incubación con GNPs, los cultivos fueron lavados con solución salina HBSS con el fin de eliminar las nanopartículas no internalizadas y el medio de cultivo fue renovado. La internalización celular de las GNPs se evaluó de manera cualitativa con la ayuda de un microscopio confocal de banda ancha (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) localizado en el Servicio de Microscopía de la Universidad Autónoma de Barcelona. Previamente a la visualización, los cultivos fueron tratados durante 5 min con CellMask™ Deep Red (cat. C10046, Thermofisher, Waltham, MA, EEUU) y Hoechst 33342 (cat. H3570, Thermofisher) para teñir membranas plasmáticas y núcleos, respectivamente. Debido a la naturaleza reflectiva de las GNPs no fue necesario aplicar una tinción adicional para visualizarlas.

3.5. Irradiación

La irradiación de los cultivos celulares se realizó 24 h después de finalizar la incubación en ausencia o presencia de nanopartículas (NF-GNPs en ambos cultivos, TfGNPs en el caso de SKBR3 y AntiEpCamGNPs en el caso de Caco2). La dosis empleada fue de 3 Gy de rayos gamma en todos los casos, aplicada con un irradiador de Cesio 137 que emite rayos gamma con una energía de 662 keV (IBL437C, CIS Biointernational, GIF Yvette, Francia), ubicado en la Unidad de Protección Radiológica de la Universidad Autónoma de Barcelona. La tasa de dosis

fue de $5,02 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$. Durante el transporte hacia y desde la Unidad de Protección Radiológica (unos 10 min en cada caso) las células fueron mantenidas en hielo, para evitar la actuación de los mecanismos de reparación del DNA. Se considera tiempo 0 el momento en que los cultivos celulares vuelven a introducirse en el incubador a 37°C .

3.6. Detección del daño en el DNA mediante el análisis de foci de $\gamma\text{-H2AX}$

Para evaluar el daño radio inducido en el DNA y la cinética de aparición y desaparición de foci de $\gamma\text{-H2AX}$, se establecieron cinco cultivos para cada línea celular y tamaño de partícula. Un cultivo se utilizó para determinar la frecuencia basal de foci de $\gamma\text{-H2AX}$, sin exposición a radiación, y los restantes cuatro cultivos para evaluar la frecuencia de foci de $\gamma\text{-H2AX}$ a diferentes tiempos postirradiación, 30 min, 2, 4 y 24 h. Para cada tiempo y tamaño de partículas se llevaron a cabo tres irradiaciones por línea celular, una sin tratamiento de GNPs, otra en presencia de NF-GNPs y una última con GNPs funcionalizadas (AntiEpCamGNPs y TfGNPs para Caco2 y SKBR3 respectivamente).

Para detectar los foci de $\gamma\text{-H2AX}$ se llevó a cabo una tinción mediante inmunofluorescencia, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2. Los anticuerpos utilizados esta vez fueron un anticuerpo primario Mouse Anti- $\gamma\text{-H2AX}$ (cat. Ab26350, Abcam) y un anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse marcado con Cy3 (cat. AP181C, Sigma-Aldrich). Después del marcado con anticuerpos y los correspondientes lavados, las muestras fueron deshidratadas en la serie de etanoles a concentraciones del 70%, 80% y 100%, durante 1 min en cada concentración. Por último, se aplicó una contratinción con DAPI para la detección de los núcleos.

La visualización de los foci de $\gamma\text{-H2AX}$ se llevó a cabo mediante el uso de un sistema de microscopía de fluorescencia automatizado (Metafer 4, Meta Systems, Altlussheim, Alemania) acoplado a un microscopio Zeiss Axio Imager.Z2 con plano-z motorizado (MetaSystems), y las imágenes obtenidas se procesaron con el

software MetaCyte, versión 3.10.2 (Meta Systems, Medford, MA, EEUU). En la captura de las señales fluorescentes se utilizó un objetivo 63X PlanApo y el filtro SpOr (canal rojo). Todas las señales de SpOr fueron obtenidas como un z-stack con un total de 10 planos focales y un z-step de 0,35 μm entre planos. Para cada una de las condiciones experimentales se llevó a cabo el recuento de unos 2000 núcleos utilizando un clasificador diseñado para este fin.

3.7. Ensayo de viabilidad celular con MTT

En una placa de 96 pocillos cada línea celular se sembró a una concentración de 4×10^4 células·mL⁻¹ y se cultivó durante 48 h antes de ser incubadas con NF-GNPs y GNPs funcionalizadas (AntiEpCamGNPs y TfGNPs para las líneas Caco2 y SKBR3, respectivamente) de 50 y 100 nm. También se realizó un cultivo control sin GNPs. 24 h después de la incubación con las GNPs, se renovó el medio de cultivo y las placas se irradiaron en las condiciones descritas con anterioridad. Transcurridas 24 h después de la irradiación se evaluó la viabilidad celular para cada condición experimental. Para ello se aplicó el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (cat. M2128, Sigma-Aldrich) (ensayo de viabilidad celular con MTT) siguiendo los protocolos estandarizados de la casa comercial. La viabilidad en todos los casos se calculó en base a la viabilidad observada en las muestras no tratadas. Para cada condición experimental se llevaron a cabo tres réplicas independientes en días separados.

3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda del software estadístico IBM SPSS Statistics 24. La normalidad de distribución de foci de γ -H2AX por célula fue comprobada en todos los casos utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors. Debido a que en todas las condiciones analizadas ninguna seguía una distribución normal, para comparar las frecuencias de foci la prueba estadística escogida fue el test U de Mann-Whitney. Las comparaciones de

viabilidad celular se realizaron aplicando el test ANOVA con comparación múltiple de Tukey. En todos los test realizados, los valores p menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización celular

4.1.1. Expresión de receptores de membrana

Las células Caco2 y SKBR3, tal y como era de esperar, expresaron en la membrana plasmática los receptores EpCam y TfR respectivamente (Figura 10). La confirmación de la expresión de estos receptores de membrana validó la elección de los anticuerpos utilizados para la funcionalización de las nanopartículas.

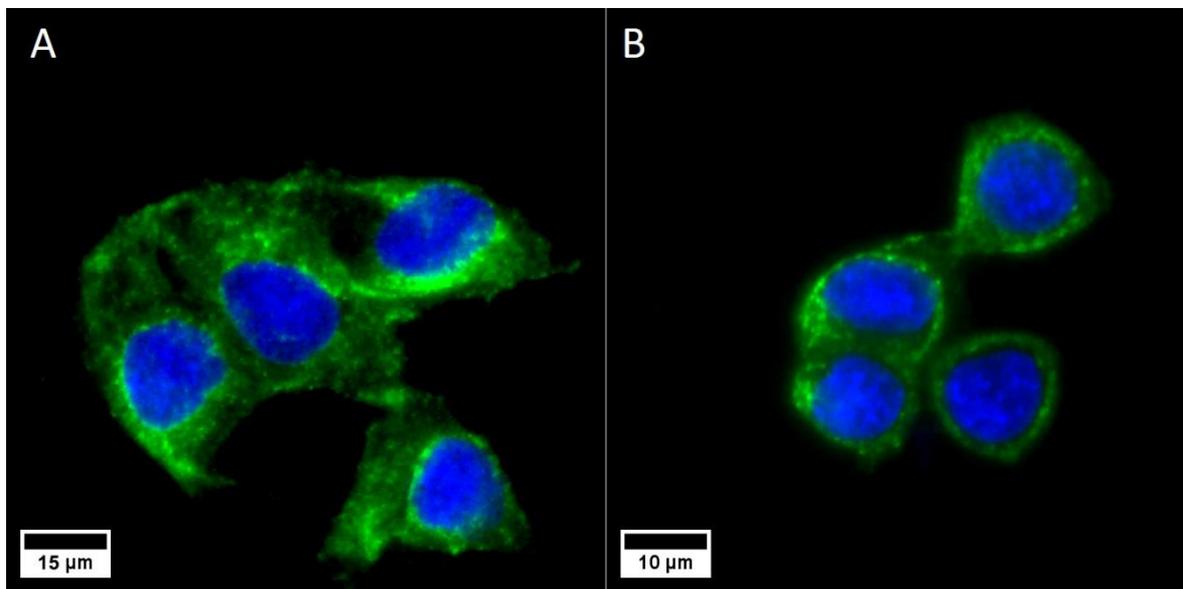


Figura 10. Imagen obtenida mediante microscopía de fluorescencia en la que se observan las células Caco2 expresando el receptor Epcam (A) y las células SKBR3 expresando el receptor TfR (B). Los núcleos de ambas líneas celulares fueron marcados en color azul (DAPI) y ambos receptores fueron reconocidos por anticuerpos específicos marcados en color verde (Alexa Fluor® 488, Abcam).

4.1.2. Caracterización citogenética

El análisis citogenético, mediante hibridación in situ fluorescente con sondas pancentromérica y pantelomérica (Figura 11), nos permitió determinar el número de cromosomas de cada una de las líneas celulares. En el caso de Caco2, el número de cromosomas osciló entre 46 y 107, y se observaron dos valores modales

de 58 y 86 cromosomas. Para SKBR3 el número de cromosomas osciló entre 46 y 87, y sólo se observó un valor modal de 76 cromosomas (Figura 12).

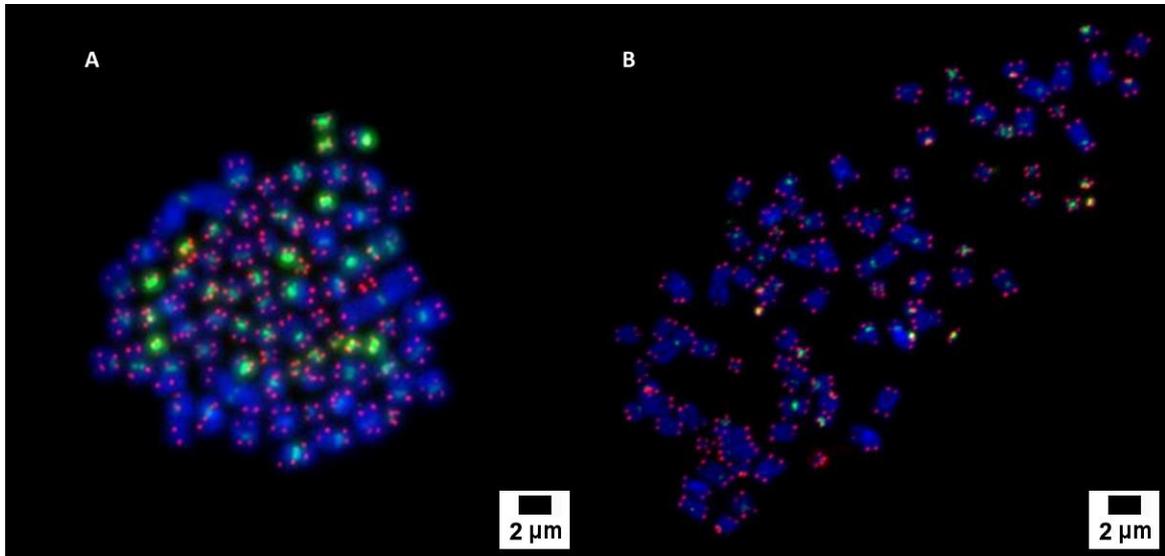


Figura 11. Metafases de Caco2 (A) y SKBR3 (B) teñidas mediante hibridación in situ fluorescente con sondas pancentromérica y pantelomérica. Las señales verdes observadas corresponden a los centrómeros, marcados mediante el fluorocromo FITC; las señales rojas corresponden a los telómeros, marcados con el fluorocromo Cy3.

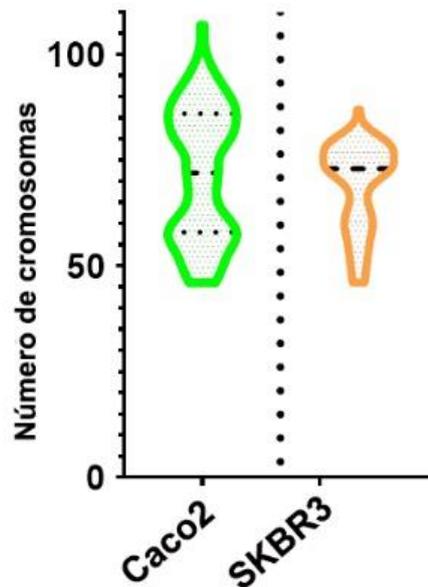


Figura 12. Gráfica *violin plot* que muestra la distribución del recuento cromosómico en ambas líneas celulares.

En el análisis citogenético, además del recuento de cromosomas, se analizaron 100 células de cada línea celular para detectar la posible presencia de cromosomas dicéntricos y fragmentos acéntricos. En la línea celular Caco2 se observó un cromosoma dicéntrico y un fragmento acéntrico en una única célula. En la línea SKBR3 todas las células analizadas presentaban un cromosoma dicéntrico, que se consideró estable. Este último resultado es consistente con los datos proporcionados por la casa comercial. La obtención de estos resultados permitió concluir que, a pesar de la variabilidad en cuanto al número de cromosomas, las líneas celulares eran estables en cuanto a la formación de alteraciones cromosómicas estructurales inestables.

4.1.3. Internalización de nanopartículas

4.1.3.1. Nanopartículas de 50 nm

Como puede observarse en las Figuras 13 y 14, en ambas líneas celulares la internalización de GNPs funcionalizadas (AntiEpCamGNPs para las células Caco2 y TfGNPs para SKBR3) parece más elevada que la internalización de GNPs no funcionalizadas (NF-GNPs). Al comparar las dos líneas celulares, las células SKBR3 muestran una mayor internalización de GNPs que las células Caco2. En SKBR3, además, las GNPs muestran una tendencia a formar agregados en el interior celular.

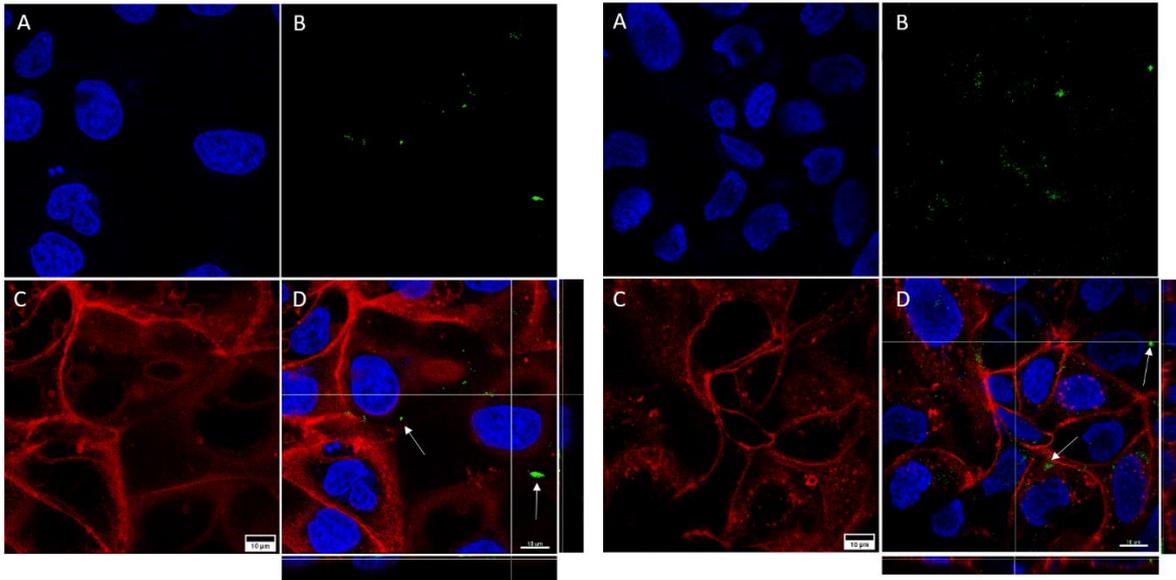


Figura 13. Capturas de células Caco2 obtenidas mediante microscopía confocal. Las imágenes muestran células tratadas con NF-GNPs (mitad izquierda) y células tratadas con GNPs funcionalizadas con el anticuerpo anti-EpCam (mitad derecha) de 50 nm de diámetro. Los núcleos (A) están marcados de color azul (Hoechst 33342), las membranas plasmáticas (C) están marcadas de color rojo (CellMask™ Deep Red). Las nanopartículas (B) son visualizadas como puntos verdes debido a que el software del microscopio asigna de manera artificial el color verde a la reflexión de las partículas. En las imágenes unificadas (D) y sus proyecciones ortogonales de las reconstrucciones del *z-stack* (esquinas inferiores derechas) puede observarse la localización intracelular de las GNPs (flechas blancas).

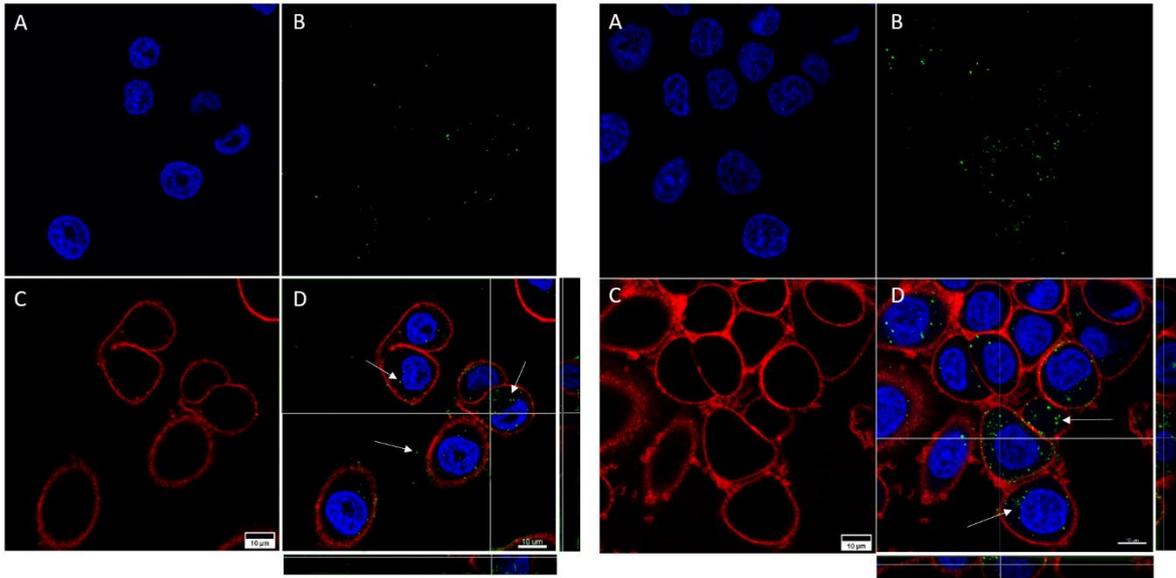


Figura 14. Capturas de células SKBR3 obtenidas mediante microscopía confocal. Las imágenes muestran células tratadas con NF-GNPs (mitad izquierda) y células tratadas con GNPs funcionalizadas con Tf (mitad derecha) de 50 nm de diámetro. Los núcleos (A) están marcados de color azul (Hoechst 33342), las membranas plasmáticas (C) están marcadas de color rojo (CellMask™ Deep Red). Las nanopartículas (B) son visualizadas como puntos verdes debido a que el software del microscopio asigna de manera artificial el color verde a la reflexión de las partículas. En las imágenes unificadas (D) y sus proyecciones ortogonales de las reconstrucciones del *z-stack* (esquinas inferiores derechas) puede observarse la localización intracelular de las GNPs (flechas blancas).

4.1.3.2. Nanopartículas de 100 nm

Para las nanopartículas de 100 nm de diámetro, tanto en células Caco2 como en células SKBR3, parece detectarse una mayor internalización de GNPs funcionalizadas respecto a NF-GNPs. Asimismo, también para las GNPs de 100 nm la internalización en las células SKBR3 parece superior a la de las células Caco2 (Figuras 15 y 16).

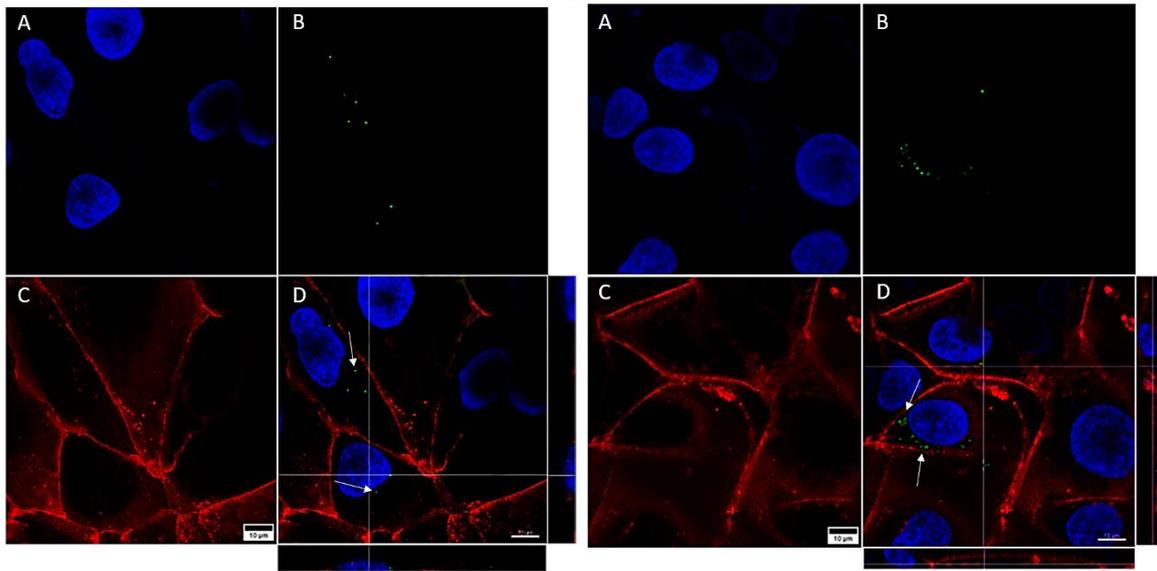


Figura 15. Capturas de células Caco2 obtenidas mediante microscopía confocal. Las imágenes muestran células tratadas con NF-GNPs (mitad izquierda) y células tratadas con GNPs funcionalizadas con el anticuerpo anti-EpCam (mitad derecha) de 100 nm de diámetro. Los núcleos (A) están marcados de color azul (Hoechst 33342), las membranas plasmáticas (C) están marcadas de color rojo (CellMask™ Deep Red). Las nanopartículas (B) son visualizadas como puntos verdes debido a que el software del microscopio asigna de manera artificial el color verde a la reflexión de las partículas. En las imágenes unificadas (D) y sus proyecciones ortogonales de las reconstrucciones del *z-stack* (esquinas inferiores derechas) puede observarse la localización intracelular de las GNPs (flechas blancas).

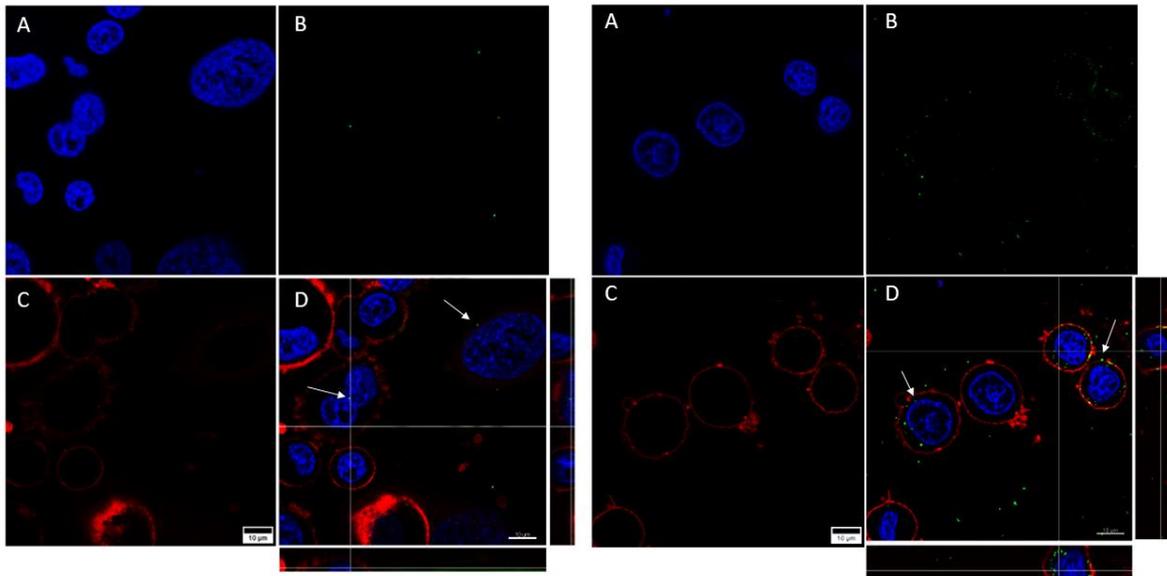


Figura 16. Capturas de células SKBR3 obtenidas mediante microscopía confocal. Las imágenes muestran células tratadas con NF-GNPs (mitad izquierda) y células tratadas con GNPs funcionalizadas con Tf (mitad derecha) de 100 nm de diámetro. Los núcleos (A) están marcados de color azul (Hoechst 33342), las membranas plasmáticas (C) están marcadas de color rojo (CellMask™ Deep Red). Las nanopartículas (B) son visualizadas como puntos verdes debido a que el software del microscopio asigna de manera artificial el color verde a la reflexión de las partículas. En las imágenes unificadas (D) y sus proyecciones ortogonales de las reconstrucciones del *z-stack* (esquinas inferiores derechas) puede observarse la localización intracelular de las GNPs (flechas blancas).

Cabe destacar que, en ambos tamaños de partícula y en las dos líneas celulares, se observa un rasgo en común: no se detectaron GNPs en el núcleo celular, localizándose únicamente en el citoplasma.

4.2. Potencial ζ de nanopartículas

El potencial ζ de las nanopartículas no funcionalizadas (NF-GNPs) y funcionalizadas (AntiEpCamGNPs y TfGNPs) de 50 y 100 nm de diámetro se midió diluyendo las GNPs tanto en agua como en medio de cultivo, utilizado en este último caso EMEM para Caco2 y McCoy's 5A para SKBR3. Como puede observarse (Figura 17), para ambos tamaños de partícula, el potencial ζ fue más electronegativo en la dilución con agua. Al evaluar la electronegatividad de las partículas diluidas en medio de cultivo se observa una menor electronegatividad y una mayor homogeneidad entre tipos de partícula.

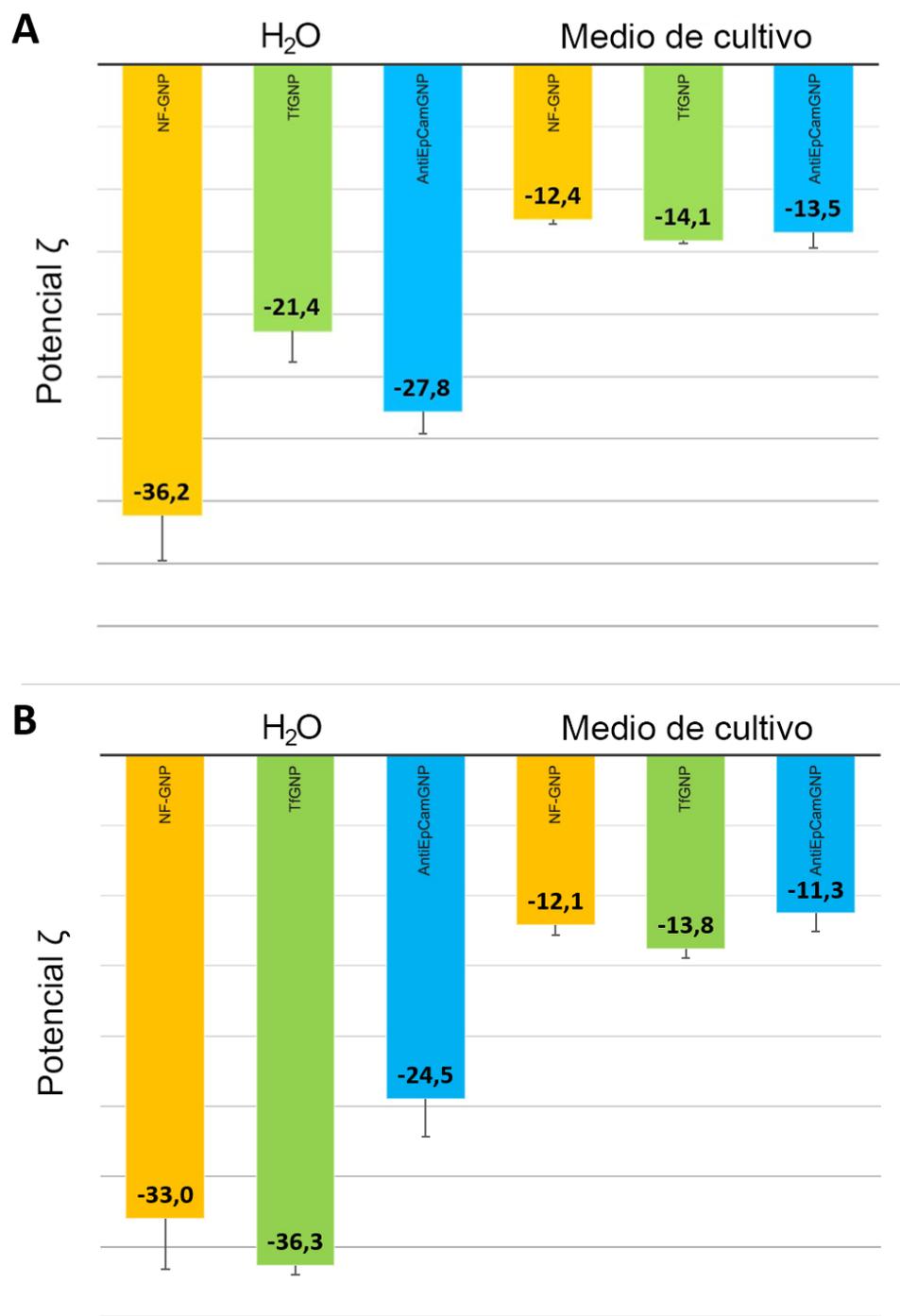


Figura 17. Potencial ζ (mV) de nanopartículas no funcionalizadas (NF-GNP) y funcionalizadas (TfGNP y AntiEpCamGNP) de 50 nm (A) y 100 nm (B) de diámetro. Las mediciones fueron realizadas con las GNP diluidas en agua y en medios de cultivo EMEM (AntiEpCampGNP) y McCoy's 5A (TfGNP).

4.3. Inducción y cinética de foci de γ -H2AX

Debido a la alta variabilidad observada en la ploidía en las dos líneas celulares, para cada tiempo post-irradiación y tratamiento con GNPs se decidió realizar el análisis de foci de γ -H2AX en 2000 núcleos. En la Figura 18 pueden verse imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de foci de γ -H2AX radioinducidos en células Caco2 y SKBR3.

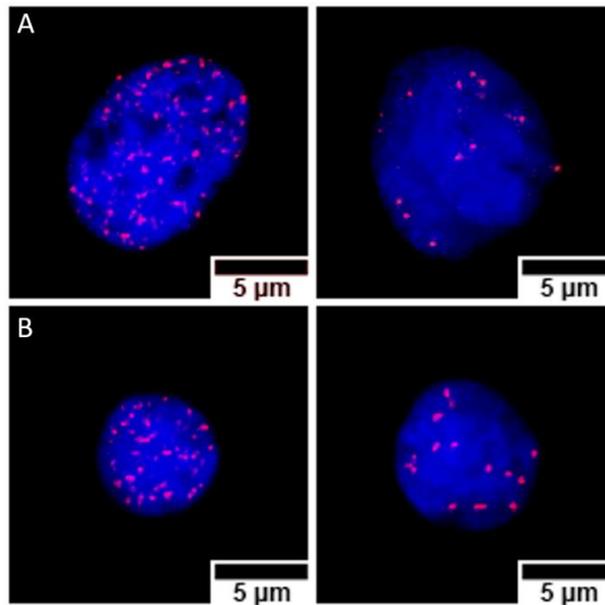


Figura 18. Núcleos de células Caco2 (A) y SKBR3 (B). Los foci de γ -H2AX, teñidos con cyanina 3 (Cy3), aparecen como puntos de color rojo, mientras que los núcleos están teñidos con DAPI y se observan de color azul. En ambas líneas celulares se muestran núcleos con números de foci elevados (izquierda) y bajos (derecha). Las imágenes se corresponden con muestras preparadas 30 min (en el caso de los recuentos altos) y 4 h (en el caso de los recuentos bajos) después de la irradiación a 3 Gy, tratadas con GNPs funcionalizadas con anti-EpCam (Caco2) o con transferrina (SKBR3).

4.3.1. Nanopartículas de 50 nm

En la línea celular Caco2, las frecuencias de foci más altas se observaron 30 min post-irradiación para todos los tratamientos con GNPs: $64,3 \pm 0,7$ (media \pm SEM) sin GNPs, $54,2 \pm 0,8$ con NF-GNPs, y $70,6 \pm 0,7$ con AntiEpCamGNPs (Figura 19). Con el paso del tiempo post-irradiación las frecuencias de foci fueron disminuyendo, hasta alcanzar, 24 h después de la irradiación, niveles similares a los de las células sin irradiar ($13,2 \pm 1,48$). Al comparar los distintos tratamientos, las frecuencias de foci en las células tratadas con AntiEpCamGNPs fueron significativamente superiores ($p < 0,001$) a las observadas en los otros tratamientos a los 30 min, 2 y 4 h, hasta volver a una frecuencia similar a la basal a las 24 h.

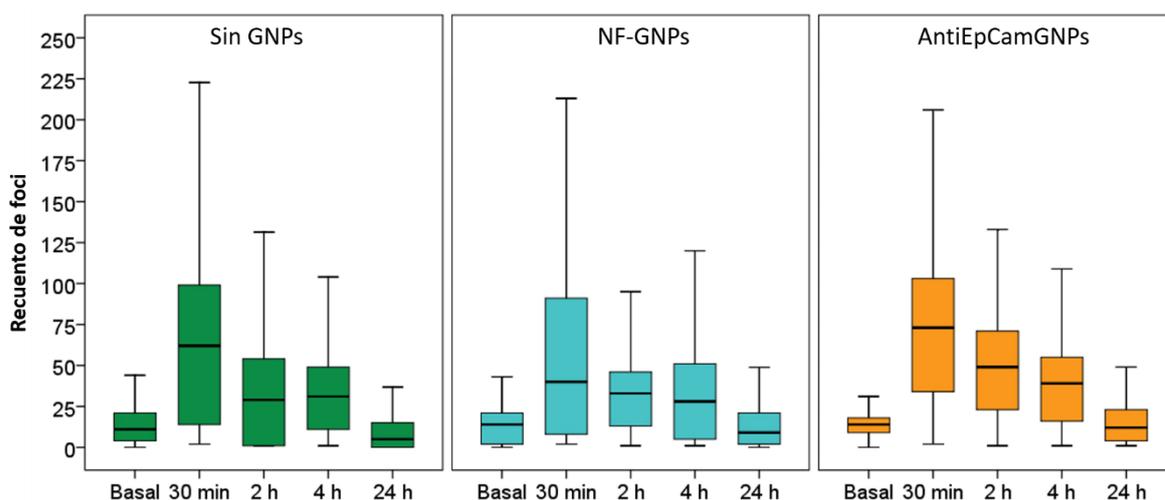


Figura 19. Gráficas *box plot* del número de foci por célula en Caco2, sin irradiar (Basal) y a diferentes tiempos (30 min, 2, 4 y 24 h) post-irradiación, en ausencia de GNPs (Sin GNPs) o en presencia de GNPs no funcionalizadas (NF-GNPs) o funcionalizadas con anti-EpCam (AntiEpCamGNPs) de 50 nm de diámetro. Las líneas horizontales en el interior de las cajas indican el valor de la mediana.

En las células SKBR3 las diferencias entre los distintos tratamientos fueron mucho más pronunciadas que en Caco2 (Figura 20). Las células irradiadas en ausencia de GNPs o en presencia de NF-GNPs mostraron una frecuencia baja de foci hasta las 2 h post-irradiación ($0,3 \pm 1,0$ y $1,3 \pm 1,0$ a las 2 h, respectivamente). Pasado este tiempo, se observó un aumento en la frecuencia de foci a las 4 h post-irradiación ($9,1 \pm 0,5$ y $17,4 \pm 0,8$, respectivamente), seguido de una disminución

hasta niveles basales transcurridas 24 h después de la irradiación. Sin embargo, las células irradiadas en presencia de TfGNPs mostraron una frecuencia máxima de foci a los 30 min post-irradiación ($36,1 \pm 0,7$), seguida de una disminución progresiva en el tiempo hasta las 24 h, pero siendo aún significativamente superior, $8,9 \pm 0,8$, a la frecuencia basal, $2,1 \pm 0,15$ ($p < 0,001$). De manera similar a lo que se observó en Caco2, en la línea SKBR3 tratada con TfGNPs la frecuencia de foci fue significativamente superior ($p < 0,001$) para todos los tiempos post-irradiación a la observada en los otros tratamientos (sin GNP o con NF-GNPs).

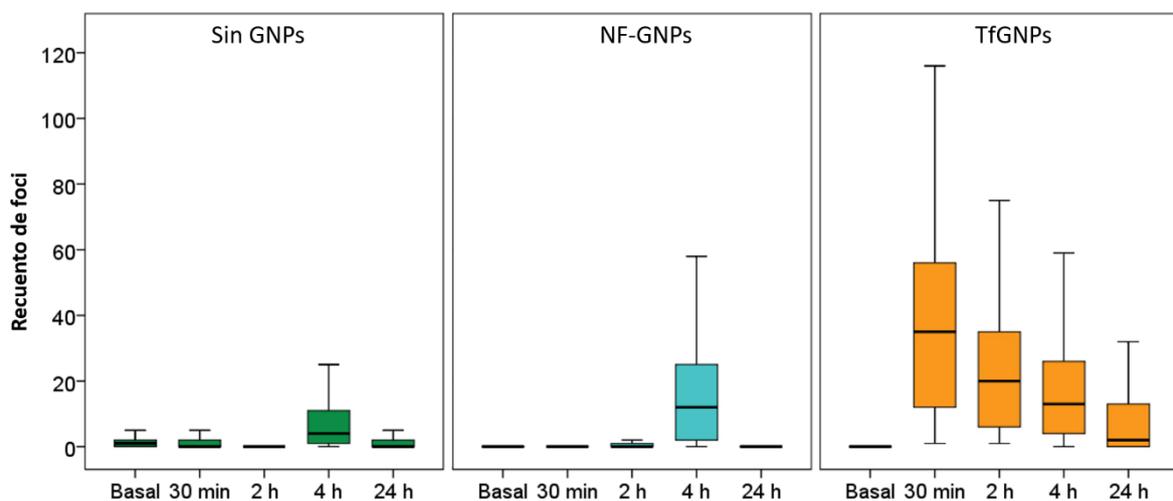


Figura 20. Gráficas *box plot* del número de foci por célula en SKBR3 antes (basal) y en diferentes tiempos (30 min, 2, 4 y 24 h) post-irradiación, en ausencia de GNPs (Sin GNPs) o en presencia de GNPs no funcionalizadas (NF-GNPs) o funcionalizadas con transferrina (TfGNP) de 50 nm de diámetro. Las líneas horizontales en el interior de las cajas indican el valor de la mediana.

La Tabla 1 muestra la tasa de incremento de las frecuencias de foci, definida como el cambio proporcional de la media de foci de un tratamiento al ser comparada con la media de otro tratamiento) de los distintos tratamientos en ambas líneas celulares. Como puede verse, las células irradiadas en presencia de partículas funcionalizadas presentan tasas superiores a 1 en todos los casos.

Tabla 1. Tasa de incremento de las frecuencias de foci. Las células Caco2 y SKBR3 fueron irradiadas a una dosis de 3 Gy en presencia de GNPs de 50nm de diámetro funcionalizadas (AntiEpCamGNPs y TfGNPs, respectivamente) y los resultados se compararon con los obtenidos tras la irradiación en ausencia de GNPs (Sin GNPs) o en presencia de GNPs no funcionalizadas (NF-GNPs) de 50 nm de diámetro.

Tiempo post-irradiación	AntiEpCamGNPs vs.		TfGNPs vs.	
	Sin GNPs	NF-GNPs	Sin GNPs	NF-GNPs
30 min	1,10	1,30	-	-
2h	1,46	1,55	-	-
4h	1,20	1,18	2,05	1,07
24h	1,87	1,18	4,98	22,57

Con el fin de comprobar si existían diferencias en la tasa de desaparición de foci con el tiempo postirradiación (*decay*), para cada tratamiento la media de foci en cada tiempo post-irradiación se ajustó a una función *one phase decay*. Para cada una de las condiciones experimentales, la función permite obtener una constante de *decay* y la estimación de la vida media de los foci (Tabla 2). En las células Caco2 la constante de la tasa de decaimiento es mayor en las células irradiadas en ausencia de GNPs que en las células tratadas en presencia de GNPs, siendo además la menor en células tratadas con AntiEpCamGNPs, lo que se relaciona con una vida media de los *foci* superior en las células tratadas con AntiEpCamGNPs que en los otros tratamientos. En las células SKBR3, debido al comportamiento de la cinética de aparición de foci, esta aproximación fue sólo posible para las células irradiadas en presencia de TfGNPs.

Tabla 2. Constante de *decay* (K) y vida media de los foci en células irradiadas a una dosis de 3 Gy en las tres condiciones experimentales: ausencia de GNPs (Sin GNPs), presencia de GNPs no funcionalizadas (NF-GNPs) y presencia de GNPs funcionalizadas específicamente (AntiEpCamGNPs y TfGNPs para Caco2 y SKBR3, respectivamente).

	Condiciones de irradiación	K (h⁻¹)	Vida media de los foci (h)
Caco2	Sin GNPs	0,35	2,00
	NF-GNPs	0,32	2,17
	AntiEpCamGNPs	0,28	2,44
SKBR3	Sin GNPs	-	-
	NF-GNPs	-	-
	TfGNPs	0,30	2,31

4.3.2. Nanopartículas de 100 nm

Al igual que sucedía con las GNPs de 50 nm, en las células Caco2 las frecuencias más elevadas de foci se observaron a los 30 min post-irradiación en todos los tratamientos aplicados (Figura 21): $64,28 \pm 1,11$ en ausencia de GNPs, $58,42 \pm 0,85$ en presencia de NF-GNPs y $65,06 \pm 0,35$ cuando las células estaban tratadas con AntiEpCamGNPs. Sin embargo, a las 4h postirradiación los valores más elevados de foci se observaron en las células no tratadas con GNPs ($31,99 \pm 0,62$).

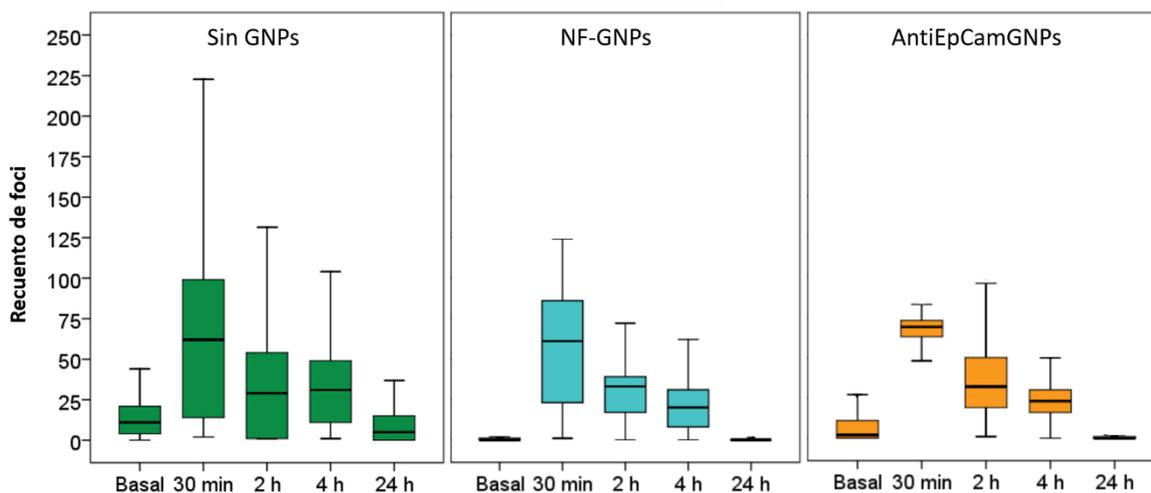


Figura 21. Gráficas *box plot* del número de foci por célula en Caco2 antes (Basal) y a diferentes tiempos (30 min, 2, 4 y 24 h) post-irradiación, en ausencia de GNPs (Sin GNPs) o en presencia de GNPs no funcionalizadas (NF-GNPs) o funcionalizadas con anti-Epcam (AntiEpCamGNP) de 100 nm de diámetro. Las líneas horizontales en el interior de las cajas indican el valor de la mediana.

En las células SKBR3 la aparición de foci y posterior decaimiento tras tratar las células con GNPs de 100 nm coincide con el observado con GNPs de 50 nm. Las células sin tratamiento y tratadas con NF-GNPs muestran un recuento de foci bajo durante las primeras 2 h (Figura 22), alcanzan su máximo a las 4 h ($9,06 \pm 0,36$ y $8,2 \pm 0,1$) y van disminuyendo hasta volver a niveles basales a las 24 h. Por otro lado, las células tratadas con TfGNP alcanzan su recuento máximo de foci a los 30 min ($20,11 \pm 0,61$) y presentan una disminución paulatina con el tiempo post-irradiación hasta las 24 h, en que el recuento de foci es de $4,78 \pm 0,1$, un valor significativamente superior al recuento basal ($2,1 \pm 0,15$). En todos los tiempos postirradiación, la frecuencia de foci en las células tratadas con TfGNP fue significativamente superior ($p < 0,001$) a la observada en los otros dos tratamientos.

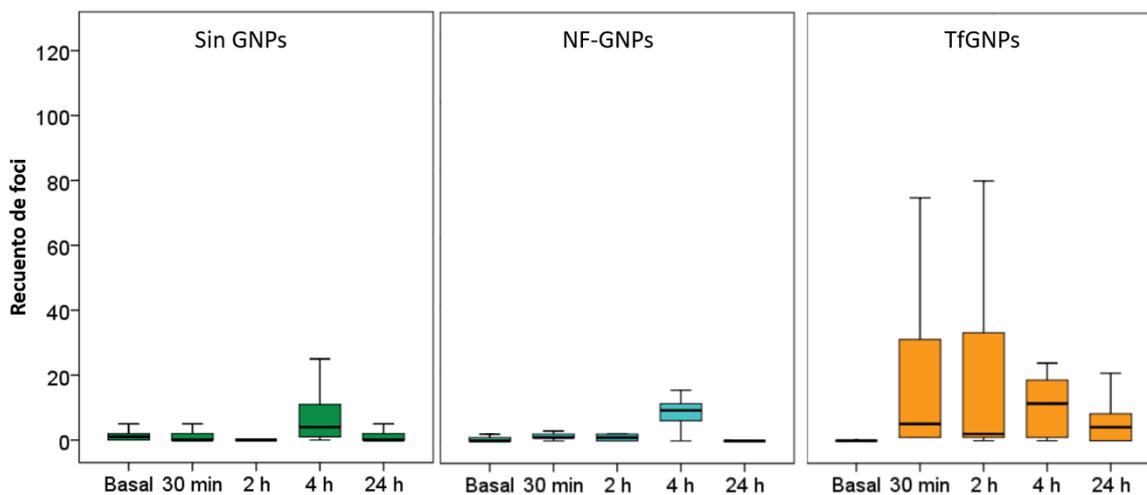


Figura 22. Gráficas *box plot* del número de foci por célula en SKBR3 antes (Basal) y a diferentes tiempos (30 min, 2, 4 y 24 h) post-irradiación, en ausencia de GNPs (Sin GNPs) o en presencia de GNPs no funcionalizadas (NF-GNPs) o funcionalizadas con transferrina (TfGNP) de 100 nm de diámetro. Las líneas horizontales en el interior de las cajas indican el valor de la mediana.

Los valores de la tasa de incremento de las frecuencias de foci (Tabla 3), de las nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo anti EpCAM en Caco2, fueron similares a los observados en ausencia de nanopartículas o con NF-GNPs, llegando a ser inferiores a los de la ausencia de GNPs a las 4 h post-irradiación. En lo relativo a SKBR3, las GNPs funcionalizadas con transferrina presentan valores muy superiores a 1 en todos los tiempos, menos a las 4 h, en que la diferencia es menos notable.

Tabla 3. Tasa de incremento de las frecuencias de foci. Las células Caco2 y SKBR3 fueron irradiadas a una dosis de 3 Gy en presencia de GNPs de 100 nm de diámetro funcionalizadas (AntiEpCamGNPs y TfGNPs, respectivamente) y los resultados se compararon con los obtenidos tras la irradiación en ausencia de GNPs (Sin GNPs) o en presencia de GNPs no funcionalizadas (NF-GNPs).

Tiempo post-irradiación	AntiEpCamGNPs vs.		TfGNPs vs.	
	Sin GNPs	NF-GNPs	Sin GNPs	NF-GNPs
30 min	1,01	1,11	8,41	13,50
2h	1,03	1,17	62,1	19,61
4h	0,68	1,04	1,15	1,27
24h	0,13	0,97	2,69	95,6

Al igual que en las células tratadas con GNPs de 50 nm, la constante de *decay* y la vida media de los foci para las células Caco2 (Tabla 4), mostró diferencias mínimas entre tratamientos. Para la línea SKBR3 sólo han podido realizarse los cálculos en presencia de TfGNPs, debido a la particular cinética en los otros dos tratamientos.

Tabla 4. Constante de *decay* (K) y vida media de los foci en células irradiadas a una dosis de 3 Gy en las tres condiciones experimentales: ausencia de GNPs (Sin GNPs), presencia de GNPs no funcionalizadas (NF-GNPs) y presencia de GNPs funcionalizadas específicamente (AntiEpCamGNPs y TfGNPs para Caco2 y SKBR3, respectivamente).

	Condiciones de irradiación	K (h ⁻¹)	Vida media de los foci (h)
Caco2	Sin GNPs	0,35	2
	NF-GNPs	0,37	1,9
	AntiEpCamGNPs	0,37	1,9
SKBR3	Sin GNPs	-	-
	NF-GNPs	-	-
	TfGNPs	0,23	3,07

La comparación estadística de las medias de foci obtenidas al irradiar las líneas celulares en presencia de GNPs de 50 nm o 100 nm evidenció diferencias entre ambos tamaños de nanopartículas. En Caco2, se observó que la frecuencia media de foci tras irradiar en presencia de las GNPs de 50 nm fue significativamente superior a la observada tras irradiar en presencia de GNPs de 100nm, para todos los tiempos y tipos de tratamiento (NF-GNPs y GNPs funcionalizadas) analizados ($p < 0,05$), con la excepción de la media a los 30 min de las NF-GNPs, en que la media de las GNPs de 100 nm ($58,42 \pm 0,85$) fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la de 50 nm ($54,23 \pm 0,82$).

En la línea SKBR3 las medias de foci basales de NF-GNPs y Tf-GNPs fueron significativamente superiores con las GNPs de 100 nm ($2,22 \pm 0,17$ y $0,33 \pm 0,03$, respectivamente) respecto a las de 50 nm ($0,08 \pm 0,01$ y $0,16 \pm 0,02$, respectivamente). Lo mismo se observó también a los 30 min post-irradiación en NF-GNPs, con una frecuencia media de foci significativamente superior en 100 nm ($1,49 \pm 0,03$) que en 50 nm ($0,62 \pm 0,86$). Sin embargo, a las 2 y 4 h de la irradiación, las frecuencias medias de foci en irradiaciones en presencia de GNPs de 50 nm fueron significativamente superiores a las de irradiaciones en presencia de GNPs de 100 nm. A las 24 h postirradiación las células tratadas con Tf-GNPs de 50 nm ($8,89 \pm 0,76$) mostraron una frecuencia media de foci superior a las células irradiadas en presencia de Tf-GNPs de 100 nm ($4,78 \pm 0,1$), pero la diferencia no fue significativa.

4.4. Ensayo de viabilidad celular con MTT

Para ambos tamaños de nanopartícula y líneas celulares, la viabilidad celular fue analizada 24 h post-irradiación a una dosis de 3 Gy mediante el ensayo con MTT.

4.4.1. Nanopartículas de 50 nm

En las dos líneas celulares, la viabilidad en ausencia de radiación no mostró diferencias significativas entre las células analizadas sin GNPs y las analizadas en presencia de GNPs no funcionalizadas y GNPs funcionalizadas. No obstante, en ambas líneas celulares, la mayor viabilidad se observó en ausencia de GNPs (Figura 23). Tras la irradiación, la viabilidad disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en todos los casos en relación al control no irradiado. Además, en ambas líneas celulares la disminución de la viabilidad fue más pronunciada en aquellas células tratadas con GNPs funcionalizadas, si bien sólo para Caco2 esta diferencia fue significativa ($p < 0,05$). Al comparar las dos líneas celulares, para todos los tratamientos las células SKBR3 mostraron viabilidades significativamente inferiores ($p < 0,05$) a Caco2.

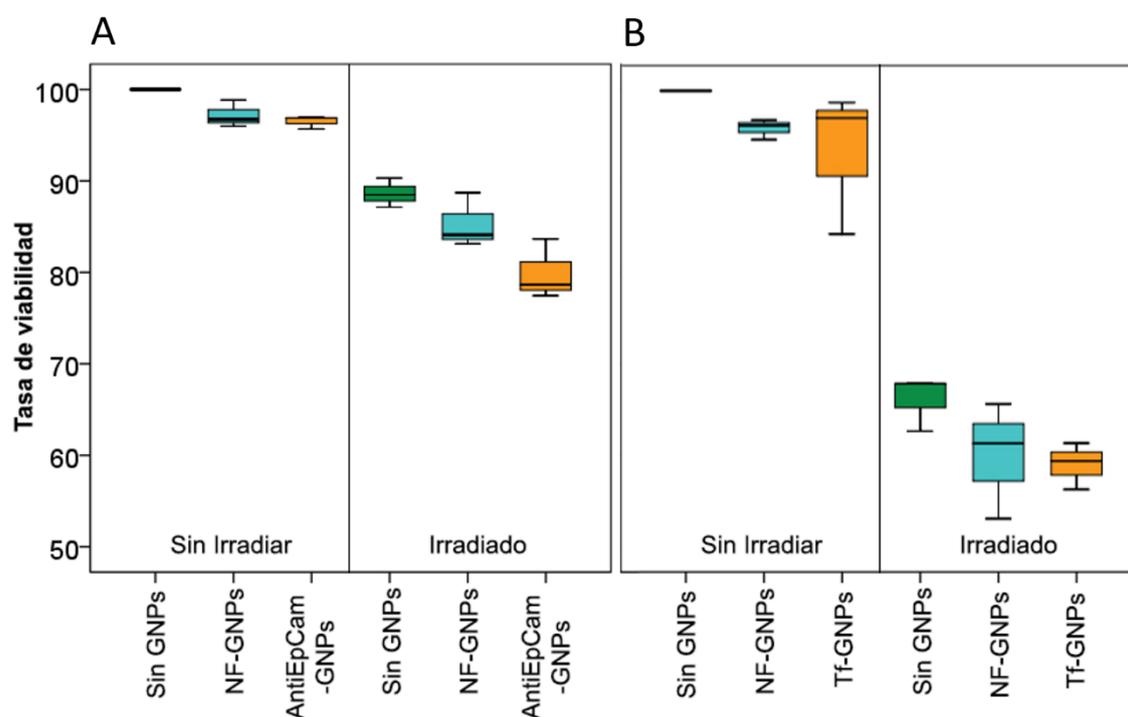


Figura 23. Viabilidad de las líneas celulares Caco2 (A) y SKBR3 (B). A la izquierda se muestran los valores sin irradiar y a la derecha a las 24 h después de la irradiación. De izquierda a derecha las cajas representan la viabilidad de las células en ausencia de GNPs (Sin GNPs), en presencia de GNPs no funcionalizadas (NF-GNPs) y en presencia de GNPs funcionalizadas (AntiEpCam-GNPs y Tf-GNPs, respectivamente).

4.4.2. Nanopartículas de 100 nm

Para las nanopartículas de 100nm se mantiene la misma tendencia observada en las nanopartículas de 50 nm (Figura 24), ausencia de diferencias significativas entre tratamientos antes de la irradiación, y tras la irradiación disminución estadísticamente significativa de la viabilidad ($p < 0,05$) en todos los casos. Asimismo, y para las dos líneas celulares, la viabilidad fue menor tras el tratamiento con GNPs funcionalizadas. A diferencia de lo observado en las GNPs de 50 nm, y en las dos líneas celulares, los tratamientos con GNPs funcionalizadas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los tratamientos con GNPs no funcionalizadas.

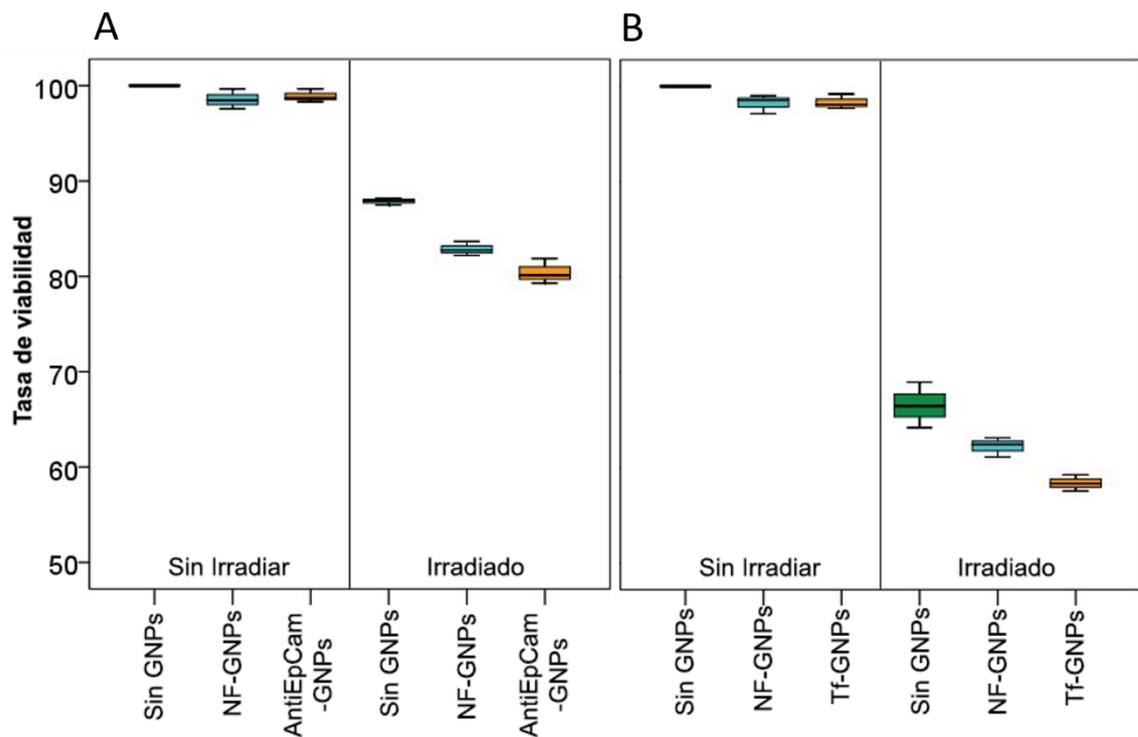


Figura 24. Viabilidad de las líneas celulares Caco2 (A) y SKBR3 (B). A la izquierda se muestran los valores sin irradiar y a la derecha a las 24 h después de la irradiación. De izquierda a derecha las cajas representan la viabilidad de las células en ausencia de GNPs (Sin GNPs), en presencia de GNPs no funcionalizadas (NF-GNPs) y en presencia de GNPs funcionalizadas (AntiEpCam-GNPs y Tf-GNPs, respectivamente).

Las medias de la viabilidad, obtenidas al tratar las líneas celulares con GNPs de 50 o 100 nm no mostraron diferencias significativas en ningún caso excepto en la línea Caco2. Además de las medias de viabilidad, para cada uno de los tratamientos se calculó la SER en base a la disminución del porcentaje de viabilidad postirradiación respecto a la viabilidad en ausencia de irradiación (Tabla 5). Los mayores valores de SER, es decir las mayores pérdidas de viabilidad, correspondieron en todos los casos a GNPs funcionalizadas de manera específica.

Tabla 5. Resumen de las medias de viabilidad postirradiación de los diferentes tratamientos con GNPs y sus correspondientes SER.

			Viabilidad (%)	SER
Caco2	50nm	NF-GNPs	85,32	1,17
		AntiEpcam	79,93	1,25
	100nm	NF-GNPs	82,86	1,21
		AntiEpcam	80,42	1,24
SKBR3	50nm	NF-GNPs	60	1,67
		Tf	59	1,70
	100nm	NF-GNPs	62,43	1,60
		Tf	58,38	1,71

5. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, el interés por mejorar los tratamientos terapéuticos para combatir el cáncer ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias que permitan una mayor eficiencia y rendimiento de los mismos. Una de las metodologías emergentes es el uso de nanopartículas de diferentes materiales que permitan la aplicación precisa de fármacos en los tejidos tumorales, o la radiosensibilización de estos tejidos. En relación al uso de nanopartículas como transportadoras de fármacos quimioterapéuticos, se ha descrito que permite mantener la estabilidad del fármaco *in vivo*, aumentar su disponibilidad y contribuir a su entrada en el tejido diana (Amreddy et al., 2018). Además de estas propiedades, se ha sugerido que el uso de nanopartículas también podría permitir la liberación selectiva del fármaco al someter el tejido a un estímulo externo, como los rayos X o ultrasonidos (Starkewolf et al., 2013, Tharkar et al., 2019). La composición y forma de las nanopartículas empleadas como transportadoras de fármacos es variada, desde nanopolímeros lipídicos a nanopartículas inorgánicas (Mitchell et al., 2021; Xiao et al., 2022; Zhang et al., 2023).

Otra aproximación al uso de nanopartículas en los tratamientos contra el cáncer, consiste en provocar muerte celular por la inducción de hipertermia mediante campo magnético en tejidos tratados con nanopartículas (Jordan et al., 2006; Lacovita et al., 2016; Gavilán et al., 2021). El uso de nanopartículas magnéticas también permite, utilizando un campo magnético de menor intensidad al utilizado para inducir hipertermia, dirigir las partículas de manera específica al tejido objetivo (Chertok et al., 2007; Chertok et al., 2008).

El uso de nanopartículas de metales de alto número atómico para incrementar el efecto de las RI en el tejido tumoral, es otra de las estrategias de aplicación de nanopartículas en este campo. Algunos de los metales estudiados por su potencial radiosensibilizador son: gadolinio ($Z=64$), bismuto ($Z=83$), hafnio ($Z=72$), platino ($Z=78$) (Retif et al., 2015; Babaye Abdollahi et al., 2021) y, el mismo que se ha utilizado en la presente tesis, oro ($Z=79$). La capacidad de las nanopartículas de oro de aumentar el efecto del daño radioinducido se ha demostrado tanto en modelos *in vitro* como en modelos animales (Hainfeld et al., 2004).

En la presente tesis, nuestro objetivo fue evaluar si el efecto radiosensibilizador de GNPs esféricas de 50 y 100 nm de diámetro era superior cuando las GNPs eran

funcionalizadas específicamente para interaccionar de manera activa con receptores de membrana de dos líneas celulares tumorales. La direccionalización específica de nanopartículas hacia células con determinados receptores se ha demostrado efectiva en condiciones de cultivo fluídicas, que simulan el torrente sanguíneo (Mora-Espí et al., 2019). Nuestros resultados parecen indicar, además, que cuando las nanopartículas son dirigidas mediante la funcionalización hacia determinados tipos celulares, su internalización por parte de las células se ve aumentada.

Cabe señalar que para evaluar el efecto radiosensibilizador de las GNPs se pueden utilizar diferentes aproximaciones metodológicas, tales como ensayos citogenéticos, de clonogenicidad, de viabilidad u otros. Es por ello que los valores de SER pueden ser diferentes según la metodología utilizada (Joiner y van der Koegel, 2018; Penninckx et al., 2020), tal y como se ha descrito previamente al comparar la efectividad biológica relativa de rayos X de diferentes energías (Verhaegen y Vral, 1994; Frankenberg et al., 2002; Frankenberg-Schwager et al., 2002; Schmid et al., 2002; Göggelman et al., 2003; Panteleeva et al., 2003; Slonina et al., 2003; Heyes y Mill, 2004; Gomolka et al., 2005; Mestres et al., 2008).

El ensayo clonogénico ha sido ampliamente empleado para valorar la pérdida de potencial reproductivo de una población celular después de una irradiación (Nuryadi et al., 2018; Oike et al., 2020). La principal limitación de este método está en las diferencias intrínsecas de supervivencia y capacidad proliferativa que pueden observarse entre líneas celulares (Stewart y Dörr, 2009; Huber et al., 2011). Los ensayos basados en análisis citogenéticos han sido también aplicados al estudio de la radiosensibilidad (Bailey y Bedford, 2006; Bakhmutsky et al., 2014; Borràs-Fresneda et al., 2016), siendo las alteraciones cromosómicas estructurales buenos marcadores para evaluar la toxicidad de las RI (Beaton et al., 2013).

En el presente trabajo hemos empleado dos metodologías principales para determinar el efecto radiosensibilizador de las GNPs: la detección de foci de γ -H2AX, como indicador del daño a nivel genético, y el ensayo de viabilidad celular con MTT. La γ -H2AX es la variante fosforilada de la histona H2AX, que aparece formando acumulaciones discretas (foci) alrededor de las DSBs inducidas por un agente clastógeno, en este caso las RI (Rogakou et al., 1999; Rothkamm y Löbrich,

2003; Ivashkevich et al., 2012). La detección de foci de γ -H2AX es una técnica ampliamente utilizada en la evaluación de radiosensibilidad (Bakhtmutsky et al., 2014; Willers et al., 2015; Borràs-Fresneda et al., 2016; van Oorschot et al., 2016; López et al., 2023; Widjaja et al., 2023). Una de las ventajas de esta metodología está en la capacidad de detectar los foci de manera casi inmediata después de una exposición a RI, mientras que otros biomarcadores como las alteraciones cromosómicas requieren que las células alcancen la fase de mitosis, obteniéndose los resultados después de que los mecanismos de reparación del DNA ya hayan actuado. Además, el análisis de foci de γ -H2AX se puede realizar a diferentes tiempos post-irradiación, permitiendo obtener la cinética de aparición y desaparición de foci, y por lo tanto inferir la velocidad de reparación del daño inducido en el DNA (Mariotti et al., 2013; Sharma et al., 2015; Belchior et al., 2022). Por lo que respecta al ensayo de viabilidad con MTT, éste permite un muestreo y cuantificación sencillos mediante espectrofotometría (Riss et al., 2013), sobre todo al compararlo con el ensayo clonogénico, que necesita más tiempo y es más laborioso. El ensayo de MTT se ha utilizado ampliamente para determinar el efecto citotóxico de numerosos compuestos y también de las RI (Zhang et al., 2010; Buch et al., 2012; Ghasemi et al., 2021).

5.1. Caracterización de las líneas celulares y nanopartículas

Con el fin de evaluar si las células utilizadas eran genéticamente inestables, se evaluó la estabilidad cromosómica de ambas líneas y, aunque el número cromosómico se mostró variable en ambas líneas celulares, no se observó ninguna célula con cromosomas a los que faltase la señal fluorescente correspondiente al telómero, indicando la ausencia de inestabilidad cromosómica estructural. La ausencia de algún telómero podría haber resultado en la formación de anomalías cromosómicas estructurales inestables que habrían ido perpetuándose en las líneas celulares en sucesivos ciclos de mitosis (Mathieu et al., 2004). La ausencia de cromosomas dicéntricos y fragmentos acéntricos observada en células Caco2 deja patente la estabilidad cromosómica estructural de la línea, a pesar de su variabilidad numérica en cuanto a ploidía. En la línea SKBR3, se observó un cromosoma dicéntrico y un fragmento acéntrico en todas las células analizadas, evidenciando que, a pesar de la presencia de esta anomalía, la línea celular muestra estabilidad cromosómica estructural. Es importante destacar que la presencia de telómeros en todos los cromosomas nos permite atribuir el exceso de los foci de γ -H2AX observados al efecto de los distintos tratamientos. Si alguna de las líneas celulares hubiera presentado la ausencia de algún telómero, esta podría haber sido detectada por los mecanismos de reparación celular como un DSB, pudiendo provocar una sobreestimación en el número de foci de γ -H2AX detectados como consecuencia de la irradiación y el tratamiento con GNPs (Bolzán, 2012).

Como ya se ha mencionado en la introducción, una parte del efecto radiosensibilizador de las GNPs, se atribuye a un aumento en la producción de ROS tras la irradiación, debido a las características físicas de la interacción de las radiaciones con elementos de elevado número atómico como el oro (Regulla et al., 1998). La presencia de partículas metálicas de alto número atómico (Z) induce una deposición de energía en el tejido tumoral mayor que la que se conseguiría sólo con la irradiación, esto se debe principalmente a tres fenómenos físicos: el efecto fotoeléctrico, el efecto Compton, y la producción de pares. En nuestro estudio, teniendo en cuenta la energía utilizada de 0.662MeV, los efectos predominantes

han sido el fotoeléctrico y, en menor medida, el efecto Compton (Fig. 25). El efecto fotoeléctrico ocurre cuando fotones de energías relativamente bajas son absorbidos por un electrón del átomo y este es eyectado. Este electrón, que se denomina electrón secundario o fotoelectrón, es el que formará ROS al interactuar con moléculas oxigenadas. A energías de fotones más elevadas, la interacción con la materia también puede ser mediante el efecto Compton. En este caso, una parte de la energía del fotón incidente se transfiere para formar un electrón secundario, mientras que el fotón incidente modifica su trayectoria. Tanto tras el efecto fotoeléctrico como el efecto Compton, el hueco dejado por el electrón es reemplazado por electrones de capas más altas lo que a su vez puede provocar la emisión de electrones Auger que se consideran de elevada LET.

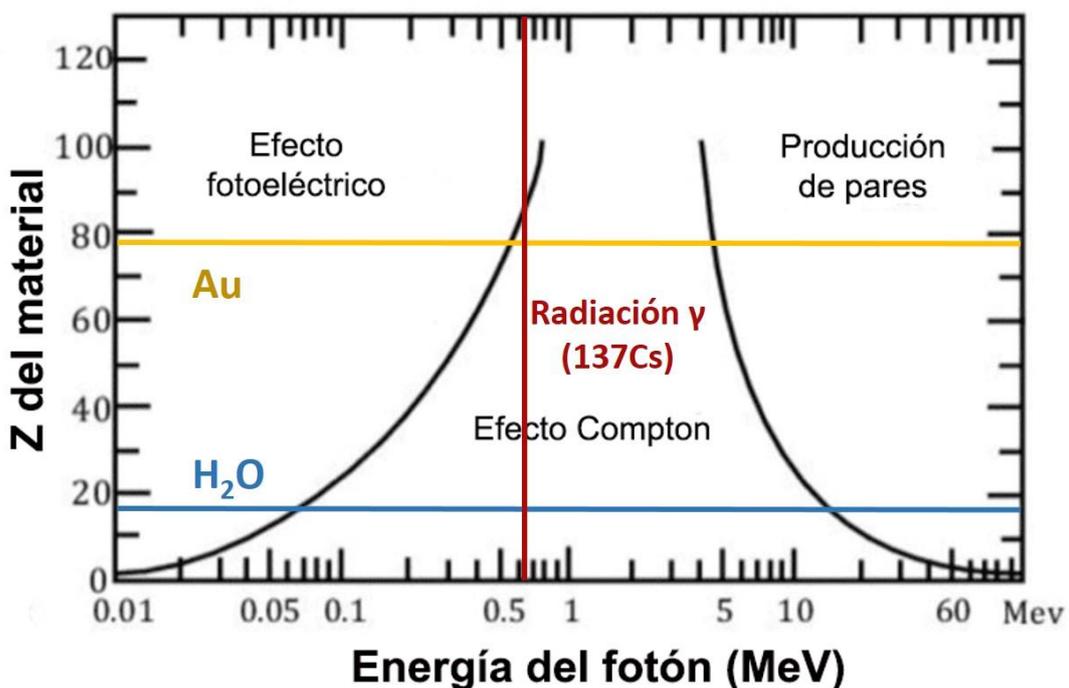


Figura 25. Representación gráfica que relaciona las energías de las RI con el efecto predominante que provocan sobre materiales de diferente Z. Como puede verse, el efecto predominante de la radiación γ (proveniente de una fuente de ^{137}Cs de 0,662 MeV, línea vertical roja) sobre el oro ($Z = 79$, línea horizontal amarilla) es el efecto fotoeléctrico, mientras que el efecto sobre el agua (Z efectiva = 18, línea horizontal azul) queda repartido entre el efecto fotoeléctrico y el efecto Compton.

Aunque las GNPs aumenten la formación de ROS tras una irradiación, también se ha descrito que en ausencia de radiación las GNPs pueden aumentar los niveles intracelulares de ROS, atribuyéndose este efecto a cambios en el potencial de membrana mitocondrial o a procesos catalíticos inducidos por la interacción de las cargas superficiales de las GNPs con el oxígeno molecular (Pan et al., 2009; Coulter, 2012; Taggart et al., 2016; Penninckx et al., 2018). Es un hecho conocido que las ROS tienen una vida media limitada y controlada por la acción de agentes celulares antioxidantes como el glutati6n. De manera que cuanto menor sea su vida m1s limitado ser1 su campo de acci6n, por lo que el efecto radiosensibilizador de las GNPs deber1a aumentar al ser internalizadas por parte de las c6lulas. Nuestras observaciones mediante microscop1a confocal indican que todas las GNPs, tanto de 50 nm como de 100 nm, son internalizadas por las c6lulas, aunque las im1genes parecen indicar que las GNPs espec1ficamente funcionalizadas (TfGNPs y AntiEpCamGNPs) se internalizaron de manera m1s efectiva por parte de ambos tipos celulares, SKBR3 y Caco2. Si bien es cierto que en nuestras observaciones no se detectaron GNPs en el n1cleo celular, no podemos descartar su presencia debido a la resoluci6n de la metodolog1a empleada. Lo que s1 podemos suponer es que, si bien la presencia de GNPs en el n1cleo no es descartable, nunca es masiva. Este hecho, sin embargo, no invalida el potencial radiosensibilizador de las GNPs, puesto que las ROS radioinducidas en el citoplasma pueden tener capacidad de difusi6n hacia el n1cleo (Provost et al., 2010; Turnbull et al., 2019; Dobeřov1a et al., 2022).

Es un hecho conocido que las cargas superficiales de las nanop1rticulas influyen en su internalizaci6n por parte de las c6lulas, de manera que las part1culas cargadas, principalmente aquellas con carga positiva, se internalizan en mayor medida que aquellas con carga neutra (Xiao et al., 2011; Valente et al., 2020). Este aumento en la internalizaci6n se ha observado en estudios como el de Pati6no y colaboradores (Pati6no et al., 2012), en el que microp1rticulas de poliestireno funcionalizadas con el pol1mero cati6nico polietileneimina o con los l1pidos cati6nicos Lipofectamina™ 2000 y FuGENE 6®, para cargarlas positivamente, se internalizaron de manera significativamente superior en c6lulas HeLa no fagoc1ticas que las mismas part1culas no funcionalizadas. Un estudio con nanop1rticulas superparamagn1ticas de 6xido ferroso cubiertas con 1cido c1trico o m1lico para

conseguir una carga positiva, evidenció un aumento en la formación de ROS intracelulares en las líneas tumorales humanas MCF-7 y Caco2, y en fibroblastos murinos 3T3, en comparación con las mismas nanopartículas no cubiertas, tras irradiar las células con rayos X (Klein et al., 2014).

En nuestro estudio hemos observado que el potencial ζ de todas las GNPs (sin funcionalizar y funcionalizadas, de 50 y de 100 nm de diámetro) se vuelve menos electronegativo cuando éste se mide en presencia de medio de cultivo. Además, las diferencias de electronegatividad observadas en agua, se ven altamente mitigadas en los resultados obtenidos en medio de cultivo, mucho más homogéneos. Este efecto podría ser explicado por la formación, por parte de las proteínas del suero presentes en el medio de cultivo, de una corona proteica alrededor de las GNPs. Este tipo de modificación, al disminuir la electronegatividad de las GNPs, incrementa la internalización de micropartículas en células HeLa (Patiño 2012). No obstante, en otros tipos celulares se ha descrito que la formación de una corona proteica puede disminuir la internalización de las micropartículas por parte de las células (Wang et al., 2013; Patiño et al., 2015; Sabourian et al, 2020). También se ha sugerido que la formación de una corona proteica, parece interferir con la capacidad de dirigir nanopartículas de SiO₂, funcionalizadas con Tf, hacia tejido epitelial pulmonar (Salvati et al., 2013). Otro estudio con modelos animales murinos concluyó que, aunque la formación de una corona proteica afecta a la direccionalización de las nanopartículas (en este caso de siRNA funcionalizadas con Tf), no disminuye la internalización de las nanopartículas funcionalizadas (Davis, 2009). De modo parecido, también se ha descrito que nanocápsulas de ácido polimetacrílico funcionalizadas con anticuerpo A33, no muestran una disminución de su interacción con líneas tumorales colorrectales (Dai et al, 2015). De los resultados de los estudios anteriormente mencionados, resulta complicado estimar o cuantificar el efecto que la formación de coronas proteicas puede tener sobre las nanopartículas y su internalización por las células, especialmente teniendo en cuenta que factores como el tamaño, la carga superficial de las partículas (Hadjidemetriou et al, 2015) o las líneas celulares empleadas en la experimentación (Yan et al., 2013) pueden impactar sobre este efecto. En cualquier caso, para obtener una estimación cuantitativa precisa de la internalización celular

de GNPs se deberían emplear metodologías alternativas a la microscopía confocal, como las basadas en la espectrometría de masas con plasma acoplado (ICP-MS).

En el presente estudio, la elección de GNPs de 50 y 100 nm de diámetro responde a la voluntad de comparar y contrastar los resultados obtenidos por otros equipos de investigación, en los que se indica que las GNPs de 50 nm de diámetro muestran una mayor internalización por parte de las células (Hubbell et al., 2009; Kirui et al., 2015) en comparación con GNPs de tamaños inferiores (14 nm) y mayores (74 nm) (Chithrani et al., 2006), además de correlacionarse con un mayor efecto radiosensibilizador (Chithrani et al., 2010). Sabuncu y colaboradores, también describieron que la internalización de GNPs de 50 nm en las líneas celulares Jurkat y PANC1 fue significativamente mayor que la de GNPs de 25 nm (Sabuncu et al., 2012). Por otra parte, hay estudios que indican que las GNPs de menor tamaño incrementan la dosis de radiación depositada en sus alrededores debido al incremento de la proporción superficie/volumen (McMahon et al., 2011). No obstante, debido a la disparidad de estudios que se han llevado a cabo con diferentes tamaños de nanopartículas, líneas celulares y condiciones experimentales, es difícil establecer un único tamaño de partícula óptimo para maximizar su internalización. Además de la capacidad de internalización celular, el tamaño de las partículas debe tenerse en cuenta de cara a su posible aplicación terapéutica futura, puesto que las nanopartículas de menor tamaño (10 nm) parecen presentar una mayor capacidad de procesamiento por parte del riñón, mientras que las de 100 nm o más pueden quedar acumuladas en el hígado (Kirui et al., 2015).

En nuestro estudio, la observación mediante microscopía confocal parece indicar que las GNPs de 50 nm de diámetro presentan una mayor internalización que sus homólogas de 100 nm. Esta observación, sin embargo, no puede afirmarse categóricamente basándonos en una evaluación cualitativa de la internalización, aunque coincide con la bibliografía analizada, que indica que las GNPs de alrededor de 50 nm presentan un grado óptimo de internalización en comparación con las de tamaños menores y mayores.

Otros factores a considerar en los estudios del efecto radiosensibilizador de las GNPs son la capacidad endocítica y la radiosensibilidad intrínseca de las líneas

celulares empleadas. Se ha descrito que las células SKBR3 son capaces de fagocitar micropartículas de polisilicio-cromo-oro de 3 μm (Patiño et al., 2016), micropartículas de poliestireno funcionalizadas con polietileneimina de 3 μm (Patiño et al., 2015) y micropartículas de poliestireno funcionalizadas con transferrina de 1 y 3 μm (Mora-Espí et al., 2018) sin que ello afecte a su viabilidad. Por otra parte, las células Caco2 pueden internalizar nanopartículas de poliestireno funcionalizadas con fluoresceína de 50 nm de diámetro, pero no de 100 nm o más (Leonard et al., 2010), ni nanopartículas de TiO₂ (Janer et al., 2014). El uso de anticuerpos anti-EpCam para dirigirlas de manera activa a las células Caco2 se ha mostrado efectivo con nanopartículas magnéticas y GNPs funcionalizadas con estos anticuerpos (Maltez-da Costa et al., 2012). Otros estudios indican que la capacidad de internalización por parte de las células Caco2 depende de su estado de diferenciación, siendo las células no diferenciadas las únicas capaces de fagocitar nanopartículas, ya que la diferenciación de estas células al cultivarlas en membranas porosas provoca cambios fenotípicos que les otorgan características similares a las de los enterocitos del intestino delgado, tales como la formación de una monocapa epitelial polarizada, el alargamiento de las microvellosidades y la creación de uniones celulares estrechas (Song et al., 2015; Kucki et al., 2017). Las células Caco2 utilizadas en nuestra experimentación fueron cultivadas en todo momento siguiendo las especificaciones para mantenerlas en proliferación, por lo que podemos estar seguros de que se han mantenido no diferenciadas durante el estudio.

5.2. Evaluación del efecto radiosensibilizador de las nanopartículas

Por lo que respecta al efecto de las GNPs de 50 y 100 nm en los cultivos celulares de Caco2 y SKBR3 sin irradiar, observamos que la presencia de NF-GNPs o de GNPs funcionalizadas no alteró de manera significativa la frecuencia basal de foci de γ -H2AX o la viabilidad celular al compararlas con células sin tratar con GNPs. Este hecho no implica que la presencia de GNPs no tenga efectos sobre las células, puesto que en todos los casos se observó una ligera disminución de la viabilidad, aunque no significativa, cuando las células se cultivaron en presencia de GNPs. Esta observación concuerda con los estudios anteriormente mencionados que describen que, en ausencia de irradiación, las GNPs provocan un aumento de ROS que podría tener un ligero efecto en la viabilidad celular. En los estudios citados, los efectos de las GNPs fueron evaluados mediante citometría de flujo después de aplicar la tinción CM-H2DCFDA, capaz de permear hacia el interior celular, y que adquiere fluorescencia en contacto con las ROS. Todos ellos coinciden en que el efecto que las GNPs pueden tener sobre las células se basan en el incremento de ROS, el agotamiento de agentes antioxidantes y cambios en la polaridad de la membrana mitocondrial.

En nuestro estudio, tras la exposición a RI, la frecuencia de foci de γ -H2AX fue evaluada a los 30 min, 2, 4 y 24 h post-irradiación. En las células Caco2 se observó un aumento significativo en las frecuencias de foci de las células irradiadas en presencia de AntiEpCamGNPs (tanto de 50 como de 100 nm) al compararlas con las células tratadas con NF-GNPs o las células sin tratamiento de GNPs. Además, el daño residual en el DNA fue superior cuando la irradiación se realizó tras el tratamiento con GNPs, ya fuesen funcionalizadas o no funcionalizadas. Todo ello parece indicar, como otros estudios han sugerido, que las GNPs podrían ejercer un efecto dual. Por un lado, un aumento en la producción de daños en el DNA y por otro por la interferencia de las GNPs en los mecanismos de reparación del DNA, reduciendo su eficiencia (Penninckx et al., 2020). Al comparar los resultados obtenidos después del tratamiento con GNPs de 50 y 100 nm se obtuvieron frecuencias de foci significativamente superiores ($p < 0,01$) en las células de ambas líneas tratadas con GNPs de 50 nm para todos los tiempos analizados y para los

dos tipos de GNPs empleados. Esto está de acuerdo con lo descrito en el apartado 5.1.

En el caso de las células SKBR3, la cinética de los foci de γ -H2AX mostró un comportamiento particular en comparación con Caco2; la frecuencia máxima de foci en células no tratadas con GNPs o tratadas con NF-GNPs (tanto de 50 como de 100 nm) se observó a las 4 h post-irradiación, mientras que en las células tratadas con TfGNPs la frecuencia máxima de foci apareció a los 30 min después de la irradiación. Resulta complicado explicar este retraso en la aparición de foci en ausencia de GNPs o en presencia de NF-GNPs, sin embargo, este tipo de comportamiento ha sido descrito previamente en líneas celulares de ovario de hámster chino irradiadas a una dosis de 6 Gy (Rothkamm y Löbrich, 2003; Rothkamm y Horn, 2009), habitualmente asociado a deficiencias de ATM, aunque el mecanismo exacto no se conoce con exactitud. A pesar de este comportamiento particular, para todos los tiempos post-irradiación la frecuencia de foci en las células irradiadas en presencia de TfGNPs (de cualquiera de los dos tamaños empleados) fue significativamente más alta que en las células irradiadas sin GNPs o tratadas con NF-GNPs. Una posible explicación para el comportamiento de la cinética de aparición de foci en SKBR3 es que el daño radioinducido en ausencia de GNPs o presencia de NF-GNPs no se produzca únicamente de manera directa e inmediata sobre el DNA, sino que la irradiación tenga como efecto un leve aumento de los niveles de ROS citosólicos que, con el tiempo se podrían acumular hasta acabar induciendo daño mitocondrial (Penninckx et al., 2018) y, a causa de la disrupción en vías metabólicas y de reparación que esto supondría, acabar provocando el daño genético observado a las 4 h. En el caso de las células tratadas con TfGNPs el pico de frecuencia de foci observado a los 30 min puede ser causado por la mayor internalización de las partículas funcionalizadas que, al estar presentes en el entorno citoplasmático en mayor cantidad, son capaces de amplificar en gran medida el efecto de la radiación hasta el punto de ser detectable a los 30 min.

Los resultados de viabilidad celular de la presente tesis, apoyan la idea de que las GNPs funcionalizadas muestran un mayor efecto radiosensibilizador (Tabla 6). Las SER calculadas en base a la tasa de viabilidad de células Caco2 irradiadas en presencia de AntiEpCamGNPs fueron de 1,25 con GNPs de 50 nm y de 1,24 con

GNPs de 100 nm, superiores a las SER de las células irradiadas en presencia de NF-GNPs que fueron de 1,17 con GNPs de 50 nm y de 1,21 con GNPs de 100 nm.

En cuanto a las SER en las células SKBR3, fueron de 1,7 y 1,71 para los tratamientos con TfGNPs y de 1,67 y 1,6 para los tratamientos con NF-GNPs (50 nm y 100 nm respectivamente en ambos tratamientos). Como se puede observar en la tabla, los resultados obtenidos son similares a los observados por otros equipos de investigación al irradiar con rayos gamma o rayos X (ver Tabla 6).

Tabla 6. Comparativa de diferentes estudios en los que se analiza el efecto sensibilizador (SER) de las GNPs.

Tipo de células tumorales	Línea celular	Tamaño de GNPs (nm)	Recubrimiento o funcionalización	Radiación	SER (Viabilidad)	Referencia
Colorrectal	CT26	4,7	PEG	Rayos X (6 MV)	1,33	Liu et al., 2008
	HT-29	24	Citrato	Rayos X (18 MV)	1,15	Zabihzadeh et al., 2018
	Caco2	50	Citrato	Radiación γ (662 keV)	1,17	Presente estudio
	Caco2	50	Anti-EpCam	Radiación γ (662 keV)	1,25	Presente estudio
	Caco2	100	Citrato	Radiación γ (662 keV)	1,21	Presente estudio
	Caco2	100	Anti-EpCam	Radiación γ (662 keV)	1,24	Presente estudio
Mama	MCF-7	1,9	Tiol	Rayos X (6 MV)	1,36	Ahmad et al., 2020
	MDA-MB-231	1,9	Tiol	Rayos X (160 kVp)	1,39	Jain et al., 2014
	MDA-MB-231	49	Glucosa	Rayos X (6 MV)	1,86	Jain et al., 2014
	SKBR3	50	Citrato	Radiación γ (662 keV)	1,67	Presente estudio
	SKBR3	50	Tf	Radiación γ (662 keV)	1,7	Presente estudio
	SKBR3	100	Citrato	Radiación γ (662 keV)	1,6	Presente estudio
	SKBR3	100	Tf	Radiación γ (662 keV)	1,71	Presente estudio
Cerebro	ALTS1C1	1,8	PEG-cRGD	Radiación γ (662 keV)	1,19	Enferadi et al., 2018
	ALTS1C1	1,8	PEG-cRGD	Rayos X (6 MV)	1,14	Enferadi et al., 2018
Cérvix	HeLa	14	Citrato	Rayos X (220 kVp)	1,12	Chithrani et al, 2010
	HeLa	50	Citrato	Radiación γ (662 keV)	1,19	Chithrani et al, 2010
	HeLa	50	Citrato	Rayos X (105 kVp)	1,57	Chithrani et al, 2010
	HeLa	50	Citrato	Rayos X (220 kVp)	1,37	Chithrani et al, 2010
	HeLa	50	Citrato	Rayos X (6 MVp)	1,15	Chithrani et al, 2010
	HeLa	74	Citrato	Rayos X (220 kVp)	1,17	Chithrani et al, 2010

Cuando se tienen en cuenta los resultados sobre las frecuencias de foci y los de viabilidad, no siempre hay una correlación directa. Cuando comparamos las frecuencias de foci inducidas por la irradiación en presencia de GNPs específicamente funcionalizadas en ambos tipos celulares (Figuras 19 y 20 del apartado de resultados), se puede observar que las frecuencias de foci a cualquier tiempo postirradiación fueron superiores en las células Caco2. Sin embargo, las células SKBR3 mostraron una mayor pérdida de viabilidad (mayor SER) que las células Caco2. Cabe recordar que, cualitativamente, las células SKBR3 parecían internalizar más GNPs que las células Caco2, lo que podría relacionarse con la mayor pérdida de viabilidad cuando se irradiaban en presencia de GNPs. La discrepancia entre el aumento de las frecuencias de foci y la tasa de disminución de la viabilidad podría deberse a una falta de correlación directa entre la cantidad de daño genético y la pérdida de capacidad reproductiva y metabólica de las células, a que las diferencias en la frecuencia de foci no son suficientemente grandes como para que tengan como consecuencia una disminución drástica en la viabilidad celular o a diferencias intrínsecas en la radiosensibilidad de las líneas celulares. De hecho, los incrementos en la SER descritos en otros estudios, indican que el efecto radiosensibilizador de las GNPs existe, pero no es muy drástico, los valores de SER (Tabla 6) están comprendidos en los diferentes estudios entre 1,12 y 1,86 (ver también Penninckx et al., 2020). Además, la complejidad de los efectos de la radiación sobre las células no se circunscribe únicamente al daño genético, incluyen otras afectaciones como son la peroxidación lipídica (asociada con cambios en la permeabilidad de la membrana celular) o alteraciones mitocondriales capaces de afectar a la producción de ATP (Howard et al., 2020).

Por lo que respecta a las diferencias en cuanto a la radiosensibilidad intrínseca entre líneas celulares, estos han podido observarse en nuestro estudio, ya que, a pesar de que las frecuencias de foci en SKBR3 son menores a las de Caco2, su viabilidad fue claramente inferior, lo cual parece indicar que Caco2 es una línea celular más radiorresistente. Este aumento en la radiorresistencia intrínseca de la línea Caco2 podría estar relacionado con la expresión disminuida de 53BP1 en estas células (Xiao et al., 2016). Hay evidencias experimentales de que niveles bajos de, o mutaciones en, 53BP1 alteran el correcto control del punto de control

de G1 del ciclo celular, lo cual podría tener como consecuencia una modificación de la viabilidad celular (Markova et al., 2015; Kong et al 2021).

Otro factor a tener en cuenta al comparar nuestros resultados con los obtenidos en otros estudios es la energía y tipo de radiación empleados. Algunos estudios indican que las RI de bajas energías resultan más efectivas para irradiar tejidos tratados con GNPs, especialmente en el rango de energía entre los 20 y los 150 keV (Künzel et al., 2014; Berrezoug et al., 2015; Li et al., 2020). Este efecto también fue descrito por Chithrani y colaboradores al irradiar células HeLa tratadas con GNPs de 50 nm, obteniendo SER , de 1,57 con rayos X de 105 kVp y de 1,37 con rayos X de 220 kVp. Cuando comparamos, las SER obtenidas en el presente trabajo al irradiar células Caco2 con radiación γ (662 keV) en presencia de GNPs de 50nm (1,17 y 1,25 para NF-GNPs y anti-EpCamGNPs respectivamente) con las de otros autores se observa que los valores son casi idénticos, SER de 1,19 con rayos gamma de la misma energía (Chithrani et al., 2010).

Aunque las nanopartículas de metales con alto número atómico son las más utilizadas para inducir radiosensibilidad, otras partículas no-metálicas están mostrando también resultados prometedores. Las nanopartículas de óxido de silicio (SiO₂) de 40 nm, cubiertas con poliamidoamina y funcionalizadas con anticuerpos anti-HER2, han obtenido radiosensibilización en células SKBR3, que los autores atribuyen a la sobreexpresión de HER2 por parte de SKBR3 (Yamaguchi et al., 2018). En este estudio de Yamaguchi y colaboradores, aunque el principio de aumentar la internalización de las partículas mediante una funcionalización específica es muy similar al propuesto en nuestro trabajo, la acción de las nanopartículas de SiO₂ no se basa tanto en amplificar el efecto de la radiación, rayos X en su caso, como en provocar un efecto sinérgico con ésta. Es decir, la internalización de nanopartículas de SiO₂ provocaría alteraciones en la permeabilidad de las membranas lisosomales, lo que potenciaría las vías de muerte celular tras el efecto de clastógeno de las RI. Además de las funcionalizaciones para dirigir NPs a líneas celulares concretas, la funcionalización de GNPs con moléculas terapéuticas puede ser también una herramienta útil en la lucha contra el cáncer. En un estudio de Cai y colaboradores (Cai et al., 2017) el tratamiento con GNPs de 30 nm funcionalizadas con trastuzumab (anticuerpo antagonista de

HER2) y la posterior irradiación de células SKBR3, dio como resultado una viabilidad celular 43 veces inferior a la observada cuando las células se irradiaron únicamente con GNPs sin funcionalizar.

El efecto radiosensibilizador de las nanopartículas de oro había sido descrito con anterioridad por numerosos estudios (revisado por Penninckx et al., 2020) y los resultados obtenidos en el presente estudio han permitido corroborarlo en las dos líneas celulares empleadas. Nuestro estudio parece indicar que la radiosensibilización es más destacable cuando las GNPs se funcionalizan para dirigirlas de manera específica a una línea celular concreta, evidenciando el incremento en la internalización por parte de las células de este tipo de partículas. Otros estudios también han descrito la mejora de internalización y radiosensibilización de distintos tipos de nanopartículas con funcionalizaciones superficiales (Yang et al., 2005). Sin embargo, estas funcionalizaciones suelen realizarse con moléculas orgánicas de baja especificidad para tejidos tumorales concretos, como por ejemplo polietilenglicol (Liu et al., 2018; Nicol et al., 2018). Otros estudios como el de Li y colaboradores (Li et al., 2021) con GNPs funcionalizadas con el anticuerpo mHsp70.1, dirigido contra la *heat shock protein* 70 expresada en membranas de algunos tipos de tejido tumoral, están en la línea de buscar una mayor especificidad en la funcionalización superficial de las GNPs para maximizar la eficacia en los tratamientos antitumorales.

Pese a que las funcionalizaciones específicas de las GNPs puedan ver su efecto radiosensibilizador interferido por la interacción con proteínas del suero que podrían afectar a la direccionalidad de las GNPs funcionalizadas hacia su objetivo terapéutico, los resultados de nuestro estudio indican que la direccionalización específica es eficiente. El hecho de trabajar con dos líneas celulares diferentes nos ha permitido ver la importancia de la radiosensibilidad intrínseca de las líneas celulares y de su capacidad para internalizar las GNPs en la variabilidad del efecto radiosensibilizador de las GNPs. Además de las diferencias entre células, la elección de moléculas utilizadas para funcionalizar las GNPs y dirigirlas a cada línea celular, así como la composición, tamaño y forma de las nanopartículas, así como el tipo y dosis de radiación empleadas son factores clave a considerar.

6. CONCLUSIONES

1. Las líneas celulares Caco2 y SKBR3 expresan los receptores de membrana EpCam y el receptor de transferrina, respectivamente. Las nanopartículas de oro pueden funcionalizarse con el anticuerpo AntiEpCam o con transferrina para dirigirlas de manera específica hacia estos receptores.

2. Ambas líneas presentan inestabilidad en lo que a ploidía se refiere, pero no presentan inestabilidad cromosómica estructural, por lo que podemos asumir que el análisis de la inducción de foci de γ -H2AX no se ve influenciado por estos factores.

3. Las células de ambas líneas mostraron capacidad de internalización de las nanopartículas de oro en todos los casos analizados, aunque los mayores niveles de internalización parecen observarse para las nanopartículas de oro de 50 nm funcionalizadas específicamente para unirse a EpCam en las células Caco2 y el receptor de transferrina en las células SKBR3.

4. Las nanopartículas oro de 50 y 100 nm, tanto funcionalizadas como sin funcionalizar, presentan potenciales ζ electronegativos. La electronegatividad se vio reducida y homogeneizada cuando el análisis se realizó con las nanopartículas diluidas en cualquiera de ambos medios de cultivo, indicando que estos modifican la carga superficial de las nanopartículas. La atenuación de la electronegatividad superficial de las nanopartículas por parte del medio de cultivo puede favorecer su internalización por las células.

5. El análisis de foci de γ -H2AX tras la irradiación, indica que la formación de roturas de doble cadena en el DNA aumenta de manera significativa en las células tratadas con nanopartículas funcionalizadas en comparación con aquellas sin tratamiento o tratadas con nanopartículas no funcionalizadas. Las nanopartículas de oro 50 nm indujeron una mayor formación de foci que sus homólogas de 100 nm, lo que concuerda con los datos de internalización.

6. Las tasas de incremento de sensibilidad (SER), es decir la pérdida de viabilidad, en las células irradiadas en presencia de nanopartículas, coinciden con las de otros estudios similares. En nuestro estudio, además, el análisis de la viabilidad celular confirmó los resultados obtenidos mediante la evaluación de la formación de foci: las células tratadas con nanopartículas de 50 nm funcionalizadas específicamente presentaron las tasas más bajas de viabilidad postirradiación.

7. Los resultados de viabilidad apoyaron lo observado en los resultados de formación de foci, aunque la correlación entre estas dos observaciones no fue siempre directa; las células SKBR3 presentaron, de media, una menor frecuencia de foci para todos los tratamientos, pero también tasas de viabilidad menores después de ser tratadas con nanopartículas de oro.

8. La falta de correlación directa entre inducción de foci y viabilidad observada en la línea SKBR3 evidencia la complejidad del análisis del efecto radiosensibilizador de las nanopartículas, debido a la cantidad de factores involucrados: desde el tamaño, composición, carga superficial y funcionalización de las nanopartículas, hasta la radiosensibilidad intrínseca de cada línea celular. Por ello, resulta complicado extrapolar de manera universal los resultados de un estudio concreto. No obstante, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el tratamiento mediante nanopartículas de oro es viable y prometedor, además de demostrar que la funcionalización específica de las nanopartículas puede ser de vital importancia para asegurar su efecto radiosensibilizador en el tejido diana.

7. BIBLIOGRAFÍA

A

- Amreddy, N., Babu, A., Muralidharan, R., Panneerselvam, J., Srivastava, A., Ahmed, R., Mehta, M., Munshi, A., & Ramesh, R. (2018). Recent Advances in Nanoparticle-Based Cancer Drug and Gene Delivery. *Advances in Cancer Research, 137*, 115-170.
- Atun, R., Jaffray, D. A., Barton, M. B., Bray, F., Baumann, M., Vikram, B., Hanna, T. P., Knaul, F. M., Lievens, Y., Lui, T. Y. M., Milosevic, M., O'Sullivan, B., Rodin, D. L., Rosenblatt, E., Van Dyk, J., Yap, M. L., Zubizarreta, E., & Gospodarowicz, M. (2015). Expanding global access to radiotherapy. *The Lancet Oncology, 16*(10), 1153-1186.

B

- Babaye Abdollahi, B., Malekzadeh, R., Pournaghi Azar, F., Salehnia, F., Naseri, A. R., Ghorbani, M., Hamishehkar, H., & Farajollahi, A. R. (2021). Main Approaches to Enhance Radiosensitization in Cancer Cells by Nanoparticles: A Systematic Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin, 11*(2), 212-223.
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences, 9*(3), 193-199.
- Bailey, S. M., & Bedford, J. S. (2006). Studies on chromosome aberration induction: What can they tell us about DNA repair? *DNA Repair, 5*(9-10), 1171-1181.
- Bakhmutsky, M. V., Joiner, M. C., Jones, T. B., & Tucker, J. D. (2014). Differences in Cytogenetic Sensitivity to Ionizing Radiation in Newborns and Adults. *Radiation Research, 181*(6), 605-616.

- Beaton, L. A., Marro, L., Samiee, S., Malone, S., Grimes, S., Malone, K., & Wilkins, R. C. (2013). Investigating chromosome damage using fluorescent *in situ* hybridization to identify biomarkers of radiosensitivity in prostate cancer patients. *International Journal of Radiation Biology*, 89(12), 1087-1093.
- Belchior, A., Canhoto, J. F., Giesen, U., Langner, F., Rabus, H., & Schulte, R. (2022). Repair Kinetics of DSB-Foci Induced by Proton and α -Particle Microbeams of Different Energies. *Life*, 12(12), 2040.
- Bennett, M. H., Feldmeier, J., Smee, R., & Milross, C. (2005). Hyperbaric oxygenation for tumour sensitisation to radiotherapy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 19(4), CD005007.
- Berkey, F. J. (2010). *Managing the Adverse Effects of Radiation Therapy*. 82(4), 8.
- Berrezoug, A., A Dib, A. S., & Belbachir, A. H. (2015). Enhanced X-ray absorption by using gold nanoparticles in a biological tissue. *Radioprotection*, 50(4), 281-285.
- Bolus, N. E. (2017). Basic Review of Radiation Biology and Terminology. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 45(4), 259-264.
- Bolzan, A. D. (2012). Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis*, 27(1), 1-15.
- Borran, A. A., Aghanejad, A., Farajollahi, A., Barar, J., & Omid, Y. (2018). Gold nanoparticles for radiosensitizing and imaging of cancer cells. *Radiation Physics and Chemistry*, 152, 137-144.
- Borràs-Fresneda, M., Barquinero, J.-F., Gomolka, M., Hornhardt, S., Rössler, U., Armengol, G., & Barrios, L. (2016). Differences in DNA Repair Capacity, Cell Death and Transcriptional Response after Irradiation between a

Radiosensitive and a Radioresistant Cell Line. *Scientific Reports*, 6(1), 27043.

Borrego-Soto, G., Ortiz-López, R., & Rojas-Martínez, A. (2015). Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 420-432.

Buch, K., Peters, T., Nawroth, T., Sängler, M., Schmidberger, H., & Langguth, P. (2012). Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay—A comparative study. *Radiation Oncology*, 7, 1.

Butterworth, K. T., McMahon, S. J., Currell, F. J., & Prise, K. M. (2012). Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale*, 4(16), 4830-4838.

C

Cai, Z., Yook, S., Lu, Y., Bergstrom, D., Winnik, M. A., Pignol, J.-P., & Reilly, R. M. (2017). Local Radiation Treatment of HER2-Positive Breast Cancer Using Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with ¹⁷⁷Lu. *Pharmaceutical Research*, 34(3), 579-590.

Caldecott, K. W. (2014). DNA single-strand break repair. *Experimental Cell Research*, 329(1), 2-8.

Chandra, R. A., Keane, F. K., Voncken, F. E. M., & Thomas, C. R. (2021). Contemporary radiotherapy: Present and future. *The Lancet*, 398(10295), 171-184.

Chen, Y., Yang, J., Fu, S., & Wu, J. (2020). Gold Nanoparticles as Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 9407-9430.

- Chertok, B., David, A. E., Huang, Y., & Yang, V. C. (2007). Glioma selectivity of magnetically targeted nanoparticles: A role of abnormal tumor hydrodynamics. *Journal of Controlled Release*, 122(3), 315-323.
- Chertok, B., Moffat, B. A., David, A. E., Yu, F., Bergemann, C., Ross, B. D., & Yang, V. C. (2008). Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*, 29(4), 487-496.
- Chithrani, D. B., Ghazani, A. A., & Chan, W. C. W. (2006). Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters*, 6(4), 662-668.
- Chithrani, D. B., Jelveh, S., Jalali, F., van Prooijen, M., Allen, C., Bristow, R. G., Hill, R. P., & Jaffray, D. A. (2010). Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy. *Radiation Research*, 173(6), 719-728.
- Christensen, D. M., Iddins, C. J., & Sugarman, S. L. (2014). Ionizing Radiation Injuries and Illnesses. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32(1), 245-265.
- Citrin, D., Cotrim, A. P., Hyodo, F., Baum, B. J., Krishna, M. C., & Mitchell, J. B. (2010). Radioprotectors and Mitigators of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *The Oncologist*, 15(4), 360-371.
- Coulter, J., Jain, S., Butterworth, K. T., Taggart, L. E., Dickson, G. R., McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Trainor, C., Hounsell, A. R., O'Sullivan, A. R., Schettino, G., Currel, F. J., Hirst, D. G., & Prise, K. M. (2012). Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2673-2685.

D

- Dai, Q., Yan, Y., Ang, C.-S., Kempe, K., Kamphuis, M. M. J., Dodds, S. J., & Caruso, F. (2015). Monoclonal Antibody-Functionalized Multilayered Particles: Targeting Cancer Cells in the Presence of Protein Coronas. *ACS Nano*, *9*(3), 2876-2885.
- Davis, M. E. (2009). The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Self-Assembling, Cyclodextrin Polymer-Based Nanoparticle: From Concept to Clinic. *Molecular Pharmaceutics*, *6*(3), 659-668.
- Dobešová, L., Gier, T., Kopečná, O., Pagáčová, E., Vičar, T., Bestvater, F., Toufar, J., Bačíková, A., Kopel, P., Fedr, R., Hildenbrand, G., Falková, I., Falk, M., & Hausmann, M. (2022). Incorporation of Low Concentrations of Gold Nanoparticles: Complex Effects on Radiation Response and Fate of Cancer Cells. *Pharmaceutics*, *14*(1), 166.

E

- Enferadi, M., Fu, S.-Y., Hong, J.-H., Tung, C.-J., Chao, T.-C., Wey, S.-P., Chiu, C.-H., Wang, C.-C., & Sadeghi, M. (2018). Radiosensitization of ultrasmall GNP-PEG-cRGDfK in ALTS1C1 exposed to therapeutic protons and kilovoltage and megavoltage photons. *International Journal of Radiation Biology*, *94*(2), 124-136.

F

- Fang, J., Nakamura, H., & Maeda, H. (2011). The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and

augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 136-151.

Frankenberg, D., Kelnhofer, K., Bär, K., & Frankenberg-Schwager, M. (2002). Enhanced Neoplastic Transformation by Mammography X Rays Relative to 200 kVp X Rays: Indication for a Strong Dependence on Photon Energy of the RBE_M for Various End Points. *Radiation Research*, 157(1), 99-105.

Frankenberg-Schwager, M., Garg, I., Frankenberg, D., Greve, B., Severin, E., Uthe, D., & Göhde, W. (2002). Mutagenicity of low-filtered 30 kVp X-rays, mammography X-rays and conventional X-rays in cultured mammalian cells. *International Journal of Radiation Biology*, 78(9), 781-789.

G

Gavilán, H., Avugadda, S. K., Fernández-Cabada, T., Soni, N., Cassani, M., Mai, B. T., Chantrell, R., & Pellegrino, T. (2021). Magnetic nanoparticles and clusters for magnetic hyperthermia: Optimizing their heat performance and developing combinatorial therapies to tackle cancer. *Chemical Society Reviews*, 50(20), 11614-11667.

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827.

Gianfaldoni, S., Gianfaldoni, R., Wollina, U., Lotti, J., Tchernev, G., & Lotti, T. (2017). An Overview on Radiotherapy: From Its History to Its Current Applications in Dermatology. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 5(4), 521-525.

Göggelmann, W., Jacobsen, C., Panzer, W., Walsh, L., Roos, H., & Schmid, E. (2003). Re-evaluation of the RBE of 29 kV x-rays (mammography x-rays) relative to 220 kV x-rays using neoplastic transformation of human CGL1-hybrid cells. *Radiation and Environmental Biophysics*, 42(3), 175-182.

Gomolka, M., Rössler, U., Hornhardt, S., Walsh, L., Panzer, W., & Schmid, E. (2005). Measurement of the Initial Levels of DNA Damage in Human Lymphocytes Induced by 29 kV X Rays (Mammography X Rays) Relative to 220 kV X Rays and γ Rays. *Radiation Research*, 163(5), 510-519.

H

Hadjidemetriou, M., Al-Ahmady, Z., Mazza, M., Collins, R. F., Dawson, K., & Kostarelos, K. (2015). *In Vivo* Biomolecule Corona around Blood-Circulating, Clinically Used and Antibody-Targeted Lipid Bilayer Nanoscale Vesicles. *ACS Nano*, 9(8), 8142-8156.

Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., & Smilowitz, H. M. (2004). The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in Medicine and Biology*, 49(18), N309-N315.

Hall, E. J., & Giaccia, A. J. (2019). *Radiobiology for the radiologist* (Eighth edition). Wolters Kluwer.

Hauge, S., Eek Mariampillai, A., Rødland, G. E., Bay, L. T. E., Landsverk, H. B., & Syljuåsen, R. G. (2021). Expanding roles of cell cycle checkpoint inhibitors in radiation oncology. *International Journal of Radiation Biology*, 1-10.

Herold, M., Das, I. J., Stobbe, C. C. D. (2000). Gold microspheres: A selective technique for producing biologically effective dose enhancement. *International Journal of Radiation Biology*, 76(10), 1357-1364.

Heyes, G. J., & Mill, A. J. (2004). The Neoplastic Transformation Potential of Mammography X Rays and Atomic Bomb Spectrum Radiation. *Radiation Research*, 162(2), 120-127.

Howard, D., Sebastian, S., Le, Q. V.-C., Thierry, B., & Kempson, I. (2020). Chemical Mechanisms of Nanoparticle Radiosensitization and Radioprotection: A Review of Structure-Function Relationships Influencing Reactive Oxygen Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 579.

Hubbell, J. A., Thomas, S. N., & Swartz, M. A. (2009). Materials engineering for immunomodulation. *Nature*, 462(7272), 449-460.

Huber, R., Braselmann, H., Geinitz, H., Jaehnert, I., Baumgartner, A., Thamm, R., Figel, M., Molls, M., & Zitzelsberger, H. (2011). Chromosomal radiosensitivity and acute radiation side effects after radiotherapy in tumour patients—A follow-up study. *Radiation Oncology*, 6(1), 32.

I

Iacovita, C., Florea, A., Dudric, R., Pall, E., Moldovan, A., Tetean, R., Stiufiuc, R., & Lucaciu, C. (2016). Small versus Large Iron Oxide Magnetic Nanoparticles: Hyperthermia and Cell Uptake Properties. *Molecules*, 21(10), 1357.

Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., & Wang, H. (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*, 22(37), 5834-5847.

Iliakis, G., Mladenov, E., & Mladenova, V. (2019). Necessities in the Processing of DNA Double Strand Breaks and Their Effects on Genomic Instability and Cancer. *Cancers*, 11(11), 1671.

International Agency for Research on Cancer, (2021). *Key Global Cancer Data for 2020*. IARC.

International Atomic Energy Agency. (2011). *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*. IAEA-EPR.

Ionita, P., Conte, M., Gilbert, B. C., & Chechik, V. (2007). Gold nanoparticle-initiated free radical oxidations and halogen abstractions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 5(21), 3504-3509.

Ivashkevich, A., Redon, C. E., Nakamura, A. J., Martin, R. F., & Martin, O. A. (2012). Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Letters*, 327(1-2), 123-133.

J

Jain, S., Coulter, J. A., Butterworth, K. T., Hounsell, A. R., McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Dickson, G. R., Prise, K. M., Currell, F. J., Hirst, D. G., & O'Sullivan, J. M. (2014). Gold nanoparticle cellular uptake, toxicity and radiosensitisation in hypoxic conditions. *Radiotherapy and Oncology*, 110(2), 342-347.

Janer, G., Mas del Molino, E., Fernández-Rosas, E., Fernández, A., & Vázquez-Campos, S. (2014). Cell uptake and oral absorption of titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, 228(2), 103-110.

Joiner, M. C., van der Kogel, A. J. (2018). *Basic Clinical Radiobiology (5th Edition)*. CRC Press.

Jordan, A., Scholz, R., Maier-Hauff, K., van Landeghem, F. K. H., Waldoefner, N., Teichgraeber, U., Pinkernelle, J., Bruhn, H., Neumann, F., Thiesen, B., von Deimling, A., & Felix, R. (2006). The effect of thermotherapy using magnetic

nanoparticles on rat malignant glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 78(1), 7-14.

K

Kamran, M. Z., Ranjan, A., Kaur, N., Sur, S., & Tandon, V. (2016). Radioprotective Agents: Strategies and Translational Advances. *Medicinal Research Reviews*, 36(3), 461-493.

Kavanagh, J. N., Redmond, K. M., Schettino, G., & Prise, K. M. (2013). DNA Double Strand Break Repair: A Radiation Perspective. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(18), 2458-2472.

Kirui, D. K., Celia, C., Molinaro, R., Bansal, S. S., Cosco, D., Fresta, M., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Mild Hyperthermia Enhances Transport of Liposomal Gemcitabine and Improves In Vivo Therapeutic Response. *Advanced Healthcare Materials*, 4(7), 1092-1103.

Klein, S., Sommer, A., Distel, L. V. R., Hazemann, J.-L., Kröner, W., Neuhuber, W., Müller, P., Proux, O., & Kryschi, C. (2014). Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as Novel X-ray Enhancer for Low-Dose Radiation Therapy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(23), 6159-6166.

Kong, X., Yu, D., Wang, Z., & Li, S. (2021). Relationship between p53 status and the bioeffect of ionizing radiation (Review). *Oncology Letters*, 22(3), 661.

Kucki, M., Diener, L., Bohmer, N., Hirsch, C., Krug, H. F., Palermo, V., & Wick, P. (2017). Uptake of label-free graphene oxide by Caco-2 cells is dependent on the cell differentiation status. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 46.

Künzel, R., Okuno, E., Levenhagen, R. S., & Umisedo, N. K. (2013). Evaluation of the X-Ray Absorption by Gold Nanoparticles Solutions. *ISRN Nanotechnology*, 2013, 865283.

L

Leonard, F., Collnot, E.-M., & Lehr, C.-M. (2010). A Three-Dimensional Coculture of Enterocytes, Monocytes and Dendritic Cells to Model Inflamed Intestinal Mucosa in Vitro. *Molecular Pharmaceutics*, 7(6), 2103-2119.

Li, C. (2014). A targeted approach to cancer imaging and therapy. *Nature Materials*, 13(2), 110-115.

Li, W. B., Belchior, A., Beuve, M., Chen, Y. Z., Di Maria, S., Friedland, W., Gervais, B., Heide, B., Hocine, N., Ipatov, A., Klapproth, A. P., Li, C. Y., Li, J. L., Multhoff, G., Poignant, F., Qiu, R., Rabus, H., Rudek, B., Schuemann, J., Stangl, S., Testa, E., Villagrasa, C., Xie, W. Z. & Zhang, Y. B. (2020). Intercomparison of dose enhancement ratio and secondary electron spectra for gold nanoparticles irradiated by X-rays calculated using multiple Monte Carlo simulation codes. *Physica Medica*, 69, 147-163.

Li, W. B., Stangl, S., Klapproth, A., Shevtsov, M., Hernandez, A., Kimm, M. A., Schuemann, J., Qiu, R., Michalke, B., Bernal, M. A., Li, J., Hürkamp, K., Zhang, Y., & Multhoff, G. (2021). Application of High-Z Gold Nanoparticles in Targeted Cancer Radiotherapy—Pharmacokinetic Modeling, Monte Carlo Simulation and Radiobiological Effect Modeling. *Cancers*, 13(21), 5370.

Little, J. B. (1968). Cellular effects of ionizing radiation. *New England Journal of Medicine*, 278 (7), 369-376.

- Liu, Y., Zhang, P., Li, F., Jin, X., Li, J., Chen, W., & Li, Q. (2018). Metal-based *NanoEnhancers* for Future Radiotherapy: Radiosensitizing and Synergistic Effects on Tumor Cells. *Theranostics*, *8*(7), 1824-1849.
- Lomax, M. E., Folkes, L. K., & O'Neill, P. (2013). Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology*, *25*(10), 578-585.
- López, J. S., Pujol-Canadell, M., Puig, P., Armengol, G., & Barquintero, J. F. (2023). Evaluation of γ -H2AX foci distribution among different peripheral blood mononucleated cell subtypes. *International Journal of Radiation Biology*, 1-9.

M

- Maltez-da Costa, M., de la Escosura-Muñiz, A., Nogués, C., Barrios, L., Ibáñez, E., & Merkoçi, A. (2012). Simple Monitoring of Cancer Cells Using Nanoparticles. *Nano Letters*, *12*(8), 4164-4171.
- Mariotti, L. G., Pirovano, G., Savage, K. I., Ghita, M., Ottolenghi, A., Prise, K. M., & Schettino, G. (2013). Use of the γ -H2AX Assay to Investigate DNA Repair Dynamics Following Multiple Radiation Exposures. *PLOS ONE*, *8*(11), e79541.
- Markova, E., Vasilyev, S., & Belyaev, I. (2015). 53BP1 foci as a marker of tumor cell radiosensitivity. *Neoplasma*, *62*(05), 770-776.
- Mathieu, N., Pirzio, L., Freulet-Marriére, M. A., Desmaze, C., & Sabatier, L. (2004). Telomeres and chromosomal instability. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, *61*(6), 641-656.

- Matsudaira, H., Ueno, A. M., & Furuno, I. (1980). Iodine Contrast Medium Sensitizes Cultured Mammalian Cells to X Rays but Not to γ Rays. *Radiation Research*, 84(1), 144-148.
- McMahon, S. J., Hyland, W. B., Muir, M. F., Coulter, J. A., Jain, S., Butterworth, K. T., Schettino, G., Dickson, G. R., Hounsell, A. R., O'Sullivan, J. M., Prise, K. M., Hirst, D. G., & Currell, F. J. (2011). Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles. *Scientific Reports*, 1(1), 18.
- Mestres, M., Caballín, M. R., Barrios, L., Ribas, M., & Barquinero, J. F. (2008). RBE of X Rays of Different Energies: A Cytogenetic Evaluation by FISH. *Radiation Research*, 170(1), 93-100.
- Mi, Y., Shao, Z., Vang, J., Kaidar-Person, O., & Wang, A. Z. (2016). Application of nanotechnology to cancer radiotherapy. *Cancer Nanotechnology*, 7(1), 11.
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), 101-124.
- Mora-Espí, I., Barrios, L., Ibáñez, E., Soriano, J., & Nogués, C. (2018). Membrane reorganization after photochemical internalization to release transferrin-biofunctionalized polystyrene microparticles. *Scientific Reports*, 8(1), 17617.
- Mora-Espí, I., Ibáñez, E., Soriano, J., Nogués, C., Gudjonsson, T., & Barrios, L. (2019). Cell Internalization in Fluidic Culture Conditions Is Improved When Microparticles Are Specifically Targeted to the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2). *Pharmaceutics*, 11(4), 177.

Mu, H., Sun, J., Li, L., Yin, J., Hu, N., Zhao, W., Ding, D., & Yi, L. (2018). Ionizing radiation exposure: Hazards, prevention, and biomarker screening. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(16), 15294-15306.

Murad, H., Alghamian, Y., Aljapawe, A., & Madania, A. (2018). Effects of ionizing radiation on the viability and proliferative behavior of the human glioblastoma T98G cell line. *BMC Research Notes*, 11(1), 330.

N

Nicol, J. R., Harrison, E., O'Neill, S. M., Dixon, D., McCarthy, H. O., & Coulter, J. A. (2018). Unraveling the cell-type dependent radiosensitizing effects of gold through the development of a multifunctional gold nanoparticle. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(2), 439-449.

Noubissi, F. K., McBride, A. A., Leppert, H. G., Millet, L. J., Wang, X., & Davern, S. M. (2021). Detection and quantification of γ -H2AX using a dissociation enhanced lanthanide fluorescence immunoassay. *Scientific Reports*, 11(1), 8945.

Nuryadi, E., Mayang Permata, T. B., Komatsu, S., Oike, T., & Nakano, T. (2018). Inter-assay precision of clonogenic assays for radiosensitivity in cancer cell line A549. *Oncotarget*, 9(17), 13706-13712.

O

Oike, T., Komatsu, S., Komatsu, Y., Nachankar, A., Darwis, N. D. M., Shibata, A., & Ohno, T. (2020). Reporting of methodologies used for clonogenic assays to determine radiosensitivity. *Journal of Radiation Research*, 61(6), 828-831.

P

- Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., Brandau, W., Simon, U., & Jahnen-Dechent, W. (2009). Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 nm Trigger Necrosis by Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. *Small*, 5(18), 2067-2076.
- Panteleeva, A., Slonina, D., Brankovic, K., Spekl, K., Pawelke, J., Hoinkis, C., & Dörr, W. (2003). Clonogenic survival of human keratinocytes and rodent fibroblasts after irradiation with 25 kV x-rays. *Radiation and Environmental Biophysics*, 42(2), 95-100.
- Patiño, T., Nogués, C., Ibáñez, E., & Barrios, L. (2012). Enhancing microparticle internalization by nonphagocytic cells through the use of noncovalently conjugated polyethyleneimine. *International Journal of Nanomedicine*, 2012(7), 5671-5682.
- Patiño, T., Soriano, J., Barrios, L., Ibáñez, E., & Nogués, C. (2015). Surface modification of microparticles causes differential uptake responses in normal and tumoral human breast epithelial cells. *Scientific Reports*, 5(1), 11371.
- Patiño, T., Soriano, J., Amirthalingam, E., Durán, S., González-Campo, A., Duch, M., Ibáñez, E., Barrios, L., Plaza, J. A., Pérez-García, L., & Nogués, C. (2016). Polysilicon-chromium-gold intracellular chips for multi-functional biomedical applications. *Nanoscale*, 8(16), 8773-8783.
- Penninckx, S., Heuskin, A.-C., Michiels, C., & Lucas, S. (2018). The role of thioredoxin reductase in gold nanoparticle radiosensitization effects. *Nanomedicine*, 13(22), 2917-2937.

- Penninckx, S., Heuskin, A.-C., Michiels, C., & Lucas, S. (2019). Thioredoxin Reductase Activity Predicts Gold Nanoparticle Radiosensitization Effect. *Nanomaterials*, 9(2), 295.
- Penninckx, S., Heuskin, A.-C., Michiels, C., & Lucas, S. (2020). Gold Nanoparticles as a Potent Radiosensitizer: A Transdisciplinary Approach from Physics to Patient. *Cancers*, 12(8), 2021.
- Perquin, M., Oster, T., Maul, A., Froment, N., Untereiner, M., & Bagrel, D. (2000). The glutathione-related detoxification pathway in the human breast: A highly coordinated system disrupted in the tumour tissues. *Cancer Letters*, 158(1), 7-16.
- Provost, C., Choufani, F., Avedanian, L., Bkaily, G., Gobeil, F., & Jacques, D. (2010). Nitric oxide and reactive oxygen species in the nucleus. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(3), 296-304.

R

- Raavi, V., Perumal, V., & F.D. Paul, S. (2021). Potential application of γ -H2AX as a biodosimetry tool for radiation triage. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 787, 108350.
- Raviraj, J., Bokkasam, V., Kumar, V., Reddy, U., & Suman, V. (2014). Radiosensitizers, radioprotectors, and radiation mitigators. *Indian Journal of Dental Research*, 25(1), 83-90.
- Regulla, D. F., Hieber, L. B., & Seidenbusch, M. (1998). Physical and Biological Interface Dose Effects in Tissue due to X-Ray-Induced Release of Secondary Radiation from Metallic Gold Surfaces. *Radiation Research*, 150(1), 92-100.

- Regulla, D. F., Schmid, E., Friedland, W., Panzer, W., Heinzmann, U., & Harder, D. (2002). Enhanced Values of the RBE and H Ratio for Cytogenetic Effects Induced by Secondary Electrons from an X-Irradiated Gold Surface. *Radiation Research*, 158(4), 505-515.
- Retif, P., Pinel, S., Toussaint, M., Frochot, C., Chouikrat, R., Bastogne, T., & Barberi-Heyob, M. (2015). Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: The Key Parameters. *Theranostics*, 5(9), 1030-1044.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). *Cell Viability Assays*. National Center for Advancing Translational Sciences.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., & Bonner, W. M. (1999). Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 146(5), 905-915.
- Roots, R., & Okada, S. (1972). Protection of DNA Molecules of Cultured Mammalian Cells from Radiation-induced Single-strand Scissions by Various Alcohols and SH Compounds. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 21(4), 329-342.
- Rosa, S., Connolly, C., Schettino, G., Butterworth, K. T., & Prise, K. M. (2017). Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nanotechnology*, 8(1), 2.
- Rothkamm, K., & Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 5057-5062.

Rothkamm, K., Barnard, S., Moquet, J., Ellender, M., Rana, Z., & Burdak-Rothkamm, S. (2015). DNA damage foci: Meaning and significance: DNA Damage Foci. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(6), 491-504.

S

Sabourian, P., Yazdani, G., Ashraf, S. S., Frounchi, M., Mashayekhan, S., Kiani, S., & Kakkar, A. (2020). Effect of Physico-Chemical Properties of Nanoparticles on Their Intracellular Uptake. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8019.

Sabuncu, A. C., Grubbs, J., Qian, S., Abdel-Fattah, T. M., Stacey, M. W., & Beskok, A. (2012). Probing nanoparticle interactions in cell culture media. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 96-102.

Salvati, A., Pitek, A. S., Monopoli, M. P., Prapainop, K., Bombelli, F. B., Hristov, D. R., Kelly, P. M., Åberg, C., Mahon, E., & Dawson, K. A. (2013). Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature Nanotechnology*, 8(2), 137-143.

Santivasi, W. L., & Xia, F. (2014). Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(2), 251-259.

Schmid, E., Regulla, D., Kramer, H.-M., & Harder, D. (2002). The Effect of 29 kV X Rays on the Dose Response of Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes. *Radiation Research*, 158(6), 771-777.

Schuemann, J., Bagley, A. F., Berbeco, R., Bromma, K., Butterworth, K. T., Byrne, H. L., Chithrani, D. B., Cho, S. H., Cook, J. R., Favaudon, V., Gholami, Y. H., Gargioni, E., Hainfeld, J. F., Hespeels, F., Heuskin, Ibeh, U. M., Kuncic, Z.,

- Kunjachan, S., Lacombe, S., Lucas, S., Lux, F., McMahon, S., Nevozhay, D., Ngwa, W., Payne, J. D., Penninckx, S., Porcel, E., Prise, K. M., Rabus, H., Ridwan, S. M., Rudek, B., Sanche, L., Singh, B., Smilowitz, H. M., Sokolov, K. V., Sridhar, S., Stanishevskiy, Y., Sung, W., Tillement, O., Virani, N., Yantasee, W., & Krishnan, S. (2020). Roadmap for metal nanoparticles in radiation therapy: Current status, translational challenges, and future directions. *Physics in Medicine & Biology*, *65*(21), 21RM02.
- Sharma, P. M., Ponnaiya, B., Taveras, M., Shuryak, I., Turner, H., & Brenner, D. J. (2015). High Throughput Measurement of γ H2AX DSB Repair Kinetics in a Healthy Human Population. *PLOS ONE*, *10*(3), e0121083.
- Slonina, D., Spekl, K., Panteleeva, A., Brankovic, K., Hoinkis, C., & Dörr, W. (2003). Induction of micronuclei in human fibroblasts and keratinocytes by 25 kV x-rays. *Radiation and Environmental Biophysics*, *42*(1), 55-61.
- Smith, T. A., Kirkpatrick, D. R., Smith, S., Smith, T. K., Pearson, T., Kailasam, A., Herrmann, K. Z., Schubert, J., & Agrawal, D. K. (2017). Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. *Journal of Translational Medicine*, *15*(1), 232.
- Song, Z.-M., Chen, N., Liu, J.-H., Tang, H., Deng, X., Xi, W.-S., Han, K., Cao, A., Liu, Y., & Wang, H. (2015). Biological effect of food additive titanium dioxide nanoparticles on intestine: An *in vitro* study. *Journal of Applied Toxicology*, *35*(10), 1169-1178.
- Starkewolf, Z. B., Miyachi, L., Wong, J., & Guo, T. (2013). X-ray triggered release of doxorubicin from nanoparticle drug carriers for cancer therapy. *Chemical Communications*, *49*(25), 2545-2547.

Stewart, F. A., & Dörr, W. (2009). Milestones in normal tissue radiation biology over the past 50 years: From clonogenic cell survival to cytokine networks and back to stem cell recovery. *International Journal of Radiation Biology*, 85(7), 574-586.

Syljuåsen, R. G. (2019). Cell Cycle Effects in Radiation Oncology. *Radiation Oncology*. Springer International Publishing.

T

Taggart, L. E., McMahon, S. J., Butterworth, K. T., Currell, F. J., Schettino, G., & Prise, K. M. (2016). Protein disulphide isomerase as a target for nanoparticle-mediated sensitisation of cancer cells to radiation. *Nanotechnology*, 27(21), 215101.

Tharkar, P., Varanasi, R., Wong, W. S. F., Jin, C. T., & Chrzanowski, W. (2019). Nano-Enhanced Drug Delivery and Therapeutic Ultrasound for Cancer Treatment and Beyond. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 324.

Turnbull, T., Douglass, M., Williamson, N. H., Howard, D., Bhardwaj, R., Lawrence, M., Paterson, D. J., Bezak, E., Thierry, B., & Kempson, I. M. (2019). Cross-Correlative Single-Cell Analysis Reveals Biological Mechanisms of Nanoparticle Radiosensitization. *ACS Nano*, 13(5), 5077-5090.

V

- Valente, K. P., Suleman, A., & Brolo, A. G. (2020). Exploring Diffusion and Cellular Uptake: Charged Gold Nanoparticles in an in Vitro Breast Cancer Model. *ACS Applied Bio Materials*, 3(10), 6992-7002.
- van Oorschot, B., Hovingh, S., Dekker, A., Stalpers, L. J., & Franken, N. A. P. (2016). Predicting Radiosensitivity with Gamma-H2AX Foci Assay after Single High-Dose-Rate and Pulsed Dose-Rate Ionizing Irradiation. *Radiation Research*, 185(2), 190-198.
- Verhaegen, F., & Vral, A. (1994). Sensitivity of Micronucleus Induction in Human Lymphocytes to Low-LET Radiation Qualities: RBE and Correlation of RBE and LET. *Radiation Research*, 139(2), 208-213.

W

- Wang, F., Yu, L., Monopoli, M. P., Sandin, P., Mahon, E., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2013). The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(8), 1159-1168.
- Wang, H., Mu, X., He, H., & Zhang, X.-D. (2018). Cancer Radiosensitizers. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(1), 24-48.
- Widjaja, L., Werner, R. A., Krischke, E., Christiansen, H., Bengel, F. M., Bogdanova, N., & Derlin, T. (2023). Individual radiosensitivity reflected by γ -H2AX and 53BP1 foci predicts outcome in PSMA-targeted radioligand therapy.

European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 50(2), 602-612.

Willers, H., Gheorghiu, L., Liu, Q., Efstathiou, J. A., Wirth, L. J., Krause, M., & von Neubeck, C. (2015). DNA Damage Response Assessments in Human Tumor Samples Provide Functional Biomarkers of Radiosensitivity. *Seminars in Radiation Oncology*, 25(4), 237-250.

X

Xiao, K., Li, Y., Luo, J., Lee, J. S., Xiao, W., Gonik, A. M., Agarwal, R. G., & Lam, K. S. (2011). The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials*, 32(13), 3435-3446.

Xiao, X., Teng, F., Shi, C., Chen, J., Wu, S., Wang, B., Meng, X., Essiet Imeh, A., & Li, W. (2022). Polymeric nanoparticles—Promising carriers for cancer therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1024143.

Xiao, Y., Zheng, X., Huang, A., Liu, T., Zhang, T., & Ma, H. (2016). Deficiency of 53BP1 inhibits the radiosensitivity of colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 49(4), 1600-1608.

Xunclà, M., Barquinero, J. F., Caballín, M. R., Craven-Bartle, J., Ribas, M., de Vega, J. M., & Barrios, L. (2008). Cytogenetic damage induced by radiotherapy. Evaluation of protection by amifostine and analysis of chromosome aberrations persistence. *International Journal of Radiation Biology*, 84(3), 243-251.

Y

Yamaguchi, H., Hayama, K., Sasagawa, I., Okada, Y., Kawase, T., Tsubokawa, N., & Tsuchimochi, M. (2018). HER2-Targeted Multifunctional Silica Nanoparticles Specifically Enhance the Radiosensitivity of HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(3), 908.

Yan, Y., Gause, K. T., Kamphuis, M. M. J., Ang, C.-S., O'Brien-Simpson, N. M., Lenzo, J. C., Reynolds, E. C., Nice, E. C., & Caruso, F. (2013). Differential Roles of the Protein Corona in the Cellular Uptake of Nanoporous Polymer Particles by Monocyte and Macrophage Cell Lines. *ACS Nano*, *7*(12), 10960-10970.

Yang, P.-H., Sun, X., Chiu, J.-F., Sun, H., & He, Q.-Y. (2005). Transferrin-Mediated Gold Nanoparticle Cellular Uptake. *Bioconjugate Chemistry*, *16*(3), 494-496.

Z

Zhang, H.-L. (2023). Current status and patent prospective of lipid nanoparticle for mRNA delivery. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *33*(2), 125-131.

Zhang, Z., Zhang, H., Liu, F., Qiu, M., & Tong, J. (2010). Effects of Gamma Radiation on Bone-Marrow Stromal Cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *73*(7), 514-519.

8. ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS

Título: Differential Radiosensitizing Effect of 50 nm Gold Nanoparticles in Two Cancer Cell Lines.

Autores: Miguel Ángel Pérez-Amor, Leonardo Barrios, Gemma Armengol y Joan Francesc Barquineró.

Fecha de publicación: 9 de agosto de 2022.

Revista: Biology.

Editorial: MDPI.

DOI: <https://doi.org/10.3390/biology11081193>