



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología

“Evaluación de la eficiencia de marcaje celular utilizando puntos cuánticos funcionalizados de Ag₂S/Marcador tumoral en detección de cáncer mamario”

Opción de titulación
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:
C. Jesús Pineda Morales

Dirigido por:
M. en C. José Alberto Isidoro Olvera Rodríguez

M. en C. José Alberto Isidoro Olvera Rodríguez
Presidente

Firma

M. en C. Jaime Moroni Mora Muñoz
Secretario

Firma

Dr. Carlos Guzmán Martínez
Vocal

Firma

Dr. Luis Alejandro Martínez Chávez
Suplente

Firma

M. en C. Tonantzi Pérez Moreno
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Evaluación de la eficiencia de marcaje celular
utilizando puntos cuánticos funcionalizados de
Ag₂S/Marcador tumoral en detección de cáncer
mamario

por

Jesús Pineda Morales

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGLIN-280928

Índice

1. Introducción.....	7
1.1. Preámbulo.....	8
1.2. Marcaje celular.....	9
1.2.1. Estudio inmunohistoquímico.....	11
1.2.2 Ensayos inmunohistoquímicos para cáncer de mama	12
1.3. Puntos cuánticos como agentes de contraste	16
1.4. Estado del arte.....	21
2. Fundamentación teórica.....	24
2.1. Tema general	24
2.2. Fenómenos de fluorescencia.....	31
2.3. Agente de contraste en ensayos <i>in vitro</i>	38
2.4. Agente monoclonal	45
2.4.1. Clasificación y tipos de mAbs	47
2.4.2. Mecanismo de acción.....	49
2.4.3. Aplicaciones y relevancia de anticuerpos.....	52
3. Metodología.....	54
3.1. Síntesis, caracterización y funcionalización de puntos cuánticos de Ag ₂ S.....	54
3.1.1. Síntesis	54
3.1.2. Caracterización	55
3.1.3. Funcionalización de los QDs.....	55
3.2. Pruebas <i>in vitro</i>	56
3.2.1 Pruebas de viabilidad y citotoxicidad.....	58
4. Hipótesis.....	58
5. Objetivos.....	58
5.1. Objetivo general.....	58
5.2. Objetivos específicos.....	59
6. Cronograma	59
7. Resultados.....	60
7.1. TEM	60
7.2. SEM.....	63
7.3. Raman.....	68
7.4. XRF	70
7.5. UV-Vis	73

7.6.	MTT	75
8.	Conclusiones.....	79
9.	Anexos.....	81
9.1.	Formación de un nivel de energía discreto	81
9.2.	Formación de excitones	81
9.3	Complementarios	82
10.	Referencias.....	85

Índice de figuras

FIGURA 1. DIVERSAS APLICACIONES DE LOS PUNTOS CUÁNTICOS EN BIOIMAGEN Y DIAGNÓSTICO	17
FIGURA 2. PROPIEDADES ÓPTICAS Y POSIBLES APLICACIONES DE LOS QDs EN LA INVESTIGACIÓN DE LOS CB. LOS QDs MÁS UTILIZADOS TIENEN UNA ESTRUCTURA EN FORMA DE CONCHA ENCAPSULADA CON POLÍMEROS ANFIHÍLICOS QUE CONTIENEN GRUPOS QUÍMICAMENTE ACTIVOS. EN COMPARACIÓN CON LOS TINTES ORGÁNICOS TRADICIONALES, LOS QDs PRESENTAN EXCELENTES PROPIEDADES ÓPTICAS (A). UNA VEZ ACOPLADOS A MOLÉCULAS ACTIVAS, LOS QDs PUEDEN ADAPTARSE PARA LA OBTENCIÓN DE IMÁGENES DE TEJIDOS, COMO EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE BIOMARCADORES (B) Y LA EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES DE PRONÓSTICO (C), Y PARA LA OBTENCIÓN DE IMÁGENES IN VIVO, COMO LA CARTOGRAFÍA DE LA ELA (D), LA VISUALIZACIÓN DE XENOINJERTOS DE CB (E) Y LA DETECCIÓN DE METÁSTASIS DE CB (F) EN INVESTIGACIONES SOBRE CB	20
FIGURA 3. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO QUE MUESTRA LAS ESTRUCTURAS DE BANDAS DE ENERGÍA EN EL ÁTOMO, EL MATERIAL A GRANEL Y LA NANOESTRUCTURA CUÁNTICA	25
FIGURA 4. (A) FORMACIÓN DE EXCITONES EN LA BANDA DE ENERGÍA DEL QD. (B) COMPARACIÓN DEL RADIO DEL EXCITÓN Y EL TAMAÑO DEL QD.....	26
FIGURA 5. ESQUEMA DE LA FOTOLUMINISCENCIA QUE SE PRODUCE EN LOS QDs. (A) EMISIÓN DE BORDE DE BANDA. (B Y C) FOTOLUMINISCENCIA CON TRANSISIÓN NO RADIATIVA AL PRINCIPIO	27
FIGURA 6. VARIACIÓN DE LA BANDA DE ENERGÍA DE LOS PUNTOS CUÁNTICOS AL VARIAR EL TAMAÑO	28
FIGURA 7. DIAGRAMA DE JABLONSKI PARA EL FENÓMENO DE FLUORESCENCIA	32
FIGURA 8. FUNDAMENTOS DE LA FLUORESCENCIA. (A) DIAGRAMA DE JABLONSKI QUE MUESTRA LOS ESTADOS ENERGÉTICOS DE UNA MOLÉCULA. LAS MOLÉCULAS QUE NO ABSORBEN ENERGÍA ESTÁN CONFINADAS PRINCIPALMENTE A LOS ESTADOS VIBRACIONALES MÁS BAJOS DEL ESTADO BÁSICO S_0 . (B) LAS CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES RELACIONADAS CON LA ABSORCIÓN Y EMISIÓN DE ENERGÍA POR UNA MOLÉCULA PUEDEN RELACIONARSE CON EL TAMAÑO DE LOS PASOS DE ENERGÍA NECESARIOS PARA LLEVAR UNA MOLÉCULA DE UN NIVEL DE ENERGÍA A OTRO. LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN DEL FLUORÓFORO COMÚN FITC SE MUESTRAN DEBAJO DE UN DIAGRAMA DE JABLONSKI. CADA LÍNEA GRIS VERTICAL ALINEA LOS ESPECTROS CON LA ENERGÍA DE LOS FOTONES ABSORBIDOS (FLECHAS APUNTANDO HACIA ARRIBA) O EMITIDOS (FLECHAS APUNTANDO HACIA ABAJO). LAS FLECHAS ESTÁN COLOREADAS PARA REPRESENTAR LA LONGITUD DE ONDA DE LOS FOTONES. POR EJEMPLO, LA FLECHA MORADA DE LA IZQUIERDA REPRESENTA LA ENERGÍA DE UN FOTÓN ULTRAVIOLETA QUE PUEDE HACER QUE LA MOLÉCULA PASE DEL ESTADO BÁSICO AL SEGUNDO ESTADO EXCITADO SINGLETE. LA FLECHA NARANJA DE LA DERECHA REPRESENTA EL FOTÓN DE MENOR ENERGÍA QUE PUEDE SER EMITIDO POR ESTA MOLÉCULA AL RETROCEDER DESDE EL ESTADO DE MENOR ENERGÍA DE S_1 A UN ESTADO VIBRACIONAL ALTO DE S_0 . OBSERVE QUE, EN LA REGIÓN DE SOLAPAMIENTO DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN, ALGUNOS FOTONES (POR EJEMPLO, LA FLECHA VERDE QUE APUNTA HACIA ARRIBA) SON ABSORBIDOS CUANDO EL NIVEL VIBRACIONAL NO ESTÁ EN SU NIVEL MÁS BAJO. OBSÉRVESE TAMBIÉN LA SIMETRÍA ENTRE LAS CURVAS DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN DEBIDO A LA SIMILITUD DE LAS TRANSICIONES A LOS ESTADOS VIBRACIONALES EN S_0 Y S_1 . (C) TIEMPOS QUE TARDAN LOS DISTINTOS PASOS DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN DE FLUORESCENCIA Y FOSFORESCENCIA	34
FIGURA 9. ILUSTRACIÓN ESQUEMÁTICA DEL DIAGRAMA DE JABLONSKI Y SU RELACIÓN CON LA IMAGEN ÓPTICA Y EL RENDIMIENTO TERAPÉUTICO DE LOS AGENTES FOTOTERANÓSTICOS. S_0 : ESTADO BÁSICO, S_1 : ESTADO EXCITADO SINGLETE, T_1 : ESTADO EXCITADO TRIPLETE, ISC: CRUCE INTERSISTEMA, 3O_2 : OXÍGENO TRIPLETE, 1O_2 : OXÍGENO SINGLETE, ROS: ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO	35
FIGURA 10. FLUORESCENCIA DE PUNTOS CUÁNTICOS. LA IMAGEN SUPERIOR MUESTRA LA FLUORESCENCIA OBTENIDA A PARTIR DE SOLUCIONES DE NANOCRIETALES DE CdSe (PUNTOS CUÁNTICOS) DE DIÁMETROS 2.0, 2.5, 3.0, 3.2, 3.9, 4.4, 5.5 Y 7.3 NANÓMETROS, RESPECTIVAMENTE. TODOS LOS VIALES SE EXCITAN A 375 NM. LOS GRÁFICOS SIGUIENTES MUESTRAN LOS ESPECTROS DE EMISIÓN DE LOS NANOCRIETALES DE CdSe EXCITADOS A 375 NM PARA LOS TAMAÑOS DE 3.2 NM, 3.9 NM Y 5.5 NM	36
FIGURA 11. DIÁMETROS DE DIVERSAS MOLÉCULAS DE ETIQUETADO	36
FIGURA 12. AGENTES DE CONTRASTE FLUORESCENTES MOLECULARES Y MOLÉCULAS DIANA UTILIZADAS PARA LA OBTENCIÓN DE IMÁGENES INTRAOPERATORIAS DURANTE LA CIRUGÍA ONCOLÓGICA. (A)	

REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MODO DE ACCIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE AGENTES DE CONTRASTE FLUORESCENTES. LOS AGENTES DE CONTRASTE FLUORESCENTES NO DIRIGIDOS, COMO EL VERDE DE INDOCIANINA, SE ACUMULAN PASIVAMENTE EN EL TEJIDO TUMORAL A TRAVÉS DEL EFECTO DE PERMEABILIDAD Y RETENCIÓN MEJORADAS. LOS AGENTES DE CONTRASTE FLUORESCENTES DIRIGIDOS, QUE CONSISTEN EN UN COLORANTE FLUORESCENTE CONJUGADO CON UNA FRACCIÓN DIRIGIDA, SE ACUMULAN ACTIVAMENTE EN EL TEJIDO TUMORAL MEDIANTE EL RECONOCIMIENTO DE UN BIOMARCADOR ESPECÍFICO EXPRESADO POR LAS CÉLULAS TUMORALES O LAS CÉLULAS ESTROMALES ASOCIADAS AL TUMOR. LA OBTENCIÓN DE IMÁGENES SE LLEVA A CABO UNA VEZ QUE LOS MARCADORES NO UNIDOS SE HAN ELIMINADO LO SUFICIENTE. LOS AGENTES DE CONTRASTE FLUORESCENTES ACTIVABLES PERMANECEN ÓPTICAMENTE SILENCIOSOS HASTA QUE SE LIBERAN LOS COLORANTES FLUORESCENTES POR DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE SU COLUMNA VERTEBRAL. (B) REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS DIFERENTES CLASES Y SUBCLASES DE MOLÉCULAS DIANA UTILIZADAS PARA EL DISEÑO DE AGENTES DE CONTRASTE FLUORESCENTES DIANA: ANTICUERPOS, FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS, ANDAMIAJES PROTEICOS, PÉPTIDOS Y MOLÉCULAS PEQUEÑAS. SE OBTUVIERON IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LLENADO DE ESPACIO DE UN ANTICUERPO (1IGT), UN FRAGMENTO FAB (6B9Z), UN DIABODY (1MOE), UN scFv (1P4I), UN NANOBODY (5MY6), UNA CENTYRIN (5L2H), UN AFFIBODY (2KZJ) Y UNA KNOTTIN (2N8B) DEL BANCO DE PROTEÍNAS RCSB Y SE PREPARARON UTILIZANDO PYMOL. EL MODELO DE MINICUERPO DE RELLENO ESPACIAL ES UNA INTERPRETACIÓN CREADA CON PYMOL; LAS REGIONES DE UNIÓN AL ANTÍGENO ESTÁN RESALTADAS EN NARANJA 41

FIGURA 13. DIFERENTES ESTRUCTURAS Y COMPOSICIONES DE NANOPARTÍCULAS EN IMÁGENES BIOMÉDICAS DE FLUORESCENCIA. A: TIPO DE VECTOR; B: ESTRUCTURA DE NÚCLEO DE NP; C: NP COMO AMORTIGUADOR; D: NP CONECTADA CON FLUORÓFORO Y QUENCHER, E: NP DE IMAGEN DE ENERGÍA TRANSFERIDA POR RESONANCIA DE FÖRSTER (FLECHA AMARILLA: NANOPARTÍCULA; FLECHA ROJA: COLORANTE FLUORESCENTE; FLECHA AZUL: LIGANDO; FLECHA GRIS: QUENCHER; FLECHA CURVA AMARILLA: TRANSFERENCIA DE ENERGÍA; FLECHA CURVA VERDE: LUZ DE EXCITACIÓN; FLECHA CURVA ROJA: LUZ DE EMISIÓN; MMP: METALOPROTEINASA DE MATRIZ) 43

FIGURA 14. DIFERENTES ESTRUCTURAS DE NANOPARTÍCULAS PARA IMÁGENES DE MRI/CT. A: ESTRUCTURA BÁSICA; B: ESTRUCTURA CORE-SHELL; C: ESTRUCTURA VECTORIAL; D: ESTRUCTURA MIXTA; E: ESTRUCTURA CORE-SHELL. (FLECHA NEGRA: MATERIALES DE IMAGEN MRI/CT; FLECHA AZUL: DECORACIÓN DE LA SUPERFICIE)..... 44

FIGURA 15. ESTRUCTURA DE LOS ANTICUERPOS: LOS ANTICUERPOS ESTÁN FORMADOS POR CUATRO CADENAS POLIPEPTÍDICAS, DOS CADENAS LIGERAS IDÉNTICAS Y DOS CADENAS PESADAS IDÉNTICAS, UNIDAS POR PUENTES DISULFURO. LAS CADENAS PESADAS CONSTAN DE UN DOMINIO VARIABLE (V_H) SEGUIDO DE UN DOMINIO CONSTANTE (C_{H1}), UNA REGIÓN BISAGRA Y OTROS DOS DOMINIOS CONSTANTES (C_{H2} Y C_{H3}). LA CADENA LIGERA TIENE UN DOMINIO VARIABLE (V_L) Y OTRO CONSTANTE (C_L). LOS DOS BRAZOS DE LA ESTRUCTURA EN FORMA DE Y CONTIENEN LOS SITIOS DE UNIÓN AL ANTÍGENO, LA REGIÓN DE UNIÓN AL ANTÍGENO DEL FRAGMENTO (FAB), JUNTO CON LA BASE DE LA ESTRUCTURA EN FORMA DE Y DENOMINADA REGIÓN CRISTALIZABLE DEL FRAGMENTO (Fc). LA ESPECIFICIDAD DEL ANTÍGENO EN LA REGIÓN FAB VIENE DETERMINADA POR LAS REGIONES DETERMINANTES DE LA COMPLEMENTARIEDAD (CDR) DENTRO DE LOS DOMINIOS VARIABLES 47

FIGURA 16. ESTRUCTURA DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 48

FIGURA 17. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES: (A) DESTRUCCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES MEDIADA POR EL SISTEMA INMUNITARIO MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO, LA CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADCC), LA INHIBICIÓN DE RECEPTORES INHIBIDORES DE CÉLULAS T COMO EL ANTÍGENO 4 ASOCIADO A LINFOCITOS T CITOTÓXICOS (CTLA4) Y LA INDUCCIÓN DE LA FAGOCITOSIS; (B) LA DESTRUCCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA DIMERIZACIÓN, LA ACTIVACIÓN DE QUINASAS Y LA SEÑALIZACIÓN DESCENDENTE QUE CONDUCE A LA REDUCCIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y LA APOPTOSIS; (C) LOS ANTICUERPOS CONJUGADOS PARA LIBERAR CARGAS TÓXICAS COMO UN FÁRMACO, UNA TOXINA, UN ARN DE INTERFERENCIA PEQUEÑO O UN RADIOISÓTOPO EN CÉLULAS TUMORALES QUE INDUCEN LA MUERTE CELULAR 49

FIGURA 18. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 52

FIGURA 19. INMUNIDAD ACTIVA FRENTE A INMUNIDAD PASIVA 53

FIGURA 20. CONFIGURACIÓN DE LAS PLACAS PARA EL CULTIVO CELULAR	57
FIGURA 21. MICROGRAFÍA EN TEM DE NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S SIN SURFACTANTE EN ESTADO DE AGLOMERACIÓN A ESCALA DE 100 NM	60
FIGURA 22. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DISTRIBUCIÓN Y TAMAÑO DE PARTÍCULAS DEL PROCESO DE SÍNTESIS EN AUSENCIA DE SURFACTANTE. MEDIA DE 19 NM DE DIÁMETRO	61
FIGURA 23. MICROGRAFÍA EN TEM DE NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S CON SURFACTANTE A ESCALA DE 50 NM .	61
FIGURA 24. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DISTRIBUCIÓN Y TAMAÑO DE PARTÍCULAS DEL PROCESO DE SÍNTESIS CON PRESENCIA DE SURFACTANTE. MEDIA DE 6.9723 NM DE DIÁMETRO.....	62
FIGURA 25. MICROGRAFÍA EN TEM DE NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S CON SURFACTANTE A ESCALA DE 100 NM.	62
FIGURA 26. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DISTRIBUCIÓN Y TAMAÑO DE PARTÍCULAS DEL PROCESO DE SÍNTESIS CON PRESENCIA DE SURFACTANTE. MEDIA DE 5.7665 NM DE DIÁMETRO.....	63
FIGURA 27. MICROGRAFÍA POR SEM DE NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S CON SURFACTANTE AL 3% DE MN; A ESCALA DE 2 μ M Y AUMENTO DE $\times 25$	64
FIGURA 28. MICROGRAFÍA POR SEM DE NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S CON SURFACTANTE AL 3% DE MN; A ESCALA DE 1 μ M Y AUMENTO DE $\times 50$	65
FIGURA 29. MICROGRAFÍA POR SEM DE NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S CON SURFACTANTE AL 3% DE MN; A ESCALA DE 500 NM Y AUMENTO $\times 100$	66
FIGURA 30. MICROGRAFÍA POR SEM DE NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S CON SURFACTANTE AL 3% DE MN; A ESCALA DE 200 NM Y AUMENTO $\times 250$	67
FIGURA 31. MICROGRAFÍA POR SEM DE NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S CON SURFACTANTE AL 3% DE MN; A ESCALA DE 200 NM Y AUMENTO $\times 200$	68
FIGURA 32. MICROSCOPIA DE RAMAN; REACCIÓN EN CONDICIONES 5	69
FIGURA 33. MICROSCOPIA DE RAMAN; REACCIÓN EN CONDICIONES 3	70
FIGURA 34. MICROSCOPIA DE RAMAN; REACCIÓN EN CONDICIONES 2	70
FIGURA 35. ANÁLISIS ELEMENTAL POR XRF DE LAS NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S -%MN. RELACIÓN MOLAR Ag:S DE 2.8:1.....	71
FIGURA 36. ANÁLISIS ELEMENTAL POR XRF DE LAS NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S -%MN. RELACIÓN MOLAR Ag:S DE 1.5:1.....	72
FIGURA 37. ANÁLISIS ELEMENTAL POR XRF DE LAS NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S -%MN. RELACIÓN MOLAR 1.3:1	73
FIGURA 38. ESPECTRO UV-VIS DE ABSORBANCIAS PERTENECIENTE A LAS 4 REACCIONES Y SU ZONA REPRESENTATIVA.....	74
FIGURA 39. GRÁFICAS DE TAUC	75
FIGURA 40. ENSAYO MTT CORRESPONDIENTE A LOS BLANCOS DE NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S	76
FIGURA 41. ENSAYO MTT CORRESPONDIENTE A LAS NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S CON PRESENCIA DE SÓLO L-CIS	77
FIGURA 42. ENSAYO MTT CORRESPONDIENTE A LAS NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S -1% MN.....	77
FIGURA 43. ENSAYO MTT CORRESPONDIENTE A LAS NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S -3% MN.....	78
FIGURA 44. ENSAYO MTT CORRESPONDIENTE A LAS NANOPARTÍCULAS DE Ag_2S -5% MN.....	78

Índice de tablas

TABLA 1 INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS IMPULSORES MOLECULARES DE LOS CARCINOMAS DE MAMA DE TIPO ESPECIAL	13
TABLA 2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES DE LOS PUNTOS CUÁNTICOS FRENTE A LOS FLUORÓFOROS ORGÁNICOS CONVENCIONALES EN APLICACIONES BIOMÉDICAS.	29
TABLA 3. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE DIVERSOS MATERIALES FLUORESCENTES INTEGRADOS EN SENSORES MI-FL.....	37

1. Introducción

El cáncer de mama es una enfermedad que día con día toma más fuerza, arrebatando miles de vidas diariamente no sólo a nivel nacional, sino también global, lo cual es una situación alarmante. En México además del problema que por sí mismo ya representa la enfermedad existen otro tipo de cuestiones que causan que el cáncer sea aún más letal. Entre ellos podemos encontrar factores como la falta de información y concientización en lo que concierne al cáncer (síntomas, clasificación, diagnóstico, tratamiento, etc.), además de la cuestión económica. Este último aspecto representa una gran limitante por parte del paciente para tomar la decisión de iniciar (o continuar) con su tratamiento y cuidados clínicos.¹

La ciencia y la tecnología están en constante desarrollo en este rubro, unificando fuerzas para proporcionar herramientas y soluciones que sean capaces de mejorar la calidad de vida de la población con cáncer de mama, mayoritariamente mujeres. Asimismo, dentro de esta lucha incesante contra el cáncer se pretende abaratar los costos tanto de los métodos de diagnóstico como los de tratamiento, debido a que los métodos convencionales resultan tener precios muy en altos en relación con la media del salario de la población mexicana al ser un país en vías de desarrollo, por ende, existe un conflicto de prioridades personales que favorece la desatención de la patología y posterga el diagnóstico. Atendiendo a otra de las principales preocupaciones por parte de los pacientes está el planteamiento de procedimientos cuya invasividad sea reducida al mínimo y sus resultados sean más eficientes. Del mismo modo, resulta fundamental disminuir al máximo los tiempos de respuesta para obtener los resultados clínicos de un diagnóstico certero, dado que entre más pronto sea la detección del cáncer, se presenta un escenario más favorable con mayor margen de maniobra para tratarse y en consecuencia más posibilidades de cura.²

Las lesiones metastásicas (es decir, cuando el cáncer se ha propagado) suelen ser múltiples y resistentes a las terapias convencionales, lo que dificulta el éxito de la resección quirúrgica y el tratamiento farmacológico. Por ello, existe una necesidad imperiosa de detectar con sensibilidad la metástasis de los tumores de mama en una fase temprana y predecir el potencial metastásico del tumor primario, lo que podría permitir intervenciones tempranas como la inhibición del tráfico de estas células a órganos distales. Por lo tanto, resulta especialmente atractivo desarrollar modalidades de imagen con suficiente información molecular que evalúe el riesgo de metástasis. Como candidato prometedor, la imagen óptica permite una identificación sensible y fácil de las clasificaciones moleculares, evitando el peligro radiactivo y el alto coste de la imagen nuclear.³

La nanotecnología tiene múltiples aportes en la comunidad científica y ha destacado por sus valiosos aportes en los campos interdisciplinarios de la biología y la medicina. El cáncer de mama no es la excepción, dado que la nanotecnología ha realizado aportes en la detección y tratamiento de esta enfermedad, la variedad y las posibilidades son infinitas y sus propiedades únicas. Numerosas nanoestructuras han sido implementadas para la detección del cáncer, entre las más relevantes podemos encontrar los puntos cuánticos (QDs, por sus siglas en inglés), los cuales poseen propiedades ópticas excepcionales que le permiten posicionarse entre los mejores instrumentos en el ámbito de la imagenología, asimismo exponen la capacidad de ser funcionalizados y ser específicos para los biomarcadores sobreexpresados en el microambiente tumoral. El principio y fundamento operativo de los puntos cuánticos es la emisión de luz a través de la excitación de electrones. Por otro lado, a pesar de que se

presume de su alcance y sus propiedades sobresalientes, también existen limitantes y estas giran en torno a que los QDs convencionales están hechos con materiales altamente tóxicos como el Te, Cd y el As. Razón por la cual se buscan implementar nuevos elementos que sean capaces de ofrecer una baja citotoxicidad aunada a un alto rendimiento.⁴

1.1. Preámbulo

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad y, actualmente es responsable de una de cada seis muertes en el mundo.¹ El cáncer de mama (BC, por sus siglas en inglés) es uno de los tumores malignos más frecuentes en las mujeres, según las estadísticas, en el mundo hay alrededor de 1.2 millones de nuevos pacientes con cáncer de mama cada año, de los cuales 0.5 millones de pacientes murieron.⁵ Los cánceres metastásicos son la principal causa de muerte relacionada con el cáncer, ya que las metástasis pueden eludir las terapias convencionales contra el cáncer, como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia.⁶

Las disparidades en la asignación de recursos, la infraestructura establecida, la organización y el acceso a la atención sanitaria provocarán a una mayor tasa de mortalidad por cáncer en los países de medianos y bajos ingresos (LMIC, por sus siglas en inglés), donde la población es muy vulnerable, los diagnósticos se realizan en fases más avanzadas de la enfermedad y el acceso a la atención es precario. Los LMIC tienen una incidencia de cáncer de mama más baja (pero creciente) y una tasa de mortalidad más alta que la de los países de altos ingresos (HIC, por sus siglas en inglés).¹ El envejecimiento, y las tendencias demográficas son los principales motores del cambio en la incidencia y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial.⁷

En México, desde 2006, el cáncer de mama es la neoplasia más frecuente, en el cual el grupo de las mujeres de 65 años o más se encuentran entre los grupos con mayor crecimiento tanto en incidencia como en morbilidad en la última década.⁷ Además, es la principal causa de muerte y discapacidad relacionada con el cáncer entre las mujeres jóvenes mexicanas, con hasta 15% de los casos en mujeres de ≤ 40 años, y la mayoría de las mujeres con BC se diagnostican en un estadio más avanzado que en los países desarrollados, ya que hasta el 50% presenta la enfermedad en estadio III o IV,⁷ y tiene un comportamiento más agresivo que el de las mujeres de más edad.²

El diagnóstico temprano basado en la concienciación de las pacientes y el acceso adecuado a los procedimientos de diagnóstico es la estrategia inicial más eficaz para lograr el control del cáncer de mama en escenarios con recursos limitados. Los principales objetivos prioritarios deben ser el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno del cáncer de mama. Una vez realizado el diagnóstico, el acceso a la cirugía y la radioterapia siguen siendo objetivos importantes de cualquier estrategia para mejorar los resultados. La detección temprana repercutirá en los resultados siempre que se disponga de atención de seguimiento.¹

Las células tumorales circulantes (CTC) de cáncer de mama en la sangre se detectan principalmente mediante inmunocitoquímica (ICC, por sus siglas en inglés), citometría de flujo (FCM, por sus siglas en inglés) y RT-PCR. La ICC refleja la existencia y distribución de biomacromoléculas, pero el procedimiento es tedioso y requiere mucho tiempo. Además,

la escasa fotoestabilidad de la fluoresceína puede influir en los resultados de la observación.⁵ La FCM y la RT-PCR son sensibles y rápidas. Sin embargo, la morfología y más información biológica no puede ser adquirida por los métodos anteriores.⁵

Aunque se han utilizado varias tecnologías de imagen de la mama, como los ultrasonidos, la óptica, la tomografía, la nuclear, los infrarrojos y las técnicas de imagen térmica, ninguna está bien establecida para captar y obtener imágenes del cáncer de mama con un cien por cien de certeza. Las nuevas nanotecnologías de obtención de imágenes pueden desempeñar un papel importante en la detección precoz del cáncer de mama mediante cribado, diagnóstico y prevención, ya que los nuevos nanomateriales ofrecen un mejor contraste para la obtención de imágenes biológicas del cáncer de mama y de otros tipos de cáncer.⁸

En el ámbito de la nanotecnología del cáncer, los nanomateriales han tenido un papel importante en el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de varios tipos de cáncer y el uso de marcadores biológicos a nanoescala, inmunoterapia, terapia fotodinámica, células madre, nanofármacos anticancerígenos en el tratamiento de cáncer.⁸

Las nanomedicinas miden 10^{-9} m, y pueden ser útiles para tratar enfermedades como el cáncer cerebral, enfermedades del sistema nervioso y varios tipos de cáncer. Estas medicinas pueden pasar por una barrera en el cerebro que normalmente evita que otros medicamentos lleguen allí, conocida como barrera hematoencefálica.⁸

Los nanotransportadores y los nanofármacos pueden utilizarse en la detección, el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de muchos tipos de enfermedades humanas, incluido el cáncer.⁸

Las propiedades ópticas y/o magnéticas únicas de las nanopartículas permiten un seguimiento celular no invasivo, preciso y en tiempo real. En particular, el prolongado tiempo de retención celular de estos nanomateriales proporciona una amplia ventana de observación y, por lo tanto, hace posible el seguimiento celular longitudinal *in vivo*.⁹

El desarrollo de un método eficiente y sensible para la detección de CTCs en sistemas biológicos complejos es esencial en el bioanálisis.⁵

1.2. Marcaje celular

El marcaje celular basado en nanopartículas ha surgido como un aspecto importante del diagnóstico y la terapéutica actuales de las enfermedades. El seguimiento y la monitorización de células trasplantadas mediante nanopartículas ha mostrado resultados prometedores *in vitro* e *in vivo*. Gracias a sus singulares propiedades mecánicas, ópticas y eléctricas, las nanopartículas podrían utilizarse para el marcaje celular eficaz de células madre, inmunitarias y cancerosas.⁹

Los receptores de la superficie celular proporcionan los elementos de reconocimiento molecular para el diseño de tecnologías de orientación del cáncer. Casi todas las estrategias actuales de focalización se basan en el reconocimiento específico de los receptores proteicos endógenos. El reconocimiento de los receptores de la superficie celular específicos de la enfermedad permite la administración selectiva de agentes terapéuticos en los tejidos enfermos y minimiza los efectos secundarios no deseados.⁹

Los anticuerpos, como elementos de reconocimiento convencionales, han sido ampliamente utilizados para el bioetiquetado.^{5,8}

Las células con mutaciones genéticas tienen la capacidad de expresar poblaciones de receptores alteradas. Algunas células de cáncer de mama expresan en exceso el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu),⁶ lo que favorece el desarrollo de diversos fármacos dirigidos al cáncer. Lamentablemente, dicha sobreexpresión de HER2 se limita al 15-20% de los cánceres de mama, por lo que la mayoría de las pacientes con cáncer de mama no pueden beneficiarse de las terapias dirigidas a HER2.⁶

El etiquetado óptico (OL, por sus siglas en inglés) se basa en la detección de la fluorescencia, este método consiste en el marcaje *ex vivo* de células con una etiqueta fluorescente, el posterior injerto de las células etiquetadas y la visualización de su acumulación en orgánulos específicos de interés. El método OL es tan sensible como las técnicas de imagen basadas en la radiomarcación, pero sin ninguna exposición a la irradiación. El método de OL proporciona un medio eficaz para el seguimiento no invasivo de las células de forma repetida, generando así una visión de la migración de las células al lugar de destino.⁹

Las etiquetas celulares basadas en nanomateriales, como los puntos cuánticos, han convertido al OL en un método de coste relativamente bajo y en una herramienta indispensable en los estudios con animales pequeños.⁹

Los agentes de contraste (CAs, por sus siglas en inglés) son productos químicos que aumentan el contraste y se utilizan para mejorar la detección de enfermedades aumentando la sensibilidad del diagnóstico.⁸

Los QDs coloidales luminiscentes son nanopartículas semiconductoras inorgánicas fluorescentes con características ópticas únicas. Son portadores de carga (electrones y huecos) confinados en las tres dimensiones. Poseen una buena estabilidad física y fotoestabilidad y se han utilizado para facilitar el seguimiento óptico de las células implantadas. Como cada célula contiene muchas nanopartículas que pasarán a las células hijas, es posible el seguimiento a largo plazo del destino de las células.⁹

El brillo superior y la falta de fotoblanqueo de los puntos cuánticos promueven su uso como etiquetas para la microscopía de luz en las ciencias de la vida.¹⁰

Los QDs son candidatos ideales para la microscopía multifotónica en animales vivos, ya que el producto de la sección transversal de absorción no lineal de dos fotones y el rendimiento cuántico de fluorescencia proporcionan una medida directa de la luminosidad para la obtención de imágenes. Los estudios de modelización también han revelado que existen dos ventanas espectrales, 700-900 nm y 1200-1600 nm, para la obtención de imágenes ópticas óptimas basadas en QDs *in vivo*. Se hace hincapié en la selección del tamaño adecuado y del recubrimiento biocompatible como factores principales.⁹

Los QDs se prefieren a los fluoróforos orgánicos para el marcaje celular multicolor debido a sus altos rendimientos cuánticos, altos coeficientes de excitación molar, fuerte resistencia al fotoblanqueo y a la degradación química, amplios espectros de excitación, largos tiempos de vida de fluorescencia, estrechos espectros de emisión y gran desplazamiento de Stokes.⁹ Debido a su monodispersidad al 100%, los QDs proporcionan datos más precisos para los

estudios cuantitativos y de localización a escala nanométrica en comparación con las nanopartículas de oro.¹⁰

En general, existen dos enfoques para el marcaje y el seguimiento celular: el marcaje celular directo y el indirecto. El etiquetado celular directo se refiere a la estrategia de cargar las células con sondas antes del injerto en el huésped. El etiquetado indirecto mediante la transfección de un gen reportero permite visualizar el tráfico, la persistencia, la proliferación y la función de las células en el lugar de destino.⁹

Las nanopartículas pueden introducirse de forma pasiva (no dirigida) o activa (dirigida) en las células de interés.⁹

1.2.1. Estudio inmunohistoquímico

La inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) es un método de prueba auxiliar ampliamente utilizado en la patología quirúrgica anatómica para la clasificación y el diagnóstico de las células y utiliza anticuerpos dirigidos contra determinados antígenos en tejidos y células específicos para facilitar la determinación del tipo de célula y el órgano de origen. El método se realiza con mayor frecuencia en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés). El uso de la IHC se ha ampliado para evaluar biomarcadores predictivos y pronósticos en muchas neoplasias malignas, como las de mama, tracto gastrointestinal, pulmón, hematolinfoide y sistema nervioso central.¹¹

Este método se aplica sobre todo junto con la evaluación morfológica como herramienta de diagnóstico y, en el contexto del diagnóstico del cáncer, sirve como plataforma sólida y rentable para la detección integral de biomarcadores. El pronóstico y la detección de la enfermedad mínima residual también pueden llevarse a cabo mediante la inmunohistoquímica.¹²

El principio básico de esta técnica consiste en la producción localizada, catalizada por enzimas, de una señal cromogénica visible *in situ* mediante microscopía óptica de rutina.¹²

Los pasos secuenciales de la IHC pueden resumirse en: 1) recuperación de antígenos (RA), implica el tratamiento previo del tejido para recuperar los antígenos enmascarados por la fijación y hacerlos más accesibles a la unión del anticuerpo; 2) adición del anticuerpo primario; 3) aplicación de un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario y 4) adición de un reactivo de detección para localizar el anticuerpo primario.¹¹

El anticuerpo primario puede ser monoclonal o policlonal, por lo general de la clase IgG, producido mediante la inmunización de un huésped mamífero como el ratón, el conejo, la cabra o el caballo.¹² En general, los anticuerpos monoclonales, que se dirigen a un solo epítipo, tienden a ser más específicos, mientras que los policlonales, que pueden unirse a muchos epítopos diferentes, tienden a ser más sensibles.¹¹

Para visualizar la interacción antígeno-anticuerpo bajo microscopía de luz, hay que marcar el anticuerpo primario o el secundario, que se dirige contra la inmunoglobulina de la especie en la que se produjo el anticuerpo primario. En el método directo, el anticuerpo primario se marca y se aplica al tejido en un proceso rápido de un solo paso; sin embargo, este método

no se utiliza comúnmente debido a la falta de amplificación de la señal y, por lo tanto, el requisito de una mayor concentración de anticuerpo, así como la necesidad de marcar cada anticuerpo primario. En el método indirecto, el anticuerpo secundario está marcado, lo que permite la amplificación de la señal y su uso con muchos anticuerpos primarios diferentes.¹¹

La inmunohistoquímica convencional (IHC) se utiliza habitualmente como técnica de diagnóstico en el campo de la patología tisular, pero adolece de ciertas limitaciones. La más crítica es que esta técnica sólo permite el marcaje de un único marcador por sección tisular. Esto hace que se pierdan oportunidades de obtener importante información pronóstica y diagnóstica de las muestras de los pacientes.

Existe la probabilidad de que aparezca la tinción de fondo, que puede deberse a la unión inespecífica de los anticuerpos, más común en los anticuerpos policlonales, y a la actividad de la peroxidasa endógena, más problemática en los tejidos con abundantes elementos hematopoyéticos, como la médula ósea.¹¹

Los falsos positivos y negativos pueden deberse al propio método inmunohistoquímico, pero también a un sinfín de otros factores, como la preparación y la fijación.¹¹ Una serie de factores preanalíticos, analíticos y postanalíticos pueden influir en la calidad de las tinciones inmunohistoquímicas.¹²

Aunque la IHC sigue siendo un método de diagnóstico y pronóstico muy práctico y rentable, este método de marcador único no puede recopilar toda la información del complejo microambiente inmunitario. Otro inconveniente de la evaluación de biomarcadores basada en la IHC es la alta variabilidad interobservador.¹³

1.2.2 Ensayos inmunohistoquímicos para cáncer de mama

La inmunohistoquímica tiene numerosas aplicaciones importantes en el diagnóstico de la patología mamaria, desde ayudar a diferenciar entre hiperplasias epiteliales benignas y proliferaciones neoplásicas hasta servir como biomarcadores predictivos y pronósticos que ayudan a guiar el tratamiento de las pacientes.¹⁴

La lista de inmunohistoquímicas que pueden apoyar el origen mamario de un carcinoma sigue creciendo, pero también lo hace la lista de advertencias en su interpretación. Ninguna inmunotinción es totalmente específica para el carcinoma de mama, y el estado del receptor de estrógeno (RE) del carcinoma influye en la sensibilidad de la inmunotinción.¹⁴

Un biomarcador del cáncer es un indicador medible; por ejemplo, el nivel o la actividad de una entidad molecular concreta, segregada por las propias células cancerosas o por el organismo en respuesta al cáncer. Tiene una firma molecular única con características identificables, que puede medirse objetivamente y evaluarse como indicador de un proceso patogénico o de la respuesta farmacológica a una terapia concreta.¹⁵

Algunos de los principales retos de la detección precoz del cáncer basada en biomarcadores son las bajas concentraciones de ciertos biomarcadores, que a menudo no reflejan el cáncer de forma eficaz, y que ninguno de los biomarcadores actualmente disponibles alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad. Los esfuerzos se centran cada vez más, no sólo en el descubrimiento de nuevos biomarcadores fiables, cuantitativos o validados para la detección

temprana del cáncer, sino también en la mejora de la sensibilidad de los ensayos y en la construcción de un sistema de amplificación de biomarcadores para facilitar la detección mediante las nuevas tecnologías de nanosensores.¹⁵

Han surgido nuevos marcadores inmunohistoquímicos como sustitutos de cambios moleculares específicos en varios carcinomas de mama de tipo especial, como el carcinoma adenoide quístico, el carcinoma secretor y el carcinoma de células altas con polaridad invertida (TCCRP, por sus siglas en inglés) (TABLA 1).¹⁴

Carcinoma de mama de tipo especial	Alteración molecular más frecuente	Inmunohistoquímica
Carcinoma adenoide quístico	Translocación <i>t</i> (6;9), que da lugar a la fusión del gen <i>MYB-NFIB</i>	MYB
Carcinoma secretor	Translocación <i>t</i> (12;15) que da lugar a la fusión génica <i>ETV6-NTRK3</i>	Pan-TRK
Carcinoma de células altas con polaridad invertida (TCCRP)	Mutación del punto caliente <i>IDH2</i> p.ARG172	IDH2

Tabla 1 Inmunohistoquímica de los impulsores moleculares de los carcinomas de mama de tipo especial.

El uso de inmunotinciones ayuda a la correcta clasificación de estos carcinomas de mama, a menudo con un coste menor y un tiempo de respuesta más rápido que el de las pruebas moleculares correspondientes.¹⁴

La expresión del receptor de estrógeno y el receptor de progesterona se analiza de forma rutinaria en los cánceres de mama como marcadores de pronóstico y predicción. Estos receptores se expresan en aproximadamente el 75-80% y el 65% de todos los tumores de mama, respectivamente.¹⁶

La precisión de las pruebas de biomarcadores del cáncer de mama es de vital importancia para el cuidado de las pacientes. Sin embargo, el 20% de los resultados de las pruebas de RE, RP y HER2 en todo el mundo son inexactos.¹⁶

Mediante un análisis de agrupación no supervisado, se identificaron cinco subtipos intrínsecos de cáncer de mama: subtipos luminal A, luminal B, similar a la mama normal, enriquecido con HER2 y similar a la mama basal. Entre ellos, los cánceres de mama de tipo luminal son en su mayoría ER/PR positivos.¹⁶

La tecnología de inmunohistoquímica convencional tiene pocos requisitos en cuanto a las condiciones experimentales y el equipo, tiene las ventajas de un funcionamiento sencillo, un posicionamiento obvio de los resultados y una detección semicuantitativa, y puede relacionar estrechamente la morfología del tejido/la célula con su función y su metabolismo. Sin embargo, en la práctica, a menudo se produce una coloración inespecífica con un fondo amarillo, lo que afecta seriamente a la interpretación de los resultados experimentales. Especialmente en el caso de los tejidos ricos en mitocondrias en el citoplasma, como los tejidos de la tiroides, el hígado y el riñón, la biotina endógena situada en el citoplasma se

activa tras la aplicación de antígenos reparadores del calor, y es fácil que se tiña con anticuerpos posteriores, lo que provoca falsos positivos y afecta al resultado de la tinción. Es fácil que se produzcan juicios erróneos.¹⁷

Debido a que diferentes tejidos, diferentes anticuerpos (incluyendo anticuerpos primarios y secundarios), diferentes tasas de flujo de aire, diferentes temperaturas de la sala e incluso la calidad del agua pueden afectar a la tinción, el tiempo de desarrollo del color no se puede predecir.¹⁷

El marcaje por inmunofluorescencia es una técnica muy conocida y ampliamente utilizada en los campos biomédicos, como la detección de proteínas y antígenos en secciones de tejido. Sin embargo, las etiquetas fluorescentes orgánicas disponibles actualmente, como la fluoresceína, los colorantes de cianina y los colorantes Alexa Fluor, son relativamente inestables y están sujetas a un fotoblanqueo relativamente rápido e irreversible bajo una iluminación de alta intensidad.¹⁷

Un excelente agente de contraste debe poseer las propiedades fotofísicas de bajo rendimiento cuántico, alto coeficiente de extinción molar, pico de absorción en la ventana del infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés) y excelente fotoestabilidad, así como tener baja toxicidad e inmunogenicidad, alta afinidad y especificidad de la diana y alta biocompatibilidad. Hasta la fecha, se ha informado de una amplia variedad de agentes de contraste para la obtención de imágenes, entre los que se incluyen nanocristales de oro, nanotubos de carbono, agentes basados en grafeno, análogos del grafeno en 2D, nanopartículas orgánicas, y nanopartículas poliméricas semiconductoras (SPN), entre otros.¹⁸

Los agentes de contraste comúnmente utilizados para la obtención de imágenes incluyen cromóforos endógenos, como la melanina, desoxihemoglobina, lípidos, oxihemoglobina o colágeno, así como agentes de contraste exógenos. Dichos agentes son necesarios para diagnosticar y tratar enfermedades como el carcinoma de mama o el glioma, ya que estas enfermedades no generan agentes de contraste endógenos y, por lo tanto, son difíciles de detectar.¹⁸

Debido a sus propiedades químicas y físicas únicas, las nanopartículas (NPs) se han desarrollado para nuevas y mejores aplicaciones de biosensores durante las últimas tres décadas. Más recientemente, ha surgido la detección de biomarcadores de cáncer mediante ensayos, conjuntos o sensores basados en NPs.¹⁵

La ventaja de las NPs radica en su capacidad para proporcionar métodos de detección de biomarcadores altamente sensibles, selectivos y rápidos, lo que permite su uso en ensayos para detectar trazas de un biomarcador en varios tipos de fluidos biológicos, desde las lágrimas hasta la orina. La técnica de detección utilizada depende de las propiedades fisicoquímicas de la NP empleada y, por tanto, en el desarrollo de ensayos basados en la nanotecnología es el reconocimiento y/o la diferenciación en el punto de atención de concentraciones ultrabajas de biomarcadores.¹⁵

Para que el ensayo tenga éxito, las NPs deben estar diseñadas para incorporar ligandos específicos del tumor en su superficie (mediante conjugación covalente o no covalente) con alta afinidad de unión a los biomarcadores del cáncer. Al interactuar con trazas de un biomarcador en un fluido fisiológico, el ligando conjugado con la NP (por ejemplo, un anticuerpo, un péptido, un aptámero u otra molécula pequeña) experimenta un cambio

instantáneo. Este cambio se convierte en una señal medible debido a las propiedades características de la NP conjugada, permitiendo así la detección del biomarcador. Además de la detección directa a través de ligandos funcionales, la propia NP puede potenciar la secreción de biomarcadores por parte de las células cancerosas para amplificar la señal y facilitar la detección temprana.¹⁵

El desarrollo de agentes de contraste NP que pueden utilizarse como biomarcadores de imagen y sus aplicaciones *in vivo* han proporcionado un nuevo enfoque para aplicar las nanotecnologías en la detección de biomarcadores. Las propiedades físicas únicas de las nanopartículas permiten utilizarlas como agentes de contraste en los biomarcadores de imagen (IBs) para estadificar la progresión de la enfermedad y controlar la eficacia del tratamiento en los pacientes.¹⁵

La manipulación de la arquitectura de los nanomateriales puede proporcionar varias ventajas, como una gran superficie, una funcionalización versátil de la superficie, capacidad para múltiples mecanismos de detección y la posibilidad de integración de dispositivos.¹⁵

Dentro de los agentes de contraste podemos encontrar diversas clasificaciones, sin embargo, de forma general pueden agruparse en: Inorgánicos y orgánicos. Por parte de los agentes de contraste de tipo inorgánico encontramos a los nanomateriales metálicos los cuales poseen una excelente absorción de la luz y una excepcional capacidad de conversión fototérmica debido al efecto de resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR). Entre ellos, nanocristales de oro y sus ensamblajes, al igual que calcogenuros de metales de transición/nanomateriales basados en el MXeno. Del mismo modo, en la categoría de los AC inorgánicos se encuentran los nanomateriales basados en el carbono, principalmente los nanotubos de carbono (CNT, por sus siglas en inglés) y los nanomateriales basados en el grafeno.¹⁸

Además de los nanomateriales mencionados, también se ha informado de otros agentes de contraste para la obtención de imágenes basados en nanomateriales, como las nanohojas de telurio, las nanohojas de boro, las nanohojas de fósforo negro, puntos cuánticos de fósforo negro, nanoplanchas de carburo de tántalo, seleniuro de molibdeno, nanoplanchas de sulfuro de cobalto, nanoplanchas de disulfuro de renio, NPs basadas en el bismutsulfuro y nanoestructuras de disulfuro de vanadio, así como nanohíbridos.¹⁸

Los agentes de contraste moleculares orgánicos, como la porfirina, la melanina, los colorantes basados en la cianina y la perileno-diimida (PDI), se han aplicado ampliamente en la obtención de imágenes debido a su excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad.¹⁸

También aparecen las nanopartículas poliméricas semiconductoras (SPNs) formadas en su totalidad por componentes orgánicos, incluidos polímeros semiconductores (SP) y oligómeros. Los SPNs tienen magníficas propiedades ópticas, como un gran coeficiente de absorción, una absorción óptica ajustable, un tamaño controlable y una alta fotoestabilidad, por lo que pueden actuar como agentes de contraste para la obtención de imágenes biomédicas.¹⁸

Los QDs son un nuevo tipo de partículas de tamaño nanométrico hechas de semiconductores inorgánicos. Tienen características ópticas novedosas, y pueden producir fluorescencia de emisión con diferentes longitudes de onda según su tamaño y composición. Los QDs tienen grandes coeficientes de extinción molar, lo que significa que son muy eficaces a la hora de

absorber la luz de una longitud de onda específica. Además, no sólo tienen un nivel de extinción molar de 10 a 50 veces mayor que el de los tintes orgánicos, sino que también tienen tiempos de vida en estado excitado más largos que los tintes orgánicos, optimizando así la separación de la fluorescencia de los puntos cuánticos de la fluorescencia de fondo. Aunque los QDs son relativamente grandes (20-40 nm, unos 150 kd), se han utilizado para la obtención de bioimágenes IHC, marcadores moleculares y celulares y marcadores *in vivo*.¹⁷

Los QDs son un nuevo tipo de sonda fluorescente. En comparación con los fluoróforos convencionales, tiene las ventajas de la estabilidad de la luz, la señal extendida, la fuerte fluorescencia y la mejora de las interacciones inmunes débiles.¹⁷

Los QDs pueden utilizarse para la detección inmunohistoquímica en tejidos FFPE, y el doble etiquetado de inmunofluorescencia con QDs también puede realizarse en secciones de tejido FFPE para detectar simultáneamente la expresión de ambos antígenos. Se descubrió que la QDs-IHC tenía mejor consistencia que la inmunohistoquímica tradicional. Asimismo, debido a las ventajas de la alta intensidad de la fluorescencia de los puntos cuánticos y la pequeña interferencia de fondo, la tecnología QDs-IHC puede resolver mejor el problema de la coloración de fondo de la IHC tradicional, y su tasa de etiquetado positivo es incluso mayor que la de la inmunohistoquímica.¹⁷

1.3. Puntos cuánticos como agentes de contraste

Los QDs, generalmente compuestos por elementos de los grupos II-VI (por ejemplo, CdSe, CdTe, CdS y ZnSe) o III-V (por ejemplo, InP, InAs, GaAs y GaN), son nanocristales semiconductores emisores de luz con tamaños de 2 a 10 nm, que ofrecen el efecto de cuantificación debido al conflicto del movimiento de los electrones en dichos nano tamaños.¹⁹ Cuando el tamaño de los puntos cuánticos se reduce, la frecuencia que crean se vuelve más restringida, es decir, la tonalidad de los puntos cuánticos está limitada por su tamaño. Tienen una frecuencia de descarga precisa, por lo que sus espectros no revelan una variedad de radiaciones de fluorescencia.²⁰

Se han desarrollado algunos QDs poco tóxicos o incluso no tóxicos, como los C-QDs, los QDs de grafeno, los QDs de silicio y los QDs de plata, que pueden evitar los metales pesados y tener propiedades ópticas superiores a los QDs semiconductores tradicionales que contienen metales pesados.²¹

Los QDs son portadores de carga (electrones y huecos) confinados en las tres dimensiones,⁹ actúan como semiconductores y son útiles para representar células y seres vivos de forma fluorescente. Dependiendo de su composición y tamaño, pueden ser una buena fuente de luz que abarca desde el UV hasta el IR. En el núcleo de cristal de un QDs hay alrededor de 100-100,000 átomos. Por otra parte, la sustancia empleada para fabricar los puntos cuánticos es la responsable de las dimensiones del QDs.²⁰

Con un tamaño entre 100 y 10,000 veces menor que el de las células humanas, los QDs pueden ofrecer interacciones sin precedentes con las biomoléculas de la superficie y el interior de las células, lo que podría revolucionar el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades.⁴

El propósito de las pruebas de fluorescencia basadas en QDs es evitar los diversos inconvenientes de los fluoróforos de color natural, y tienen preferencias específicas como: Fotoestabilidad, relación señal/ruido, emisión restringida, tiempos de vida de la fluorescencia prolongados, una única fuente de excitación es posible y sensibilidad eficaz. Los puntos cuánticos constituyen una herramienta fantástica para la obtención de imágenes vasculares de los tumores y de imágenes atómicas multimodales de la angiogénesis.²⁰

Los principales usos de los QDs en la terapia del cáncer incluyen la detección y el diagnóstico tempranos de los tumores, la bioimagen, la administración dirigida de fármacos genéticos, la fototerapia y la administración de fármacos. Los QDs son también la mejor opción para la administración de fármacos debido a su gran biocompatibilidad, baja citotoxicidad y gran capacidad de captación celular.²⁰

Los QDs pueden desempeñar un papel crucial en el diagnóstico de tumores. La detección de los trastornos de fase I se asocia a una tasa de resistencia a los 5 años superior al 90% en la gran mayoría de los casos debido a la terapia correctiva. Las tecnologías de nomenclatura fluorescente o de imagen fluorescente son herramientas importantes en el arsenal de resolución clínica. Debido a su estabilidad fotoquímica y a su fuerte producción de fluorescencia, los puntos cuánticos se utilizan sobre todo para mejorar la obtención de imágenes de fluorescencia (FIGURA 1).²⁰

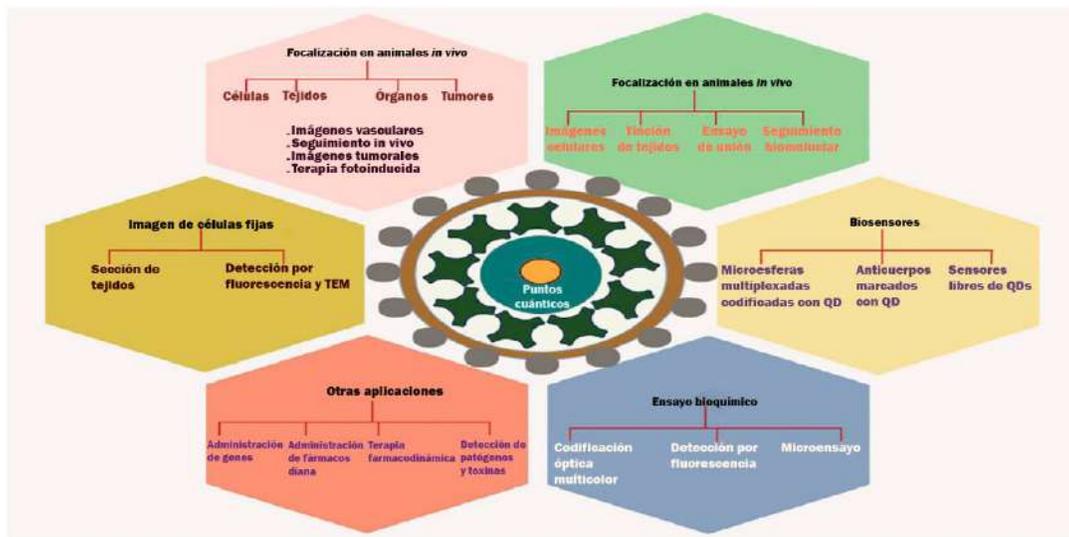


Figura 1. Diversas aplicaciones de los puntos cuánticos en bioimagen y diagnóstico

Una amplia variedad de temas de investigación se beneficia de las ventajas únicas de los QDs, que van desde la caracterización de los patrones de distribución de las proteínas de membrana y los estudios de una sola molécula para la determinación de la estequiometría de las proteínas, hasta la detección de proteínas expresadas a bajos niveles de expresión y la cuantificación de los niveles o ratios de expresión modificados.¹⁰

Las sondas multifuncionales basadas en QDs conducen al desarrollo de la administración de fármacos anticancerígenos y de siRNA, a la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), al diagnóstico molecular del cáncer multiplexado y a la obtención de imágenes *in vivo*. Asimismo, los QDs pueden utilizarse para monitorizar los cambios dinámicos de un

microambiente tumoral, lo que contribuye a la investigación del mecanismo de invasión del cáncer y permite una mejor guía para la terapia clínica personalizada.⁴

En comparación con los tintes orgánicos convencionales, los QDs poseen varias ventajas distintivas, como una alta fotoestabilidad contra el fotoblanqueo, un largo tiempo de vida de la fluorescencia, una amplia gama de longitudes de onda de excitación y anchos de banda de emisión más estrechos que permiten el análisis simultáneo de múltiples objetivos celulares utilizando una excitación de una sola longitud de onda,¹⁹ lo que promueve su uso como etiquetas para la microscopía de luz en las ciencias de la vida.¹⁰

Los QDs se prefieren a los fluoróforos orgánicos para el marcaje celular multicolor debido a sus altos rendimientos cuánticos, altos coeficientes de excitación molar, fuerte resistencia al fotoblanqueo y a la degradación química, amplios espectros de excitación, largos tiempos de vida de fluorescencia, estrechos espectros de emisión y gran desplazamiento de Stokes.⁹

Debido a su monodispersidad al 100%, los QDs proporcionan datos más precisos para los estudios cuantitativos y de localización a escala nanométrica cotejándolos con las nanopartículas de oro aplicadas tradicionalmente con su fracción desconocida de partículas preagrupadas.¹⁰

Los QDs tienen un mayor potencial de degradación que los ensayos de imagen óptica convencionales, lo que les permite hacer un seguimiento de las mediciones de las células durante más tiempo y dar información fresca sobre las colaboraciones subatómicas. Dado que los QDs son nanoclusters, proporcionan un excelente contraste al obtener imágenes con una lente de aumento de electrones cuando la dispersión mejora. Los QDs demuestran una descarga sintonizable por tamaño (desde el UV hasta el IR). En comparación con los tonos tradicionales, la fluorescencia dura mucho tiempo.²⁰

En comparación con las laboriosas metodologías enzimáticas, el uso de QDs elimina la necesidad de añadir sustrato, lo que puede contribuir a la reducción del tiempo de análisis aplicando un proceso sencillo. La señal electroquímica obtenida puede entonces relacionarse cuantitativamente con la concentración del analito. Además, al trabajar con etiquetas electroactivas se superan los aspectos de inestabilidad térmica inherentes a la naturaleza de las enzimas, que son las principales dificultades para su uso como etiquetas.²²

Las imágenes ópticas son un método importante para detectar y obtener imágenes del sistema linfático. En comparación con la luz visible, la fluorescencia NIR tiene ventajas en la obtención de imágenes del sistema linfático debido a su alta penetración en los tejidos a través de la piel y los tejidos subcutáneos. Los QDs NIR con una longitud de onda de emisión que va de 700 a 2500 nm son adecuados para mapear el sistema linfático porque la profundidad de penetración tisular de los QDs NIR es de 5 mm, lo que puede penetrar la piel y los tejidos subcutáneos para realizar imágenes linfáticas en animales grandes. Al mismo tiempo, los QDs tienen una sección transversal de dos fotones más grande que los tintes fluorescentes convencionales, lo que puede evitar la interferencia de la autofluorescencia del tejido y puede ayudar a conseguir imágenes de tejidos profundos.²¹

Una ventaja potencial de las imágenes basadas en QDs es que pueden evaluar y distinguir simultáneamente los drenajes linfáticos de múltiples áreas de drenaje separadas, lo cual es difícil para las técnicas tradicionales de linfangiografía, como los rayos X, la resonancia magnética o los radionúclidos.²¹

Para la aplicación del espectro, la sensibilidad de las imágenes moleculares basadas en QDs puede ser de dos a tres órdenes mayor que la de los tintes fluorescentes habituales. Además, la fluorescencia en el infrarrojo cercano de los NIR-QDs puede detectarse en tejidos profundos, lo que los hace adecuados para la obtención de imágenes *in vivo* con una elevada relación señal/fondo.⁴

A diferencia de la inmunohistoquímica tradicional (IHC), la QD-IHC es más exacta y precisa a niveles bajos de expresión de proteínas y puede lograr una detección cuantitativa que proporcionará mucha más información para el tratamiento personalizado.⁴

La nanoplataforma dirigida basada en QDs ofrece varias ventajas, como lo son: 1) las etiquetas de imagen o las combinaciones de etiquetas para diferentes modalidades de imagen pueden unirse a una única nanopartícula; 2) los ligandos de focalización en la nanopartícula pueden proporcionar una mayor afinidad y especificidad de unión; 3) la capacidad de integrar un biomarcador específico para evitar las barreras biológicas puede permitir una mayor eficacia de focalización; 4) la entrega efectiva y controlada de agentes terapéuticos en los pacientes, que pueden ser monitoreados de forma no invasiva en tiempo real.⁴

Los agentes de imagen basados en QDs pueden satisfacer imágenes tumorales *in vivo* de alta calidad y menos impactos biológicos mediante la "permeabilidad y retención mejoradas" (EPR, por sus siglas en inglés) o la imagen molecular dirigida. El principio de las imágenes tumorales basadas en la EPR es la permeabilidad de los vasos sanguíneos del tumor.⁴

Varios estudios utilizaron QDs para desarrollar imágenes fluorescentes *in vitro* de células humanas malignas de melanoma, ovario, mama, páncreas, glioblastoma, epidermoide de ovario, pulmón, hepatocelular y adenocarcinoma.²⁰

Una de las formas más significativas de enfocar y obtener imágenes *in vivo* es examinar la biodistribución y la farmacología de los QDs. El tipo y la composición de las superficies naturales o bioorgánicas de los puntos cuánticos determinan su biocompatibilidad. Los biomarcadores tumorales son cruciales para detectar y diagnosticar el cáncer en una fase temprana. Si se puede encontrar una serie de marcadores tumorales y diferenciar adecuadamente entre células cancerígenas y no cancerígenas, las pruebas de biomarcadores resultan útiles para la detección y el análisis del cáncer.²⁰ Las etiquetas pueden mejorar en gran medida la transducción de la señal y simplificar la estrategia de detección. Los QDs se revelaron como candidatos prometedores como tales etiquetas, ya que pueden conjugarse con anticuerpos y otras proteínas.²²

Existen tres biomarcadores obligatorios para todas las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama invasivo: el receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Este último se ha establecido como un importante biomarcador de diagnóstico y se recomienda su análisis ya que esta proteína se sobreexpresa en el 15-20% de los cánceres de mama primarios invasivos y se relaciona con los fenotipos más agresivos. El HER2 puede medirse en el plasma sanguíneo.²² El etiquetado específico y la cuantificación precisa de esos biomarcadores de pronóstico son el procedimiento clave para evaluar el pronóstico del BC.²¹

En el diagnóstico de enfermedades malignas, las nanopartículas fluorescentes pueden utilizarse para crear diversos perfiles de biomarcadores tumorales.²⁰

Para aplicaciones tumorales, los QDs se encapsulan con diversos tipos de polímeros anfífilicos para hacerlos más biocompatibles y solubles en agua. Estos polímeros anfífilicos suelen llevar grupos químicamente activos, como grupos carboxilo, hidroxilo y tiol, que pueden acoplarse con agentes funcionales modificados, como estreptavidina, fármacos, pequeñas moléculas, ADN y anticuerpos.²¹ Cuando se conjugan con agentes bimoleculares como anticuerpos, péptidos u otras moléculas pequeñas, las sondas basadas en QDs pueden utilizarse para dirigirse a moléculas cancerígenas con gran especificidad y sensibilidad.⁴

Los QDs, pueden ser buenos nanotransportadores de entrega a los tumores *in vivo* para la obtención de imágenes multiparamétricas dadas sus áreas superficiales relativamente grandes que pueden ser conjugadas con más de un ligando de orientación. Además, los QDs son sondas de microscopía óptica y electrónica de doble modalidad, lo que permite el seguimiento en tiempo real y la localización ultraestructural durante la transfección.⁴ Los cambios en la superficie también pueden ayudar a disminuir la unión desenfocada, reducir la acumulación y la agregación, y facilitar la obtención de una imagen objetiva clara y la entrega.²⁰

Para los estudios de tejidos, la imagen basada en QDs se ha utilizado para estudiar las interacciones de los biomarcadores (FIGURA 2B) y evaluar los biomarcadores de pronóstico (FIGURA 2C). Para estudios *in vivo*, las imágenes basadas en QDs se han aplicado para mapear el sistema linfático axilar (ALS) (FIGURA 2D), mostrar el tumor de xenoinjerto de BC (FIGURA 2E) y detectar metástasis de BC (FIGURA 2F).²¹

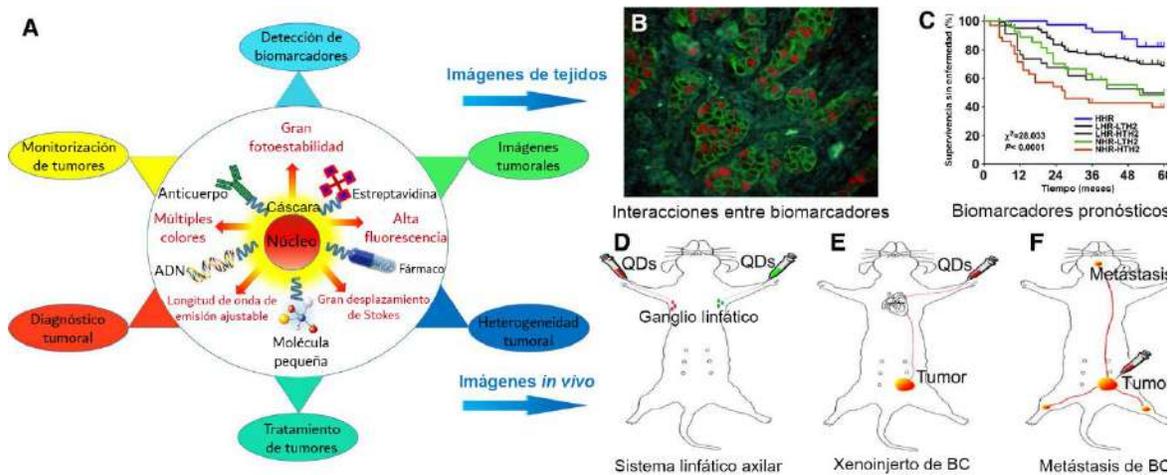


Figura 2. Propiedades ópticas y posibles aplicaciones de los QDs en la investigación de los CB. Los QDs más utilizados tienen una estructura en forma de concha encapsulada con polímeros anfífilicos que contienen grupos químicamente activos. En comparación con los tintes orgánicos tradicionales, los QDs presentan excelentes propiedades ópticas (A). Una vez acoplados a moléculas activas, los QDs pueden adaptarse para la obtención de imágenes de tejidos, como el estudio de las interacciones entre biomarcadores (B) y la evaluación de biomarcadores de pronóstico (C), y para la obtención de imágenes *in vivo*, como la cartografía de la ELA (D), la visualización de xenoinjertos de CB (E) y la detección de metástasis de CB (F) en investigaciones sobre CB

Un progreso alentador en este campo es el desarrollo de la imagen multiplexada basada en QDs que muestra un gran potencial para la imagen multiplexada *in situ* para revelar simultáneamente las interacciones de diferentes moléculas. Las imágenes multiplexadas basadas en QDs también se han empleado para revelar de forma simultánea las interacciones dinámicas entre los biomarcadores del microambiente tumoral (colágeno IV, angiogénesis

tumoral y macrófagos infiltrados) y las células cancerosas (metaloproteinasa de matriz 9), incorporando las dimensiones temporal y espacial.²¹

Gracias a las imágenes basadas en QDs, se puede estudiar bien la coexpresión y la coevolución de múltiples biomarcadores en las células cancerosas y el microambiente. Al mismo tiempo, los valores pronósticos de esos biomarcadores también pueden evaluarse con mayor precisión, lo que impulsará eficazmente el progreso de la patología molecular y promoverá la transición a la oncología preventiva y predictiva.²¹

1.4. Estado del arte

Desde que los puntos cuánticos se conjugaron por primera vez con una molécula biológica en 1998, han evolucionado hasta convertirse en una potente herramienta de bioimagen fluorescente, incluida la imagen intracelular y de una sola molécula.²³

Los cambios moleculares en los tejidos son extremadamente complejos y resulta difícil estudiar la progresión de la enfermedad. Esto representa un importante reto que aún persiste en el campo biomédico, especialmente en el cáncer. Además, la heterogeneidad de los tumores supone un reto importante para el desarrollo de terapias dirigidas. En este sentido, el uso de QDs ha demostrado ser muy prometedor para permitir el marcaje celular *ex vivo* no invasivo y la obtención de imágenes de diagnóstico en muestras tumorales, así como la investigación *ex vivo* de los marcadores moleculares y los principales procesos dinámicos del cáncer: migración, invasión y metástasis.²³

Para ser más aplicables en la obtención de imágenes biomédicas en tiempo real, el diagnóstico y las aplicaciones quirúrgicas guiadas por imágenes, las sondas de obtención de imágenes deben ser capaces de obtener imágenes de tejidos profundos. La luz en el rango visible (por debajo de 700 nm) no es capaz de penetrar en el tejido profundo debido a los altos niveles de dispersión de los absorbentes naturales (por ejemplo, lípidos, desoxihemoglobina, agua). Los QDs tienen una gran sección transversal de dos fotones, lo que significa que es posible utilizar la irradiación del infrarrojo cercano con nanopartículas que emiten alrededor de 650-900 nm de longitud de onda. Esto se conoce como la ventana de transparencia tisular, ya que la absorción por el agua y el tejido es muy débil en este rango, lo que hace posible la obtención de imágenes de tejidos profundos. Además, los QDs son excelentes sondas para la obtención de imágenes *in vivo* en tiempo real, ya que son 100-1000 veces más intensas que los fluoróforos orgánicos convencionales y son capaces de obtener imágenes multifotónicas con excitación por una sola longitud de onda.²³

Otra de las principales aplicaciones de los puntos cuánticos es la obtención de imágenes tumorales dirigidas, ya que el pequeño tamaño de los QDs facilita la acumulación en la vasculatura permeable alrededor de las zonas tumorales debido al efecto EPR. Al ser sólo una acumulación pasiva, las aplicaciones se ven limitadas por la escasa especificidad tumoral. En este sentido, el uso de las estrategias de bioconjugación con elementos de focalización específicos para el cáncer ha mejorado significativamente la eficacia de la focalización.²³

Los QDs representan un candidato interesante para habilitar plataformas teranósticas para tumores, y el desarrollo de nanotransportadores co-cargados con agentes quimioterapéuticos.²³

Los QD también se han utilizado para facilitar la terapia génica mediante la administración intracelular y la obtención de imágenes del tratamiento con RNA de interferencia pequeño (siRNA). Los siRNA son cadenas cortas de RNA de doble cadena que tienen la capacidad de silenciar específicamente los genes a través de una vía endógena conocida como RNA de interferencia (RNAi). El RNAi se define como el proceso de corte del RNA mensajero por un siRNA de secuencia específica, y puede aplicarse como terapia para las enfermedades que resultan de una expresión génica aberrante.²³

Los puntos cuánticos de sulfuro de plata (Ag₂S QDs) son fluoróforos bien conocidos en el infrarrojo cercano,²⁴ han surgido como un nanomaterial único que muestra ventajas sin precedentes y prestaciones superiores en biomedicina debido a sus características estructurales y fisicoquímicas únicas. En consecuencia, los QDs se han utilizado cada vez más para el etiquetado, la obtención de imágenes, el sondeo, la computación molecular, los biosensores, y la detección desde que se utilizaron por primera vez como etiquetas biológicas.²⁵

Es bien sabido que la luz de las longitudes de onda visibles a NIR (650-1350 nm) no es invasiva para la detección y obtención de imágenes de tejidos anormales. La ventana óptica NIR consiste en la primera región del infrarrojo cercano (NIR-I; $650 \leq \lambda \leq 1000$ nm) y la segunda región del infrarrojo cercano (NIR-II; $1000 \leq \lambda \leq 1700$ nm). La NIR-II puede ser más propicia para la obtención de imágenes que la NIR-I debido a la menor fluorescencia y a la menor dispersión de la luz.²⁵

Los Ag₂S QDs, han despertado un gran interés en la obtención de imágenes de fluorescencia *in vivo* debido a su buena biocompatibilidad y a su potencial para emitir en la segunda ventana del infrarrojo cercano (NIR-II, 1000-1700 nm), donde la autofluorescencia corporal y la dispersión de fotones se ven minimizadas, lo que permite mejorar enormemente la resolución de las imágenes (a escala micrométrica) y la profundidad de penetración de la luz (hasta varios milímetros).²⁴

Los QDs NIR-II incluyen principalmente Ag₂S, Ag₂Se, Ag₂Te, PbS, PbSe, InAs, Cd₃P₂, Cd₃As₂, CdTe, HgTe. Sin embargo, los elementos tóxicos como el cadmio, el mercurio, el plomo y el arsénico han afectado seriamente a su aplicación en el campo biomédico.²⁵

En comparación con los QDs, los nanotubos de carbono, las moléculas orgánicas y los puntos de polímero suelen tener un rendimiento cuántico (QY, por sus siglas en inglés) de baja fotoluminiscencia (PL, por sus siglas en inglés). Los QDs de la ventana óptica del infrarrojo cercano ($650 \leq \lambda \leq 1700$ nm) son las mejores sondas de imagen. Dentro de este rango ($650 \leq \lambda \leq 1700$ nm), la interferencia causada por la asimilación y la dispersión del agua y los tejidos bióticos se vuelve insignificante. Los QDs de Ag₂S no contienen metales pesados tóxicos y su constante de producto de solubilidad es ultrabaja ($K_{sp}(\text{Ag}_2\text{S}) = 6.3 \times 10^{-50}$), lo que garantiza la mínima cantidad de iones de plata liberados en el entorno biológico. Sus perfectas propiedades ópticas permiten que los QDs de Ag₂S sean un material prometedor para la obtención de imágenes y la detección.²⁵

Para la obtención de imágenes *in vivo*, los QDs de Ag₂S han demostrado una profunda penetración en los tejidos y una mejor resolución espacial de $\approx 10 \mu\text{m}$. Teniendo en cuenta las propiedades ópticas de los QDs de Ag₂S, se les ha considerado como prometedores agentes de contraste para la obtención de imágenes debido a su alto rendimiento cuántico, su ventajosa región espectral y su ausencia de metales pesados tóxicos.²⁵

Los Ag₂S QDs son un nuevo tipo de QDs NIR que, en comparación con otros QDs, presentan varias ventajas, como la no toxicidad y la alta estabilidad ($K_{sp}=6.3 \times 10^{-50}$). Por lo tanto, este tipo de QDs ha atraído una atención constante para la obtención de imágenes anatómicas, el diagnóstico de tumores, la administración de fármacos y se ha conjugado con diferentes ligandos para la orientación de los tumores.²⁶

Los Ag₂S QDs se han utilizado como portadores de fármacos, etiquetas y agentes de imagen. Para la aplicación de imágenes, los parámetros farmacocinéticos (PK, por sus siglas en inglés) de los QDs deben ser cuidadosamente adaptados para asegurar su rápida acumulación en el sitio de destino, seguido de una rápida eliminación del cuerpo.²⁶

Es importante destacar que los QDs de Ag₂S tienen una toxicidad insignificante y demuestran méritos evidentes en comparación con los QDs que contienen cadmio y con la obtención de imágenes nucleares con riesgo radiactivo. La versátil química de la superficie de los QDs de Ag₂S permite una fácil modificación para incorporar ligandos y fármacos específicos para la obtención de imágenes y la terapia del cáncer. Además, los QDs de Ag₂S pueden utilizarse como agente fototérmico para el tratamiento del cáncer.³

He et al.²⁴ expusieron una estrategia de dopaje catiónico mediante la introducción de una cierta dosis de iones de metal de transición Pb²⁺ en los nanocristales de Ag₂S para modular sus propiedades ópticas. Los QDs de Ag₂S dopados con Pb (designados como Pb:Ag₂S QDs) presentan una estructura cristalina renovada y un rendimiento óptico significativamente mejorado. Los QDs de Ag₂S fueron dopados con éxito con iones de transición de metal Pb²⁺. Los QDs de Pb:Ag₂S, emiten una emisión PL brillante y sintonizable (975-1242 nm) en la ventana NIR-II, presentan una excelente estabilidad y una decente biocompatibilidad, y muestran una capacidad superior de obtención de imágenes NIR-II ultrarrápidas. Estas ventajas hacen de este material una perspectiva de aplicación prometedora en la obtención de imágenes de fluorescencia *in vivo*. El dopaje de Pb no sólo puede renovar eficazmente la estructura cristalina de los QDs de Ag₂S, sino que también puede diseñar convenientemente su banda de emisión en la ventana NIR-II biológica.

Javidi et al.²⁶ sintetizaron varios tipos de Ag₂S QDs (QDs-CO₂H-5 nm, QDs-CO₂H-15 nm, QDs-CO₂H-25 nm y QDs-NH₂-5 nm) controlando el tiempo de reacción mediante un método de coprecipitación en un solo paso, un procedimiento sintético acuoso respetuoso con el medio ambiente, e investigaron la PK y la distribución tisular (TD, por sus siglas en inglés) de los QDs preparados en ratones y ratas. Se prepararon con éxito QDs de Ag₂S en presencia de ácido tioglicólico y cisteamina como agentes de recubrimiento. Los QDs preparados presentaron una forma esférica y fueron monodispersos. Sus resultados *in vivo* indicaron que tras la administración *i.v.* de Ag₂S QDs a ambas especies animales, independientemente del tamaño de las partículas, la dosis inyectada y la carga superficial, las vesículas se acumularon principalmente en el hígado y el intestino y se excretaron sobre todo en las heces. Asimismo, los resultados sugieren que el hecho de tener un tamaño pequeño (alrededor de 5 nm), una carga superficial positiva y la administración a una dosis relativamente baja aumentan el

aclaramiento de QDs y, por lo tanto, podrían considerarse como propiedades adecuadas si se desean las aplicaciones de etiquetado y/o obtención de imágenes de QDs.

Wang et al.³ desarrollaron una sonda fluorescente sencilla y versátil utilizando QDs Ag₂S conjugados covalentemente con AMD3100, un reconocido antagonista de CXCR4, un marcador específico de metástasis. La selectividad hacia la línea celular de cáncer de mama con alta expresión de CXCR4 se verificó *in vitro* e *in vivo* utilizando cocultivos celulares y modelos de ratones con tumores duales. Esta sonda teranóstica (QD-AMD) fue diseñada para identificar, rastrear, predecir e inhibir la metástasis del cáncer de mama *in vivo*. La sonda se incubó con cuatro líneas celulares diferentes (4T1, MDA-MB-231, MCF-7 y MCF-10A) con distintos niveles de expresión de CXCR4. La sonda podía reconocer con precisión células de cáncer de mama altamente metastásicas y rastrear su colonización en el pulmón dirigiéndose a CXCR4. Estos resultados sugieren el potencial del uso de QD-AMD como una sonda de orientación tumoral fiable para la identificación precisa *in vivo* de tumores de diferentes fenotipos moleculares. Además, la unión de QD-AMD a las células tumorales metastásicas disminuiría su potencial metastásico. En concreto, QD-AMD podía inhibir sustancialmente la invasión de células 4T1 al pulmón neutralizando la interacción CXCR4-CXCL12. El potencial terapéutico de QD-AMD se explotó aún más con la combinación del bloqueo de CXCR4 con la terapia fototérmica, lo que resultó en una reducción drástica del tumor primario y un alivio significativo de la carga metastásica pulmonar.

2. Fundamentación teórica

2.1. Tema general

En el campo de la imagen biomédica, las partículas inorgánicas (por ejemplo, óxido de hierro, oro, puntos cuánticos) han cobrado un gran interés en las últimas décadas. En concreto, se están explorando ampliamente para aplicaciones como sondas funcionalizadas con ADN para la identificación en tiempo real de biomoléculas relevantes para la enfermedad, agentes de diagnóstico para la detección de tumores a través de antígenos de membrana específicos para el tumor, y sondas moleculares para el seguimiento y la supervisión simultánea de la administración de fármacos y la eficacia terapéutica. Este interés se debe a las propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas únicas de las partículas inorgánicas, que pueden alterarse mediante cambios en su tamaño, composición, geometría y estructura. Además, los materiales inorgánicos ofrecen una relativa facilidad de procesamiento y resistencia a la degradación en condiciones fisiológicas en comparación con los materiales orgánicos. En este sentido, la capacidad de ajuste y la resistencia hacen que las partículas inorgánicas sean una modalidad muy atractiva y tentadora.²³

Las partículas inorgánicas de tamaño nanométrico son especialmente interesantes en el campo biomédico. Muchas proteínas y biomoléculas comunes existen en una escala de tamaño similar, y esas pequeñas escalas de longitud permiten que los materiales inorgánicos interactúen muy estrechamente con las entidades biológicas a nivel molecular. Esta estrecha interacción puede permitir una mayor especificidad y sensibilidad de detección, así como la capacidad de captación intracelular. Al mismo tiempo, el tamaño nanométrico también

aumenta la relación entre la superficie y el volumen de la partícula. Esta mayor proporción, junto con la amplia gama de productos químicos disponibles, permite una fácil modificación de la superficie para mejorar la biocompatibilidad, la solubilidad y la reactividad.²³

En las aplicaciones de bioimagen, las partículas de tamaño nanométrico también ofrecen una ventaja significativa para superar la grave toxicidad que suele acompañar a los materiales inorgánicos. La disminución del tamaño puede permitir una mayor sensibilidad y una menor dosis efectiva, sin necesidad de sacrificar la función. Se han desarrollado muchos tipos de nanopartículas inorgánicas en este campo, como las nanopartículas superparamagnéticas, las nanopartículas metálicas y las nanopartículas semiconductoras. Estas últimas se denominan QDs.²³

Los materiales presentan propiedades fascinantes cuando una o varias de sus dimensiones se reducen a la escala nanométrica. Una de las observaciones más inmediatas al reducir el tamaño de los materiales a la escala nanométrica es el confinamiento en el movimiento de los electrones debido al efecto de confinamiento cuántico. Esto conduce a la discretización de los niveles de energía de los electrones en función del tamaño de confinamiento del material (FIGURA 3). La estructura resultante presenta interesantes y novedosas propiedades optoelectrónicas, fisicoquímicas, mecánicas y magnéticas que no presentan las correspondientes estructuras a granel del mismo material. Un control adecuado de las dimensiones y de la composición de estos materiales permite obtener propiedades y respuestas profundas adaptadas para conseguir nuevos dispositivos y tecnologías.²⁷

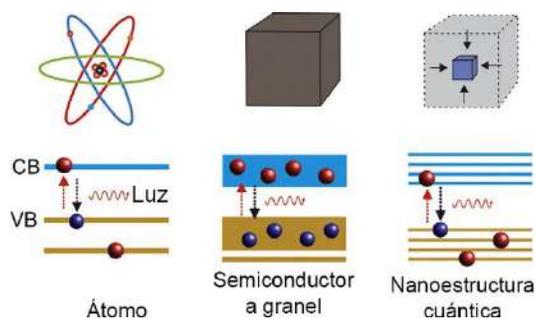


Figura 3. Diagrama esquemático que muestra las estructuras de bandas de energía en el átomo, el material a granel y la nanoestructura cuántica

Las propiedades fisicoquímicas de las partículas nanocristalinas son diferentes de las de los materiales a granel por dos razones específicas. En primer lugar, la elevada relación superficie-volumen hace que haya muchos átomos en la superficie de la red cristalina. En segundo lugar, las bandas electrónicas se dividen en niveles de energía discretos como resultado del confinamiento tridimensional de los portadores de carga que se produce. Esto conduce al confinamiento cuántico de la carga.²⁸

En un cristal semiconductor a granel, los niveles de energía forman bandas. La banda de valencia está llena y la banda de conducción está completamente vacía a 0 K. Las bandas de valencia y de conducción están separadas por un hueco energético finito característico del material llamado "bandgap",²⁷ es decir, es la energía necesaria para excitar un electrón de una banda electrónica a otra de un nivel energético superior.²³ Cuando un electrón de la banda

de valencia alcanza la energía suficiente para superar el hueco energético, debido a la excitación térmica o a la absorción de un fotón, y pasa a la banda de conducción, queda un hueco.²⁷ Este esquema de excitación crea finalmente un par electrón-hueco conocido como excitón. Al relajarse de nuevo a su estado básico, el excitón emite energía en forma de fotón fluorescente.²³ Este electrón excitado forma parte de los portadores de carga en los dispositivos semiconductores o se recombina con el hueco después de un tiempo finito con la liberación de energía. En el caso de los QDs de nanocristales semiconductores, cuando el diámetro o simplemente el tamaño del cristal se aproxima, o se hace menor que su "radio de Bohr", el electrón excitado por una fuente de energía externa tiende a formar un enlace débil con su agujero. Este estado de unión del electrón y el hueco del electrón, que se atraen mutuamente por la fuerza electrostática de Coulomb, se denomina "excitón" (FIG. 4A). Por lo tanto, el radio de Bohr es la distancia en un excitón electrón-hueco, también llamado radio de Bohr del excitón. Cada material semiconductor tiene un radio de Bohr característico del excitón (FIGURA 4B) por debajo del cual se produce el efecto de confinamiento cuántico. Esta propiedad única de confinamiento hace que la "banda" de energías se convierta en niveles de energía discretos en los QDs.²⁷

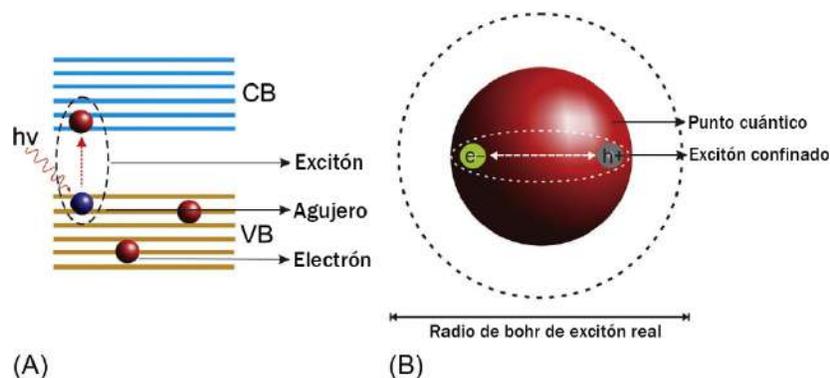


Figura 4. (A) Formación de excitones en la banda de energía del QD. (B) Comparación del radio del excitón y el tamaño del QD

Los QDs son la clase de materiales en los que se pueden evidenciar los efectos de confinamiento cuántico. Son cristales semiconductores muy pequeños, del orden del nanómetro, que contienen apenas entre cien y mil átomos. Como resultado, confinan fuertemente los electrones o los ya mencionados excitones en las tres dimensiones espaciales. Los QDs son un subgrupo de la familia de los nanomateriales, que incluye metales, aislantes, semiconductores y materiales orgánicos. En concreto, el término "punto cuántico" se refiere únicamente a los nanocristales semiconductores, mientras que cualquier otro material inorgánico en el régimen nano se denomina "nanocristal".²⁷

Es bien sabido que el confinamiento cuántico sólo se produce en los puntos cuánticos semiconductores debido a su naturaleza de bandgap sintonizable que el bandgap cero de los metales respectivamente. Las propiedades peculiares de la banda prohibida sintonizable de los QDs se componen únicamente de materiales del grupo II-VI, III-V y IV-VI.²⁸

Los QDs presentan propiedades electrónicas intermedias a las de los semiconductores a granel y las moléculas aisladas. Las propiedades optoelectrónicas están determinadas por su

tamaño y forma y se alteran en función de estas variables,²⁷ lo que da lugar a múltiples aplicaciones diferentes.²⁸

Una de las características ópticas más distintivas de los QDs es su color. Los QDs del mismo material, pero con diferentes tamaños, aparecen en colores distintivos. Cuando la energía externa en forma de fotón que incide sobre los QDs hace que el material emita luminiscencia a una determinada longitud de onda, se conoce como fotoluminiscencia. Un electrón de la banda de valencia es excitado a la banda de conducción si un fotón de energía igual o superior a la energía de la banda prohibida incide sobre el material. En este proceso, se deja un hueco en la banda de valencia (**FIGURA 5A**). El electrón excitado se recombina y retoma el estado básico perdiendo energía en forma de emisión de luz. La energía de la luz emitida puede describirse como la suma de la energía del bandgap entre la banda de valencia más ocupada y el nivel más bajo de la banda de conducción desocupada, las energías de confinamiento de electrones y agujeros y la energía de enlace de los excitones.²⁷

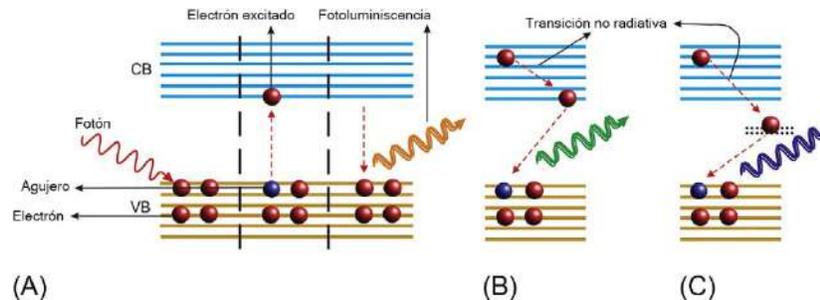


Figura 5. Esquema de la fotoluminiscencia que se produce en los QDs. (A) Emisión de borde de banda. (B y C) Fotoluminiscencia con transición no radiativa al principio

La propiedad mejor documentada y comprendida es la relación inversa entre el tamaño del nanocrystal y la brecha de banda energética; en otras palabras, a medida que el tamaño del nanocrystal disminuye, la brecha de banda energética aumenta y las correspondientes longitudes de onda de excitación/emisión disminuyen. Esto es el fundamento del **efecto de confinamiento cuántico**.²³ La luminiscencia en los QDs se desplaza en función del tamaño; los QDs de menor tamaño tienen mayores bandgaps. En consecuencia, se requiere más energía para excitar el electrón y, a su vez, se emite un fotón de mayor energía con longitudes de onda más cortas en el rango azul o verde. Del mismo modo, los QDs más grandes tienen bandgaps poco profundos y emiten fotones en longitudes de onda rojas. El color y la longitud de onda de emisión de los QDs pueden ser determinados por su tamaño y composición. De este modo, los QDs pueden ajustarse con precisión durante la síntesis para que emitan cualquier color de luz a partir del mismo material, simplemente cambiando el tamaño y la forma de los puntos.²⁷

La **FIGURA 6** ilustra la variación de la banda prohibida de los QDs al variar su tamaño. Los QDs pueden estar hechos de materiales de un solo elemento, o de semiconductores compuestos. Los extensos trabajos realizados en los métodos de síntesis coloidal han hecho posible la producción de QDs con la distribución de tamaño deseada mediante el ajuste preciso de los parámetros de síntesis y las combinaciones de materiales, por lo que se pueden fabricar QDs con fluorescencia y alto rendimiento cuántico.²⁷

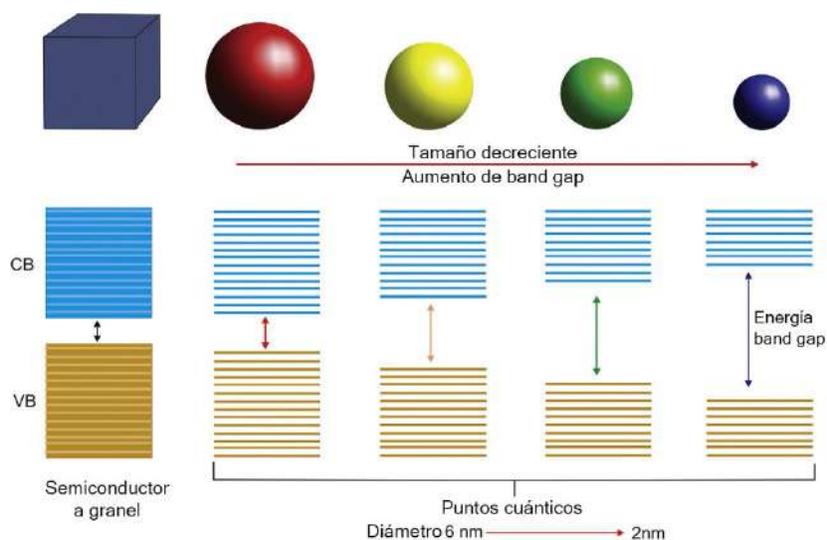


Figura 6. Variación de la banda de energía de los puntos cuánticos al variar el tamaño

Debido a sus propiedades únicas, los QDs tienen aplicaciones en muchos campos, como las celdas solares, los LED, los transistores, las pantallas, los diodos láser, la computación cuántica y las imágenes médicas. Los QDs han demostrado ser superiores a los tintes orgánicos tradicionales utilizados en los análisis biológicos modernos.²⁷

En el ámbito biomédico, los QD ofrecen muchas ventajas sobre los tintes orgánicos y los compuestos fluorescentes tradicionales. En la **TABLA 2** se resume un análisis comparativo de las propiedades de los puntos cuánticos frente a los fluoróforos orgánicos convencionales.²³

Propiedad	Puntos cuánticos	Fluoróforos orgánicos convencionales
Tamaño	Sintonizable (2-10 nm)	Típicamente <0.5 nm (proteína o molécula pequeña)
Espectro de absorción	Bandas anchas y discretas	Estrecho
Espectro de emisión	Estrecho (simétrico, ajustable en tamaño)	Amplio (asimétrico con cola roja)
Absortividad molar (ϵ)	Grande (normalmente del orden de $0.5-5 \times 10^6 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)	Pequeña (normalmente del orden de $0.5-2.5 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$)
Espectros de emisión	Estrecho (simétrico, sintonizable por tamaño)	Amplio (asimétrico con cola de desplazamiento al rojo)
Rendimiento cuántico	Alto (0.1-0.8 en el rango visible y 0.2-0.7 en el NIR)	Bajo (0.5-1.0 en el rango visible y 0.05-0.25 en el NIR)
Tiempo de vida del estado excitado de fluorescencia	Largo (10-100 ns con decaimiento multiexponencial)	Corto (<10 ns con decaimiento monoexponencial)

Sección transversal de dos fotones	Grande (normalmente del orden de $0.2-5 \times 10^{-46} \text{cm}^4 \text{s} \text{ fotones}^{-1}$)	Pequeña (normalmente del orden de $1 \times 10^{-49} \text{cm}^4 \text{sec} \text{ fotones}^{-1}$)
Sensibilidad de detección	Alta	Baja
Resistencia al fotoblanqueo	Alta	Baja
Solubilidad acuosa	Baja (necesidad de recubrimiento o funcionalización de la superficie)	Alta (controlada químicamente)
Profundidad de penetración en el tejido	Media (depende del tamaño)	Alta
Capacidad de multiplexación espectral	Alta	Baja (solapamiento espectral)
Capacidad de cuantificación	Alta	Baja
Toxicidad	Potencial de acumulación y lixiviación de metales pesados, metabolismo lento típico	Dependiente de la química, metabolismo rápido típico
Puntos fuertes	Facilidad de ajuste del espectro; rendimiento cuántico (hasta 100 veces más luminoso); alta fotoestabilidad	Materiales hidrosolubles, normalmente estables; facilidad de bioconjugación (muchos disponibles en el mercado); penetración profunda en los tejidos.
Retos principales	Posible toxicidad <i>in vivo</i> ; Solubilidad y estabilidad acuosas deficientes; Dificultad para alterar la biodistribución	Falta de sintonizabilidad; Propensión al fotoblanqueamiento; Mayor dificultad para obtener imágenes <i>multiplex in vivo</i>

Tabla 2. Análisis comparativo de las propiedades de los puntos cuánticos frente a los fluoróforos orgánicos convencionales en aplicaciones biomédicas.

El bandgap sintonizable y, a su vez, la posibilidad de obtener colores específicos y una fluorescencia estrecha mediante los QDs está allanando el camino para su uso en aplicaciones biológicas. Muchas investigaciones biológicas en biología molecular y biotecnología requieren tintes fluorescentes marcados para la detección de una proteína, anticuerpo o célula específica.²⁷ Los QDs pueden conjugarse con diversas biomoléculas, además de las ya mencionadas, como oligonucleótidos y ligandos de moléculas pequeñas, para dirigir su trayectoria *in vitro* o *in vivo* hacia un objetivo específico o para impartir capacidad terapéutica.²³ Estos colorantes se adhieren químicamente a la molécula objetivo y ayudan a la detección.²⁷ La conjugación de la superficie de los QDs con biomoléculas depende en gran

medida de las químicas de los ligandos disponibles para proporcionar grupos funcionales adecuados para la unión covalente o no covalente.²³

En este sentido, los QDs están ganando rápidamente popularidad debido a su superior contraste de color, brillo y estabilidad *in vivo* en comparación con los colorantes tradicionales.²⁷ Hay una serie de ventajas competitivas que hacen que los QDs sean deseables en numerosas aplicaciones biomédicas. En comparación con los tintes orgánicos comunes y las proteínas luminiscentes, los QDs tienen espectros de excitación amplios; espectros de emisión estrechos,²³ con un pico simétrico, mientras que los picos de emisión son más amplios y no simétricos por naturaleza;²⁷ así como grandes desplazamientos de Stokes. Los QDs también poseen propiedades ópticas superiores, incluyendo una mayor intensidad (hasta casi 100 veces más brillante,²³ esto permite la fácil obtención de imágenes *in vivo* de especímenes gruesos)²⁷ y una estabilidad significativamente mejorada contra el fotoblanqueo. Los tintes orgánicos tradicionales son muy propensos al fotoblanqueo, y el rendimiento cuántico puede ser a menudo inferior al 15% en un entorno biológico. Además, a diferencia de la mayoría de los colorantes orgánicos convencionales, los QDs ofrecen un amplio rango óptico de fluorescencia, desde el ultravioleta cercano hasta el infrarrojo cercano. En particular, los QDs que emiten en el NIR han ampliado enormemente el potencial de la fluorescencia en la biomedicina debido a su menor absorción tisular y a su relativamente baja autofluorescencia.²³

La variedad de propiedades de excitación y emisión disponibles gracias al ***efecto de confinamiento cuántico*** es muy atractiva en las aplicaciones biomédicas.²³ Entre las ventajas competitivas del uso de etiquetas de QDs se encuentra el que absorben fotones de una amplia gama de longitudes de onda que van desde el ultravioleta hasta las largas longitudes de onda visibles.²⁷ Por ejemplo, se pueden inyectar QDs de varios tamaños en un paciente, excitarlos con una sola longitud de onda y producir una emisión reproducible y estrecha con una mínima interferencia entre canales y solapamiento espectral. La reducción del solapamiento es fundamental, ya que aumenta la eficacia de la detección, mejora la sensibilidad y puede permitir la detección multicolor y la funcionalidad multimodal. En cambio, es un reto controlar y modular las longitudes de onda espectrales de los tintes orgánicos tradicionales,²³ debido a que tienen una banda de absorción estrecha que requiere una longitud de onda de excitación específica para cada uno.²⁷ Asimismo, estas propiedades dependen de la estructura química, la conformación y la reactividad. No pueden modificarse fácilmente para que emitan diferentes colores, lo que limita su aplicabilidad en aplicaciones de imagen múltiple.²³

Los puntos cuánticos constituyen una herramienta versátil para permitir herramientas de diagnóstico más precisas y fluoroinmunoensayos, imágenes multiplexadas, plataformas duales de imagen y terapéuticas, imágenes *in vivo* y de procesos celulares en tiempo real, y seguimiento de células individuales y moléculas biológicas.²³

Los recientes avances en las estrategias de síntesis y bioconjugación han hecho progresar rápidamente la capacidad de garantizar un control preciso sobre el tamaño, la polidispersidad, el rendimiento cuántico y las propiedades superficiales de los QDs.²³

Los nanomateriales basados en puntos cuánticos desempeñan un papel importante en las aplicaciones de muchos campos, como los Q-LED, los transistores, las células solares, los diodos láser para pantallas, las imágenes médicas, la informática cuántica, etc. Sus cambios se deben al control preciso del tamaño, la forma, la emisión de color y la sintonización de la banda prohibida. Estas propiedades cambian en el interior de los puntos cuánticos, lo que conduce a diferentes aplicaciones, desde la recolección de energía hasta la aplicación biomédica.²⁸

2.2. Fenómenos de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia requiere que los objetos de interés sean fluorescentes. La fluorescencia es la emisión de luz que se produce en nanosegundos tras la absorción de una luz que suele ser de menor longitud de onda. La diferencia entre las longitudes de onda de excitación y de emisión, conocida como desplazamiento de Stokes, es la propiedad crítica que hace que la fluorescencia sea tan potente. Al filtrar completamente la luz excitante sin bloquear la fluorescencia emitida, es posible ver sólo los objetos que son fluorescentes.²⁹

Una molécula fluorescente (fluorocromo) es aquella que absorbe un fotón de luz de una determinada longitud de onda y, tras un breve intervalo, emite parte de esa energía en forma de un fotón de otra longitud de onda. Parte de la energía absorbida se pierde en procesos ajenos a la radiación, por lo que el fotón emitido tiene menos energía que el fotón absorbido. La ley de Planck indica que la energía de radiación de un fotón es inversamente proporcional a su longitud de onda. Como el fotón emitido tendrá menos energía, tendrá una mayor longitud de onda y, por tanto, un color diferente al del fotón absorbido.³⁰

La absorción de energía por un fluorocromo es el resultado de las interacciones del vector del campo eléctrico oscilante de la onda luminosa con los electrones del fluorocromo. Para un electrón determinado, se requiere una cierta cantidad de energía para una transición electrónica. Sólo se absorben las energías cercanas a esta energía de transición; el fluorocromo es esencialmente transparente a los fotones de otras energías. Dado que la energía y la longitud de onda están relacionadas, esto significa que para cada fluorocromo sólo hay ciertas longitudes de onda capaces de una interacción productiva que genere fluorescencia.³⁰

Los orbitales electrónicos más externos de la molécula del fluorocromo determinan tanto su eficacia como compuesto fluorescente como las longitudes de onda de absorción y emisión. Cuando los compuestos fluorescentes en su llamado *estado básico* absorben fotones, pueden producirse alteraciones en los estados electrónicos, vibracionales y rotacionales de la molécula. La relajación vibracional y la emisión de fluorescencia son las principales formas en que un fluorocromo vuelve a su estado básico de baja energía tras haber experimentado previamente la transición a un *estado excitado*.²⁹

La fluorescencia en las imágenes subcelulares es más útil cuando hay especificidad en lo que se marca con fluorescencia. Existen varios mecanismos para garantizar la especificidad. El método más empleado es vincular el fluorocromo a una molécula de anticuerpo y utilizar la especificidad de la unión del anticuerpo para localizar un antígeno de interés. Un fluorocromo unido a una sustancia biológicamente activa se denomina fluoróforo.³⁰

La mejor manera de ilustrar la absorción y la emisión de fotones por un fluorocromo es utilizando un diagrama de energía de Jablonski, llamado así por Aleksander Jablonski, el físico polaco que introdujo el diagrama en 1953.³⁰ El diagrama de Jablonski explica la fotofísica molecular mediante una representación gráfica de los estados electrónicos de una molécula y de las transiciones entre esos estados,³¹ lo que indica que, en general, la energía de excitación de la luz absorbida se disipa a través de tres vías: 1) emisión de fluorescencia; 2) cruce intersistema (ISC, por sus siglas en inglés) a un estado excitado triplete; y 3) desactivación térmica mediante decaimiento no radiativo, lo que corresponde a las funciones biomédicas de: a) obtención de imágenes de fluorescencia; b) obtención de imágenes de luminiscencia persistente por generación de fosforescencia y/o terapia fotodinámica (PDT) por producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); así como c) obtención de imágenes fotoacústicas (PA, por siglas en inglés) y terapia fototérmica (PTT).³²

La formación de la fluorescencia obedece a la siguiente estructura (**FIGURA 7**): un electrón débilmente retenido en el estado básico (S_0) sería promovido al estado excitado (S_1 o S_2) mediante la absorción de la energía adecuada, y después de alguna transición no radiativa de relajación vibracional y/o conversión interna, el electrón excitado volvería a S_0 desde el nivel mínimo de vibración de S_1 , acompañando a la emisión de fluorescencia centrada en una longitud de onda mayor que la del espectro de excitación (llamado desplazamiento de Stokes).³³

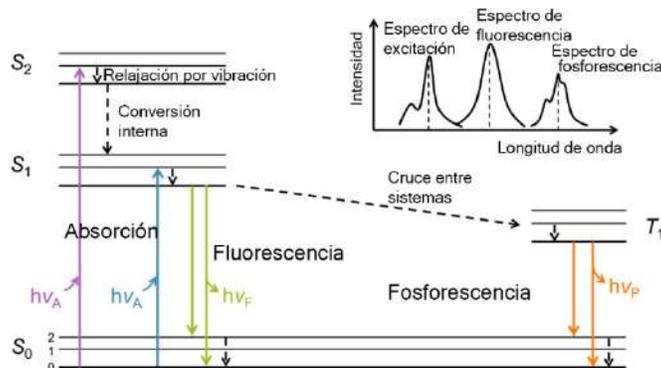


Figura 7. Diagrama de Jablonski para el fenómeno de fluorescencia

En el diagrama de Jablonski, el eje vertical del gráfico representa el aumento de la energía desde la parte inferior (estado básico o S_0) hasta la parte superior (estados de excitación singlete y triplete o S_n y T_n).³¹ A temperatura ambiente, la mayoría de los electrones de los fluorocromos sólo tienen energía suficiente para existir en el estado de energía más bajo (tierra) (S_0).³⁰ Sin embargo, la absorción de un fotón transfiere la energía del fotón a un electrón del estado básico y eleva la energía del electrón a un estado superior (excitado).³⁰ Las transiciones entre los estados (como la excitación, la conversión interna, la fluorescencia, el cruce entre sistemas, etc.) se representan como flechas (onduladas para las transiciones no radiativas, rectas para las transiciones radiativas).³¹

En el lado izquierdo del diagrama (**FIGURA 8a**) se encuentran los estados singlete. Estos estados mantienen los estados de espín emparejados $+1/2$ y $-1/2$ de los electrones tal y como son normalmente, con cada electrón de un par con espines opuestos. S_0 es el estado básico y representa la energía de una molécula que no está siendo excitada por la luz. S_1 y S_2 son estados singulares excitados en los que un electrón exterior es impulsado a un orbital

diferente. S_2 contiene más energía que S_1 y S_1 más energía que el estado básico, S_0 . A la derecha del diagrama se encuentran los estados tripletes en los que un electrón exterior, impulsado a un nuevo orbital, también ha sufrido una inversión de espín posterior, de modo que un antiguo par de electrones está ahora en paralelo.²⁹

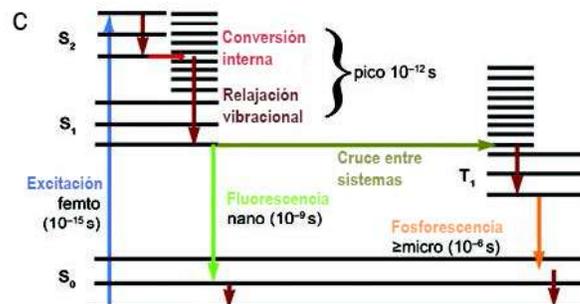
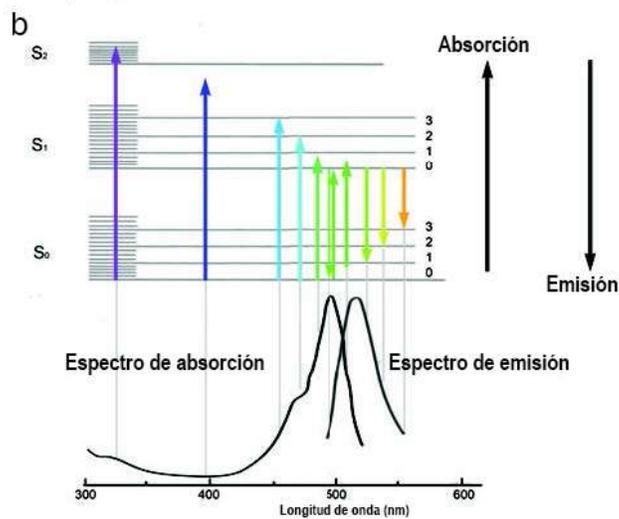
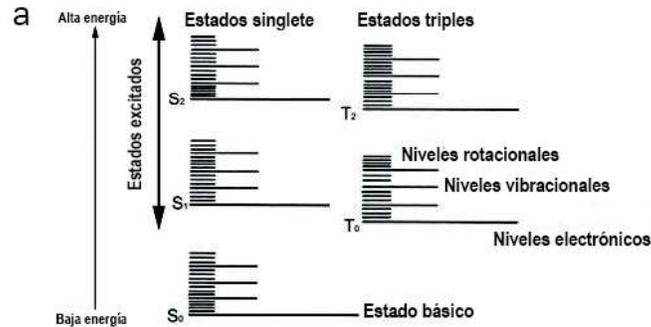


Figura 8. Fundamentos de la fluorescencia. (a) Diagrama de Jablonski que muestra los estados energéticos de una molécula. Las moléculas que no absorben energía están confinadas principalmente a los estados vibracionales más bajos del estado básico S_0 . (b) Las características espectrales relacionadas con la absorción y emisión de energía por una molécula pueden relacionarse con el tamaño de los pasos de energía necesarios para llevar una molécula de un nivel de energía a otro. Los espectros de absorción y emisión del fluoróforo común FITC se muestran debajo de un diagrama de Jablonski. Cada línea gris vertical alinea los espectros con la energía de los fotones absorbidos (flechas apuntando hacia arriba) o emitidos (flechas apuntando hacia abajo). Las flechas están coloreadas para representar la longitud de onda de los fotones. Por ejemplo, la flecha morada de la izquierda representa la energía de un fotón ultravioleta que puede hacer que la molécula pase del estado básico al segundo estado excitado singlete. La flecha naranja de la derecha representa el fotón de menor energía que puede ser emitido por esta molécula al retroceder desde el estado de menor energía de S_1 a un estado vibracional alto de S_0 . Observe que, en la región de solapamiento de los espectros de absorción y emisión, algunos fotones (por ejemplo, la flecha verde que apunta hacia arriba) son absorbidos cuando el nivel vibracional no está en su nivel más bajo. Obsérvese también la simetría entre las curvas de absorción y emisión debido a la similitud de las transiciones a los estados vibracionales en S_0 y S_1 . (c) Tiempos que tardan los distintos pasos de excitación y emisión de fluorescencia y fosforescencia

Una de las características de un diagrama típico de Jablonski es que cualquier desactivación electrónica se produce desde el nivel vibracional más bajo, es decir, la relajación vibracional precede a la desactivación electrónica.³¹

Cuando un fluoróforo absorbe la luz, toda la energía que posee un fotón se transfiere al fluoróforo. Esta energía está inversamente relacionada con la longitud de onda del fotón. Si la energía del fotón absorbido es mayor que la necesaria para pasar exactamente del estado básico al nivel energético más bajo de S_1 , la molécula también sufrirá un cambio de vibración, rotación y/o pasará a un orbital electrónico aún más alto (S_2). Por lo tanto, existe un rango de longitudes de onda que pueden excitar una molécula. Sin embargo, la energía mínima requerida para la fluorescencia es la de un fotón que pueda provocar la transición de un electrón a un estado electrónico excitado superior (es decir, de S_0 a S_1).²⁹

Las moléculas pueden existir en más de un estado de excitación. En el caso de los fluoróforos orgánicos, el estado singlete es el más común. En el estado singlete, todos los electrones están emparejados. Sin embargo, las moléculas también pueden existir en un estado triplete, en el que un conjunto de espines de los electrones está desaparejado. La probabilidad de que una molécula pase del estado singlete al triplete es cada vez mayor cuando la energía absorbida excita la molécula a estados superiores al nivel S_1 . Desde el estado triplete, la energía puede perderse en forma de conversión interna en calor, lo que permite el retroceso al estado S_1 generando un fotón (aunque con retraso). Esto se llama fosforescencia.³⁰

Una vez excitada, la molécula utiliza varias vías diferentes para perder ulteriormente la energía absorbida y volver al estado básico (**FIGURA 8c**). La "conversión interna" es una transición entre estados orbitales de electrones (como S_2 a S_1). En sentido estricto, la conversión interna permite transiciones isoenergéticas desde energías vibracionales bajas de un estado electrónico a modos vibracionales altos de un estado electrónico inferior, por lo que no se pierde energía durante esta transición, sino que la energía extra se desprende incluso a través de la relajación vibracional. Durante la relajación vibracional, la energía vibracional del fluoróforo se transfiere a las moléculas cercanas mediante interacciones directas.²⁹

El espectro de emisión de un fluoróforo es simplemente el rango de longitudes de onda que puede tener este fotón emitido (**FIGURA 8b**).²⁹

Según el diagrama de Jablonski, hay varias vías de disipación de energía después de que un cromóforo sea excitado al estado excitado de alta energía por la luz (**FIGURA 9**). Cuando la

luz absorbida se reemite como fotones de baja energía, proporciona imágenes de fluorescencia/fosforescencia con alta sensibilidad y resolución espaciotemporal. Cuando los fotones absorbidos se convierten en calor localizado a través de la desactivación vibracional hacia el estado básico (S_0), este proceso puede utilizarse para la obtención de imágenes acústicas/fototérmicas (PT, por sus siglas en inglés) y la PTT de enfermedades. Los electrones en el estado excitado singlete (S_1) también podrían transferirse al estado excitado triplete (T_1) para producir especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) altamente tóxicas para la PDT.³⁴

Existen tres vías para el proceso de disipación de energía en estado excitado de los agentes ópticos según el diagrama de Jablonski, a saber, la emisión de fluorescencia a través de la desintegración radiativa, la PA/PT a través de la desactivación térmica y la generación de ROS en T_1 .³⁴

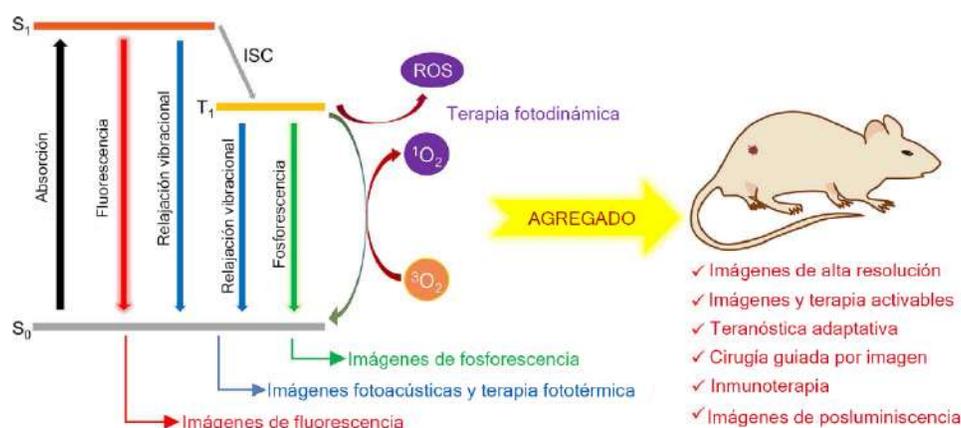


Figura 9. Ilustración esquemática del diagrama de Jablonski y su relación con la imagen óptica y el rendimiento terapéutico de los agentes fototeranósticos. S_0 : estado básico, S_1 : estado excitado singlete, T_1 : estado excitado triplete, ISC: cruce intersistema, 3O_2 : oxígeno triplete, 1O_2 : oxígeno singlete, ROS: especies reactivas del oxígeno

La mayoría de las sondas más recientes se han basado en la química orgánica estándar de los fluorocromos. Sin embargo, ahora se están desarrollando algunos enfoques no tradicionales de la fluorescencia. Entre ellos están los puntos cuánticos. Al igual que los fluorocromos orgánicos, emiten luz a una longitud de onda mayor que la de la luz absorbida. Varias propiedades de los puntos cuánticos los hacen atractivos para la obtención de imágenes biológicas; las principales son su alto rendimiento cuántico y su extrema fotoestabilidad. Los puntos cuánticos son muy brillantes y presentan muy poco fotoblanqueo. Además, para una composición determinada de punto cuántico, diferentes tamaños del mismo cristal emitirán a diferentes longitudes de onda (**FIGURA 10**). Esto significa que un solo tipo de material puede producir una serie de colores con un brillo similar y propiedades químicas parecidas, como la unión a ligandos. Además, los puntos cuánticos absorben un amplio espectro de longitudes de onda por debajo de sus longitudes de onda de emisión, por lo que una sola longitud de onda puede utilizarse para excitar múltiples fluoróforos. Esto es ideal para experimentos en los que se analizan dos o más estructuras utilizando fluorocromos de diferentes colores. Los experimentos multicolor también se simplifican con los puntos cuánticos porque los cristales emiten dentro de un espectro muy estrecho (**FIGURA 10**).³⁰

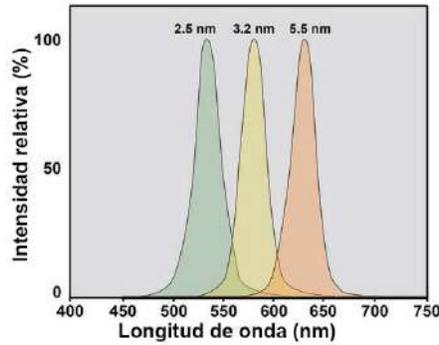


Figura 10. Fluorescencia de puntos cuánticos. La imagen superior muestra la fluorescencia obtenida a partir de soluciones de nanocristales de CdSe (puntos cuánticos) de diámetros 2.0, 2.5, 3.0, 3.2, 3.9, 4.4, 5.5 y 7.3 nanómetros, respectivamente. Todos los viales se excitan a 375 nm. Los gráficos siguientes muestran los espectros de emisión de los nanocristales de CdSe excitados a 375 nm para los tamaños de 3.2 nm, 3.9 nm y 5.5 nm

En la **FIGURA 11** se compara el tamaño de los puntos cuánticos con el de otras etiquetas biológicas útiles.³⁰ Las características de distintos materiales fluorescentes se resumen en la **TABLA 3**, para ofrecer una comparación de sus propias ventajas y limitaciones.³³

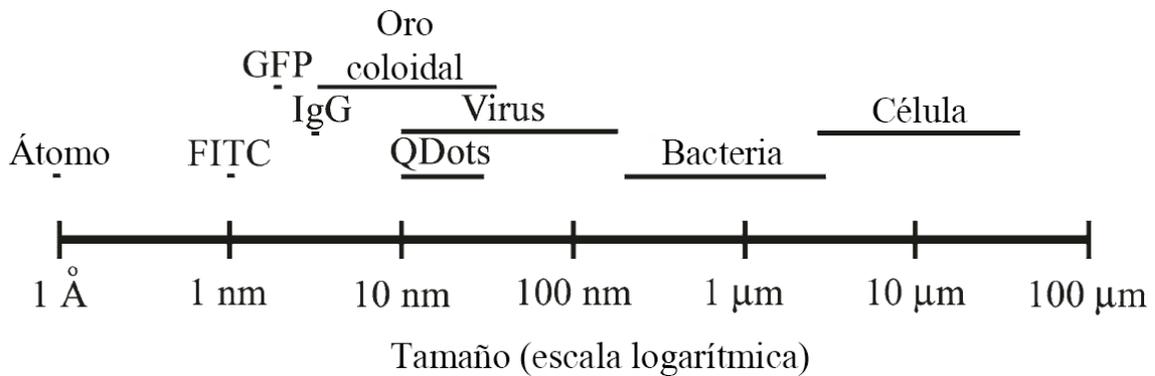


Figura 11. Diámetros de diversas moléculas de etiquetado

Tipo de material	Ventajas	Limitaciones
Colorantes fluorescentes orgánicos	Amplia variedad, colores vivos, fácil acceso, tamaño pequeño, buena biocompatibilidad e intensidad fluorescente relativamente alta	Pico de excitación estrecho, pico de emisión ancho y en cola, poca estabilidad, fácil fotoblanqueo
Puntos cuánticos (QDs)	(i) QDs semiconductores: buena estabilidad química, pico de excitación ancho, pico de emisión estrecho y simétrico, fuerte luminiscencia, gran desplazamiento de Stokes y tenibilidad del color; (ii) QDs basados en carbono: baja toxicidad,	QDs con iones pesados: toxicidad e intermitencia de la fluorescencia

	biocompatibilidad, buena estabilidad química y propiedades de fotoluminiscencia comparables a las de los QDs	
Nanoclusters metálicos	Baja toxicidad, facilidad de preparación, excelente biocompatibilidad y, en comparación con los QD, presentan señales de fluorescencia más intensas y duraderas atribuidas a una mayor resistencia al fotoblanqueo y al parpadeo	Los nanoclusters de metales nobles son caros.
Nanopartículas de conversión ascendente	Penetración más profunda de la luz, ausencia de autofluorescencia (a partir de muestras biológicas), larga vida útil y otras excelentes propiedades ópticas de los nanoclusters metálicos	–

Tabla 3. Ventajas y limitaciones de diversos materiales fluorescentes integrados en sensores MI-FL.

La técnica de imágenes ópticas (por ejemplo, imágenes de fluorescencia, imágenes fotoacústicas, imágenes de resplandor/luminiscencia persistente, etc.) tiene enormes ventajas en la investigación del cáncer, entre las que se incluyen una excelente sensibilidad y resolución temporal, alto contraste y modo en tiempo real, instrumentos portátiles y alta seguridad.³²

Se han realizado importantes avances en el desarrollo de nuevos agentes ópticos para el diagnóstico (por ejemplo, imágenes de fluorescencia, PA y tomografía de coherencia óptica) y la fototerapia (por ejemplo, PDT, PTT y otras terapias relacionadas con la fotografía). Hasta ahora, se han desarrollado nanomateriales de oro, puntos cuánticos semiconductores, NPs de conversión ascendente dopadas con tierras raras, nanomateriales basados en el carbono, nanoestructuras bidimensionales y materiales orgánicos y poliméricos para aplicaciones fototeranósticas.³⁴

La bioimagen en la segunda región del infrarrojo cercano (NIR-II, 1000-1700 nm) ha proporcionado una nueva oportunidad para la aplicación in vivo de las técnicas de imagen óptica. En comparación con la ventana visible (400-700 nm) y la primera NIR (NIR-I, 700-900 nm), la luz NIR-II posee una interacción luz-tejido mucho menor (por ejemplo, dispersión, absorción y reflexión), lo que permite una alta profundidad de penetración y resolución espacial. Algunos materiales, como los nanotubos de carbono, los puntos cuánticos, las nanopartículas dopadas con tierras raras y los tintes orgánicos, se han desarrollado como emisores NIR-II.³⁴

2.3. Agente de contraste en ensayos *in vitro*

La detección y el diagnóstico precoz de la enfermedad es una parte crucial de la práctica clínica, especialmente en el caso del cáncer. La tasa de mortalidad a los diez años de las pacientes con cáncer de mama que se beneficiaron de la detección precoz se redujo en un 17-28%. La tecnología de imagen médica suele desempeñar el papel más importante en la detección precoz y la evaluación de la respuesta terapéutica de diversas enfermedades. Las modalidades de imagen que se utilizan actualmente son la radiografía, la tomografía computarizada (CT, por sus siglas en inglés), la resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés), el ultrasonido (US, por sus siglas en inglés), la tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés), la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) y la imagen por fluorescencia.³⁵

Para mejorar la detección de la lesión, muy a menudo se combina más de una modalidad de imagen. Para obtener una información anatómica y funcional más precisa, se utilizan agentes de contraste de imagen médica para distinguir entre el tejido normal y las lesiones anormales.³⁵

El agente de contraste fluorescente se administra para visualizar el órgano o tejido de interés con suficiente sensibilidad y contraste. Para las aplicaciones médicas, los agentes fluorescentes que emiten a longitudes de onda en la región del infrarrojo cercano, entre 650 y 800 nm, son más ventajosos que los que emiten luz visual. La luz infrarroja cercana puede penetrar más profundamente en el tejido (hasta varios mm) con menos dispersión que la luz visual y hay menos autofluorescencia.³⁶

Los agentes de contraste mejoran la eficacia de los estudios de imagen y se convierten en esenciales en la caracterización y eventual diagnóstico de la patología. Son compuestos químicos que permiten la visualización de estructuras anatómicas específicas del cuerpo humano en la imagen médica y forman parte integral de muchos métodos de imagen.³⁷

Los contrastes se utilizaron inicialmente para visualizar mejor las estructuras vasculares y el tracto gastrointestinal. Con el tiempo, se convirtieron en un componente clave de la imagen médica y su uso se extendió a la evaluación de la vascularización y la perfusión del tejido en los órganos sólidos, concretamente mediante técnicas de imagen transversal y una mejor visualización y caracterización de las lesiones focales dentro de estos órganos.³⁷

Hoy en día, los agentes de contraste tienen una amplia gama de áreas de aplicación. Alrededor del 30% de las exploraciones por MRI se realizan con agentes de contraste. Los agentes de contraste se utilizan para caracterizar lesiones en órganos sólidos; visualizar estructuras vasculares; hacer un seguimiento de la actividad tumoral; evaluar infecciones, abscesos y otras enfermedades inflamatorias; y detectar la perfusión de los tejidos. Además, con el uso de un agente de contraste adecuado, es posible visualizar cualquier estructura tubular, como las vísceras huecas del sistema gastrointestinal, el líquido cefalorraquídeo, las glándulas salivales, los conductos mamarios y los vasos linfáticos.³⁷

Debido a la mejora de las estrategias de focalización y a su larga vida de circulación en la sangre, las nanopartículas se han estudiado para la detección y el diagnóstico tempranos de tumores, así como la obtención de imágenes biomédicas debido a sus propiedades únicas de orientación pasiva, activa y física. En virtud de su pequeño tamaño, las nanopartículas presentan efectos de permeabilidad y retención (EPR) mejorados en los tumores, con aumentos relativos de las concentraciones tumorales locales del agente de contraste. El uso más común ha sido el empleo de nanoagentes de contraste con las modalidades de imagen existentes.³⁵

En comparación con los agentes de contraste tradicionales, los agentes de nanoimagen presentan una elevada relación superficie/volumen que permite el etiquetado de la superficie con moléculas y ligandos específicos para mejorar el perfil de toxicidad y las propiedades de imagen. Otras ventajas de las nanopartículas son la visualización funcional y el seguimiento de procesos biológicos, como la detección de macrófagos en lesiones ateroscleróticas mediante CT y la obtención de imágenes moleculares de la angiogénesis mediante MRI. Por otro lado, el mayor tiempo de circulación plasmática de las nanopartículas mejora la biodistribución con una mayor señal de contraste entre la lesión y el fondo. Asimismo, la forma y el tamaño de las nanopartículas pueden manipularse para optimizar la carga de compuestos de imagen, y sus propiedades físicas intrínsecas también pueden modificarse para satisfacer necesidades clínicas específicas.³⁵

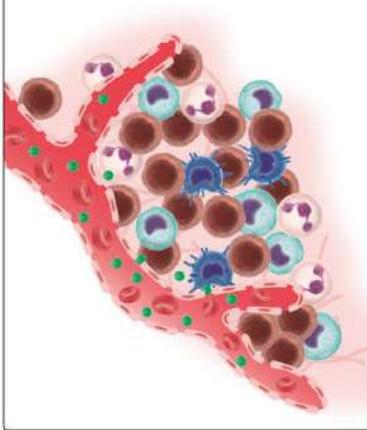
Además de las estrategias de orientación pasiva, el etiquetado de la superficie de las nanopartículas con diversos ligandos a los receptores diana puede aumentar la localización del agente de contraste para la obtención de imágenes mediante la unión específica a los receptores diana en las lesiones.³⁵

La capacidad inherente de los anticuerpos de reconocer eficazmente antígenos específicos expresados en la superficie celular y el proceso relativamente sencillo mediante el cual se pueden generar nuevos anticuerpos los convierte en la mayor clase de agentes dirigidos fácilmente disponibles. Por lo tanto, muchos grupos están evaluando preclínicamente nuevos anticuerpos marcados con fluorescencia en el infrarrojo cercano que se dirigen a biomarcadores alternativos para distintas aplicaciones de imagen intraoperatoria, demostrando todos ellos la viabilidad de los anticuerpos para resaltar las lesiones tumorales.³⁶

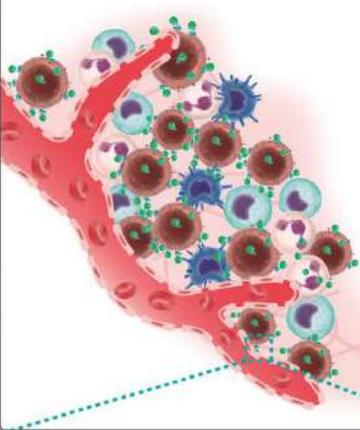
Los avances en la ingeniería de proteínas han conducido al desarrollo de fragmentos de anticuerpos (minicuerpos, fragmentos Fab, diabodies y fragmentos variables de cadena única) (**FIGURA 12**) que conservan características de unión similares, pero muestran una mejor penetración en el tumor y una eliminación más rápida de los tejidos no objetivo.³⁶

Los fragmentos de anticuerpos de bajo peso molecular (<60 kDa) que se eliminan rápidamente de la sangre a través de la excreción renal se han investigado especialmente como herramientas para aplicaciones de imágenes moleculares porque permiten obtener imágenes altamente específicas y de alto contraste en los primeros momentos después de la inyección. Otra clase de agentes dirigidos que han suscitado interés son los andamios proteicos no inmunoglobulínicos, entre los que se encuentran las centirinas, las afibodinas o las cistinas (**FIGURA 12**).³⁶

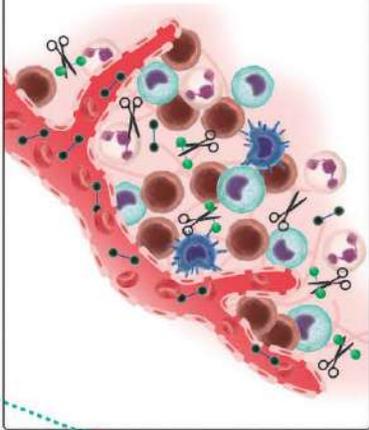
Agentes de contraste fluorescentes no dirigidos



Agentes de contraste fluorescentes dirigidos

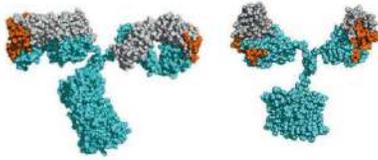


Agentes de contraste fluorescentes activables



Agentes de contraste fluorescentes activables

Anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de alto peso molecular



IgG (150 kDa)

Minicuerpo (80 kDa)

Anticuerpos de bajo peso molecular



Fab (55 kDa)

Diacuerpo (55 kDa)

seFv (28 kDa)

Nanoanticuerpo (15 kDa)

Anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de alto peso molecular

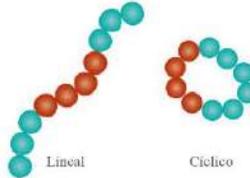


Centirina (10 kDa)

Afibodina (6 kDa)

Knottin (3 kDa)

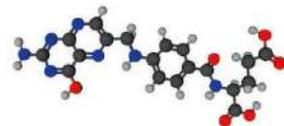
Péptidos



Lineal

Cíclico

Moléculas pequeñas



Ácido fólico

Figura 12. Agentes de contraste fluorescentes moleculares y moléculas diana utilizadas para la obtención de imágenes intraoperatorias durante la cirugía oncológica. (A) Representación esquemática del modo de acción de los distintos tipos de agentes de contraste fluorescentes. Los agentes de contraste fluorescentes no dirigidos, como el verde de indocianina, se acumulan pasivamente en el tejido tumoral a través del efecto de permeabilidad y retención mejoradas. Los agentes de contraste fluorescentes dirigidos, que consisten en un colorante fluorescente conjugado con una fracción dirigida, se acumulan activamente en el tejido tumoral mediante el reconocimiento de un biomarcador específico expresado por las células tumorales o las células estromales asociadas al tumor. La obtención de imágenes se lleva a cabo una vez que los marcadores no unidos se han eliminado lo suficiente. Los agentes de contraste fluorescentes activables permanecen ópticamente silenciosos hasta que se liberan los colorantes fluorescentes por digestión enzimática de su columna vertebral. (B) Representación esquemática de las diferentes clases y subclases de moléculas diana utilizadas para el diseño de agentes de contraste fluorescentes diana: anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, andamiajes proteicos, péptidos y moléculas pequeñas. Se obtuvieron imágenes representativas de llenado de espacio de un anticuerpo (1IGT), un fragmento Fab (6B9Z), un diabody (1MOE), un scFv (1P4I), un nanobody (5MY6), una centyrin (5L2H), un affibody (2KZJ) y una knottin (2N8B) del banco de proteínas RCSB y se prepararon utilizando PyMOL. El modelo de minicuerpo de relleno espacial es una interpretación creada con PyMOL; las regiones de unión al antígeno están resaltadas en naranja

Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos son los ligandos de orientación activa más comunes y eficaces. Los anticuerpos tienen una gran afinidad específica con los antígenos correspondientes, lo que puede aumentar la concentración de nanopartículas en un lugar específico. Otro ligando utilizado para la orientación es un aptámero, que también se denomina anticuerpo químico. Se trata de una secuencia única de ADN o ARN que se pliega en una estructura secundaria con una alta afinidad de orientación hacia los receptores de la superficie celular.³⁵

Los péptidos representan una fracción adicional de ligando, con ventajas como la estabilidad química, la facilidad de síntesis y la reducción de la inmunogenicidad. Otras proteínas y moléculas con funciones de orientación activa son la transferrina, el ácido fólico y la biotina.³⁵

Las nanopartículas también pueden actuar como plataformas de entrega específicas cargadas con otros elementos de imagen para identificar cánceres. Un ejemplo es el de los nanoclusters de oro encapsulados en liposomas y funcionalizados con el anticuerpo HER2 para detectar células de cáncer de mama humano en suero y tejidos por colorimetría.^{35,38}

Además, las nanopartículas pueden emplearse para la detección selectiva de biomarcadores tumorales. La detección precoz de ciertos biomarcadores del cáncer puede ser muy difícil, y las nanopartículas se han utilizado para amplificar la señal. Por ejemplo, se descubrió que un nano-genosensor amplifica significativamente la señal del conocido biomarcador del cáncer de mama, miRNA-21, en muestras clínicas,^{31,39} y se empleó un nano-inmunosensor para detectar ultrasensiblemente el antígeno 15-3 del cáncer de mama en muestras de plasma humano.^{35,36} Otros usos de la detección con nanopartículas han incluido la identificación de células tumorales circulantes (CTCs).^{35,37}

Los compuestos que contienen yodo y bario se utilizan con frecuencia en las modalidades de imagen basadas en los rayos X (radiografía, fluoroscopia, CT, angiografía), y los compuestos que contienen gadolinio se utilizan en la imagen por MRI. Dependiendo de la estructura anatómica que se vaya a visualizar, los agentes de contraste pueden administrarse de diferentes maneras, como por vía intravenosa, intraarterial, intratecal, oral y rectal.³⁷

El gadolinio es un metal de tierras raras altamente tóxico que contiene siete electrones no apareados, lo que lo hace ideal para la obtención de imágenes por MRI una vez quelado para evitar su toxicidad.

En la actualidad, se están desarrollando numerosas nanopartículas conjugadas con iones paramagnéticos como el hierro, el gadolinio y el manganeso con diferentes formas, tamaños y composiciones. El objetivo común es producir moléculas que sean específicas para un tejido u órgano y que, por tanto, proporcionen una alta resolución de contraste para indicaciones concretas y tengan menos efectos secundarios.³⁷

En los últimos años se ha pasado de la imagen de fluorescencia estructural y funcional a la imagen de fluorescencia molecular, utilizando agentes fluorescentes más específicos (**FIGURA 12**). Las imágenes de fluorescencia molecular podrían utilizarse para muchas aplicaciones relevantes para la cirugía oncológica, como la detección de lesiones tumorales ocultas, la evaluación de los márgenes del tumor y la invasión locorregional, y el énfasis en las estructuras vitales.³⁶

Una estrategia diferente para rastrear activamente el tejido tumoral es el uso de trazadores fluorescentes activables. El agente fluorescente es ópticamente silencioso hasta que se activa, a menudo a través de la escisión enzimática de la estructura principal (**FIGURA 12**).³⁶

En la **FIGURA 13** se muestran los diseños de nanopartículas más utilizados para la obtención de imágenes por fluorescencia en la investigación preclínica. El primer y más común diseño incorpora fluoróforos marcados en la superficie como vectores (**FIGURA 13A**). Otro diseño, conocido como estructura "core-shell" (**FIGURA 13B**), utiliza un colorante fluorescente que se carga en el centro de las nanopartículas, con la cubierta exterior de la nanopartícula marcada con anticuerpos, ligandos y péptidos. Algunos ejemplos de diseños de core-shell son las micelas, las nanopartículas cuánticas de dendrímero y QDs, y la nanomatriz multicapa. Las ventajas de estos diseños incluyen la solubilización de los fluoróforos hidrofóbicos y la protección de los fluoróforos internos de la rápida degradación y excreción.³⁵

Un tercer diseño utiliza un colorante fluorescente concentrado y apagado dentro de las nanopartículas (**FIGURA 13C**) para mejorar la resolución y la relación entre el objetivo y el fondo, con una sensibilidad potencialmente mayor en la obtención de imágenes. En este diseño, la nanopartícula absorbe la energía de los tintes fluorescentes como un interruptor que mantiene la señal en un estado "apagado" mientras está en circulación. Cuando las nanopartículas se concentran en el sitio objetivo, la nanopartícula se degrada por moléculas como la caspasa, la proteasa y la DNasa, liberando el colorante de la nanopartícula y aliviando el estado de apagado. La fluorescencia del colorante pasa así a un estado "encendido". Esta plataforma de diseño se ha aprovechado para detectar la actividad de las proteasas, la apoptosis, los tumores y la inflamación. El cuarto diseño es similar al anterior (**FIGURA 13D**), sólo que el colorante fluorescente se combina con una molécula de apagado independiente, y luego la combinación se incorpora a las nanopartículas.³⁵

Además, existe un diseño más para la obtención de imágenes de fluorescencia basadas en nanopartículas que utiliza la transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET) (FIGURA 13E). La FRET es un proceso en el que la energía se transfiere de una molécula donante a una molécula receptora, y la energía liberada crea fluorescencia.³⁵

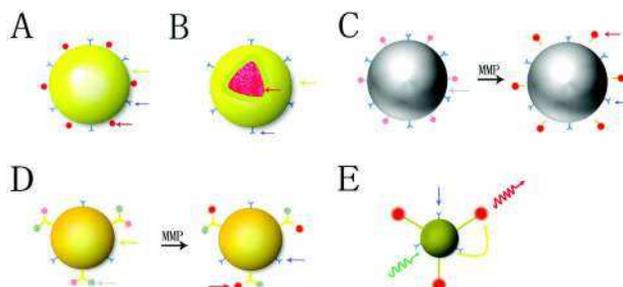


Figura 13. Diferentes estructuras y composiciones de nanopartículas en imágenes biomédicas de fluorescencia. A: Tipo de vector; B: Estructura de núcleo de NP; C: NP como amortiguador; D: NP conectada con fluoróforo y quencher, E: NP de imagen de energía transferida por resonancia de Förster (flecha amarilla: nanopartícula; flecha roja: colorante fluorescente; flecha azul: ligando; flecha gris: quencher; flecha curva amarilla: transferencia de energía; flecha curva verde: luz de excitación; flecha curva roja: luz de emisión; MMP: metaloproteinasas de matriz)

Los agentes de contraste de la MRI ayudan significativamente a la detección de lesiones y a la diferenciación de los tejidos sanos. Los protones de hidrógeno desempeñan un papel fundamental en el mecanismo de la MRI, ya que todos los protones alinean su espín en una dirección bajo el control de un campo magnético externo.³⁵

El diseño estructural más común de los agentes de contraste de MRI en partículas de tamaño nanométrico es una nanopartícula magnética con decoración superficial. Se trata de una estructura básica y sencilla, que puede utilizarse directamente o como material magnético original para desarrollar nuevas nanopartículas (FIGURA 14A). La nanopartícula de óxido de hierro superparamagnético (SPIO, por sus siglas en inglés) es un ejemplo de este diseño. Otro diseño es una estructura de núcleo-cáscara, con materiales magnéticos sintetizados como el núcleo con materiales orgánicos o inorgánicos utilizados para la cáscara (FIGURA 14B). Ejemplos de esta estructura son las micelas y los dendrímeros.³⁵

Un tercer diseño utiliza una estructura vectorial, con materiales magnéticos utilizados en la adhesión de la superficie o la conexión del ligando a otras nanopartículas (FIGURA 14C). La modificación de la superficie proporciona el contraste de la MRI, y la nanopartícula principal puede tener otras funciones, como la obtención de imágenes por fluorescencia, la obtención de imágenes por CT y la carga de fármacos. Otros diseños utilizan una estructura mixta, con materiales magnéticos cargados tanto en el centro como en la superficie de las nanopartículas para proporcionar un mayor contraste. Un ejemplo es el liposomal-gadolinio (FIGURA 14D).³⁵

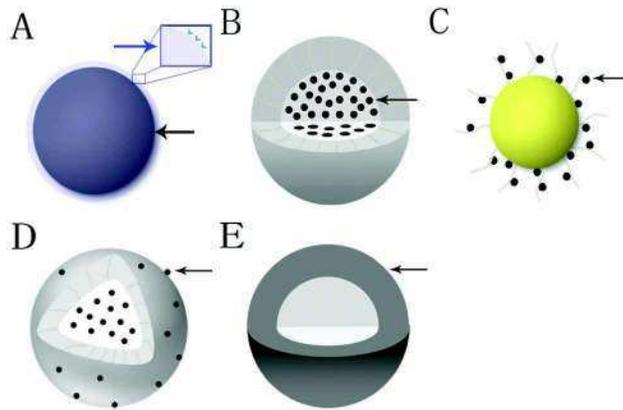


Figura 14. Diferentes estructuras de nanopartículas para imágenes de MRI/CT. A: estructura básica; B: estructura core-shell; C: estructura vectorial; D: estructura mixta; E: estructura core-shell. (Flecha negra: materiales de imagen MRI/CT; Flecha azul: decoración de la superficie)

Los agentes de contraste para CT desempeñan un papel crucial en la distinción entre tejidos con coeficientes de atenuación similares. Actualmente, los agentes de contraste para CT intravenosos se basan principalmente en el yodo.³⁵

Existen dos categorías de agentes de contraste para CT basados en la composición de las nanopartículas. La primera incluye los agentes de contraste basados en el yodo. Las nanopartículas se utilizan como vectores para cargar yodo utilizando la clásica estructura core-shell. El yodo se carga en el núcleo de la nanopartícula. La segunda categoría es la de los agentes de contraste basados en metales, en la que las nanopartículas se fabrican utilizando diversos metales con altos coeficientes de atenuación de los rayos X. Los metales utilizados en esta categoría son el oro, el óxido de tantalio y el dióxido de circonio.³⁵

Los agentes de contraste de ultrasonido se han desarrollado para aumentar las diferencias de señal acústica entre los tejidos normales y las lesiones objetivo. Los actuales agentes de contraste por ultrasonidos disponibles en el mercado consisten en microburbujas de entre 1 y 8 μm .³⁵

En función de su composición, existen tres tipos de agentes de contraste de nanopartículas que se utilizan actualmente para la obtención de imágenes por ultrasonidos. El primer tipo utiliza gas (microburbujas) para crear fuertes reflexiones acústicas, y es el material más común que se convierte en agentes de contraste para US. El segundo tipo utiliza un diseño de nanopartículas de base sólida con señales acústicas de dispersión relativamente altas, a menudo mediadas por la forma de las nanopartículas. El último tipo es una nanopartícula de base líquida.³⁵

El radionúclido común para la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) en uso clínico es el Tecnecio-99 m con una vida media de 6 horas. Otros radionúclidos utilizados en las nanopartículas son el indio-111, el yodo-123, 125 y 131, y el oro-198, 199.³⁵

Para los trazadores de imágenes PET/SPECT de nanopartículas se necesitan núclidos con una vida media razonablemente larga. El radioisótopo comúnmente utilizado para la PET en la práctica clínica es el flúor-18, con una vida media de 109.8 minutos, que suele ser

demasiado corto para aplicarlo en nanopartículas debido al tiempo necesario para su preparación y captación celular. Por ello, se necesitan otros nucleidos con vidas medias más largas para preparar diversas NPs. Algunos ejemplos son el cobre-64 con una vida media de 12.7 horas, el indio-111 con una vida media de 2.8 días y el yodo-124 con una vida media de 4.2 días.³⁵

En relación con los agentes de contraste convencionales, las nanopartículas han demostrado mejorar la intensidad de la señal, la capacidad de focalización y un mayor tiempo de circulación tanto in vitro como en modelos de enfermedades animales, especialmente para el diagnóstico y la terapia del cáncer. Con la ayuda de la nanotecnología, las modalidades de imagen individuales se han vuelto más potentes que antes, y la imagen multimodal ha demostrado ser muy prometedora.³⁵

2.4. Agente monoclonal

Los anticuerpos son glicoproteínas que se encuentran en el plasma y en los fluidos extracelulares. Son los principales efectores del sistema inmunitario adaptativo, y se producen en respuesta a moléculas y organismos (como bacterias, virus, moléculas extrañas y otros agentes) que son neutralizados y/o eliminados por éstos. Esta respuesta es un mecanismo clave utilizado por el organismo anfitrión para protegerse contra la acción de moléculas u organismos extraños. Son secretadas por los linfocitos B especializados (células plasmáticas) y también pueden denominarse inmunoglobulinas (Ig), ya que contienen un dominio estructural que se encuentra en varias proteínas.⁴²

Los linfocitos B portadores de receptores específicos, reconocen y se unen a los determinantes antigénicos del antígeno e inducen un proceso de división y diferenciación, que transforma los linfocitos B en células plasmáticas que sintetizan predominantemente anticuerpos.⁴²

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) se definen como "moléculas producidas en el laboratorio y diseñadas para servir como anticuerpos sustitutos que pueden restaurar, mejorar o imitar el ataque del sistema inmunitario a las células cancerosas" al unirse a los antígenos que se encuentran en la superficie de las células cancerosas.⁴³ Los anticuerpos monoclonales son producidos por un solo clon de células B y se dirigen a un epítipo específico de un antígeno.⁴⁴

Los anticuerpos son productos biológicos que pueden ser producidos por líneas celulares y extraídos de su sobrenadante extracelular, por lo que presentan un alto contenido de impurezas. El proceso actual de producción de mAbs terapéuticos suele constar de dos etapas principales (i) el procesamiento ascendente, que se basa en la producción de anticuerpos por líneas celulares derivadas de células de mamíferos; y (ii) el procesamiento descendente, que consiste en la recuperación, purificación y aislamiento de los mAbs a partir de las células y los restos celulares, el medio de procesamiento y otras impurezas.⁴²

La producción y liberación de anticuerpos por parte de las células plasmáticas forma parte de la respuesta inmunitaria normal del organismo ante una sustancia o toxina extraña. Los científicos desarrollaron un método para diseñar anticuerpos como método para atacar a las células cancerosas. Los anticuerpos monoclonales, también conocidos como mAbs, son sustancias desarrolladas en un laboratorio que buscan y se unen a proteínas específicamente seleccionadas en cualquier lugar del cuerpo.⁴³

Los anticuerpos están formados por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas, que están unidas por puentes disulfuro formando una estructura similar a la forma de una Y (**FIGURA 15**).⁴⁴ Funcionalmente, los anticuerpos se dividen en dos partes; los dos brazos de la estructura en forma de Y contienen los sitios de unión al antígeno y se denominan región de unión al antígeno del fragmento (Fab), que varía según el antígeno que se le una,⁴³ junto con la base de la estructura en forma de Y que media la señalización inmunológica de los anticuerpos y se denomina región cristalizable del fragmento (Fc), que es la responsable de unir el anticuerpo con las células que participan en la respuesta inmunitaria.⁴³ El brazo Fab de un anticuerpo IgG contiene las cadenas ligeras completas y parte de la cadena pesada, cada una con sus propios dominios constantes y variables. La especificidad del antígeno en la región Fab viene determinada por las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) dentro de los dominios variables. Estas CDRs tienen la mayor variación de secuencia dentro de los anticuerpos, y esta característica da lugar a la diversa gama de especificidades de los antígenos.⁴⁴

Tanto las cadenas ligeras como las pesadas están compuestas por dominios variables y constantes, cada uno con funciones diferentes. Los dominios variables determinan la especificidad del antígeno, y los dominios constantes determinan la clase de inmunoglobulina (Ig). En el caso de las cadenas ligeras, el dominio constante difiere dependiendo de si están codificadas por los genes j o k. Del mismo modo, el dominio constante de la cadena pesada varía con 5 genes (γ , μ , α , δ y ϵ), y esto determina la clase general de anticuerpos (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente).⁴⁴

En las personas sanas, los anticuerpos IgG representan aproximadamente el 75% de los anticuerpos séricos, el 15% son IgA, el 10% son IgM, junto con cantidades muy pequeñas de anticuerpos IgD e IgE circulantes. Los anticuerpos IgG son el principal isotipo utilizado en la terapia contra el cáncer.⁴⁴

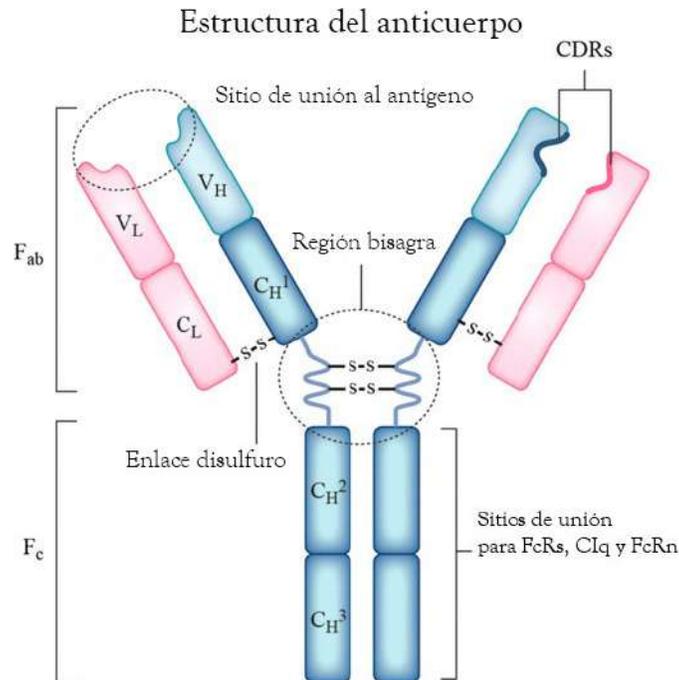


Figura 15. Estructura de los anticuerpos: Los anticuerpos están formados por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas, unidas por puentes disulfuro. Las cadenas pesadas constan de un dominio variable (V_H) seguido de un dominio constante (C_H1), una región bisagra y otros dos dominios constantes (C_H2 y C_H3). La cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) y otro constante (C_L). Los dos brazos de la estructura en forma de Y contienen los sitios de unión al antígeno, la región de unión al antígeno del fragmento (F_{ab}), junto con la base de la estructura en forma de Y denominada región cristalizante del fragmento (F_c). La especificidad del antígeno en la región F_{ab} viene determinada por las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) dentro de los dominios variables

Dentro del sistema inmunitario, una de las principales funciones de los anticuerpos es neutralizar agentes patógenos como bacterias y virus. Las CDR de las regiones variables de un anticuerpo reconocen una estructura molecular específica de un antígeno, denominada epítipo, presente en el patógeno. Debido a la naturaleza aleatoria de la generación de anticuerpos en el desarrollo de cada célula B individual, hay millones de células B circulando en cualquier momento que reconocen cada una un antígeno diferente. Una vez que una célula B encuentra un patógeno invasor con su epítipo único, se somete a la maduración con la ayuda de células T específicas y produce grandes cantidades de anticuerpos solubles. Múltiples células B reconocerán diferentes epítipos presentes en el patógeno, por lo que se producirán muchos anticuerpos diferentes. Una vez producidos, estos anticuerpos se unen a su antígeno en la superficie de la bacteria o el virus para neutralizar el patógeno y marcarlo para su destrucción por parte de las células efectoras de la inmunidad innata.⁴⁴

2.4.1. Clasificación y tipos de mAbs

Existen cuatro clasificaciones de mAbs: murinos, quiméricos, humanizados y humanos. La estructura de los mAbs se representa en la **FIGURA 16**.⁴³

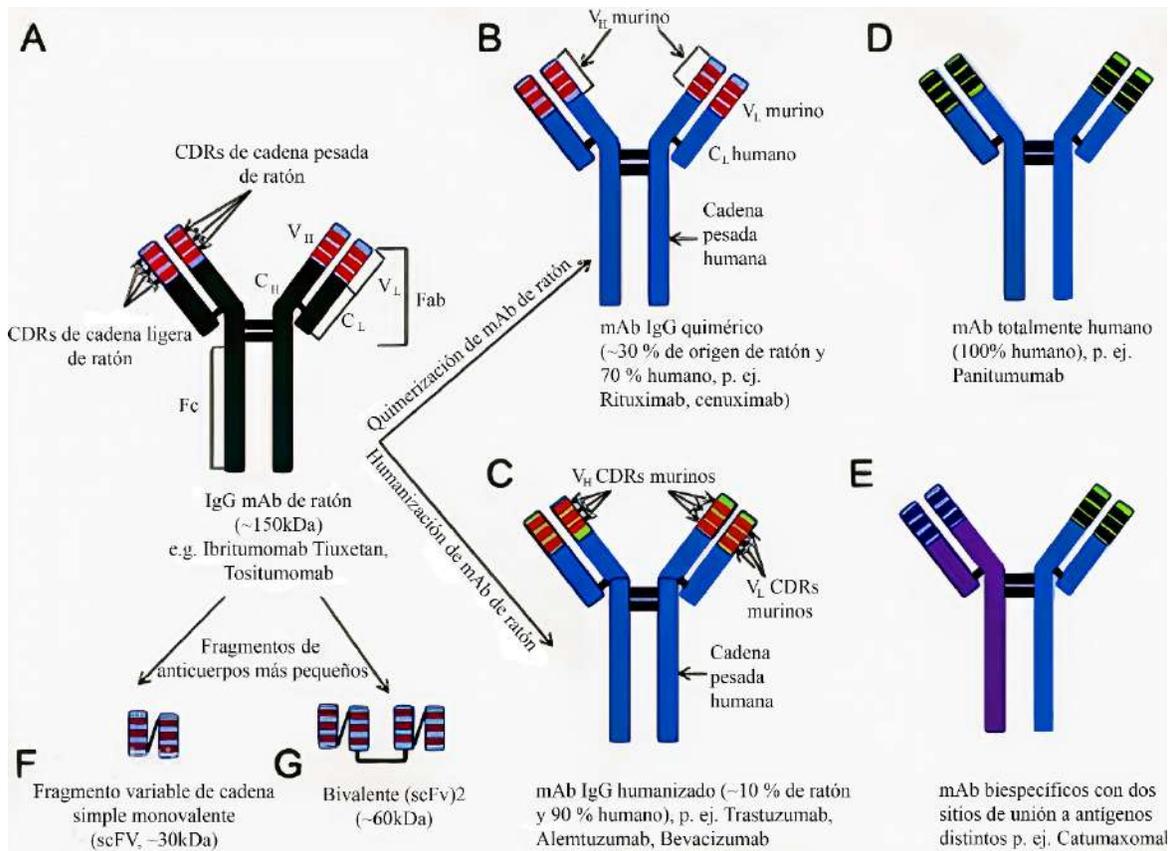


Figura 16. Estructura del anticuerpo monoclonal

- **Murino:** Utiliza linfocitos B cosechados de ratones que se fusionan con una línea celular de mieloma inmortal que carece del gen de la hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa. Las reacciones alérgicas son comunes en los seres humanos, con un beneficio potencial limitado debido a su corta vida media.
- **Quimérico:** Aproximadamente un 65% de derivado humano, 35% de derivado murino, utiliza la región variable específica del antígeno murino y las cadenas pesadas y ligeras del humano. Demuestra una vida media prolongada en humanos con una inmunogenicidad reducida; sigue siendo capaz de inducir anticuerpos contra el fármaco.
- **Humanizado:** Las regiones hipervariables murinas de las cadenas ligeras y pesadas se fusionan en un marco de Ab humano; aproximadamente 95% humano. Ha disminuido la producción de anticuerpos antidroga; limitaciones porque el proceso de creación es difícil.⁴³
- **Humano:** Anticuerpos monoclonales totalmente humanos. Menos antigénicos y mejor tolerados; parecen tener la vida media más larga en humanos.
 - **mAbs no conjugados:** También llamados mAbs "desnudos" son aquellos anticuerpos que funcionan por sí mismos. Son los más utilizados en el tratamiento del cáncer. En la mayoría de los casos, estas moléculas se adhieren a los antígenos de las células cancerosas.

- **mAbs conjugados:** Combinación de un mAb con un agente quimioterapéutico o con una partícula radiactiva. Sirve como mecanismo de administración y minimiza el daño a las células normales por los agentes quimioterapéuticos o la partícula radiactiva unida al mAb.
- **mAbs biespecíficos:** Es una combinación de dos mAbs diferentes que permite que el mAb se adhiera a dos antígenos diferentes al mismo tiempo. Uno de ellos es la proteína que se encuentra en las células cancerosas, y el otro es una proteína que se encuentra en las células inmunitarias.

2.4.2. Mecanismo de acción

Los anticuerpos utilizados en la terapia del cáncer tienen varios métodos para mediar en la muerte de las células tumorales, que están íntimamente relacionados con la función nativa del antígeno objetivo (**FIGURA 17**). Pueden actuar directamente sobre las células tumorales mediante el bloqueo de los receptores de factores de crecimiento necesarios para el crecimiento del tumor, como los miembros de la familia ErbB.⁴⁴

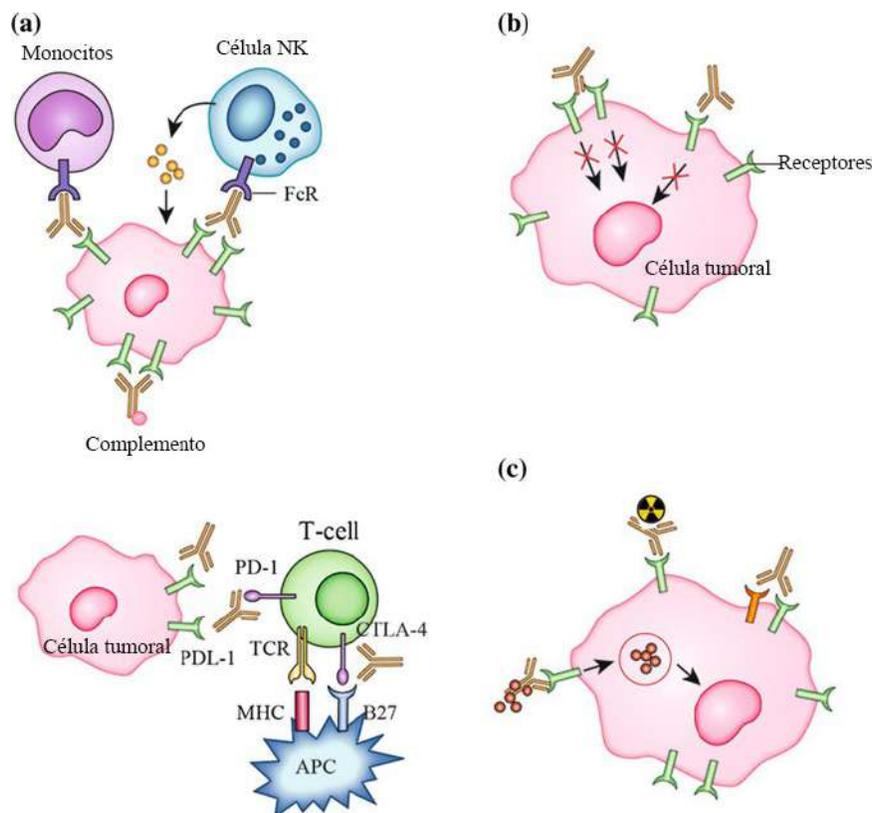


Figura 17. Mecanismos de acción de los anticuerpos monoclonales: (a) Destrucción de células tumorales mediada por el sistema inmunitario mediante la activación del complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la inhibición de receptores inhibidores de células T como el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) y la inducción de la fagocitosis; (b) la destrucción de células tumorales mediante la inhibición de la dimerización, la activación de quinasas y la señalización descendente que conduce a la reducción de la proliferación y la apoptosis; (c) los anticuerpos conjugados para liberar cargas tóxicas como un fármaco, una toxina, un ARN de interferencia pequeño o un radioisótopo en células tumorales que inducen la muerte celular

Para la orientación ideal de los antígenos asociados a los tumores (TAA, por sus siglas en inglés), lo que se requiere es un antígeno de la superficie celular del tumor que esté mutado,

sobreexpresado o expresado selectivamente en comparación con el tejido normal. Además de la expresión, la función del antígeno y el efecto sobre la señalización descendente también se tienen en cuenta a la hora de seleccionar una diana.⁴⁴

Los antígenos diana no se limitan al propio tumor, ya que las estructuras de soporte del mismo, como la vasculatura, el estroma y la matriz extracelular en el microambiente tumoral, también proporcionan objetivos potenciales para limitar el crecimiento o inducir la muerte de las células tumorales.⁴⁴

Las células tumorales recubiertas de anticuerpos son reconocidas por las células inmunitarias mediante interacciones con receptores específicos de su superficie celular y desencadenan funciones efectoras celulares. Esta interacción está mediada por el dominio Fc del anticuerpo, que contiene sitios de unión específicos para los receptores de la superficie de las células inmunitarias. Estos se conocen como receptores Fc (FcR), que se expresan en una variedad de células efectoras inmunitarias. Las células asesinas naturales (NK) son las que gozan de mayor reputación entre las células efectoras antitumorales, ya que han demostrado ser los principales mediadores de la citotoxicidad mediada por células dependientes de antígenos (ADCC). La ADCC se desencadena cuando el dominio Fc del anticuerpo terapéutico unido es reconocido por el receptor Fc gamma IIIa (FccRIIIa) en la superficie de las células NK e implica la liberación de factores citotóxicos, como la perforina, que provocan la lisis de la célula tumoral.⁴⁴

Las células tumorales opsonizadas pueden ser fagocitadas mediante el acoplamiento de los Fc γ Rs, y además de la eliminación de la célula diana, puede producirse la presentación del antígeno para activar las células T. El proceso de engullir una célula tumoral recubierta de anticuerpos se denomina fagocitosis celular dependiente de antígeno (ADCP) e implica la participación de los Fc γ Rs activadores. Esto podría proporcionar a los pacientes una inmunidad a largo plazo contra los tumores mediante la inducción del sistema inmunitario adaptativo en forma de células T de memoria antitumoral. Este vínculo entre el sistema inmunitario innato y el adaptativo mediante la administración pasiva de anticuerpos antitumorales se denomina efecto vacunal y durante mucho tiempo se ha considerado el santo grial de la terapia con anticuerpos. Una función adicional de los anticuerpos mediada por Fc es la de activar el sistema del complemento a través de una serie de pequeñas proteínas que se encuentran en la sangre. Esto implica el reclutamiento de estas proteínas para formar un complejo en la superficie del patógeno. Este complejo cumple tres funciones principales: potenciar la fagocitosis, reclutar células inmunitarias y formar un complejo de ataque de membrana (MAC) que lizará el objetivo.⁴⁴

Cuando se utilizan mAbs en oncología, existen varios mecanismos de acción para destruir las células cancerosas (**FIGURA 18**). Estos mecanismos incluyen impedir las cascadas de supervivencia de las células tumorales, inhibir el crecimiento del tumor interfiriendo en la angiogénesis tumoral, eludir la muerte celular programada y evadir los puntos de control inmunitarios. Algunos de los diferentes mecanismos de acción son los siguientes:⁴³

1) Eliminación directa de las células tumorales

Esta acción es estimulada por la actividad agonista del receptor, como la unión de un anticuerpo a un receptor de la superficie de la célula tumoral y su activación, lo que conduce a la muerte celular. También puede ser estimulada por la actividad antagonista del receptor "como un anticuerpo que se une a un receptor de la superficie celular y bloquea la dimerización, la activación de la quinasa y la señalización descendente, lo que conduce a la reducción de la proliferación y la apoptosis". Un mAb que se une a una enzima puede conducir a la neutralización y la apoptosis, mientras que los anticuerpos conjugados pueden utilizarse para entregar una carga útil, como un fármaco, a la célula tumoral.⁴³

2) Eliminación de células tumorales mediada por el sistema inmunitario

En este contexto, el sistema inmunitario buscará las células cancerosas y las destruirá. Este tipo de muerte celular puede llevarse a cabo mediante la iniciación de uno de varios mecanismos. Estos mecanismos incluyen:⁴³

- a) Fagocitosis
- b) Activación del complemento
- c) Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)
- d) Células T modificadas genéticamente que se dirigen al tumor mediante un fragmento variable de cadena única
- e) Células T que se activan mediante la presentación cruzada del antígeno mediada por anticuerpos a las células dendríticas
- f) Inhibición de los receptores inhibidores de las células T

3) Ablación de células vasculares y estromales

Esta acción también se inicia mediante una de las muchas opciones. Estas incluyen:⁴³

- a) antagonismo del receptor de la vasculatura o atrapamiento del ligando
- b) inhibición de las células estromales
- c) entrega de una toxina a las células estromales
- d) entrega de una toxina a la vasculatura

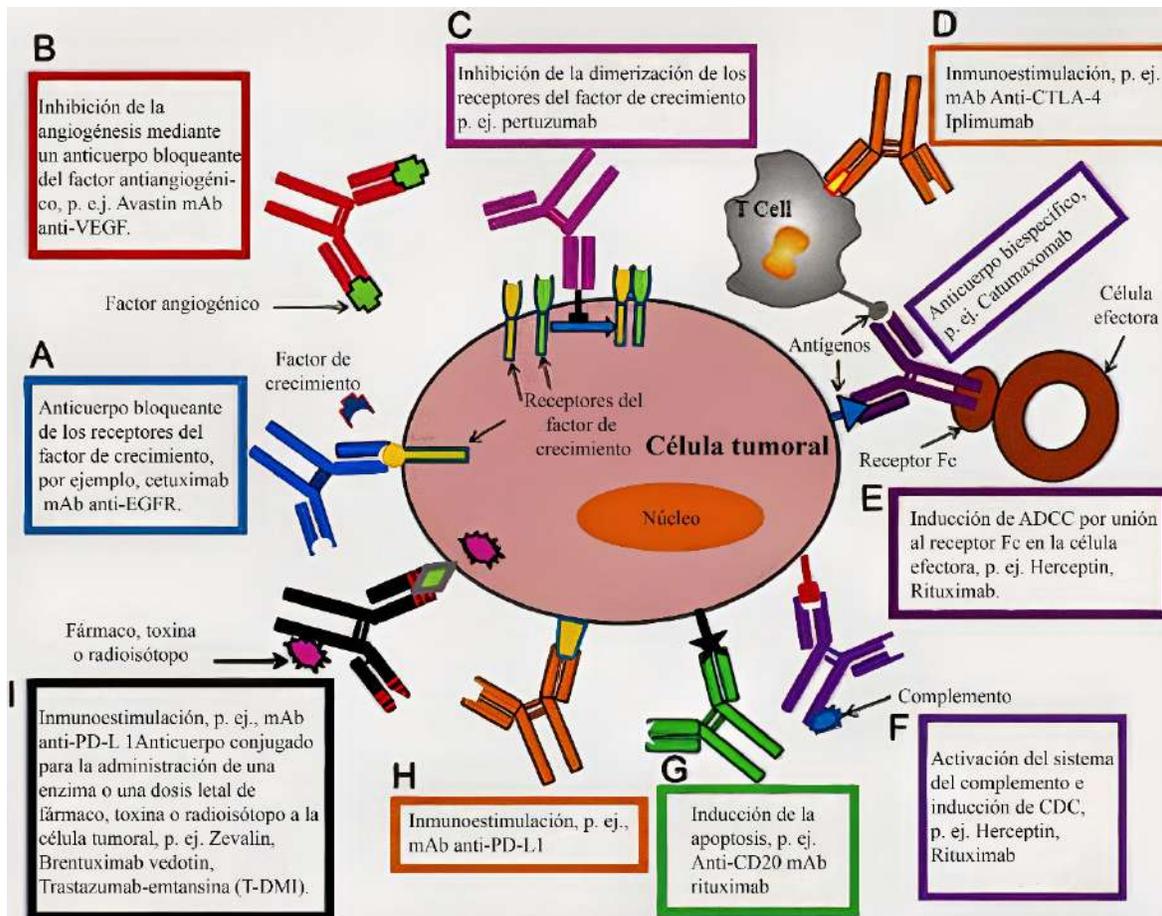


Figura 18. Mecanismo de acción del anticuerpo monoclonal

2.4.3. Aplicaciones y relevancia de anticuerpos

Tras el descubrimiento de los anticuerpos y sus funciones, se comprendió que podrían ser eficaces para el tratamiento y el diagnóstico de los cánceres. Dado que los anticuerpos son exclusivamente específicos para su antígeno diana, podrían utilizarse para dirigirse directamente a los tumores que expresan el antígeno.⁴⁴

Su alta especificidad es una excelente ventaja para fines terapéuticos, ya que los mAbs sólo pueden interactuar con una sustancia específica. Esta especificidad es también muy atractiva para numerosos ensayos clínicos y pruebas de diagnóstico de laboratorio, como la detección e identificación de analitos, marcadores celulares, patógenos, entre otros.⁴²

Por último, una ventaja adicional de los mAbs está relacionada con el hecho de que, una vez generado el hibridoma deseado, los mAbs pueden producirse a través de una fuente constante y renovable, lo que permite un suministro continuo y reproducible de anticuerpos.⁴²

A nivel de diagnóstico, los anticuerpos IgG son agentes de reconocimiento biológico ideales, por lo que se han utilizado en numerosas técnicas analíticas, como Western Blotting (inmunotransferencia), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica la inmunoprecipitación, el ensayo inmunoenzimático (ELISA), las micromatrices de anticuerpos, la inmunoscintigrafía, los ensayos radioinmunológicos, los análisis de citometría de flujo, los

inmunosensores, las reacciones en cadena de la inmunopolimerasa (IPCRs, por sus siglas en inglés) y las IPCRs en tiempo real. Estos anticuerpos también se utilizan como herramientas importantes en la cromatografía de inmunoafinidad, en la identificación y localización de proteínas intracelulares y extracelulares, y se emplean para la detección de patógenos, adulterantes, toxinas y/u otros residuos (fármacos, sustancias químicas o pesticidas) en productos alimentarios y en el análisis/seguimiento medioambiental.⁴²

Por lo que respecta a sus aplicaciones terapéuticas, los mAbs presentan un gran potencial para su uso en inmunoterapia pasiva. La inmunidad pasiva se confiere mediante la transferencia de anticuerpos específicos contra un patógeno concreto a un huésped, y se distingue de la inmunidad activa porque, en este último caso, la inmunidad se confiere mediante la respuesta del huésped a un antígeno patógeno determinado, como se representa en la **FIGURA 19**.⁴²

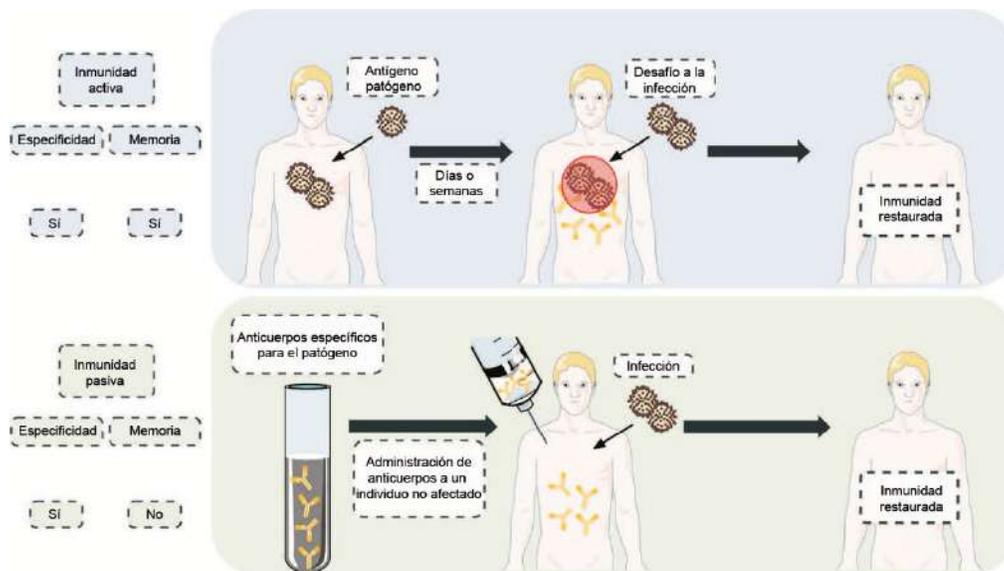


Figura 19. Inmunidad activa frente a inmunidad pasiva

Los anticuerpos también pueden utilizarse para administrar una carga útil directamente en el lugar del tumor gracias a la especificidad única de su TAA. Estos conjugados de anticuerpos pueden utilizarse para administrar un fármaco, una toxina, un pequeño ARN de interferencia (siRNA) o incluso un isótopo radiactivo en un enfoque dirigido que a menudo da lugar a una mayor eficacia y una menor toxicidad.⁴⁴

Los mAbs ofrecen un tratamiento alternativo a los pacientes con cáncer que han fracasado o progresado con la quimioterapia estándar. El descubrimiento de estas moléculas ha revolucionado la lucha contra el cáncer, al permitir enfoques más directos para eliminar las células cancerosas dirigiéndose a antígenos específicos de esas células.⁴³

3. Metodología

La presente investigación tiene lugar en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro en Campus Aeropuerto (FI-CA) en el laboratorio de materiales funcionales y nanoestructurados con el apoyo del Dr. Eduardo Elizalde.

La metodología implementada consiste en tres fases: 1) síntesis y caracterización de los puntos cuánticos de Ag_2S ; 2) funcionalización y caracterización de estos; finalmente, 3) pruebas *in vitro* e *in vivo* para probar el nanosistema generado para la detección de cáncer de mama.

3.1. Síntesis, caracterización y funcionalización de puntos cuánticos de Ag_2S

3.1.1. Síntesis

La síntesis de los QDs de Ag_2S tendrá como sede de desarrollo el laboratorio de materiales funcionales y nanoestructurados ubicado en campus aeropuerto. Previo a la generación de las soluciones precursoras, el material utilizado deberá lavarse, asimismo, secarse con alcohol, el manejo del material tras haber sido secado, requiere rigurosamente su manipulación con guantes, y de este modo evitar contaminación por contacto, al concretar el paso mencionado se continuará a preparar las cuatro soluciones que requeridas para la síntesis de los QDs de Ag_2S (NOTA: se deberá utilizar agua bidestilada para todas las soluciones que se requieran); las soluciones requeridas para este paso son las siguientes:

- 1) 1 L de solución de EDTA monobásico a 20 mM. (Sol. A)
- 2) 1 L de solución de CTAB monobásico a 20 mM. (Sol. B)
- 3) 0.5 L de solución de nitrato de plata (AgNO_3) al 0.1 mM. (Sol. C)
- 4) 0.5 L de solución de sulfuro de sodio (Na_2S) al 0.5 mM. (Sol. D)

En un vaso de precipitado se depositarán 50 mL de la Sol. A, añadiendo 50 mL de la Sol. B y finalmente 50 mL más de etanol, esta mezcla se someterá a una etapa de sonicación, dicho proceso se generará a través de un homogeneizador sónico de mano con un sonotrodo de diámetro de 80 mm a una potencia de 45W y un snap del 1%. Esta mezcla se dejará bajo dichas condiciones hasta alcanzar una temperatura de 35 °C. Dado este punto se añadirán 50 mL de la Sol. C (esta adición deber ser continua y por las paredes del recipiente), el proceso de sonicación debe cumplir con las condiciones preestablecidas y permanecerá hasta alcanzar una temperatura de 50°C. Para estas instancias se deberá agregar a la mezcla 50 mL de la Sol. D a una tasa de 1 gota por cada 5 segundos, en el momento que se añade a la mezcla la última gota deberá realizarse un conteo dependiendo el diámetro de QDs que se espera 5, 7, 13 y 18 min (tamaño promedio de los QDs 2, 5, 8, 10 nm); concluyendo el periodo de tiempo se detiene el homogeneizador sónico.

La mezcla resultante deberá enfriarse a temperatura ambiente, cuando su temperatura ronde entre los 25°C a 30°C, se centrifugará a 7000 rpm por 10 minutos,⁴⁵ a continuación se

decantará y el sólido obtenido será resuspendido en una solución 40:60 de agua con PBS y se almacenará en un frasco ámbar a una temperatura de 4°C.⁴⁶

3.1.2. Caracterización

3.1.2.1. Caracterización de los QDs sin funcionalizar.

La caracterización del material tendrá como objetivo obtener información necesaria de este para entonces poder sustentar su uso y características a través de los datos generados; en primera instancia, es necesario determinar el tamaño de partícula, el cual se determinará por medio de la microscopía electrónica de barrido (TEM, por sus siglas en inglés);⁴⁷ asimismo para este análisis las muestras serán preparadas por medio de la técnica de fundición por gota, se situará una gota de la solución de QDs en etanol sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono, el disolvente sufrirá una evaporación a temperatura ambiente.

Para la determinación de las características ópticas se hará valer de la técnica de espectroscopia UV-vis,^{48,49} utilizando una concentración de 20 mM en la solución a analizar y con parámetros para el barrido en un rango de 190 a 1100 nm. Aunado a estas técnicas, también se hará uso de fluoroscopia de rayos X en NIR-I a temperatura ambiente, la fuente de excitación será un láser de 785 nm.^{50,51}

3.1.2.2. Caracterización de los QDs funcionalizados.

Al igual que en los QDs carentes de funcionalización se implementará TEM para la determinación del tamaño de los QDs funcionalizados aplicando la misma metodología para la elaboración de las muestras. Para ratificar la funcionalización del sistema se medirá el peso molecular utilizando un Zetasizer, midiendo la absorción a 562 nm.⁵² Este proceso se lleva a cabo por triplicado.

La caracterización óptica se desarrollará bajo los mismos parámetros ya establecidos en la sección precedente. Por otro lado, se incorporará un análisis de espectroscopia infrarroja de la transformada de Fourier, buscando analizar la presencia de grupos funcionales específicos en los QDs funcionalizados. Para finalizar, se usará el Zetasizer con el fin de evaluar la propiedad de carga superficial de los QDs funcionalizados a diferentes pH (3, 5, 7, 9 y 11) y se determinará el potencial Z.^{52,53}

3.1.3. Funcionalización de los QDs

Este procedimiento se divide en dos partes: 1) la preparación de la superficie de los QDs; para la cual debe considerarse la implementación de cuatro tipos de anticuerpos monoclonales, de forma que serán requeridas cuatro soluciones de puntos cuánticos con la superficie activada (QDs act).

NOTA: Previo a la preparación de las soluciones precursoras, el material utilizado deberá lavarse y ser secado con alcohol, el manejo del material ya seco deberá ser estrictamente con guantes con el propósito de evitar contaminación por contacto.

Para la elaboración de la solución de QDs act., son imperativas las soluciones mostradas a continuación:

- 1) 400 mL de solución de QDs de Ag₂S a 60 mM. (Sol. E)
- 2) 10 mL de solución de 1,1-carbonildiimidazol (CDI) a 0.05 mM (Sol. F)
- 3) 40 mL de solución de albúmina de suero bovino (BSA) a 45 mM (Sol G)

En un vaso de precipitado se dispondrán de los 400 mL de la Sol. E con los 10 mL de la Sol. F, haciendo uso de una plancha caliente con agitación magnética, la temperatura deberá regularse a 55°C y se mantendrá reaccionando por 30 minutos con una agitación promedio de 300 rpm.⁵² Posteriormente, la mezcla anterior se expone a temperatura ambiente para su enfriamiento, a continuación, se le añadirán los 40 mL de la Sol. G y se conservará en reacción por 2 horas a temperatura ambiente y una agitación media de 50 rpm.^{52,53}

Para la segunda parte serán utilizados cuatro tipos de anticuerpos monoclonales, los cuales son:

- a) ErbB2 (HER2) anticuerpo monoclonal (3B5). (Anti A)
- b) ER-beta-1 receptor de estrógeno anticuerpo monoclonal (ERB455). (Anti B)
- c) PR-AT 4.14 receptor de progesterona anticuerpo monoclonal. (Anti C)
- d) Ki-67 Anticuerpo monoclonal (SolA15). (Anti D)

Por ende, la subsecuente metodología deberá repetirse de forma individual para cada uno de estos, teniendo en consideración la biofuncionalización de los QDs en función a su diámetro del modo sucesivo:

- 1) QDs de diámetro de 2 nm con el Anti A. (Nanosistema 1)
- 2) QDs de diámetro de 5 nm con el Anti B. (Nanosistema 2)
- 3) QDs de diámetro de 8 nm con el Anti C. (Nanosistema 3)
- 4) QDs de diámetro de 10 nm con el Anti D. (Nanosistema 4)

Para la oxidación del anticuerpo monoclonal son requeridas las soluciones mostradas enseguida:

- 1) 1 mL de solución de anticuerpo monoclonal a 50 mg/mL (Sol. H)
- 2) 3 mL de solución de peryodato de sodio a 0.1 mM (Sol. I)

En un vaso de precipitado ambas soluciones (Sol. H y Sol. I) deben mezclarse en condiciones de ausencia de luz a una velocidad media de 150 rpm durante 30 minutos.⁵⁴

Por último, en otro vaso de precipitado se depositarán 100 mL de la solución de QDs act. y se pondrá en agitación constante a una velocidad media de 50 rpm a temperatura ambiente y a esto se le adicionarán la solución de anticuerpos monoclonales oxidados y se dejará en reacción por dos horas. Las muestras resultantes se lavan mediante triplicado con agua destilada y se almacenan a 4 °C en condiciones de ausencia de luz.^{53,54}

3.2. Pruebas in vitro

Las pruebas *in vitro* del sistema nanoestructurado y su interacción con células se llevarán a cabo en el laboratorio de Neuroinmunoendocrinología en campus aeropuerto. Precedentemente a inicializar la investigación en las instalaciones del laboratorio, es imprescindible vestir pijama quirúrgica y guantes de forma continua, queda restringido el uso de joyería de cualquier tipo mientras se realice algún procedimiento que involucre la manipulación de materia biológica o materiales que se ocuparan para esta actividad, todo el material utilizado debe estar esterilizado y previamente a su uso debe rociarse con una solución de alcohol al 5% para descartar la contaminación ambiental.

Para los cultivos celulares se ocuparán placas de 96 pozos a una densidad celular de 10,000 células por pozo (esta densidad debe ser determinada por conteo directo mediante una cámara de Neubauer), por cada análisis a efectuar serán usadas dos placas; igualmente se emplearán cuatro soluciones en diferentes concentraciones por cada nanosistema planteado (estos nanosistemas se definieron en la sección 3.1.2), las concentraciones a manejar son 100, 50, 25 y 10 μM (NOTA: estas disoluciones deben hacerse en PBS).

Para cada pozo será añadido 100 μL de la solución de QDs funcionalizados correspondiente y 100 μL de medio de cultivo, permanecerán en incubación por 30 min (T1), 1 h (T2), 2 h (T3), 4 h (T4) y 24 h (T5) a 37°C con una concentración de CO₂ al 5% y humedad del 95%,^{52,55} la estructura de las placas de cultivo es presentada en la **FIGURA 20**.

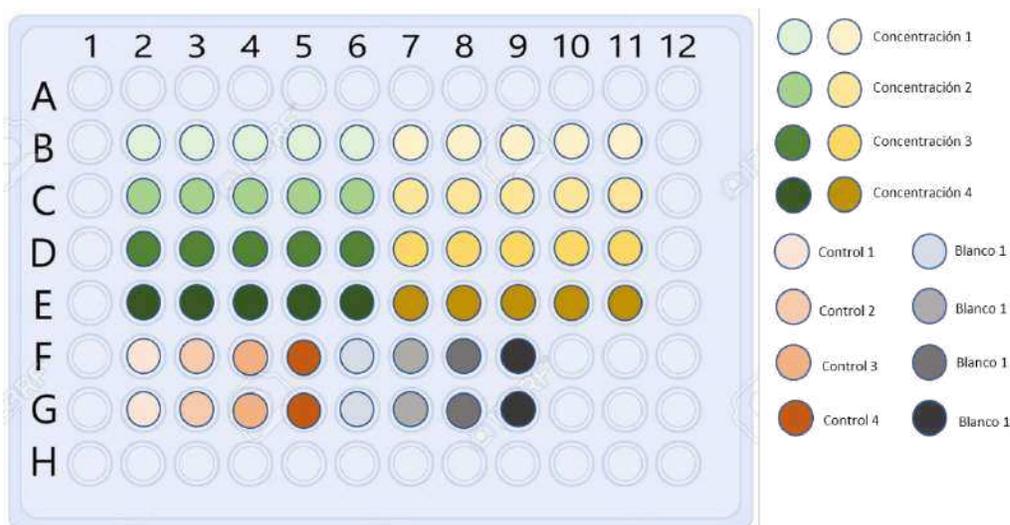


Figura 20. Configuración de las placas para el cultivo celular

Finalmente, es relevante indicar el uso de células modelo para esta investigación, las cuales pertenecen a la línea celular MCF-7.

- Adherencia celular

Para este ensayo debe tomarse en cuenta la recuperación del medio de cada pozo, y la recuperación del sobrenadante. El medio recobrado será examinado por medio de la técnica de UV-vis para extraer la concentración de QDs funcionalizados en el medio, que de haber presentado adherencia celular, debería ser menor que la inicial,⁵⁶ las lecturas se deberán hacer

a 545 nm (este valor puede presentar variabilidad, en función de lo que concluyan las pruebas ópticas realizadas al nanosistema correspondiente) y mediante microscopia óptica se evidenciará si existe adherencia en las células, ya que de presentarse dicha adherencia, será posible observar los aglomerados de QDs formados en las células.

3.2.1 Pruebas de viabilidad y citotoxicidad.

Se preparan 0.2 mg/mL de sal de MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) disuelta en medio DMEM suplementado.⁵⁷

Tras la obtención de la solución, de las placas de cultivo celular que ya contienen QDs funcionalizados, se les extraerá todo el medio de cultivo por aspirado, habiendo sido aspirado, se adicionan 100 µL de MTT a cada pocillo de cultivo y se mantiene en incubación durante un intervalo de 4-7 h a 37°C con una concentración de CO₂ al 5% y humedad del 95%,^{58,59} durante este periodo, se debe dar seguimiento en el microscopio para inspeccionar la formación de los cristales de formazán, es decir, cuando ocurra la formación de un precipitado de color morado. El formazán es diluido al suprimir el medio con las sales de MTT y agregar 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). Para finalizar, la placa se inserta en el lector de microplaca, con una agitación posterior durante 10 segundos y se ejecuta la lectura de absorbancia (densidad óptica) a 570 nm.⁵⁷

En vista de las lecturas de absorbancia se prosigue al cálculo la viabilidad celular de acuerdo con la ecuación 1 (Ec. 1).⁵²

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{Absorbancia\ de\ los\ PC\ con\ las\ células}{Absorbancia\ de\ las\ células\ control} \quad (1)$$

Con base a los resultados se computa el promedio y la desviación estándar, reconociendo así el nivel de citotoxicidad con base a las ISO 10993 donde sobresale la clasificación de citotoxicidad con base al porcentaje de viabilidad celular: 100-75%: No citotóxico, 74-50%: Ligeramente citotóxico, 49-25%: Moderadamente citotóxicos, 24-0%: Extremadamente citotóxico.⁵² Dada la situación en que los QDs reduzcan más del 50% de la viabilidad celular se cuantifica la concentración citotóxica media (CC50) [Diferencia de dosis*diferencia de porcentajes (50-%superior/50-% inferior) +Dosis identificada=CC50].⁵⁴

4. Hipótesis

El uso de puntos cuánticos a base de Ag₂S funcionalizados con marcadores tumorales, facilitará la sensibilidad para la identificación de células cancerosas mamarias con el fin de realizar una detección temprana por medio de técnicas de fluoroscopia.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Obtener puntos cuánticos de Ag₂S funcionalizados con marcadores tumorales para la identificación de cáncer de mama.

5.2. Objetivos específicos

- 1) Sintetizar por medio de sonoquímica QDs de Ag₂S y caracterizarlos fisicoquímicamente por medio de UV-vis, TEM y dispersión de luz dinámica.
- 2) Evaluar la citotoxicidad de los QDs a través del ensayo de MTT.
- 3) Funcionalizar los QDs con anticuerpos monoclonales por medio del proceso de humectación química.
- 4) Caracterizar a través de UV-vis, TEM, dispersión de luz dinámica e IR.
- 5) Evaluar la viabilidad, citotoxicidad y adhesión celular.

6. Cronograma

Año: 2023												
Actividades	Meses (dividido en semanas)											
	Noviembre				Diciembre				Enero			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
Revisión bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Síntesis de QDs de Ag ₂ S		■	■	■	■	■	■					
Caracterización de los QDs sin funcionalizar		■	■	■	■	■						
Funcionalización de los QDs					■	■	■					
Caracterización de los QDs funcionalizados					■	■	■	■	■			
Pruebas <i>in vitro</i> de viabilidad y citotoxicidad						■	■	■	■			
Análisis de resultados		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Redacción de tesis	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

7. Resultados

7.1. TEM

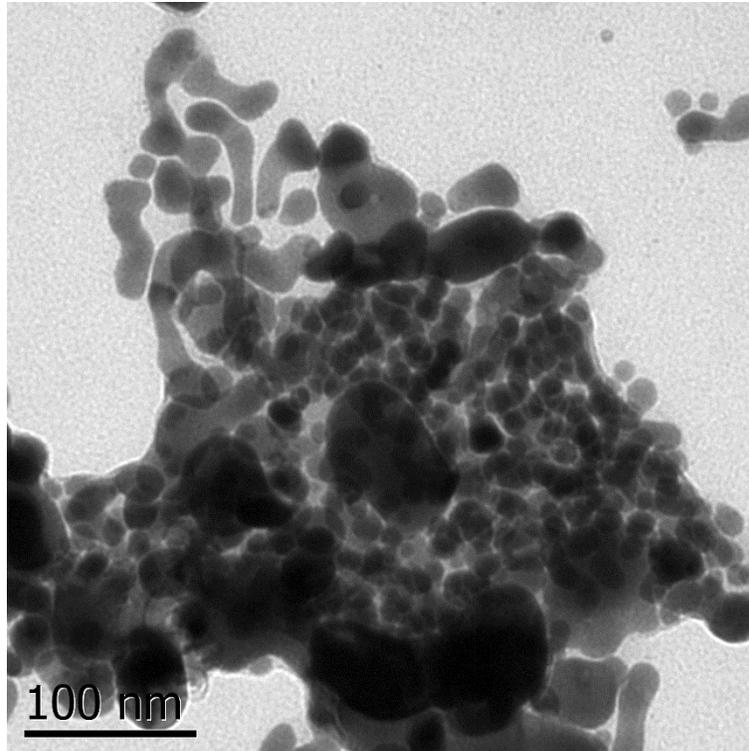


Figura 21. Micrografía en TEM de nanopartículas de Ag_2S sin surfactante en estado de aglomeración a escala de 100 nm

En la **FIGURA 21**, se puede observar la micrografía de las partículas de Ag_2S sin el control del uso de surfactante, de manera general las partículas no son homogéneas en forma y tamaño derivado del mismo proceso, también se destaca una notoria aglomeración de estas, notándose zonas con mayor densidad de color en la micrografía, lo cual nos sugiere que el material no es estable en su energía superficial y por tal motivo tiende a aglomerarse lo cual puede ser una desventaja para el uso que se requiere de estas partículas.

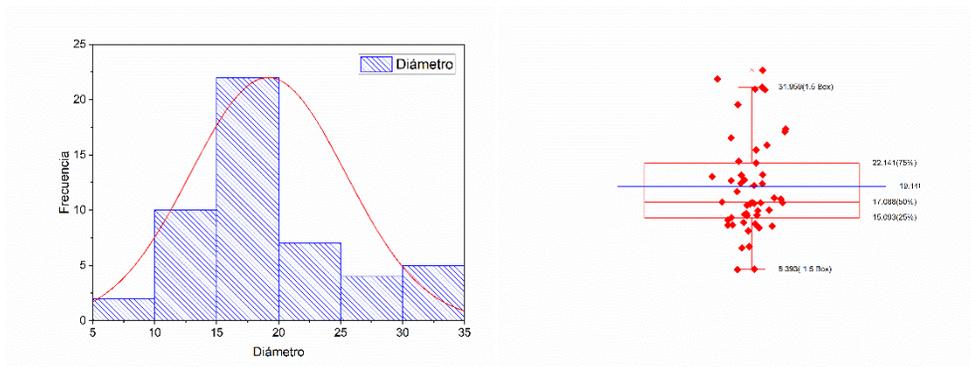


Figura 22. Análisis estadístico de la distribución y tamaño de partículas del proceso de síntesis en ausencia de surfactante. Media de 19 nm de diámetro

En la **FIGURA 22** se tiene el análisis de la micrografía de la **FIGURA 21**, se puede observar en la **FIGURA 22^A**, el histograma de las partículas; se tomó una muestra de 50 mediciones tomando la distancia más larga de las partículas como parámetro de diámetro. Se puede ver que cerca del 50% de la muestra se sitúa en el rango de tamaño de los 15 a los 20 nm, al realizar un análisis detallado de los datos y usando el modelo estadístico de caja y bigotes (**FIGURA 22^B**), se puede ver que la mayoría los datos, como confirma el histograma, se centra en los valores de diámetro de los 15 a los 20 nm, teniendo como media los 19 nm de diámetro, también se pueden observar dos valores fuera de rango en la parte del límite superior, este se puede deber a que, como se mencionó anteriormente no se tiene un control en el crecimiento de las partículas al no hacer uso de un surfactante que restrinja la cinética de reacción y permita la modulación de crecimiento de partícula.

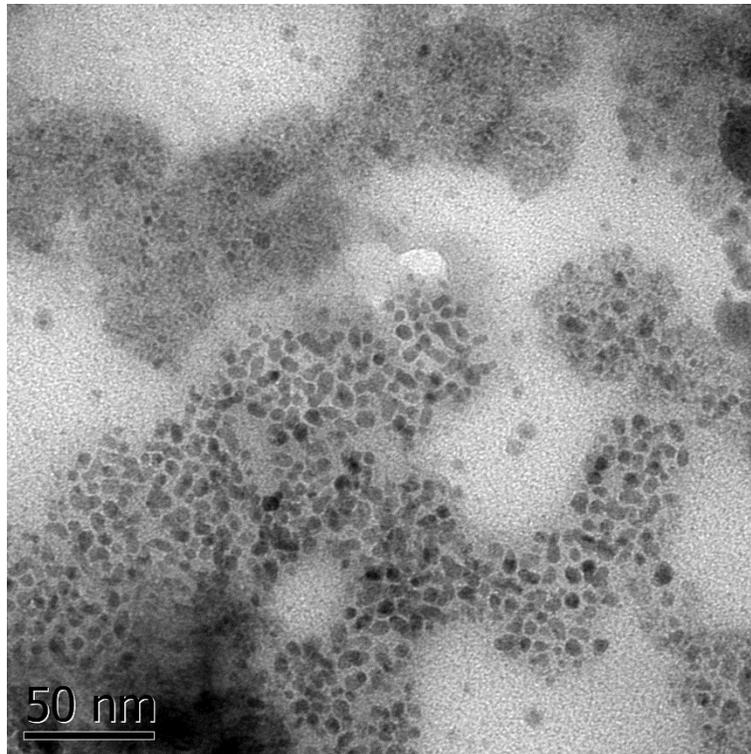


Figura 23. Micrografía en TEM de nanopartículas de Ag₂S con surfactante a escala de 50 nm

La **FIGURA 23** muestra la micrografía de las partículas de Ag₂S ahora con la presencia de surfactante, el cual tiene interferencia directa en la estabilidad de las partículas, su tamaño, forma y dispersión, así como su reactividad y propiedades superficiales. Por lo cual en comparativa con la **FIGURA 21**, presenta zonas oscuras mínimas, ya que existe una mejor dispersión de estas. Cabe destacar que la aglomeración se reduce considerablemente, así como el tamaño de las partículas. Incluso en cuanto a morfología se refiere lucen más uniformes, de modo que podemos afirmar que el surfactante nos permite tener un mejor dominio sobre las características de nuestras partículas.

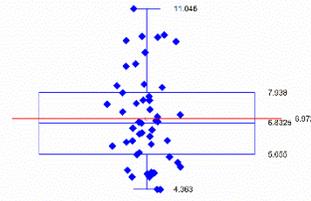
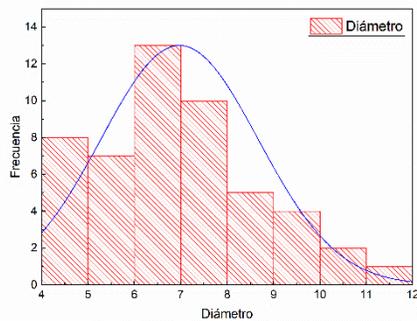


Figura 24. Análisis estadístico de la distribución y tamaño de partículas del proceso de síntesis con presencia de surfactante. Media de 6.9723 nm de diámetro

La **FIGURA 24** corresponde al análisis de la micrografía de la **FIGURA 23**, empleándose 50 datos de la micrografía correspondiente, como se mencionó y realizó anteriormente; se generó el histograma de la **FIGURA 24^A**, el cual revela que el tamaño promedio de las partículas oscila entre el rango de 6-7 nm. Haciendo uso complementario del modelo estadístico de caja y bigotes **FIGURA 24^B** se puede examinar que la mayoría de los puntos recae en la zona de entre 5.655 a los 6.8325 nm, con una media de 6.9723 nm de diámetro. Cabe destacar que no existen valores fuera de rango en este gráfico, asumiendo al surfactante como responsable de mejores valores de tamaños y uniformidad de partículas.

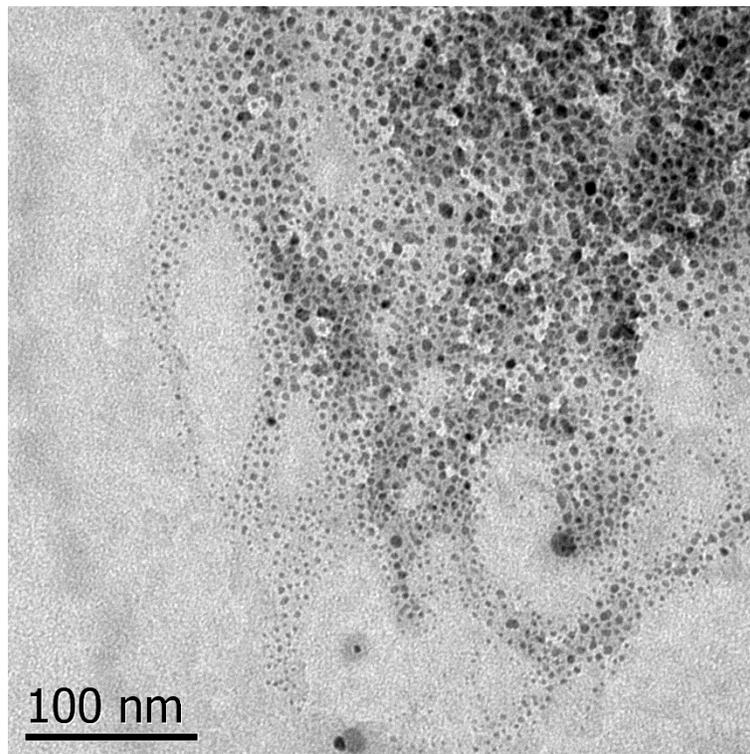


Figura 25. Micrografía en TEM de nanopartículas de Ag₂S con surfactante a escala de 100 nm.

Además de la influencia del surfactante sobre los productos de la síntesis, la cavitación es otro parámetro que afecta la cinética de crecimiento de las partículas, el cual podríamos

definir como el proceso mediante el cual se forman burbujas en un líquido sometido a ultrasonido, y estas burbujas pueden colapsar violentamente, generando altas temperaturas y presiones locales. Entre las consecuencias de aumentar la cavitación están el aumento de la velocidad de reacción; mejora en la dispersión de los reactivos; cambios en el tamaño y la morfología de las nanopartículas. Los efectos de este fenómeno se muestran en la **FIGURA 25**. Inicialmente se manejó una cavitación de 80 para las primeras síntesis de Ag_2S con presencia y ausencia de surfactante (**FIGURAS 21 Y 23**, respectivamente); sin embargo, la micrografía de la **FIGURA 25** presenta los productos de la síntesis de partículas de Ag_2S a una cavitación de 95%. Con base a la micrografía es posible conjeturar que, a mayor cavitación; y, por ende, una mayor administración energética al sistema, existe una mejor dispersión de las partículas, así como una mayor homogeneidad, abarcando una mayor área superficial.

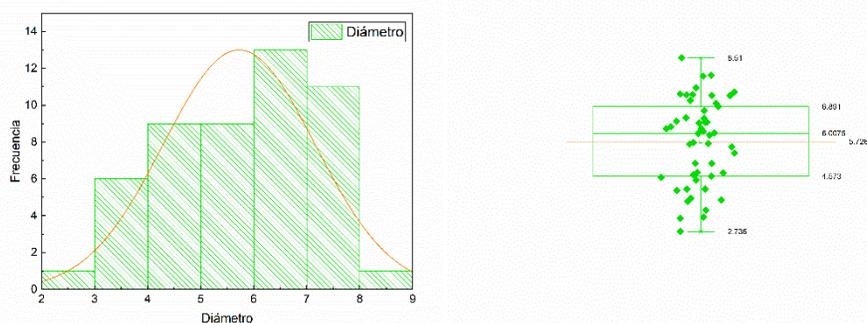


Figura 26. Análisis estadístico de la distribución y tamaño de partículas del proceso de síntesis con presencia de surfactante. Media de 5.7665 nm de diámetro

De acuerdo con la **FIGURA 26^A** como parte del estudio de la micrografía de la **FIGURA 25** se determina que el tamaño promedio de las partículas se ubica en el rango de 6-7 nm como sucedió en el análisis anterior (**FIGURA 24**); pero la diferencia es evidente en cuanto a los tamaños máximos y mínimos, siendo más finos en este último caso, con un tamaño mínimo de partícula de 2 nm y un tamaño máximo de 9 nm. Conforme a la **FIGURA 26^B**, exhibe que las condiciones manejadas para esta síntesis provocaron que existiera una mayor cantidad de puntos en el tercer cuartil en el rango entre 6.0075-6.891 nm. El diámetro promedio es de 5.7665 nm. Es notable el incremento en la estabilidad y homogeneidad de las partículas con respecto a las anteriores. Por lo que las variables del surfactante y la cavitación juegan roles importantes en las características principales de las partículas como lo son, más evidentemente, el tamaño y la dispersión.

7.2. SEM

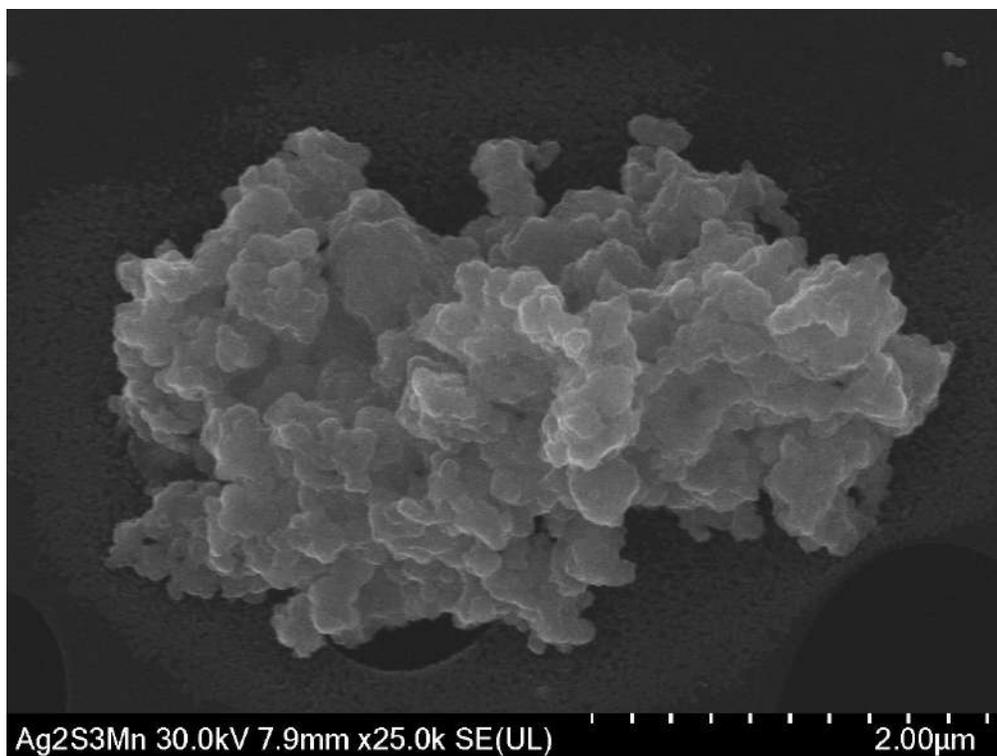


Figura 27. Micrografía por SEM de nanopartículas de Ag_2S con surfactante al 3% de Mn; a escala de $2\ \mu\text{m}$ y aumento de $\times 25$

En la **FIGURA 27** se aprecia la morfología de las partículas de Ag_2S , que revela una evidente aglomeración de partículas al presentar un cúmulo de textura rugosa. Lo cual tiene una correlación directa con el método de síntesis (sonoquímica) y las propiedades de los reactivos que tienen lugar, e.g.: la sonoquímica puede causar agitación mecánica intensa, esto favorece la nucleación y crecimiento de las nanopartículas. Las condiciones de cavitación pueden crear condiciones de alta energía que promueven la formación de superficies rugosas en las partículas; los reactivos utilizados pueden interactuar de manera compleja en presencia de ultrasonidos, con la posibilidad de generar especies intermedias o productos secundarios que afectan la morfología de las nanopartículas y favorece la formación de estructuras rugosas; la alta energía proporcionada por la sonoquímica puede generar parámetros que promuevan un crecimiento no uniforme de las nanopartículas; la nucleación y el crecimiento de las nanopartículas pueden ocurrir en sitios específicos, dichos sitios pueden estar influenciados por factores como la presencia de impurezas, la agitación local y la concentración de reactivos.

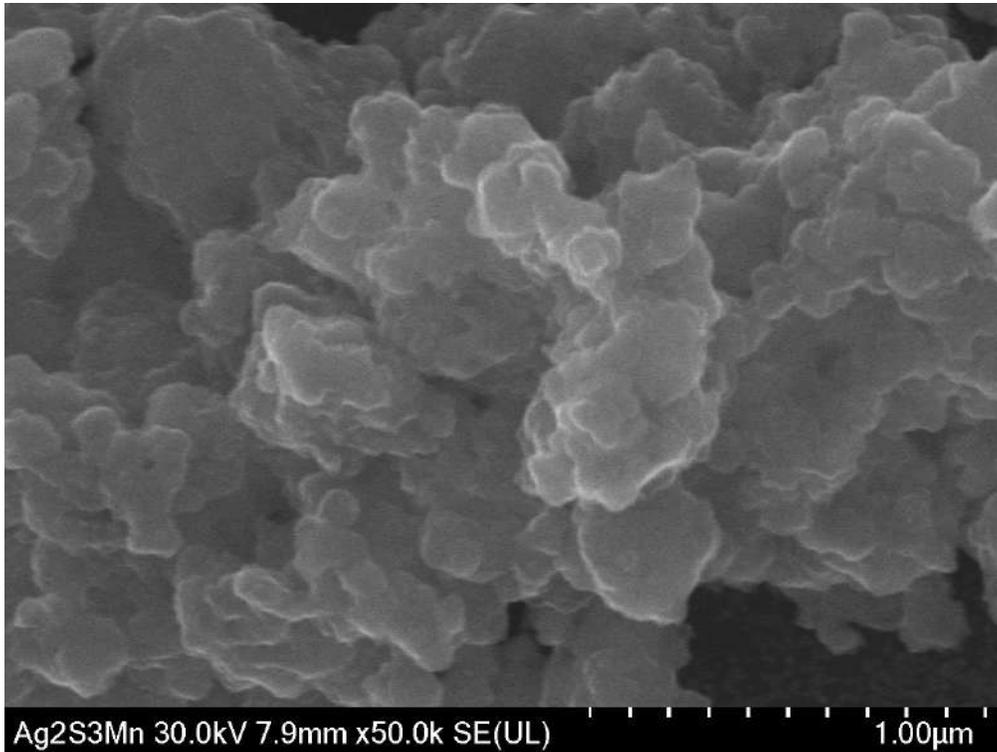


Figura 28. Micrografía por SEM de nanopartículas de Ag_2S con surfactante al 3% de Mn; a escala de $1\ \mu\text{m}$ y aumento de $\times 50$

La **FIGURA 28** proporciona un acercamiento más profundo, en el cual se aprecia con mayor detalle las propiedades superficiales de las partículas, donde se nota que son cúmulos y capas del material, este fenómeno pudo deberse a que la muestra se recubrió con oro y quizá esto pudo generar como un empaquetamiento de las partículas con la capa de oro simulando ser una sola partícula.

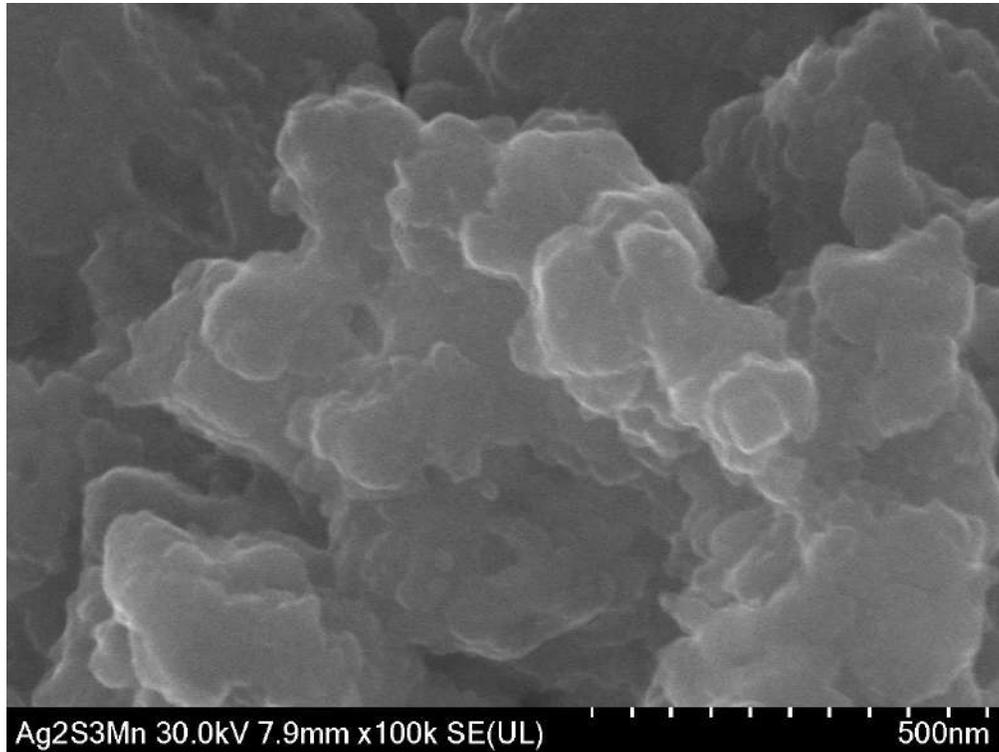


Figura 29. Micrografía por SEM de nanopartículas de Ag_2S con surfactante al 3% de Mn; a escala de 500 nm y aumento $\times 100$

Para el estudio en SEM es frecuente recubrimiento de muestras con oro, para mejorar la conductividad eléctrica y reducir la carga estática en la muestra, lo que permite una mejor resolución de la muestra. Esto también afecta a la lectura e interpretación de resultados porque pueden influir en su morfología y su observación de la micrografía. En la **FIGURA 29** se evidencia este efecto, debido a que redujo el espacio existente entre las partículas provocando que estas experimentaran una compactación. Además, el recubrimiento con oro también puede afectar la morfología superficial de la muestra, ya que la capa de oro puede formar estructuras granulares o rugosas.

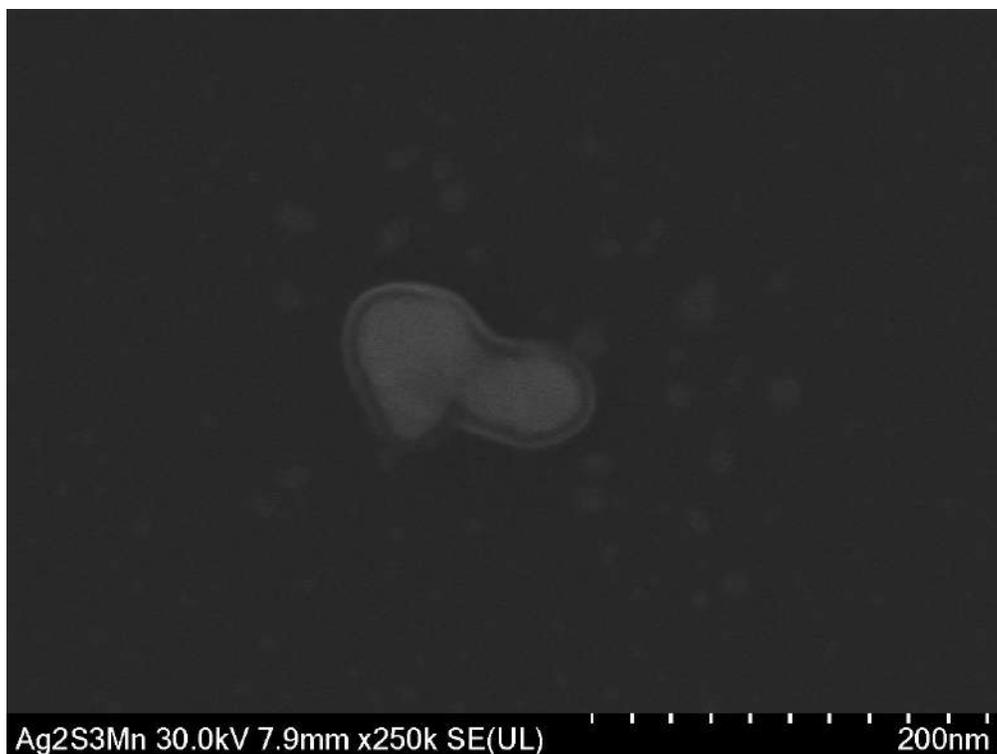


Figura 30. Micrografía por SEM de nanopartículas de Ag_2S con surfactante al 3% de Mn; a escala de 200 nm y aumento $\times 250$

En relación con la **FIGURA 30** presenta un análisis en ausencia del recubrimiento con oro sobre la muestra, en el cual se aprecia mejor la morfología real de las partículas de Ag_2S . En la micrografía se puede apreciar una capa rodeando la partícula como si fuera una envoltura, dicho recubrimiento se puede atribuir a la influencia de la L-Cisteína sobre los productos de reacción, ya que es capaz de adsorberse en la superficie de las nanopartículas, formando una capa que impide la aglomeración y el crecimiento excesivo de las partículas. Dicha capa es claramente notoria, exponiendo la propiedad estabilizadora de la L-Cisteína para controlar la morfología y el tamaño de las nanopartículas sintetizadas.

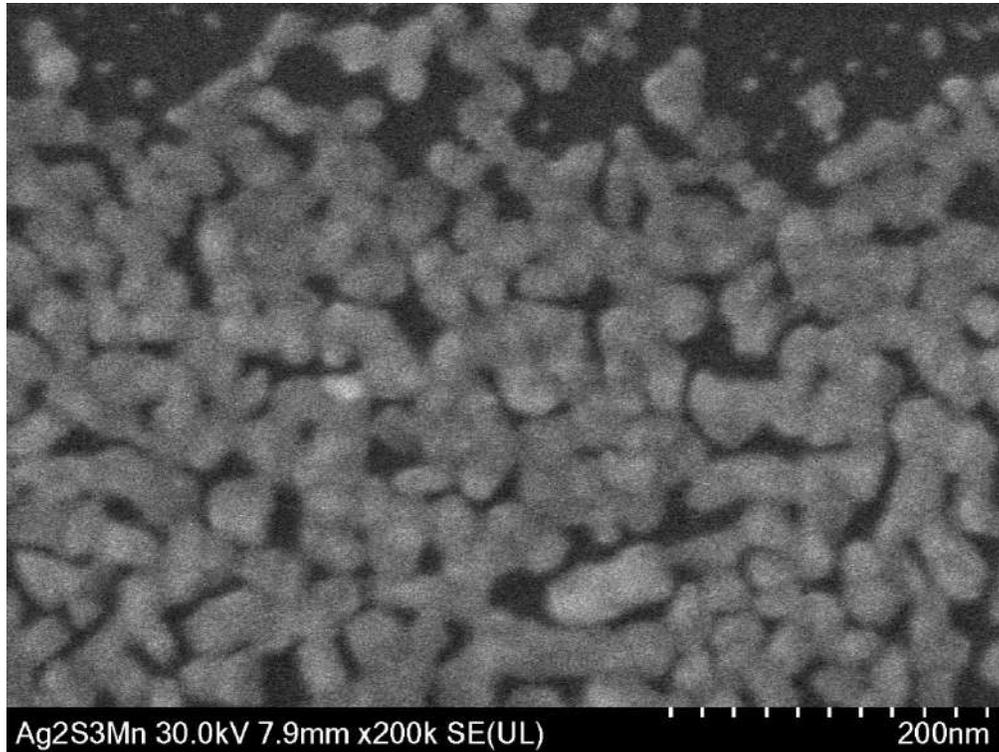


Figura 31. Micrografía por SEM de nanopartículas de Ag_2S con surfactante al 3% de Mn; a escala de 200 nm y aumento $\times 200$

En la **FIGURA 31** se tiene una vista general de las partículas de Ag_2S sin el recubrimiento de oro. Como se mencionó en el párrafo anterior por el efecto del recubrimiento ocasionado por la L-Cisteína existe una separación entre las partículas evitando que se aglomeren y permitiendo la estabilidad de estas manteniendo sus características de tamaño y forma, con esto se muestra de manera más clara la morfología real de las partículas.

7.3. Raman

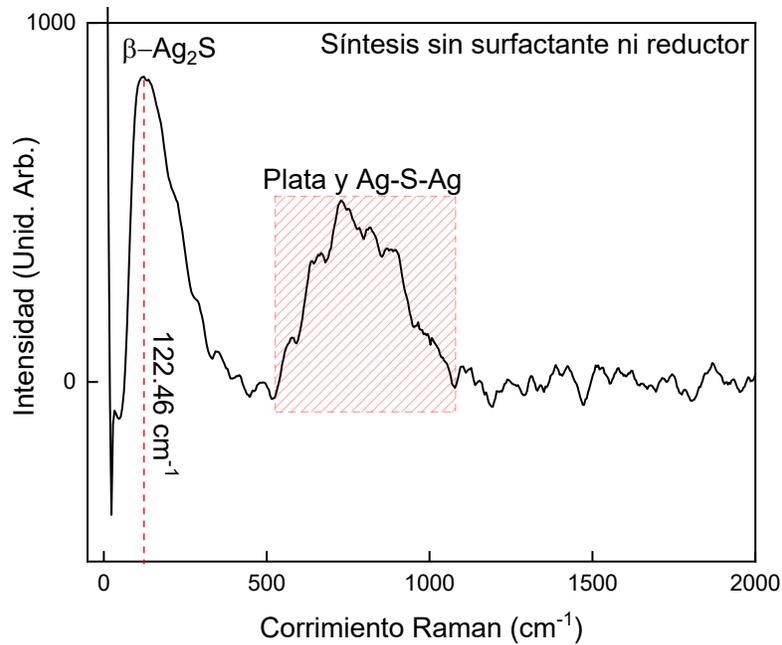


Figura 32. Microscopía de Raman; reacción en condiciones 5
1.94:1 Ag:S (1.54 XRF) y 15 μM Cit-Na

La **FIGURA 32**, muestra el espectro Raman de la reacción que no se utilizó surfactante como agente regulador del tamaño de partícula, se puede observar que se tiene una señal a 122.46 cm⁻¹, indicando la presencia de la estructura cristalina β monocristalina del Ag₂S, sin embargo, también se tiene la presencia de plata metálica en el rango de los 500 a 1100 cm⁻¹, recordando la micrografía de la **FIGURA 21**, se puede hacer relación y comprobar que la calidad de esa reacción no es la propicia para tener sólo nanopartículas de sulfuro de plata, se debe considerar que la presencia de plata metálica también puede ser un factor por el cual la aglomeración de las partículas se propició.

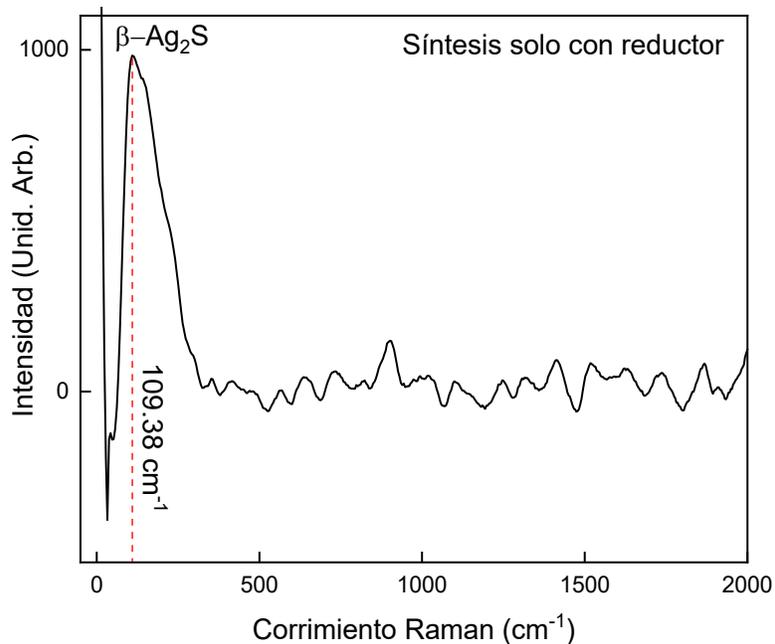


Figura 33. Microscopía de Raman; reacción en condiciones 3
2:1 Ag:S y 20 μM Cit-Na

Para el caso de la reacción donde solo se utilizó reductor se tiene un espectro Raman (**FIGURA 33**) que muestra una señal principal en 109.38 cm^{-1} esto nos indica que de igual manera se tiene la fase β del material monocristalina, pero en este caso ya no se tiene la señal de plata metálica, con esto se comprueba que el uso de un agente que recule la reducción de la plata es fundamental para poder ser utilizada en este tipo de reacciones donde se busca la obtención de nanopartículas estables y sin la presencia del metal reducido, también es destacable que el corrimiento al azul del espectro nos revela que se tiene un esfuerzo de compresión en la estructura cristalina sugiriendo que el tamaño de partícula es pequeño por la presencia de este tipo de esfuerzo en la red, lo cual tiene sentido al ver la micrografía de la **FIGURA 23**, donde el tamaño promedio de partícula es de 6.97 nm .

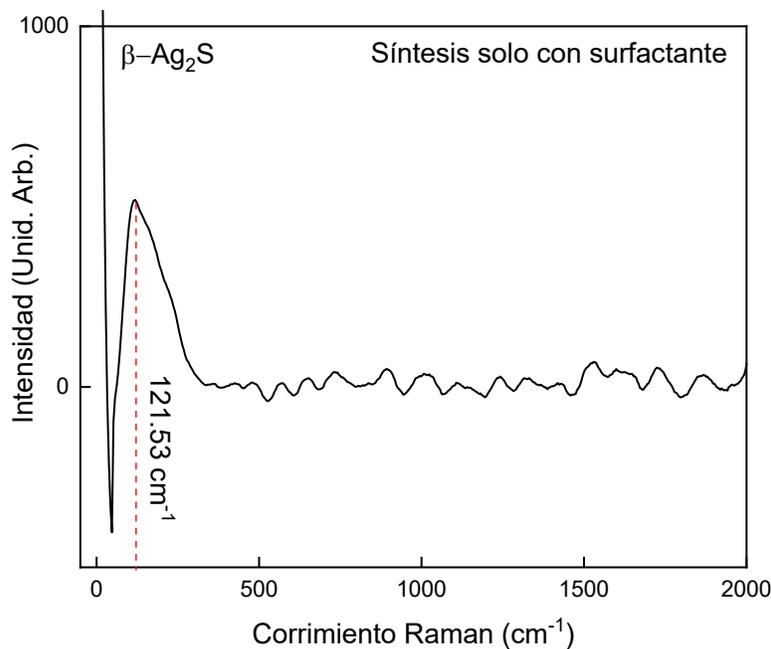
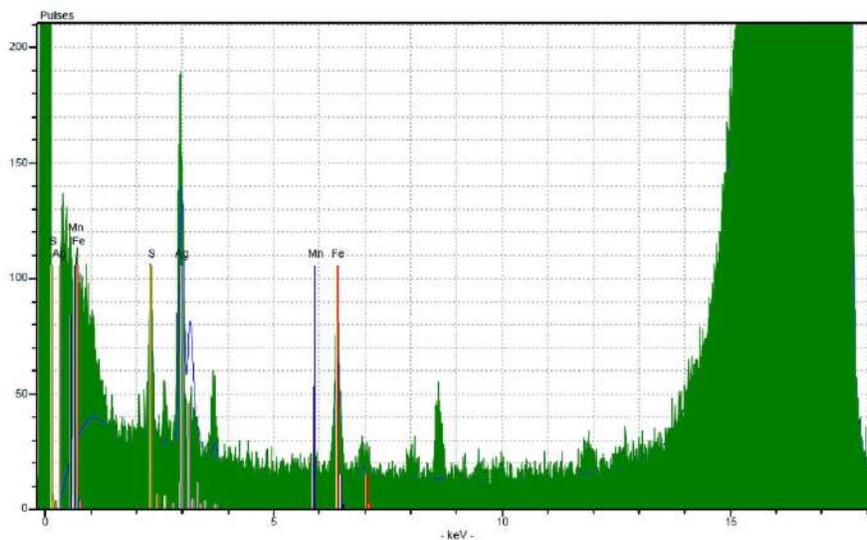


Figura 34. Microscopía de Raman; reacción en condiciones 2
2:1 Ag:S y 15 μM Cit-Na

En la **FIGURA 34** se tiene el espectro Raman correspondiente a la reacción con surfactante, se tiene igual una señal en la zona de la estructura cristalina en fase β monocristalina, por el ancho de la señal se puede intuir que la partícula es pequeña y el corrimiento hacia el rojo de la señal puede atribuirse a la morfología de la partícula que como se aprecia en la micrografía de la **FIGURA 25** son cuasi esferas, lo cual puede propiciar una interacción de tensión en la red, el tamaño promedio de partícula es de 5.76 nm , lo cual por el ancho de la señal principal del Raman tiene sentido que se tenga una reducción en el tamaño de partícula.

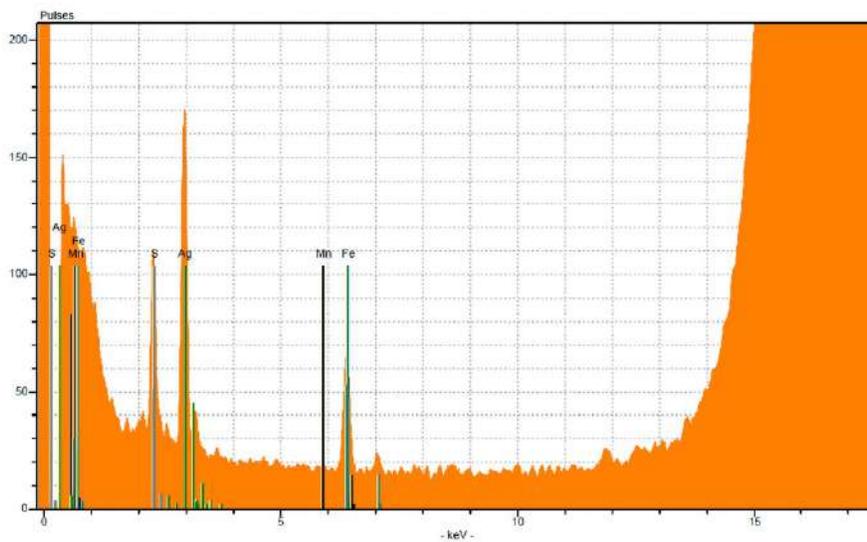
7.4. XRF



Elemento	Línea	Conc./ $\mu\text{g/l}$
S	K12	19.7
Mn	K12	0.113
Fe (IS)	K12	1.000
Ag	L1	54.7

Figura 35. Análisis elemental por XRF de las nanopartículas de Ag_2S -%Mn. Relación molar Ag:S de 2.8:1

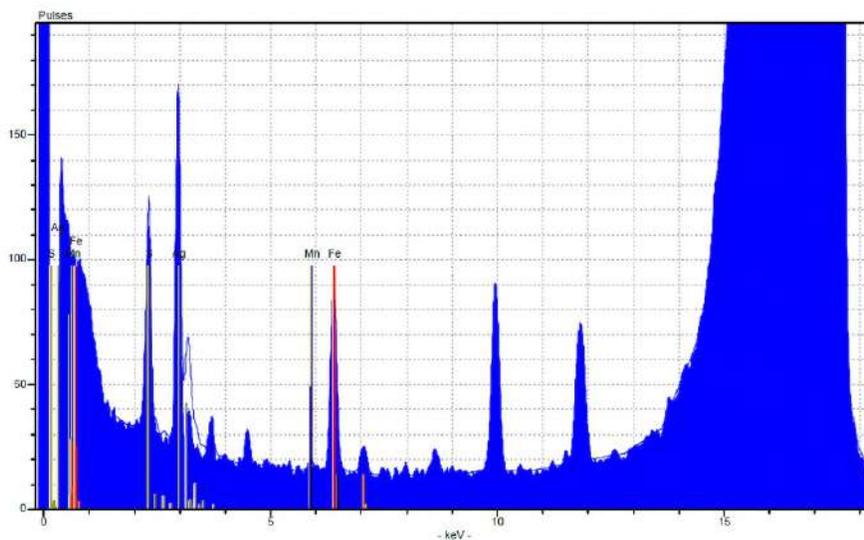
La **FIGURA 35** se tiene el espectro obtenido por el análisis de fluorescencia de rayos X (XRF, por sus siglas en inglés), este permite determinar la composición elemental de una muestra; adicionalmente puede cuantificar los elementos presentes en la misma. De este modo podemos confirmar la presencia de Ag y S, que son los componentes principales de las nanopartículas de Ag_2S , a su vez el Mn en los sistemas correspondientes; así como la ausencia de residuos y subproductos de la reacción que pudieran afectar el rendimiento de la reacción, como las propiedades de las partículas. Por consiguiente, es posible confirmar tanto la eficacia del proceso de síntesis como el de purificación de las partículas. Es necesario mencionar la existencia de Fe debido a que funge como estándar en el análisis. La relación molar de Ag:S que arroja el análisis para este sistema es de 2.8:1, en consecuencia, existe una correlación directa que a mayor concentración de plata bajo la ausencia de surfactante favorece la aglomeración de las partículas.



Elemento	Línea	Conc./ $\mu\text{g/l}$
S	K12	33.8
Mn	K12	No determinado
Fe (IS)	K12	1.00
Ag	L1	49.2

Figura 36. Análisis elemental por XRF de las nanopartículas de $\text{Ag}_2\text{S}-\% \text{Mn}$. Relación molar Ag:S de 1.5:1

Para la **FIGURA 36** se tiene una relación molar Ag:S cuando el surfactante está presente en la reacción es de 1.5:1, este fenómeno puede explicarse que la presencia del surfactante genera una restricción en la reacción entre la plata y el azufre, pero tomando como referencia la micrografía de la **FIGURA 23**, se puede ver que este factor no significa una desventaja en el producto final, ya que se logró tener un tamaño de partícula cercano a los 6.8 nm, aparte de contar con una dispersión de forma y tamaño homogénea y se evitaron las aglomeraciones de las partículas.



Elemento	Línea	Conc./ $\mu\text{g/l}$
S	K12	23.5
Mn	K12	0.062
Fe (IS)	K12	1.000
Ag	L1	31.7

Figura 37. Análisis elemental por XRF de las nanopartículas de Ag_2S -%Mn. Relación molar 1.3:1

La **FIGURA 37** es para el caso de la reacción donde la variante fue la energía del sistema en la síntesis, la relación molar Ag:S de 1.3:1, aunque la estequiometría se aleja del valor dado teóricamente que es de 2:1 en este caso se obtuvo la distribución de tamaño de partícula, el cual se puede comprobar con la micrografía de la **FIGURA 25**, este fenómeno puede ser que la restricción de reacción produjo partículas más pequeñas y con mejor dispersión de tamaño, además respaldando los resultados de la espectroscopia Raman de la **FIGURA 34** se tiene el material en la fase cristalina deseada sin verse afectada por la relación molar que se presenta, además otro factor para tener menos relación molar es la presencia de Mn en la muestra, el cual en el rendimiento de relación molar corre las relaciones a menores valores en este caso para la plata.

7.5. UV-Vis

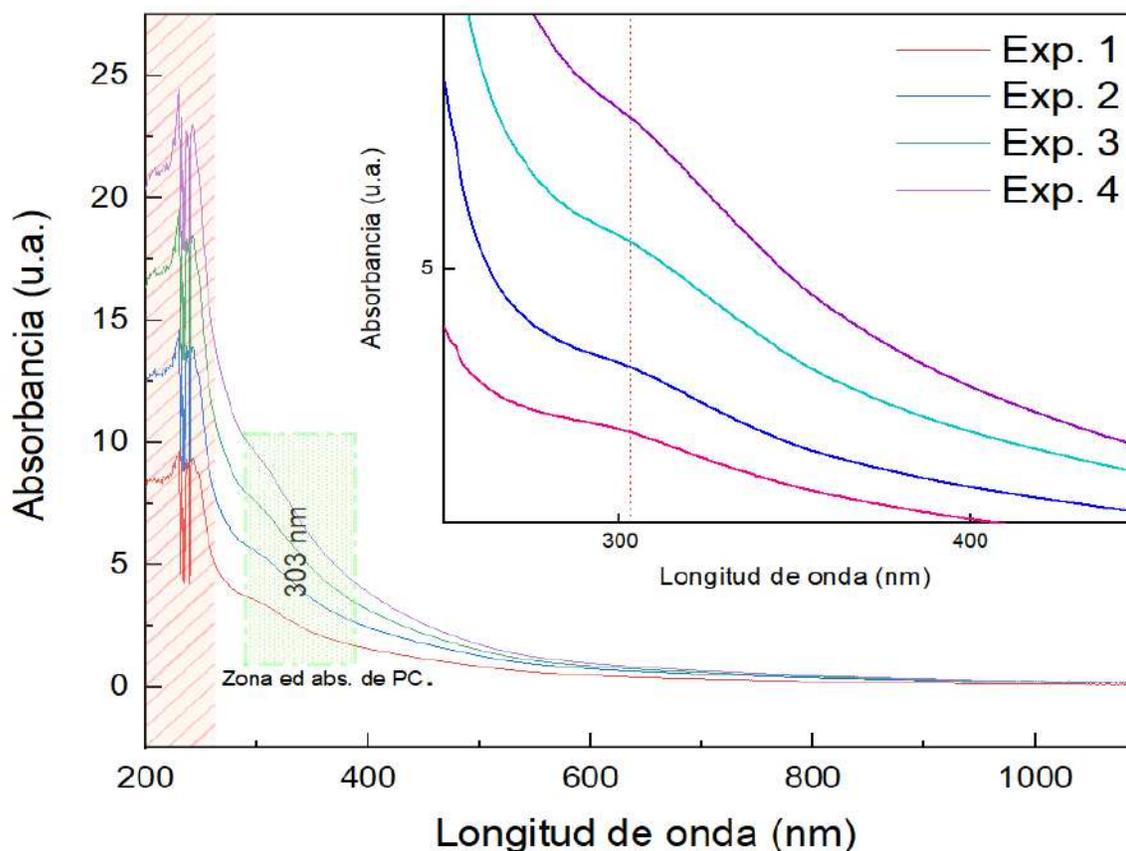


Figura 38. Espectro UV-Vis de absorbancias perteneciente a las 4 reacciones y su zona representativa

En la **FIGURA 38**, se tiene el espectro general de UV-vis de las partículas, donde se tienen cuatro variaciones de experimento y se puede notar en los espectros que se tienen diferentes valores de absorbancia, este fenómeno se puede explicar como una modulación de tamaño de partícula, se debe prestar especial atención a la zona de 300 a 400 nm, ya que en esta región del espectro es donde se tiene los fenómenos de absorción de las nanopartículas de Ag_2S , en donde haciendo un análisis a mayor detalle sobre esta zona, se puede apreciar que se tiene desde la absorción base para el experimento uno situada en los 300 nm un corrimiento al rojo, esto nos indica que el tamaño de partícula va creciendo, otro dato del espectro es que solo cuenta con esa zona de interacción del material con la energía, por lo tanto también nos indica que no tenemos otros elementos que participan en nuestro sistema.

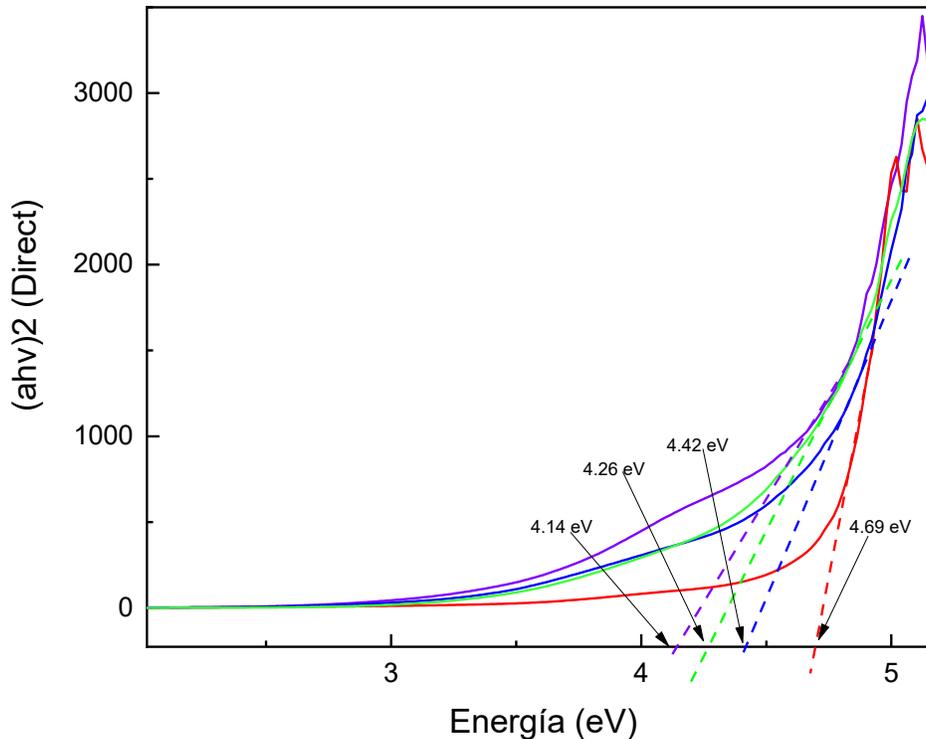


Figura 39. Gráficas de TAUC

Del espectro general de UV-vis de las partículas también se puede obtener el valor del band gap a través del uso de modelo de las gráficas de TAUC, este modelo permite calcular el valor aproximado del band gap óptico, para el caso específico de este material se utilizó para un modelo de material con banda directa, y los valores obtenidos fueron mayores a los 4 eV, esto nos indica que tenemos fenómenos de confinamiento cuántico, ya que el valor del material en bulto oscila los 2 eV, este aumento en el valor nos sugiere que por efectos de baja dimensionalidad se promueve el confinamiento cuántico, lo cual si relacionamos con las micrografías y los tamaños de partícula obtenidos hace sentido, ya que la dimensión de estos sistemas está por debajo de los 10 nm y esto permite tener este fenómeno observado en el análisis UV-vis.

7.6. MTT

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico basado en la reducción del MTT amarillo a formazán púrpura por células metabólicamente activas. La cantidad de formazán se correlaciona con el número de células viables.

Para analizar la viabilidad celular, se realizaron estudios de MTT para su evaluación. La línea celular implementada pertenece a la MCF-7. Se utilizó el equipo ELISA, el cual genera un recuento de la densidad óptica a través de longitudes de onda de 540 y 720 nm.

Considerando la viabilidad superior al 80% como no tóxica en base a la norma ISO 10993-5, los Ag₂S QDs mostraron una excelente biocompatibilidad en estas células.⁶⁰

En cuanto a los resultados obtenidos, se pueden observar diversos comportamientos dependientes de las diferentes concentraciones planteadas, como es el caso de los sistemas constituyentes o ausentes de Mn. Con respecto a la variabilidad en la longitud de la barra de error se puede atribuir a la aglomeración de las partículas, dado que algunas células interactuaron de tal manera que penetraron la membrana celular. Igualmente cabe la posibilidad de que dicho comportamiento tenga relación con la adaptabilidad de la célula/partícula.

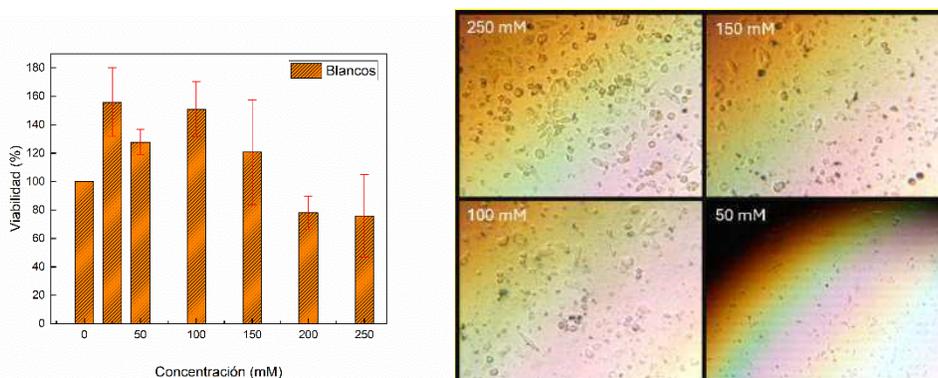


Figura 40. Ensayo MTT correspondiente a los blancos de nanopartículas de Ag_2S

A diferencia de los iones Ag^+ altamente tóxicos, los QDs Ag_2S no tienen este problema debido a su constante de solubilidad ultrabaja ($k_{sp}=6.3 \times 10^{-50}$) lo cual no permite que se disocie iones, sino que se mantiene como compuesto, esto permite que la concentración de Ag en la línea celular tras el tratamiento con QDs no sea significativa, lo que indica que los QDs no liberan Ag en las células y confirma la naturaleza no tóxica de estos QDs.⁶⁰ La citotoxicidad ultrabaja observada en el ensayo MTT podría atribuirse a los componentes metálicos poco tóxicos de los QDs Ag_2S , así como a su constante de solubilidad ultrabaja, que determina la liberación ultralenta de los componentes metálicos al entorno biológico.⁶¹

En la **FIGURA 40**, primero se observa que en el ensayo MTT los valores de viabilidad respecto al blanco cuando las células son sometidas a los tratamientos con diversas concentraciones de nanopartículas de Ag_2S , hasta la dosis de 150 mM se tiene un efecto altamente proliferativo, esto significa que se tiene un estímulo derivado entre la interacción de la partícula y la célula, el cual fomenta que los ciclos de división celular sean más cortos y por ende se tenga mayor viabilidad de las células, sin embargo para las concentraciones superiores de 150 mM, los valores de viabilidad muestran un valor cercano al 75%, esto de primer instancia podría sugerir que se tiene presencia de muerte celular, ya que se tiene un valor bajo de viabilidad, sin embargo, al analizar las imágenes en microscopio, se puede ver que no se tiene presencia de desecho celular, lo cual se puede interpretar que a valores de dosis mayores a los 150 mM en las células se genera un estímulo citostático, es decir, que la tasa de división celular se ve disminuida pero no genera muerte celular.

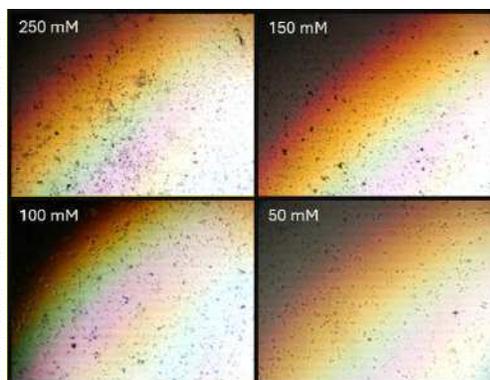
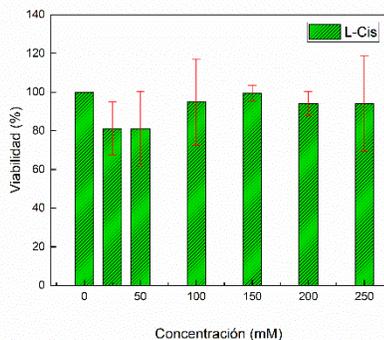


Figura 41. Ensayo MTT correspondiente a las nanopartículas de Ag_2S con presencia de sólo L-Cis

De acuerdo con la **FIGURA 41**, para las concentraciones de 25 y 50 mM existe un comportamiento idéntico entre sí aproximado al 80% de viabilidad celular; por lo que retomando el argumento del párrafo anterior aunado a las fotografías microscópicas complementarias que demuestran la omisión de muerte celular podría tratarse de un efecto citostático, además con base en la amplitud de las líneas de error puede interpretarse que existe un extenso periodo de adaptación en la interacción célula- partícula. Razón tal, por la que se puede inferir que las concentraciones más estables y favorables corresponden a 150 y 200 mM con valores muy cercanos al control. A pesar de ello, todos los valores se sitúan por encima del rango establecido de viabilidad celular. Otro aspecto para considerar es que a partir de concentraciones igual o mayores a 150 mM se visualizan aglomeraciones del material en el medio.

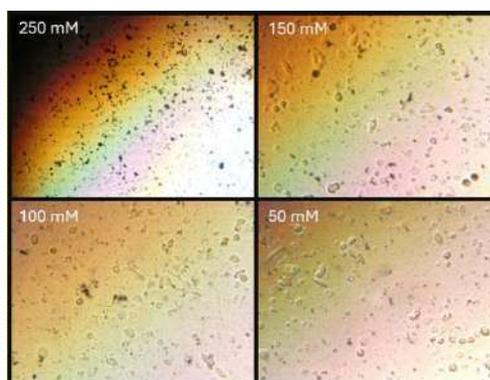
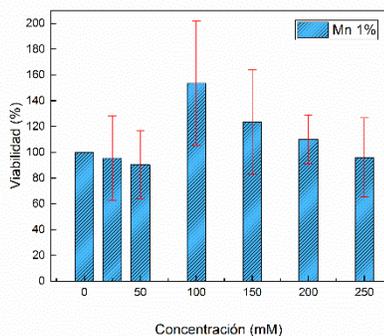


Figura 42. Ensayo MTT correspondiente a las nanopartículas de Ag_2S -1% Mn

La **FIGURA 42** exhibe que hay un ligero decaimiento de la viabilidad celular oscilante al valor de 90%, sin embargo, conforme aumentan las concentraciones el efecto es proliferativo, alcanzando su pico en la concentración de 100 mM con un valor aproximado al 150%, respecto a la imagen de microscopio se vuelve a tener presencia de aglomeración de partículas, la forma de las células no se ve distorsionada por tanto el efecto proliferativo solo está causando un aumento en la tasa de división, luego, para los tratamientos de mayor dosis del material se presenta una caída en la viabilidad, a pesar de ello en las imágenes de microscopía no se aprecia una pérdida en la densidad celular pero sí un incremento en la

cantidad de material disperso en el medio. La viabilidad para la concentración más alta correspondiente a 250 mM no sufrió caídas drásticas referentes a la viabilidad, incluso es muy cercana al valor del control con aproximadamente el 90%, pero en la imagen se aprecia una distribución de muchas partículas aglomeradas, este fenómeno pudo casuar un pasivamiento en la adherencia de las células en la superficie y este pudo ser el causante directo de la caída en el valor de la viabilidad.

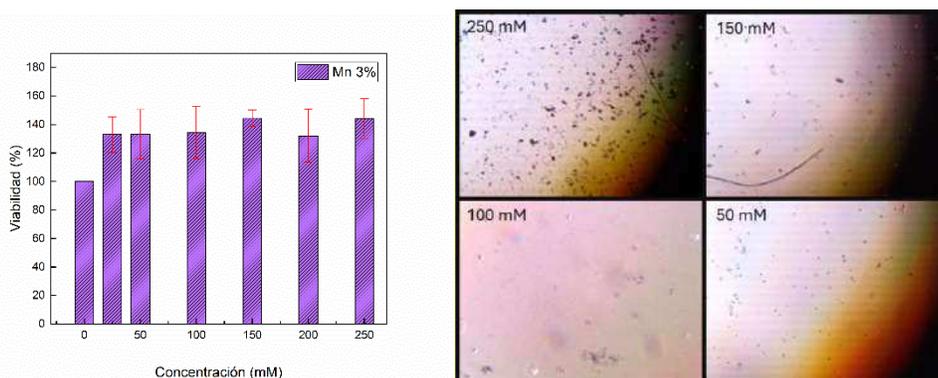


Figura 43. Ensayo MTT correspondiente a las nanopartículas de Ag₂S-3% Mn

Para el caso del tratamiento con las nanopartículas dopadas con 3% W/W de Mn en la **FIGURA 43**, para todas las concentraciones de los diversos tratamientos la viabilidad respecto al blanco es superior al 120%, esto nos está sugiriendo que con este porcentaje de Mn el estímulo no importa la concentración es de proliferación, en el caso particular, respecto a las barras de error, el tratamiento con 150 mM es el que presenta mejor adaptación ya que el error es pequeño y además es el caso que mayor valor de proliferación presenta, cercano al 140% al apoyarnos en las imágenes se nota un efecto de aglomeración de las nanopartículas, y relacionando lo que se tiene en los casos anteriores quizá este efecto de aglomeración es lo que está causando el estímulo que acelera el ciclo de división celular.

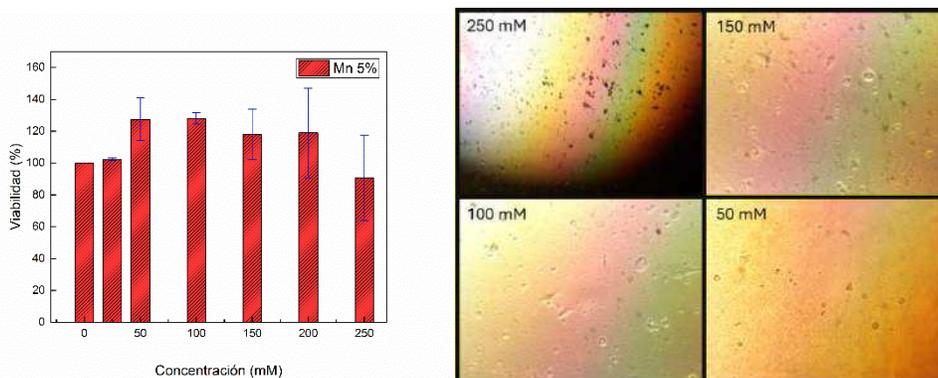


Figura 44. Ensayo MTT correspondiente a las nanopartículas de Ag₂S-5% Mn

En la **FIGURA 44**, se tiene el caso de la evolución de las partículas de Ag₂S dopadas con un 5% de Mn, para el caso partículas de 25 mM se tiene que la viabilidad es muy similar a la que se tiene con el blanco, y en el caso de la dosis de 250 mM el valor es cercano al 90%, siendo este el más bajo, en la imagen de microscopio para este caso se puede ver que las partículas se tienden a aglomerar, este fenómeno podría ser el responsable de causar que la

interacción, o bien, el estímulo que se tiene de la partícula a la célula cause un leve retraso en su ciclo de división, ya que en la imagen no se tiene presencia de desecho celular. Para los casos de las dosis de 50, 100, 150 y 200 mM los valores de viabilidad son mayores que la referencia, aquí se presenta el fenómeno ya observado en los ensayos anteriores, el estímulo que causa en la célula es proliferativo, generando que estas se dividan más rápido. En las imágenes de microscopio no se observa una distorsión de la morfología celular, de modo que, aunque este estímulo funcione como un catalizador en su proceso de división no provoca ninguna otra alteración visible sobre la célula.

8. Conclusiones

Por medio de las caracterizaciones por TEM, fue posible realizar el análisis e influencia que tiene el surfactante sobre las características generales de las partículas de Ag_2S , ya que sin la presencia de este la aglomeración es considerablemente alta, no hay forma definida. De modo que el empleo del surfactante nos proporciona un mejor control sobre las propiedades de las partículas, principalmente en la estabilidad de las partículas, su tamaño, forma y dispersión.

El estudio por SEM permitió analizar con mayor detalle y precisión las características de la morfología de las nanopartículas. Declarando que existe una fuerte correlación con el método de síntesis, a través de la cavitación y energía que se suministra al sistema, por consecuencia se ven afectadas la nucleación y el crecimiento de las partículas. Asimismo, es importante realizar las pruebas sin el dopaje de oro, ya que este le confiere propiedades como una mayor aglomeración, ocasionando así menos especificidad del material.

Mediante el XRF se realizó un análisis composicional que confirmaba la existencia de elementos presentes en el sistema planteado, y la ausencia de residuos o subproductos que obstaculizaran la síntesis. Gracias a los datos arrojados fue posible obtener las relaciones molares entre los elementos y examinar su comportamiento e influencia sobre sus particularidades.

El estudio MTT permitió evaluar la interacción célula-nanopartícula para determinar la viabilidad celular. Sin embargo, es necesario realizar técnicas complementarias ya que el MTT revela la cantidad de células vivas, pero no exhibe la cantidad de residuos celulares, por lo que pasa desapercibido los posibles efectos citostáticos, es decir, lo que podría asumirse como muerte celular, en realidad podría tratarse de estancamiento debido a los retrasos en el ciclo de división y adaptabilidad de la célula-partícula. No obstante, se reconoce que las QDs Ag_2S cuentan con baja citotoxicidad, que podría atribuirse a varios factores, a los que contribuyen especialmente sus constituyentes elementales poco tóxicos.⁶⁴ Incluso, pueden potenciarse sus propiedades y atributos al implementar ligandos de orientación que las convierten altamente selectivas *in vitro* para la orientación y la obtención de imágenes de diferentes líneas celulares.⁶² Es por ello por lo que estas nanopartículas manifiestan un escenario prometedor para bioaplicaciones.

En la microscopía Raman se pudo identificar que las partículas mediante la detección de sus modos vibracionales moleculares se comprobó que se tenía sulfuro de plata en fase β monocristalina, esto es de alta relevancia, ya que proporcionó información clara sobre la estructura cristalina y las fases de los elementos en el material. Con las variaciones en los

sistemas propuestos se pudo identificar que la plata metálica favorecía la aglomeración de partículas y el uso del surfactante es fundamental para tener nanopartículas estables.

En el espectro de UV-Vis se observó la relación entre los valores de absorbancia y el tamaño de partícula de los sistemas, así como la ventana de excitación específica de las partículas de Ag_2S que se presenta entre los 300-400 nm, la cuál es única para que sea posible la interacción material-energía. De forma complementaria el modelo de gráficas TAUC proporcionó valores aproximados del band gap óptico correspondientes a <4 eV, en virtud de lo cual se infiere la existencia confinamiento cuántico, lo cual refleja la reducción dimensional de las partículas obtenidas y esto se refuerza con las microscopias TEM que se obtuvieron comprobando así que la partícula si tiene las características de puntos cuánticos.

Finalmente se puede concluir de manera general que los resultados de la caracterización fisicoquímica y biología de las nanopartículas de Ag_2S tiene potencial en su posible uso como marcador molecular, ya que los resultados arrojan que tienen buena interacción con las células, no deforman su fisiología y no tiene efectos citotóxicos, lo cual reafirma que el sistema propuesto desde la síntesis como su aplicación tiene potencial de uso.

9. Anexos

9.1. Formación de un nivel de energía discreto

La formación del nivel de energía discreto ocurre cuando los átomos se juntan en un material a granel, el número de estados de energía aumenta sustancialmente para formar bandas de estados casi continuas. Y también se produce una tendencia a la disminución de la cantidad de átomos en el material, y los estados de energía se deslocalizan con naturaleza de confinamiento. El fenómeno crea pares electrón-hueco y naturaleza de confinamiento espacial cuando las partículas se mueven hacia la longitud de onda natural de-Broglie de los electrones en la banda de conducción. Como resultado, la diferencia de energía entre las bandas de energía se incrementa con la disminución de la dimensión del tamaño de las partículas.²⁸

La partícula se comporta como una partícula libre cuando las dimensiones de la estructura de confinamiento son muy grandes en comparación con la *longitud de onda de Broglie*. En esta etapa, los estados de energía son continuos, y el bandgap vuelve a su posición original, y otro espectro de energía no permanece continuo y se vuelve de naturaleza discreta cuando las dimensiones de la estructura de confinamiento se reducen hacia la nanoescala. Por lo tanto, el bandgap presenta propiedades dependientes del tamaño y acaba provocando un desplazamiento hacia el azul de la luz emitida al disminuir el tamaño de la partícula. Sin embargo, este efecto demuestra las consecuencias de confinar los electrones y el par electrón-hueco (o los excitones) dentro de una dimensión que se aproxima al límite cuántico crítico, a menudo denominado radio del excitón de Bohr.²⁸

Desde este punto de vista, un punto cuántico confina en las tres dimensiones; un hilo cuántico (nanohilo) confina en dos dimensiones; y un pozo cuántico confina sólo en una dimensión. Las estructuras correspondientes también se denominan pozos de potencial cero (0D), unidimensional (1D) y bidimensional (2D), respectivamente, en relación con el número de dimensiones en las que la partícula confinada tiene libertad de movimiento.²⁸

- Electrones confinados en una dirección, es decir, pozos cuánticos (películas delgadas): Los electrones pueden moverse fácilmente en dos dimensiones (2D), por lo que una dimensión está cuantificada.
- Electrones confinados en dos direcciones, es decir, hilos cuánticos: Los electrones pueden moverse fácilmente en una dimensión (1D), por lo que la bidimensionalidad está cuantificada.
- Electrones confinados en tres direcciones, es decir, puntos cuánticos: Los electrones pueden moverse fácilmente en la dimensión cero (0D), por lo que la tridimensionalidad está cuantificada.

En conclusión, cada dirección de confinamiento cambia una componente continua k a una componente discreta caracterizada por un número cuántico n .

9.2. Formación de excitones

En el caso de los semiconductores, los electrones se desplazaron de la banda de valencia a la banda de conducción cuando se emite luz que cae sobre ellos, y en consecuencia el efecto de recombinación impone o crea la partícula fotónica. El electrón y el agujero fueron ocupados o creados desde la banda de conducción y la banda de valencia, respectivamente. Sin embargo, la carga del agujero es equivalente a la del electrón, lo que ayuda a la implementación de una partícula denominada excitación. En las cargas mencionadas y la interacción de intercambio de coulomb, hay una conexión atractiva entre el electrón y el agujero. Este tipo de par electrón-hueco se expresa a veces en un término simple como cuasipartícula que se denomina excitón. Se trata de una cuasipartícula eléctricamente neutra que se da en aislantes, semiconductores y algunos líquidos.²⁸

En la física del estado sólido, el bandgap/la brecha energética está separada entre el nivel de energía finito de la banda de conducción y la banda de valencia. Cuando un electrón de la banda de valencia alcanza la energía suficiente para superar la brecha energética, debido a la excitación térmica o a la absorción de un fotón, y pasa a la banda de conducción, se crea un hueco a la izquierda en la banda de valencia. El hueco creado se desplaza a la banda de conducción; éste se forma como un electrón excitado; el portador de carga en el dispositivo semiconductor se recombina con el hueco tras la liberación de energía. La combinación del par de electrones y agujeros conduce a la formación de excitones.²⁸

Debido a las diferentes cargas de polaridad y a la interacción de intercambio de fuerzas de coulomb, existe una conexión atractiva entre el electrón y el hueco, y de forma sencilla, el par electrón-hueco se denomina cuasipartícula que recibe el nombre de excitón. Debido a la combinación de electrones y agujeros, la naturaleza neutra de la cuasipartícula resultante existe en diferentes materiales como semiconductores, aislantes y algunos líquidos. Además, este excitón transporta la energía sin comprometer la carga eléctrica neta según la teoría de la materia condensada.²⁸

Sin embargo, hay una diferencia importante. Los excitones tienen una separación física media entre el electrón y el agujero, denominada radio de Bohr del excitón. Esta distancia física es diferente en cada material. En el caso de los nanocristales semiconductores (SNC) (QDs), el tamaño de las partículas es menor que el radio de Bohr; el electrón excitado por una fuente de energía externa tiende a formar un enlace débil con su agujero. Este estado de unión del electrón y el hueco del electrón, que se atraen por la fuerza electrostática de coulomb, suele denominarse excitón.²⁸

Así, el radio de Bohr es la distancia en un excitón electrón-hueco, también llamado radio de Bohr del excitón. Cada material semiconductor tiene un radio de Bohr característico del excitón en el que se produce el efecto de confinamiento cuántico. Esta propiedad única de confinamiento hace que la "banda" de energías se convierta en niveles de energía discretos en los QDs.²⁸

9.3 Complementarios

El sulfuro de plata preparado carece de grupos funcionales, lo que limita su aplicación posterior. La modificación de la funcionalización de la superficie dota a los QDs de Ag_2S de buenas propiedades fototérmicas o de carga de fármacos.²⁵

El seguimiento dinámico de las células en el cuerpo sigue siendo un reto importante para la plena comprensión de la función y el paradero de células específicas.²⁵

La eficiencia de fotoluminiscencia de los puntos cuánticos (QDs) de Ag_2S es difícil de competir con los QDs basados en Cd-, Pb. La alta movilidad de Ag^+ en el cristal de Ag_2S , que provoca una gran deficiencia de cationes y defectos en el cristal, puede ser la principal responsable del bajo rendimiento cuántico de fotoluminiscencia (PLQY, por sus siglas en inglés) de los QDs de Ag_2S .²⁴

Aunque los QDs de Ag_2S tienen múltiples ventajas en la obtención de imágenes in vivo, su baja eficiencia de fotoluminiscencia sigue siendo un gran obstáculo en su camino hacia diversas aplicaciones. Otro reto en la síntesis es sintonizar la longitud de onda de emisión de forma controlable, lo cual es de importancia crítica para la obtención de imágenes multicolor.²⁴

Aunque se han aplicado varios enfoques sintéticos para preparar los QDs de Ag_2S , incluyendo el ajuste del tamaño de las partículas, la ingeniería de los ligandos de la superficie, el recubrimiento de las carcasas, etc., ninguno de estos QDs de Ag_2S tenía un bajo rendimiento cuántico de fotoluminiscencia (PLQY) que pudiera competir con los QDs tradicionales basados en Cd-, Pb. La elevada movilidad de los iones Ag^+ en la red cristalina de Ag_2S , que provoca abundantes vacantes de cationes y defectos en el cristal, es perjudicial para la eficacia de la fotoluminiscencia de los QDs y es difícil de resolver con los métodos sintéticos habituales.²⁴

Además, el tamaño de las partículas de los QDs suele descontrolarse en la síntesis cuando se utilizan precursores altamente reactivos para facilitar la nucleación y cristalización de los nanocristales. Este dilema es común en la síntesis de QDs del grupo I-VI. Por ejemplo, los QDs de Ag_2Se con emisión sintonizable de 1080 a 1330 nm de los que informaron Zhu et al. tenían un PLQY muy bajo.²⁴

A pesar de las aplicaciones biológicas rápidamente emergentes de Ag_2S QDs, muy pocos estudios han investigado la farmacocinética (PK, por sus siglas en inglés) y la distribución tisular (DT, por sus siglas en inglés) de este colorante NIR.²⁶

Hasta el año 2019, sólo un estudio relevante realizado por Zhang et al. ha evaluado la PK y la distribución de los QDs de Ag_2S PEGilados y no hay ningún informe sobre las características in vivo de los QDs de Ag_2S convencionales (no PEGilados).²⁶

Además, el hueso absorbió una cantidad considerable de Ag_2S QDs. La mayor acumulación de QDs en el hígado y el hueso podría atribuirse a la captación de nanomateriales por parte de los macrófagos en el hígado y la médula ósea, así como al endotelio discontinuo de los capilares en estos tejidos. En realidad, el endotelio vascular no es una barrera para la biodistribución de estos agentes, excepto en el cerebro.²⁶

Hay que tener en cuenta que, al entrar los portadores coloidales en la circulación sanguínea, las proteínas plasmáticas suelen adsorberse en la superficie de la nanopartícula, lo que

conduce a la opsonización y luego a la fagocitosis por parte de los MPS en el hígado y la filtración esplénica.²⁶

Las partículas con carga positiva tienen una mayor afinidad para adsorber proteínas plasmáticas, lo que conlleva un aumento de su tamaño hidrodinámico. Está bien establecido que las macromoléculas y las nanopartículas de más de 6 nm no son lo suficientemente capaces de ser filtradas a través del glomérulo de los riñones, por lo que el hígado, que tiene capilares endoteliales discontinuos (con un fenestrado de unos 100 nm), juega un papel crítico en su disposición.²⁶

Además de los hepatocitos, que son el tipo de célula más abundante del hígado, otro tipo de célula del hígado, las células de Kupffer, participan principalmente en la eliminación de las nanopartículas, en particular las que tienen una carga superficial negativa.²⁶

Por supuesto, el papel de la mayor tendencia de las proteínas plasmáticas a la adsorción a las partículas positivas y el consiguiente aumento del tamaño hidrodinámico también podría tener un papel en la mayor captación pulmonar observada para los QDs con carga positiva.²⁶

Cada nanopartícula tiene sus propias propiedades intrínsecas. Además, los detalles de los procedimientos experimentales, como la raza y la especie animal, el tiempo y la duración del muestreo, el tipo de indicador (atrapado o unido covalentemente) y la vía de administración (oral o i.v.) pueden variar en los distintos estudios, lo que puede afectar a los resultados obtenidos.²⁶

Para acelerar la aplicación clínica de las QDs, se requiere una comprensión detallada de la respuesta del organismo a estas vesículas y del papel de los principales parámetros efectivos (como el tamaño de las partículas, la carga superficial, la forma, la dosificación, etc.).²⁶

10. Referencias

1. Barrios CH. Global challenges in breast cancer detection and treatment. *Breast*. Published online 2022. doi:10.1016/j.breast.2022.02.003
2. Villarreal-Garza C, López-Martínez EA, Martínez-Cannon BA, et al. Medical and information needs among young women with breast cancer in Mexico. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2019;28(4). doi:10.1111/ecc.13040
3. Wang Z, Ma Y, Yu X, et al. Targeting CXCR4–CXCL12 Axis for Visualizing, Predicting, and Inhibiting Breast Cancer Metastasis with Theranostic AMD3100–Ag2S Quantum Dot Probe. *Adv Funct Mater*. 2018;28(23). doi:10.1002/adfm.201800732
4. Fang M, Peng CW, Pang DW, Li Y. Quantum dots for cancer research: current status, remaining issues, and future perspectives. *Cancer Biol Med*. 2012;9(3):151-163. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2012.03.001
5. Wang QY, Huang W, Jiang XL, Kang YJ. Breast cancer cells synchronous labeling and separation based on aptamer and fluorescence-magnetic silica nanoparticles. *Opt Mater (Amst)*. 2018;75:483-490. doi:10.1016/j.optmat.2017.11.003
6. Wang H, Wang R, Cai K, et al. Selective in vivo metabolic cell-labeling-mediated cancer targeting. *Nat Chem Biol*. 2017;13(4):415-424. doi:10.1038/nchembio.2297
7. Cabrera-Galeana P, Soto-Perez-de-Celis E, Reynoso-Noverón N, et al. Clinical characteristics and outcomes of older women with breast cancer in Mexico. *J Geriatr Oncol*. 2018;9(6):620-625. doi:10.1016/j.jgo.2018.04.003
8. Singh R, Nalwa HS. Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents, and anticancer nanodrugs. *J Biomed Nanotechnol*. 2011;7(4):489-503. doi:10.1166/jbn.2011.1324
9. Bhirde A, Xie J, Swierczewska M, Chen X. Nanoparticles for cell labeling. *Nanoscale*. 2011;3(1):142-153. doi:10.1039/c0nr00493f
10. Peckys DB, Quint C, Jonge N de. Determining the Efficiency of Single Molecule Quantum Dot Labeling of HER2 in Breast Cancer Cells. *Nano Lett*. Published online 2020. doi:10.1021/acs.nanolett.0c02644
11. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An introduction to the performance of immunohistochemistry. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 1897. Humana Press Inc.; 2019:289-298. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_25
12. Sukswai N, Khoury JD. Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14(5):368-375. doi:10.1007/s11899-019-00533-9
13. Tan WCC, Nerurkar SN, Cai HY, et al. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer Commun*. 2020;40(4):135-153. doi:10.1002/cac2.12023

14. Cimino-Mathews A. Novel uses of immunohistochemistry in breast pathology: interpretation and pitfalls. *Modern Pathology*. 2021;34:62-77. doi:10.1038/s41379-020-00697-3
15. Ye F, Zhao Y, El-Sayed R, Muhammed M, Hassan M. Advances in nanotechnology for cancer biomarkers. *Nano Today*. 2018;18:103-123. doi:10.1016/j.nantod.2017.12.008
16. Tang P, Bui MM, Peng Y. Immunohistochemistry in Breast Cancer. In: *Practical Breast Pathology*. Springer International Publishing; 2019:173-192. doi:10.1007/978-3-030-16518-5_7
17. Wan W, Pu Q, Huang X, Luo D, Hu Y, Liu Y. Comparison of quantum dot immunofluorescence histochemistry with conventional immunohistochemistry in detecting *Helicobacter pylori* infection in paraffin-embedded tissues of gastric biopsy. *J Mol Histol*. 2021;52(3):461-466. doi:10.1007/s10735-020-09954-w
18. Fu Q, Zhu R, Song J, Yang H, Chen X. Photoacoustic Imaging: Contrast Agents and Their Biomedical Applications. *Advanced Materials*. 2019;31(6). doi:10.1002/adma.201805875
19. Liang C, Wang C, Liu Z. Stem cell labeling and tracking with nanoparticles. *Particle and Particle Systems Characterization*. 2013;30(12):1006-1017. doi:10.1002/ppsc.201300199
20. Devi S, Kumar M, Tiwari A, et al. Quantum Dots: An Emerging Approach for Cancer Therapy. *Front Mater*. 2022;8. doi:10.3389/fmats.2021.798440
21. Wang LW, Peng CW, Chen C, Li Y. Quantum dots-based tissue and in vivo imaging in breast cancer researches: current status and future perspectives. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;151(1):7-17. doi:10.1007/s10549-015-3363-x
22. Freitas M, Neves MMPS, Nouws HPA, Delerue-Matos C. Quantum dots as nanolabels for breast cancer biomarker HER2-ECD analysis in human serum. *Talanta*. 2020;208. doi:10.1016/j.talanta.2019.120430
23. Wagner AM, Knipe JM, Orive G, Peppas NA. Quantum dots in biomedical applications. *Acta Biomater*. 2019;94:44-63. doi:10.1016/j.actbio.2019.05.022
24. He H, Lin Y, Tian ZQ, Zhu DL, Zhang ZL, Pang DW. Ultrasmall Pb:Ag₂S Quantum Dots with Uniform Particle Size and Bright Tunable Fluorescence in the NIR-II Window. *Small*. 2018;14(11). doi:10.1002/sml.201703296
25. Lu C, Chen G, Yu B, Cong H. Recent Advances of Low Biological Toxicity Ag₂S QDs for Biomedical Application. *Adv Eng Mater*. 2018;20(6). doi:10.1002/adem.201700940
26. Javidi J, Haeri A, Nowroozi F, Dadashzadeh S. Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Excretion of Ag₂S Quantum Dots in Mice and Rats: the Effects of Injection Dose, Particle Size and Surface Charge. *Pharm Res*. 2019;36(3). doi:10.1007/s11095-019-2571-1
27. Sumanth Kumar D, Jai Kumar B, Mahesh HM. Quantum Nanostructures (QDs): An Overview. In: *Synthesis of Inorganic Nanomaterials*. Elsevier; 2018:59-88. doi:10.1016/b978-0-08-101975-7.00003-8

28. Ramalingam G, Kathirgamanathan P, Ravi G, et al. Quantum Confinement Effect of 2D Nanomaterials. In: *Quantum Dots - Fundamental and Applications*. IntechOpen; 2020. doi:10.5772/intechopen.90140
29. Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*. 2005;2(12):910-919. doi:10.1038/nmeth817
30. Jerome WG. The Theory of Fluorescence. In: *Basic Confocal Microscopy*. Springer International Publishing; 2018:21-36. doi:10.1007/978-3-319-97454-5_2
31. Diagrama EL, Jablonski DE, Sipoš RR, Sima J. *JABLONSKI DIAGRAM REVISITED*. Vol 37.; 2020.
32. Chen C, Ou H, Liu R, Ding D. Regulating the Photophysical Property of Organic/Polymer Optical Agents for Promoted Cancer Phototheranostics. *Advanced Materials*. 2020;32(3). doi:10.1002/adma.201806331
33. Yang Q, Li J, Wang X, Peng H, Xiong H, Chen L. Strategies of molecular imprinting-based fluorescence sensors for chemical and biological analysis. *Biosens Bioelectron*. 2018;112:54-71. doi:10.1016/j.bios.2018.04.028
34. Qi J, Ou H, Liu Q, Ding D. Gathering brings strength: How organic aggregates boost disease phototheranostics. *Aggregate*. 2021;2(1):95-113. doi:10.1002/agt2.25
35. Han X, Xu K, Taratula O, Farsad K. Applications of nanoparticles in biomedical imaging. *Nanoscale*. 2019;11(3):799-819. doi:10.1039/c8nr07769j
36. Hernot S, van Manen L, Debie P, Mieog JSD, Vahrmeijer AL. Latest developments in molecular tracers for fluorescence image-guided cancer surgery. *Lancet Oncol*. 2019;20(7):e354-e367. doi:10.1016/S1470-2045(19)30317-1
37. Erturk SM, Ros PR, Ichikawa T, Saylisoy S. *Medical Imaging Contrast Agents: A Clinical Manual*.
38. Tao Y, Li M, Kim B, Auguste DT. Incorporating gold nanoclusters and target-directed liposomes as a synergistic amplified colorimetric sensor for HER2-positive breast cancer cell detection. *Theranostics*. 2017;7(4):899-911. doi:10.7150/thno.17927
39. Salahandish R, Ghaffarinejad A, Omidinia E, et al. Label-free ultrasensitive detection of breast cancer miRNA-21 biomarker employing electrochemical nano-genosensor based on sandwiched AgNPs in PANI and N-doped graphene. *Biosens Bioelectron*. 2018;120:129-136. doi:10.1016/j.bios.2018.08.025
40. Hasanzadeh M, Solhi E, Jafari M, et al. Ultrasensitive immunoassay of tumor protein CA 15.3 in MCF-7 breast cancer cell lysates and unprocessed human plasma using gold nanoparticles doped on the structure of mesoporous silica. *Int J Biol Macromol*. 2018;120:2493-2508. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.020
41. Huang Q, Wang Y, Chen X, et al. Nanotechnology-based strategies for early cancer diagnosis using circulating tumor cells as a liquid biopsy. *Nanotheranostics*. 2018;2(1):21-41. doi:10.7150/ntno.22091

42. Capela E V, Aires-Barros MR, Freire MG, Azevedo AM. *Monoclonal Antibodies- Addressing the Challenges on the Manufacturing Processing of an Advanced Class of Therapeutic Agents*. Vol 4.; 2017.
43. Bayer V. An Overview of Monoclonal Antibodies. *Semin Oncol Nurs*. 2019;35(5). doi:10.1016/j.soncn.2019.08.006
44. Parakh S, King D, Gan HK, Scott AM. Current development of monoclonal antibodies in cancer therapy. In: *Recent Results in Cancer Research*. Vol 214. Springer New York LLC; 2020:1-70. doi:10.1007/978-3-030-23765-3_1
45. Gofman V v., Aubert T, Ginsté D vande, et al. Synthesis, modification, bioconjugation of silica coated fluorescent quantum dots and their application for mycotoxin detection. *Biosens Bioelectron*. 2016;79:476-481. doi:10.1016/J.BIOS.2015.12.079
46. Cui C, Li X, Liu J, Hou Y, Zhao Y, Zhong G. Synthesis and Functions of Ag₂S Nanostructures. *Nanoscale Res Lett*. 2015;10(1):1-21. doi:10.1186/S11671-015-1125-7/FIGURES/10
47. Zuo Y, Chen J, Yang H, et al. Ag-Ag₂S quantum-dots modified TiO₂ nanorod arrays with enhanced photoelectrochemical and photocatalytic properties. *J Alloys Compd*. 2019;780:347-354. doi:10.1016/J.JALLCOM.2018.11.274
48. Shi LJ, Zhu CN, He H, et al. Near-infrared Ag₂Se quantum dots with distinct absorption features and high fluorescence quantum yields. *RSC Adv*. 2016;6(44):38183-38186. doi:10.1039/C6RA04987G
49. Perepelitsa AS, Ovchinnikov O v., Smirnov MS, et al. Structural and optical properties of Ag₂S/SiO₂ core/shell quantum dots. *J Lumin*. 2021;231:117805. doi:10.1016/J.JLUMIN.2020.117805
50. Lim YT, Kim S, Nakayama A, Stott NE, Bawendi MG, Frangioni J v. Selection of Quantum Dot Wavelengths for Biomedical Assays and Imaging: <http://dx.doi.org/10.1162/15353500200302163>. 2003;2(1):153535002003021. doi:10.1162/15353500200302163
51. Du Y, Xu B, Fu T, et al. Near-infrared photoluminescent Ag₂S quantum dots from a single source precursor. *J Am Chem Soc*. 2010;132(5):1470-1471. doi:10.1021/JA909490R/SUPPL_FILE/JA909490R_SI_001.PDF
52. Sahoo SL, Liu CH, Kumari M, Wu WC, Wang CC. Biocompatible quantum dot-antibody conjugate for cell imaging, targeting and fluorometric immunoassay: crosslinking, characterization and applications. *RSC Adv*. 2019;9(56):32791-32803. doi:10.1039/C9RA07352C
53. Zhao MX, Zeng EZ. Application of functional quantum dot nanoparticles as fluorescence probes in cell labeling and tumor diagnostic imaging. *Nanoscale Res Lett*. 2015;10(1):1-9. doi:10.1186/S11671-015-0873-8
54. Bilan R, Fleury F, Nabiev I, Sukhanova A. Quantum dot surface chemistry and functionalization for cell targeting and imaging. *Bioconjug Chem*. 2015;26(4):609-624. doi:10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.5B00069

55. Chen C, Peng J, Xia HS, et al. Quantum dots-based immunofluorescence technology for the quantitative determination of HER2 expression in breast cancer. *Biomaterials*. 2009;30(15):2912-2918. doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.02.010
56. Chen Z, Lu M. Novel electrochemical immunoassay for human IgG1 using metal sulfide quantum dot-doped bovine serum albumin microspheres on antibody-functionalized magnetic beads. *Anal Chim Acta*. 2017;979:24-30. doi:10.1016/J.ACA.2017.05.014
57. Nifontova G, Ramos-Gomes F, Baryshnikova M, Alves F, Nabiev I, Sukhanova A. Cancer Cell Targeting With Functionalized Quantum Dot-Encoded Polyelectrolyte Microcapsules. *Front Chem*. 2019;7(JAN). doi:10.3389/FCHEM.2019.00034
58. Nifontova G, Ramos-Gomes F, Alves F, Nabiev I, Sukhanova A. Stimulus-Sensitive Theranostic Delivery Systems Based on Microcapsules Encoded with Quantum Dots and Magnetic Nanoparticles. *Methods in Molecular Biology*. 2020;2135:199-212. doi:10.1007/978-1-0716-0463-2_11
59. Nifontova G, Efimov A, Agapova O, Agapov I, Nabiev I, Sukhanova A. Bioimaging Tools Based on Polyelectrolyte Microcapsules Encoded with Fluorescent Semiconductor Nanoparticles: Design and Characterization of the Fluorescent Properties. *Nanoscale Res Lett*. 2019;14(1):29. doi:10.1186/s11671-019-2859-4
60. Aydemir D, Hashemkhani M, Acar HY, Ulusu NN. Evaluation of the biocompatibility of the GSH-coated Ag₂S quantum dots in vitro: a perfect example for the non-toxic optical probes. *Mol Biol Rep*. 2020;47(6):4117-4129. doi:10.1007/s11033-020-05522-3
61. Chen H, Li B, Zhang M, et al. Characterization of tumor-targeting Ag₂S quantum dots for cancer imaging and therapy in vivo. *Nanoscale*. 2014;6(21):12580-12590. doi:10.1039/c4nr03613a
62. Ozkan Vardar D, Aydin S, Hocaoglu I, Yagci Acar FH, Basaran N. Effects of silver sulfide quantum dots coated with 2-mercaptopropionic acid on genotoxic and apoptotic pathways in vitro. *Chem Biol Interact*. 2018;291:212-219. doi:10.1016/j.cbi.2018.06.032
63. Gao M, Zhao H, Wang Z, Zhao Y, Zou X, Sun L. Controllable preparation of Ag₂S quantum dots with size-dependent fluorescence and cancer photothermal therapy. *Advanced Powder Technology*. 2021;32(6):1972-1982. doi:10.1016/j.appt.2021.04.011
64. Zhang X, Gu Y, Chen H. Synthesis of biocompatible near infrared fluorescence Ag₂S quantum dot and its application in bioimaging. *J Innov Opt Health Sci*. 2014;7(3). doi:10.1142/S1793545813500594