

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Evaluación del efecto de la generación de especies de oxígeno
altamente reactivas inducido por nanopartículas de oro
recubiertas con TiO_2 tipo núcleo-coraza en fibroblastos**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Natanael Cruz González

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Natanael Cruz González

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Codirectora de tesis

Dr. José Manuel Romo Herrera
Codirector de tesis

Miembros del Comité

Dr. Uriel Caudillo Flores

Dr. Diego Luis Delgado Álvarez



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Natanael Cruz González** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Evaluación del efecto de la generación de especies de oxígeno altamente reactivas inducido por nanopartículas de oro recubiertas con TiO₂ tipo núcleo-coraza en fibroblastos

Resumen aprobado por:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Codirectora de tesis

Dr. José Manuel Romo Herrera
Codirector de tesis

Las nanopartículas de oro presentan baja toxicidad, excelente biocompatibilidad e interesantes propiedades ópticas y fisicoquímicas, como la resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR). Por otro lado, los semiconductores son materiales eficientes como fotocatalizadores, como el dióxido de titanio (TiO₂), que tiene una banda prohibida de ~3.2 eV con absorción en el ultravioleta, lo que limita su absorción de luz a esa región del espectro electromagnético. Por lo tanto, la aplicación híbrida de ambos materiales como nanopartículas tipo núcleo@coraza combina sus propiedades metal@semiconductor. En este caso, las NPs de Au@TiO₂ aumentan la captación de luz visible y generan pares electrón-hueco, capaces de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante el efecto fotocatalítico, que pueden ser aprovechadas para una futura perspectiva en la cicatrización de heridas. En este trabajo se sintetizaron AuNPs; el análisis de imagen TEM adquirió un diámetro promedio de 24 nm, y la espectroscopía UV-Visible mostró la respuesta óptica LSPR a 524 nm. Al recubrirlas con TiO₂ tipo núcleo@coraza aumentó el diámetro en 32 nm y la LSPR se desplazó hacia 532 nm. Las propiedades fisicoquímicas de las Au@TiO₂NPs se explotaron para encontrar la concentración óptima de viabilidad celular y generación de ROS inducidas en la exposición de células de fibroblastos 3T3-L1 a diferentes concentraciones de NPs e irradiación de luz verde (λ 502 nm) y luz UV (λ 390 nm). Los ensayos *in vitro* demostraron que las Au@TiO₂NPs pueden ser internalizadas por las células. Mediante el efecto fototérmico y fotocatalítico, las Au@TiO₂NPs pueden promover la proliferación celular y generar especies reactivas de oxígeno, desempeñando así un papel beneficioso en la regeneración de tejidos.

Palabras clave: Resonancia de plasmón de superficie localizado, nanotoxicología, especies reactivas de oxígeno

Abstract of the thesis presented by **Natanael Cruz González** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Evaluation of the effect of reactive oxygen species generation induced by TiO₂-coated gold nanoparticles of the core-shell type on fibroblasts

Abstract approved by:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Thesis Codirector

Dr. José Manuel Romo Herrera
Thesis Codirector

Gold nanoparticles exhibit low toxicity, excellent biocompatibility, and interesting optical and physicochemical properties, such as localized surface plasmon resonance (LSPR). On the other hand, semiconductors are efficient materials as photocatalysts, such as titanium dioxide (TiO₂), which has a band gap of ~3.2 eV with absorption in the ultraviolet, which limits its light absorption to that region of the electromagnetic spectrum. Therefore, the hybrid application of both materials as core@shell nanoparticles combines their metal@semiconductor properties. In this case, Au@TiO₂NPs increase the collection of visible light and generate electron-hole pairs, capable of producing reactive oxygen species (ROS) through the photocatalytic effect, which can be exploited for a future perspective in wound healing. In this project, AuNPs were synthesized, TEM image analysis acquired an average diameter of 24 nm, and UV-Visible spectroscopy showed the LSPR optical response at 524 nm. Coating them with TiO₂ core@shell type increased the diameter by 32 nm and the LSPR was shifted towards 532 nm. The physicochemical properties of Au@TiO₂NPs were exploited to find the optimal concentration of cell viability and ROS generation induced upon exposure of 3T3-L1 fibroblast cells to different concentrations of NPs and irradiation of green light (λ 502 nm) and UV light (λ 390 nm). The *in vitro* assays demonstrated that the Au@TiO₂NPs can be internalized by cells. Through the photothermal and photocatalytic effect, Au@TiO₂NPs may promote cell proliferation and generate reactive oxygen species, thereby playing a beneficial role in tissue regeneration.

Keywords: Localized surface plasmon resonance, nanotoxicology, reactive oxygen species

Dedicatoria

Me esforzaré y viviré plenamente,
para cuando nos volvamos a encontrar,
te sientas orgulloso de lo que juntos logramos hacer.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN-UNAM) y al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA-UNAM) por todos los recursos e instalaciones brindadas durante mi trayecto en el posgrado en Ciencias en Nanociencias.

Agradezco el apoyo financiero del proyecto PAPIIT IN111223 de la DGAPA-UNAM y los proyectos A1-S-17539 y Fordecyt 272894 del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT). Así como la beca de maestría (CVU. 1136599) que fueron un soporte para dedicarme de tiempo completo al posgrado.

A los líderes del proyecto, la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno y el Dr. José Manuel Romo Herrera por el trabajo y la sinergia satisfactoria que logramos.

Al comité de tesis, el Dr. Uriel Caudillo Flores y al Dr. Diego Luis Delgado Álvarez por sus sugerencias enriquecedoras y disposición completa en el proyecto.

Al M. en C. Manuel Aguilar Franco por las micrografías de STEM, al M.I. Gerardo Antonio Fonseca Hernández por su asistencia técnica en el DLS, a la M. en C. Elizabeth Mavil por su apoyo técnico en cultivo celular y al Dr. Gonzalo Ramírez García por las facilidades con la fuente de LED.

Al grupo de NanotoxLab y al laboratorio de ensamblaje de grafeno y plasmónica.

A mí familia, gganbu y amigos por ser personas que cambian el “lo siento” por el “te siento”.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Cicatrización de heridas.....	1
1.2 Nanomateriales.....	1
1.3 Mecanismos en la exposición de nanopartículas a fuentes de luz.....	3
1.4 Especies reactivas de oxígeno.....	4
1.5 Línea celular de fibroblastos 3T3-L1.....	5
1.6 Fundamento del proyecto.....	6
1.7 Antecedentes.....	6
1.7.1 Aplicaciones de las nanopartículas de oro y el dióxido de titanio.....	6
1.7.2 Efectos nanotoxicológicos de las nanopartículas de oro y el dióxido de titanio.....	7
1.7.3 Exposición de nanopartículas a fuentes de luz.....	9
1.7.4 Función de fibroblastos para cicatrización de heridas.....	10
1.8 Hipótesis.....	11
1.9 Objetivos.....	11
1.9.1 Objetivo general.....	11
1.9.2 Objetivos específicos.....	11

Capítulo 2. Metodología.....	12
2.1 Síntesis de nanopartículas de oro con morfología esférica	12
2.1.1 Síntesis de semillas de Au	12
2.1.2 Crecimiento de semillas de Au	13
2.2 Nanopartículas de oro recubiertas con TiO ₂ tipo núcleo@coraza	13
2.3 Caracterización fisicoquímica de los materiales	16
2.3.1 Espectroscopía de absorbancia de luz ultravioleta-visible (UV-Visible).....	16
2.3.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	17
2.3.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)	18
2.4 Cultivo celular.....	19
2.4.1 Línea celular	19
2.4.2 Descongelación de células	19
2.4.3 Subcultivo celular	19
2.4.4 Recuento celular.....	20
2.4.5 Criopreservación celular.....	21
2.5 Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT	21
2.6 Evaluación de especies reactivas de oxígeno.....	25
2.6.1 Medición de ROS por espectrofluorimetría	25
2.6.2 Determinación de la producción de ROS por citometría de flujo	28
2.7 Internalización celular por citometría de flujo.....	30
Capítulo 3. Resultados	32
3.1 Síntesis y caracterización de Au@TiO ₂ NPs.....	32
3.1.1 Respuesta óptica	32
3.1.2 Distribución de tamaño y morfología.....	35
3.1.3 Potencial Z y diámetro hidrodinámico	36
3.2 Caracterización de TiO ₂ tipo P25.....	37

3.3	Viabilidad de fibroblastos expuestos a Au@TiO ₂ NPs y fuentes de luz	38
3.4	Efecto en la morfología de las células 3T3-L1	41
3.5	Generación de especies reactivas de oxígeno	42
3.5.1	Medición de las ROS por espectrofluorimetría	42
3.5.2	Medición de las ROS por citometría de flujo.....	45
3.6	Internalización celular medida por citometría de flujo.....	47
Capítulo 4. Discusión.....		49
4.1	Síntesis y caracterización fisicoquímica de las Au@TiO ₂ NPs	50
4.2	Caracterización fisicoquímica del TiO ₂ tipo P25.....	52
4.3	Efecto de la luz en las células	52
4.4	Efecto en la viabilidad celular.....	53
4.5	Efecto en la morfología de las células	54
4.6	Internalización celular	54
4.7	Generación de especies reactivas de oxígeno	55
4.8	Perspectivas futuras.....	57
4.9	Diagrama de los mecanismos propuestos	58
Capítulo 5. Conclusiones		60
Literatura citada		61
Anexos.....		65

Lista de figuras

Figura	Página
1. Propiedades de las AuNPs y las TiO ₂ NPs.....	2
2. Sistema convencional de generación de ROS fotocatalíticas.....	3
3. Mecanismos de transferencia de energía inducidos por la LSPR en metal@semiconductor. A) Inyección de electrones calientes. B) Transferencia de energía resonante inducida por plasmones (PIRET) [Extraída de Linic et al. (2011)].....	4
4. Efectos inducidos en células mediante la generación de especies reactivas de oxígeno.....	5
5. Fundamento del proyecto de investigación.....	6
6. Aplicaciones de las AuNPs y las TiO ₂ NPs.....	7
7. Síntesis de nanopartículas de oro esféricas	13
8. Recubrimiento tipo núcleo@coraza de AuNPs con TiO ₂	14
9. Representación de los cuatro cuadrantes de conteo en la cámara de Neubauer	20
10. Espectro de emisión del LED verde (502 nm) y UV (390 nm) reportado por el fabricante (StellarNet Inc)	22
11. Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT de la exposición de células con Au@TiO ₂ NPs y fuentes de luz	24
12. Evaluación de las especies reactivas de oxígeno producidas en la exposición de células 3T3-L1 con las Au@TiO ₂ NPs y fuentes de luz mediante el espectrofluorímetro	27
13. Estrategia para evaluar las especies reactivas de oxígeno mediante citometría de flujo	29
14. Estrategia para evaluar la internalización celular mediante citometría de flujo	31
15. Evolución de la LSPR de las AuNPs en los pasos de síntesis. Así como la concentración de oro [Au ⁰] experimental obtenido mediante espectrofotometría UV-Visible. Se incluyen imágenes de las dispersiones coloidales de oro.....	33
16. Espectro de absorción de los stocks de diferente volumen de AuNPs (G ₁) con su respectiva concentración de oro [Au ⁰]. Obtenido mediante espectrofotometría UV-Visible	33
17. Respuesta óptica y concentración de oro [Au ⁰] de la primera etapa (Síntesis de AuNPs, recubrimiento con HPC y lavado de NPs) en un medio de H ₂ O. Obtenido mediante espectrofotometría UV-Visible	34
18. Respuesta óptica y concentración de oro [Au ⁰], obtenidos mediante espectrofotometría UV-Visible. A) Segunda etapa (Transferencia a un medio de alcohol). B) Tercera etapa (Recubrimiento con TiO ₂).....	34

19. Distribución de tamaños (izquierda) y micrografías (derecha), obtenidos mediante TEM. A) AuNPs. B) Au@TiO₂NPs. C) Ilustración que indica el aumento de tamaño de las AuNPs al recubrirlas con TiO₂ (izquierda) y micrografías obtenidas mediante STEM de Au@TiO₂NPs (derecha) 35
20. Caracterización de las NPs en diferentes medios, mediante DLS. A) Potencial Z. B) Diámetro hidrodinámico 36
21. Caracterización de TiO₂ tipo P25. A) Respuesta óptica, mediante espectrofotometría UV-Visible. B) Estimación de la banda prohibida mediante el diagrama de Tauc. C) Micrografías del TEM 37
22. Evaluación de la viabilidad de células 3T3-L1 expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de AuNPs, P25, TiO₂ y Au@TiO₂NPs por ensayo de MTT. Los símbolos indican los valores promedio \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres ensayos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican de la siguiente forma: *(P<0.05), **(P<0.01), *** (P<0.001) y **** (P<0.0001)..... 38
23. Evaluación de la viabilidad de células 3T3-L1 expuestas a fuentes de luz por diferentes periodos de irradiación y distintos intervalos de medición, por ensayo de MTT. Los símbolos indican los valores promedio \pm desviación estándar (SD) de 10,000 células en triplicado para tres ensayos independientes. Las diferencias significativas se indican de la siguiente forma: **** (P<0.0001) 39
24. Evaluación de la viabilidad de células 3T3-L1 expuestas a diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs y distintas fuentes de luz mediante el ensayo de MTT. Los símbolos indican los valores promedio \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres ensayos independientes. Las diferencias significativas se indican de la siguiente forma: *(P<0.05), **(P<0.01), *** (P<0.001) y **** (P<0.0001) 40
25. Alteración en la morfología de las células 3T3-L1 expuestas a las Au@TiO₂NPs e irradiación con y sin fuentes de luz, obtenidas por el microscopio óptico invertido. La barra de escala indica 50 μ m 42
26. Generación de especies reactivas de oxígeno inducidas por las diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs en un medio de cultivo sin células. Los resultados son expresados con los promedios \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres experimentos independientes 43
27. Generación de especies reactivas de oxígeno, inducidas en la exposición de células 3T3-L1 con diferentes concentraciones de AuNPs, P25, TiO₂ y Au@TiO₂NPs durante 24 h mediante el espectrofluorímetro. Los resultados son expresados con los promedios \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican de la siguiente forma: ** (P<0.01) 43
28. Generación de especies reactivas de oxígeno en la exposición de células 3T3-L1 a luz verde y luz UV por 10 min, obtenidas mediante espectrofluorímetro. Los resultados son expresados con el promedio \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres experimentos independientes 44
29. Generación de especies reactivas de oxígeno inducidas en la exposición de células 3T3-L1 con diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs y fuentes de luz, evaluadas mediante el

- espectrofluorímetro. Los resultados son expresados como los promedios \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican de la siguiente forma: ****(P<0.0001) 45
30. Generación de especies reactivas de oxígeno en la exposición de células 3T3-L1 con diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs. A) Con exposición a las fuentes de luz. B) Sin exposición a las fuentes de luz. Los resultados son expresados con los promedios \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican de la siguiente forma: *(P<0.05) y ****(P<0.0001) 46
31. Complejidad interna de células 3T3-L1 tras la exposición con Au@TiO₂NPs mediante citometría de flujo. A) Posterior a la exposición con luz verde y luz UV. B) Sin exposición a las fuentes de luz. Los resultados son expresados con los promedios \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican de la siguiente forma: ***(P<0.001) y ****(P<0.0001) 48
32. Mecanismos propuestos de acuerdo a los resultados obtenidos, que ocurren en la exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs tras la irradiación con las diferentes fuentes de luz 58
33. Diseño experimental con fuente LED para los ensayos *in vitro* 65

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Comparación entre los parámetros de síntesis de AuNPs de Bastús et al. (2011) y las AuNPs utilizadas por Seh et al. (2012) para el recubrimiento de TiO ₂	16
2. Concentraciones inhibitorias medias de Au@TiO ₂ NPs para la línea celular de fibroblastos al irradiar con diferentes fuentes de luz.	41

Capítulo 1. Introducción

1.1 Cicatrización de heridas

La cicatrización de heridas representa uno de los desafíos más antiguos y persistentes, debido a que la piel es el órgano más grande del ser humano y es considerado uno de los tejidos más vulnerables por el contacto directo con el mundo exterior. Aunque la mayoría de las lesiones se pueden restaurar básicamente a su apariencia original, en adultos es difícil lograrlo en su totalidad. El mecanismo de reparación de heridas cutáneas se divide en cuatro procesos continuos y coordinados, que incluyen hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. En el proceso, los fibroblastos desempeñan un papel importante en la reparación de heridas porque producen moléculas de matriz extracelular, como el colágeno tipo I y secretan factores de crecimiento esenciales como el factor de crecimiento endotelial vascular. Estos factores derivados de fibroblastos son necesarios para que las células endoteliales germinen, lo que hace que el epitelio se mueva hacia el centro de la herida y promueva su cicatrización (Liang et al., 2021).

1.2 Nanomateriales

Los nanomateriales pertenecen al campo de la nanotecnología, la cual es una ciencia que estudia la materia en escala de 1 a 100 nm. Las nanopartículas (NPs) presentan propiedades diferentes a los materiales a granel y se utilizan ampliamente para aplicaciones biomédicas como ingeniería de tejidos, basándose en su carácter fisicoquímico y fotocatalítico. Las características de las NPs como la morfología, tamaño, química de superficie y composición, afectan sus propiedades fisicoquímicas, lo que influye en sus efectos nanotoxicológicos al interactuar con los sistemas biológicos, incluida la reducción en la viabilidad celular, internalización, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), biodistribución y la farmacocinética. Incluso, la exposición a las NPs puede afectar las estructuras/orgánulos intracelulares y alterar las funciones asociadas con cambios morfológicos (Mezni et al., 2021; Yadid et al., 2019), por lo que la elección de los materiales a utilizar y el estudio de su toxicidad son relevantes en este trabajo.

El dióxido de titanio (TiO₂), un semiconductor con buena estabilidad química, biocompatible, alta actividad

fotocatalítica, alto índice de refracción (~ 2.4) y baja toxicidad (Figura 1). Es el fotocatalizador más utilizado para producir ROS. Sin embargo, el TiO_2 sólo puede excitarse en la región UV (200–400 nm) debido a su amplia banda prohibida (3.0 \sim 3.2 eV). Además, la tasa de recombinación de pares electrón-hueco generados es alta, lo que resulta en una disminución de la actividad catalítica. Por ello, se considera adicionar nanopartículas de metales nobles como el oro (Au), platino (Pt) o plata (Ag) que presentan el efecto de resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR, por sus siglas en inglés). Este efecto puede describirse como la oscilación colectiva de electrones inducida por fotones resonantes, un fenómeno óptico que puede mejorar eficazmente la absorción óptica (Wang et al., 2022). Se prefieren las AuNPs debido a su alta capacidad de absorción en la región visible, buena estabilidad (inerte), excelente biocompatibilidad y no presenta toxicidad (Figura 1). Sin embargo, para que las AuNPs extiendan el rango de absorción, su LSPR debe ajustarse a la región de emisión de la luz, controlando el tamaño y la forma de las AuNPs. De esta manera, se aprovecha la sinergia de las propiedades ópticas y electrónicas de Au- TiO_2 , así pueden actuar para mejorar las tasas de separación entre electrones y huecos, aumentando la eficiencia fotocatalítica (T. Zheng et al., 2019).

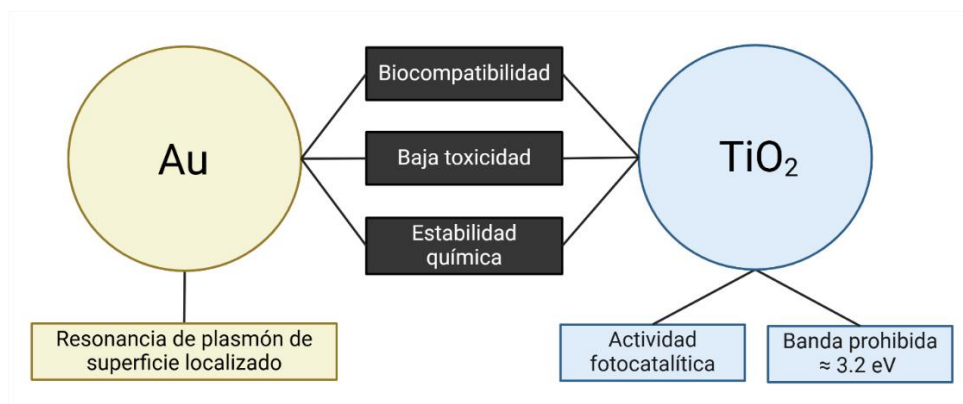


Figura 1. Propiedades de las AuNPs y las TiO_2 NPs

Este tipo de nanopartículas metal@semiconductor responden a diversos cambios de estímulos físicos (campos magnéticos, térmicos y eléctricos) y químicos (pH, fuerzas iónicas y enzimas). Una característica única de estos fotocatalizadores es que la nanoestructura plasmónica interactúa con la luz a través de una excitación de LSPR. La luz tiene alta resolución espacial y muestra un comportamiento no invasivo en longitudes de onda más largas, lo que la convierte en un excelente medio dinámico para la manipulación sin contacto de NPs, siendo una forma no perjudicial de controlar los biomateriales desde una perspectiva fisiológica. La luz ultravioleta (UV) (100–400 nm) y la luz visible (400–750 nm) se usan para tratar tejidos superficiales, mientras que la radiación infrarroja cercana (NIR, por sus siglas en inglés) (750–2500 nm), se usa para tratar tejidos en mayores profundidades (Choi et al., 2022).

1.3 Mecanismos en la exposición de nanopartículas a fuentes de luz

La interacción de NPs con luz puede provocar el efecto fotocatalítico y fototérmico. El TiO_2 sigue el modelo convencional de generación de ROS fotocatalíticas, que se ilustra en la Figura 2. La energía en que los electrones de TiO_2 pueden transitar desde la banda de valencia a la banda de conducción se encuentra en el rango UV. Los fotones con energía superior a la banda prohibida excitan los electrones y los mueven de la banda de valencia a la banda de conducción, generando pares electrón-hueco que reaccionan con el medio para producir ROS. Los electrones excitados liberan energía térmica cuando regresan a la banda de valencia para estabilizar el nivel de energía (Choi et al., 2022).

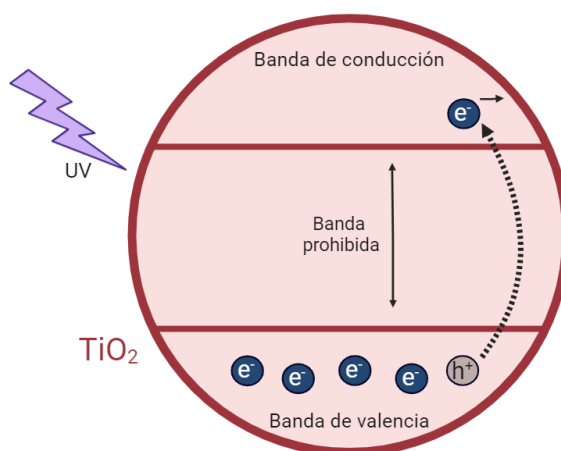


Figura 2. Sistema convencional de generación de ROS fotocatalíticas

Incorporar Au en TiO_2 demuestra una eficiente absorción de luz mediante la resonancia de plasmón de superficie localizado que es producido por radiaciones electromagnéticas cuyos constituyentes eléctricos provocan la excitación de electrones libres en el metal. Esta excitación da como resultado la oscilación colectiva de electrones en la región visible (Sarfraz & Khan, 2021). Cuando las partículas vibran por la energía externa, la energía cinética de los electrones aumenta, haciendo que el material genere calor (Choi et al., 2022). El efecto fotocatalítico mejorado con Au- TiO_2 puede ocurrir mediante mecanismos de transferencia de energía protagonizados por LSPR, esta combinación mejora la concentración de portadores de carga y la velocidad de las reacciones fotocatalíticas en el semiconductor cercano. El mecanismo de inyección de carga de metal a semiconductor (Figura 3) puede ocurrir mediante luz visible al utilizar oro, los portadores de carga se inyectan directamente desde nanoestructuras plasmónicas excitadas en la superficie del semiconductor. Ambos materiales deben estar en contacto directo entre sí. Este mecanismo ejecuta semirreacciones en semiconductores como la producción de ROS. Existe otro mecanismo que ocurre al irradiar Au- TiO_2 con luz visible y luz UV, se trata del mecanismo electromagnético

de campo cercano (PIRET) (Figura 3), su ventaja es que puede ocurrir en sistemas donde el semiconductor y el metal plasmónico estén separados entre sí por espaciadores no conductores que impidan el intercambio directo de carga entre los dos materiales. Se basa en la interacción del semiconductor con fuertes campos eléctricos inducidos por LSPR cerca de la nanoestructura metálica. Como la tasa de formación del par electrón-hueco en un semiconductor es proporcional a la intensidad local del campo eléctrico, la tasa de formación del par electrón-hueco aumenta en algunas regiones del semiconductor (Linic et al., 2011).

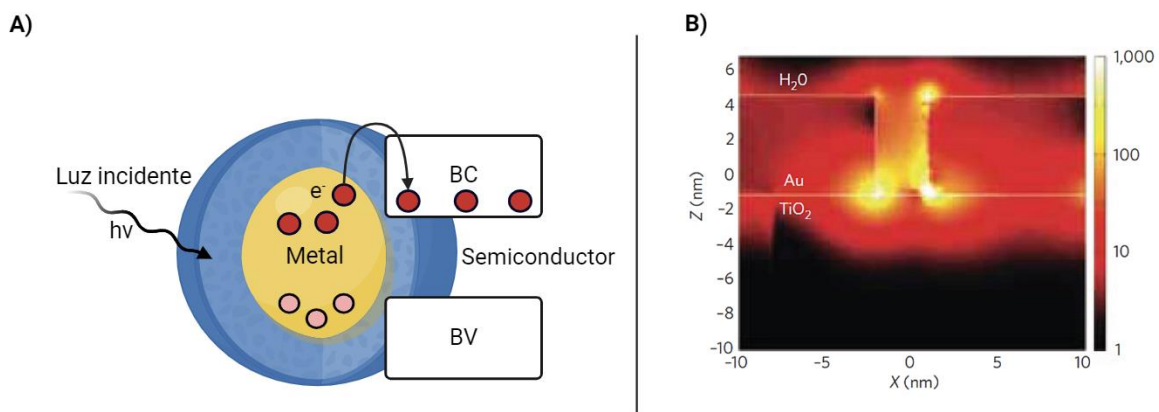


Figura 3. Mecanismos de transferencia de energía inducidos por la LSPR en metal@semiconductor. A) Inyección de electrones calientes. B) Transferencia de energía resonante inducida por plasmones (PIRET) [Extraída de Linic et al. (2011)]

Como tecnología no invasiva, la terapia fotodinámica basada en nanopartículas (NPs) ha despertado un gran interés en mejorar la cicatrización de heridas. Al ajustar fotodinámicamente la temperatura de las heridas puede promover la proliferación celular y generar especies reactivas de oxígeno, desempeñando así un papel beneficioso en la regeneración de tejidos (G. Cheng & Li, 2020).

1.4 Especies reactivas de oxígeno

Las ROS son partículas químicamente reactivas y se forman por la reducción química de O_2 , incluyen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales superóxidos (O_2^-) y radicales hidroxilos ($\cdot OH$). Las ROS se producen como una respuesta natural al metabolismo normal del oxígeno, el cual es esencial para la persistencia celular, aunque puede tener algunos efectos nocivos cuando son sobreproducidas (Yu et al., 2020). Las mitocondrias desempeñan un papel de señalización esencial a través de su producción de ROS, regulando procesos importantes necesarios para la proliferación celular. Se define un modelo en el que niveles muy

bajos de ROS promueven la homeostasis celular normal, mientras que se requieren aumentos precisos de ROS para la proliferación celular y la adaptación al estrés (Diebold & Chandel, 2016). Además, las NPs producen efectos en las células, una vez que las NPs se adsorben en la superficie celular, pasan a través de la membrana hacia el espacio intracelular, donde inducen la generación de ROS, esto puede producir genotoxicidad, apoptosis y necrosis, disminuyendo la viabilidad celular (Yu et al., 2020). En la Figura 4 se resume el impacto de la generación de ROS.

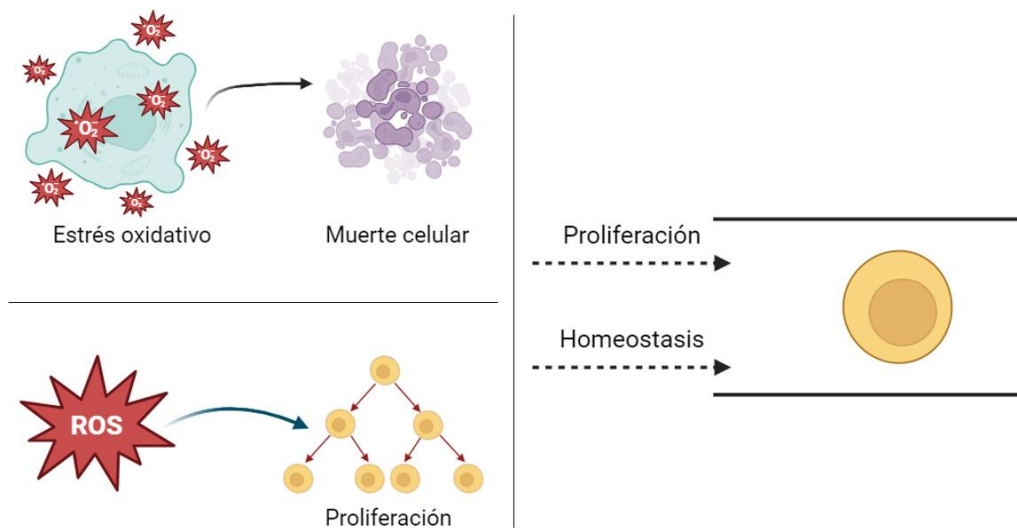


Figura 4. Efectos inducidos en células mediante la generación de especies reactivas de oxígeno

1.5 Línea celular de fibroblastos 3T3-L1

Los fibroblastos 3T3-L1 contribuyen a la formación de tejido conectivo con gran potencial para diferenciarse en adipocitos, antes de esta conversión sintetizan grandes cantidades de colágeno, un componente importante de la matriz extracelular, que está implicado en la remodelación de tejido. Las ventajas de diferenciarse en adipocitos, son la capacidad de migrar a las heridas para limpiarlas de restos celulares y liberar péptidos antimicrobianos para combatir la infección, también promueve la proliferación y migración de preadipocitos. Además, los adipocitos dérmicos generan miofibroblastos para reparar el daño de la piel después de la lipólisis y liberan ácidos grasos en las heridas.

Por las funciones mencionadas anteriormente, se considera que el tejido adiposo desempeña un papel crucial en el proceso de cicatrización de heridas, participando en la respuesta inmune, inflamación, angiogénesis, adipogénesis y reepitelización (Pan et al., 2021; Siebert et al., 2016).

1.6 Fundamento del proyecto

En esta investigación, nuestro propósito es encontrar la biocompatibilidad óptima, generar el efecto fototérmico y producir especies reactivas de oxígeno en la exposición de células con Au@TiO₂NPs e irradiación con fuentes de luz, potenciando el efecto fotocatalítico de manera sinérgica entre el Au y el TiO₂. De esta manera inducir la proliferación celular en un modelo de fibroblastos 3T3-L1 para una perspectiva futura en cicatrización de heridas. El fundamento del proyecto se observa en la Figura 5.

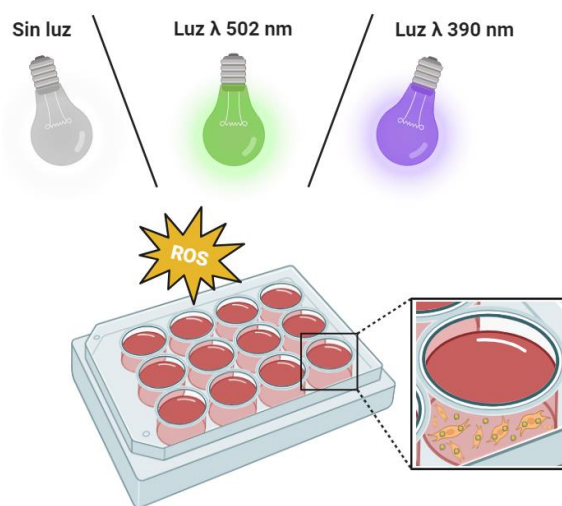


Figura 5. Fundamento del proyecto de investigación

1.7 Antecedentes

1.7.1 Aplicaciones de las nanopartículas de oro y el dióxido de titanio

Las AuNPs son estables (inertes) y no tóxicas en una amplia variedad de entornos con propiedades optoelectrónicas controlables. Debido a estos beneficios, las AuNPs se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones que van desde el sector ambiental y energético hasta los campos biomédicos. Otra de sus ventajas es la capacidad de ingresar en los tejidos conectivos, por lo que logran penetrar hasta la célula diana de manera muy eficiente y efectiva para administrar fármacos (Sarfraz & Khan., 2021). Además, en la revisión de Lee et al. (2020) se expone la capacidad de unirse con otros materiales mediante la modificación de la superficie. Estas interacciones producen AuNPs modificadas que también son adecuadas para liberar fármacos. Por ejemplo, al tratar con 10 μM de AuNPs conjugadas con

doxorubicina, se inhibió la proliferación celular del 50% al 60% en comparación con la doxorubicina libre.

Por otra parte, las TiO₂NPs se han utilizado en nanomedicina gracias a su alta biocompatibilidad, capacidad de liberación de fármacos y baja toxicidad. También se utilizan en productos farmacéuticos, cosméticos (protectores solares), métodos de diagnóstico y en electrónica (Ilyas et al., 2021). En el trabajo de Sagadevan et al. (2022) se describen algunos estudios, entre ellos, los nanoconjugados de TiO₂ exhibieron efectos antivirales contra el virus de la influenza (H3N2) a través de un mecanismo de interacción directa. También han demostrado actividad antiviral contra la influenza aviar (H9N2). Además, las NPs de TiO₂ se han estudiado por su eficaz actividad antioxidante. Incluso, Ilyas et al. (2021) resaltaron la buena actividad anticancerígena, por ejemplo, contra células de cáncer de mama humano (MCF-7). Varios informes han demostrado que las actividades de TiO₂NPs y AuNPs son muy efectivas contra diferentes cepas de hongos, bacterias y virus (Ilyas et al., 2021; Lee et al., 2020). Ambos materiales comparten algunas aplicaciones dentro del área biomédica, las cuales se observan en la Figura 6.

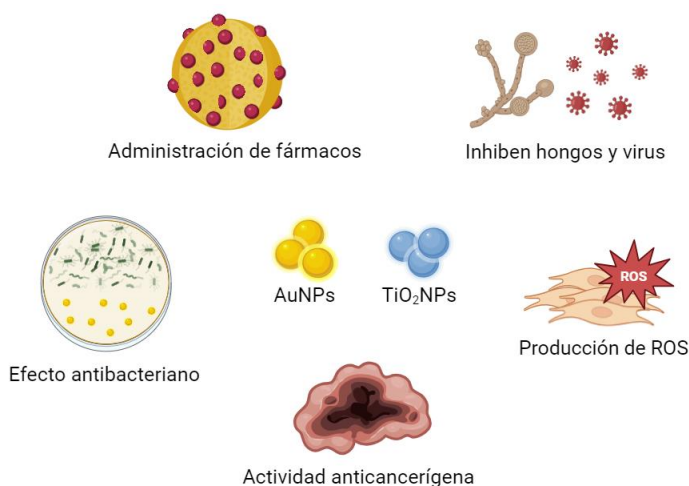


Figura 6. Aplicaciones de las AuNPs y las TiO₂NPs

1.7.2 Efectos nanotoxicológicos de las nanopartículas de oro y el dióxido de titanio

La interacción entre los nanomateriales y los sistemas biológicos se producen de diversas maneras, dependiendo de las propiedades de las NPs y del tipo de célula, empleando diferentes rutas de absorción o dirigiéndose a diferentes orgánulos. La toxicidad de una nanopartícula es una de las preocupaciones para su adaptación en aplicaciones biomédicas (Elahi et al., 2018). Las nanoestructuras comúnmente demuestran efectos a través del daño de la membrana, la disfunción de las proteínas, la mutación del ADN,

la apoptosis y el comportamiento diferente de proliferación. El principal mecanismo de toxicidad de las NPs son las ROS y su posterior producción de estrés oxidativo (Jafari et al., 2020).

La metodología de síntesis también puede influir en la toxicidad, como el agente estabilizante utilizado y el medio de dispersión de las NPs. En un informe sobre la citotoxicidad de las AuNPs recubiertas de citrato, se observó que estas partículas no son citotóxicas. Además, la toxicidad también depende del tamaño y la concentración. Se descubrió que las AuNPs cuyo tamaño era <2 nm causaron daño oxidativo a la estructura mitocondrial y condujeron la destrucción de las células (Nejati et al., 2022). También evaluaron AuNPs con diámetros que oscilaban entre 0.8 y 15 nm, en varios tipos de células (epiteliales, endoteliales, macrófagos y fibroblastos). Descubrieron que todos los tamaños estaban endocitados y las partículas de 1.4 y 1.2 nm causaron la muerte celular por necrosis y apoptosis, respectivamente. Por el contrario, las de 15 nm, no fueron tóxicas. Otro factor que influye en la toxicidad es la corona orgánica que rodea al oro. Una vez que las partículas se introducen en medios fisiológicos, su superficie queda cubierta por otros factores que pueden afectar tanto su citotoxicidad como su función (Yadid et al., 2019).

Las AuNPs presentan muy poca toxicidad en los tejidos debido a su biocompatibilidad. La preocupación es utilizar estas NPs en concentraciones altas y en un plazo relativamente largo. Aunque su propiedad citotóxica se suele utilizar para tratar ciertos trastornos, en ocasiones puede revertirse, es decir, puede dañar también las células sanas (Sarfranz & Khan, 2021).

Varios estudios han demostrado que el tratamiento de fibroblastos dérmicos humanos con AuNPs altera la morfología celular, como redondeo, encogimiento y granulación; pero no afecta la viabilidad celular (Mateo et al., 2015). En la revisión de Lee et al. (2020) estudiaron las NPs en modelos animales *in vivo* y se encontró que el daño causado por las AuNPs no fue permanente ya que las células pudieron recuperarse después de la eliminación de las AuNPs. Se produjo una recuperación casi completa de las células después de 14 días de eliminación de AuNPs (13 nm y 45 nm de diámetro). Mientras que, Mezni et al. (2021) mencionan que la forma dopada Au-TiO₂ provocó alteraciones en las células, orgánulos/estructuras y funciones que condujeron a riesgos para la salud humana.

En general, el dióxido de titanio es un óxido metálico inofensivo y no tóxico en concentraciones moderadas. En el trabajo de Geppert et al. (2020) se evaluaron TiO₂NPs en fibroblastos dérmicos humanos normales neonatales (nNHDF) sin causar pérdida en la viabilidad celular hasta la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 h y no alteró la producción de ROS. Por otro lado, en el trabajo de Anh Nga et al. (2024) indicaron que las TiO₂NPs mostraron citotoxicidad dependiente de la concentración y el tiempo, en tres

líneas de células hepáticas normales y cancerosas de humanos (HL-7702, SMMC-7721 y CBRH-7919) y una línea de células hepáticas (BRL-3A) de rata.

La fase cristalina de los materiales es importante. Por ejemplo, el potencial de genotoxicidad varía según la fase cristalina del TiO_2 , de modo que la genotoxicidad de la fase anatasa es más inductora que la fase rutilo porque las partículas más pequeñas con una superficie más grande aumentan los efectos secundarios, mientras que ambas causaron la producción de ROS y daño en el ADN (Jafari et al., 2020). Las TiO_2 NPs fueron declaradas carcinógenas del grupo 2B, ya que pueden ser cancerígenas para los seres humanos sometidos a grandes dosis y se consideran una causa potencial de inducción de daños en el ADN en ratones y seres humanos (células epidérmicas y células de la médula ósea) (Sagadevan et al., 2022). Esta serie de antecedentes remarcan la importancia de estudiar los efectos de las NPs en el sistema biológico de interés para evidenciar la seguridad en las aplicaciones biomédicas.

1.7.3 Exposición de nanopartículas a fuentes de luz

El efecto fototérmico puede ocurrir en la exposición de NPs a fuentes de luz. Cuando la frecuencia de la radiación electromagnética incidente es análoga al de los electrones libres de Au, los electrones se excitan colectivamente y producen resonancia, lo que convierte la energía lumínica en energía cinética de los electrones y esta a su vez en energía térmica, por lo tanto, aumenta el calor local. Cuando la luz UV incide en el TiO_2 , los fotones con energía superior a la banda prohibida de TiO_2 (≈ 3.2 eV) son absorbidos por los electrones en la banda de valencia y saltan a la banda de conducción, formando pares electrón-hueco. Después de eso, a través de la relajación radiativa de los fotones (re-radiación) ante la recombinación o la relajación no radiativa de los fonones (calentamiento), la energía se transfiere a la superficie del TiO_2 y los electrones excitados finalmente regresan al borde de la banda de valencia; es importante resaltar que una liberación de energía en forma de fonones provoca un calentamiento local (S. Cheng et al., 2024). Esto lo corrobora experimentalmente T. Zheng et al. (2019) con Au@TiO_2 NPs, utilizando irradiación láser de 635 nm durante 5 min y demuestran el efecto fototérmico con un aumento de calor en la solución de H_2O dependiente de la concentración de NPs.

Se ha demostrado que incidir luz UV en las TiO_2 NPs también provoca el efecto fotocatalítico, esto mejora el resultado antimicrobiano, antifúngico y antiviral. Sus características fotocatalíticas crean radicales libres con amplia reactividad contra varios microbios patógenos (Anh Nga et al., 2024). Estas NPs también ofrecieron ventajas en la terapia fotodinámica al producir ROS que condujeron a la muerte celular

mediante luz UV (Sagadevan et al., 2022). En la revisión de Jafari et al. (2020) informaron que las TiO₂NPs exhibieron potencial de liberar fármacos anticancerígenos en la piel controlada por luz UV, siendo un inconveniente la necesidad de irradiar con luz ultravioleta para activar el fotocatalizador. Sin embargo, los autores destacan el uso de fotocatalizadores activados por luz visible con nanoestructuras de TiO₂ dopadas para resolver el problema.

La terapia fototérmica es la principal aplicación de las AuNPs en biomedicina. Cuando las AuNPs se irradiaron con luz, la energía de los fotones de luz fue absorbida por las AuNPs y se transformó en energía térmica, lo que provocó un aumento de temperatura local de las AuNPs destruyendo células tumorales en las primeras etapas del tumor (Nejati et al., 2022; Sarfraz & Khan, 2021). En el trabajo de Seh et al. (2012) se investigaron las actividades fotocatalíticas de las nanopartículas de oro (50 nm) y las nanopartículas amorfas de TiO₂, ambas resultaron muy bajas bajo irradiación con luz visible. Por otro lado, utilizando fotocatalizadores núcleo@coraza de Au@TiO₂NPs, la tasa de generación de hidrógeno en luz visible aumentó significativamente, lo que indica una interacción sinérgica entre el oro y el TiO₂ para una actividad fotocatalítica mejorada.

1.7.4 Función de fibroblastos para cicatrización de heridas

Los fibroblastos son fundamentales en la cicatrización de heridas y desempeñan un papel clave en la deposición de componentes de la matriz extracelular (MEC), la contracción de la herida y la remodelación de nueva MEC. Los fibroblastos dérmicos surgen de dos linajes diferentes. El linaje dérmico superior está involucrado con los folículos pilosos, mientras que el inferior sintetiza la MEC, además, se relaciona con los adipocitos y es en gran medida responsable de la reparación dérmica después de una herida. A su vez, los fibroblastos crean una red de conexiones entre las células circundantes que participan en el proceso de cicatrización de heridas mediante la comunicación intercelular mediada por el contacto directo entre los fibroblastos y las células inmunitarias, mastocitos y queratinocitos (Stunova & Vistejnova, 2018).

Dentro de los tratamientos para reparación de heridas, han utilizado un hidrogel autocurativo cargado con fibroblastos L929. También se informó que los hidrogeles cargados con queratinocitos epidérmicos humanos y fibroblastos dérmicos promueven sinérgicamente una mejor reparación de heridas (Liang et al., 2021).

1.8 Hipótesis

La exposición de fibroblastos a Au@TiO₂NPs y luz verde genera especies reactivas de oxígeno y favorece la proliferación celular.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

Evaluar la generación de ROS en fibroblastos producidos por nanopartículas de oro-TiO₂ tipo núcleo-coraza al ser expuestos a irradiación con diferentes fuentes de luz y evaluar su efecto sobre la viabilidad celular.

1.9.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar nanopartículas de oro con morfología esférica.
2. Obtener nanopartículas de oro recubiertas con TiO₂ tipo núcleo-coraza.
3. Caracterizar las propiedades ópticas y estructurales de las nanopartículas obtenidas.
4. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y estructurales de polvo nanoestructurado de TiO₂ comercial (tipo P25).
5. Monitorear la generación de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) producidas por los fibroblastos expuestos a diferentes concentraciones de las nanopartículas.
6. Determinar la concentración óptima de nanopartículas en la que sean biocompatibles *in vitro* en fibroblastos.
7. Determinar el efecto de la exposición a diferentes fuentes de luz, en la biocompatibilidad de fibroblastos.
8. Cuantificar la generación de especies de oxígeno altamente reactivas producidas en cultivos celulares de fibroblastos con las distintas nanopartículas.

Capítulo 2. Metodología

En esta sección se detalla el procedimiento utilizado para la síntesis de nanopartículas de oro recubiertas con dióxido de titanio tipo núcleo@coraza y las técnicas de caracterización empleadas. Así como los diseños experimentales *in vitro* para su evaluación en la línea celular 3T3-L1.

2.1 Síntesis de nanopartículas de oro con morfología esférica

Se sintetizaron nanopartículas de oro (AuNPs) en solución acuosa estabilizadas con citrato de sodio con morfología esférica por medio de una estrategia de crecimiento con semillas controlado cinéticamente mediante la reducción de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) 25 mM por citrato trisódico dihidratado (CS) 2.2 mM. La síntesis de AuNPs fue reportada por Bastús et al. (2011), que inicia con la síntesis de semillas de oro estabilizadas mediante la adsorción de las moléculas de citrato de sodio, que brindan estabilidad en H_2O por la electrostática de la carga global negativa que proporciona a la partícula, además, tiene el papel de solución amortiguadora para mantener un pH constante de 7 durante la reacción. El paso posterior a la síntesis de semillas es su crecimiento controlando el tamaño, morfología y concentración, mediante un procedimiento iterativo para lograr las nanopartículas deseadas. La metodología de síntesis de AuNPs se ilustra en la Figura 7.

El criterio para elegir el tamaño óptimo de AuNPs se basó en la baja toxicidad de las NPs que se encuentran en el rango de 10-1000 nm de diámetro (Kii & Park, 2021); en cuestión óptica, las NPs más pequeñas absorben más luz y eventualmente podrían producir más especies reactivas de oxígeno, las NPs con tamaños grandes dispersan más la luz y al dispersarla más y absorberla menos, no energizan electrones que pueden generar ROS. Además, se requiere utilizar luz verde para su excitación con un diodo emisor de luz (LED, por sus siglas en inglés) con una longitud de onda de 502 nm. De acuerdo a este criterio, el objetivo fue sintetizar AuNPs con resonancia de plasmón de superficie localizado en 524 nm que corresponde al rango de diámetro entre 20 y 25 nm según lo reportado por Bastús et al. (2011).

2.1.1 Síntesis de semillas de Au

Se calentó una solución de citrato de sodio a 2.2 mM en agua Milli-Q con agitación vigorosa hasta que

alcanzó su punto de ebullición, posteriormente se inyectó HAuCl_4 (25 mM) y se mantuvo la agitación durante 10 min donde el color de la solución cambió a carmesí claro indicando la formación de semillas de oro (Au).

2.1.2 Crecimiento de semillas de Au

Inmediatamente después de la síntesis de las semillas de Au, se disminuyó la temperatura de la dispersión hasta que alcanzó 90°C . Después se inyectó HAuCl_4 (25 mM) y se mantuvo la agitación durante 30 min para que termine la reacción. Se repitió este proceso una vez más llegando a la primera generación (G_1). Después, la dispersión se diluyó extrayendo una cantidad de muestra y se agregó un volumen equivalente de agua Milli-Q y citrato de sodio 60 mM. Esta dispersión se utilizó como semilla para la siguiente generación y se repitió el proceso iterativamente hasta obtener el tamaño de NPs deseado. Además, se escaló la síntesis a diferentes volúmenes de dispersión de NPs de acuerdo a lo requerido por los ensayos *in vitro*.

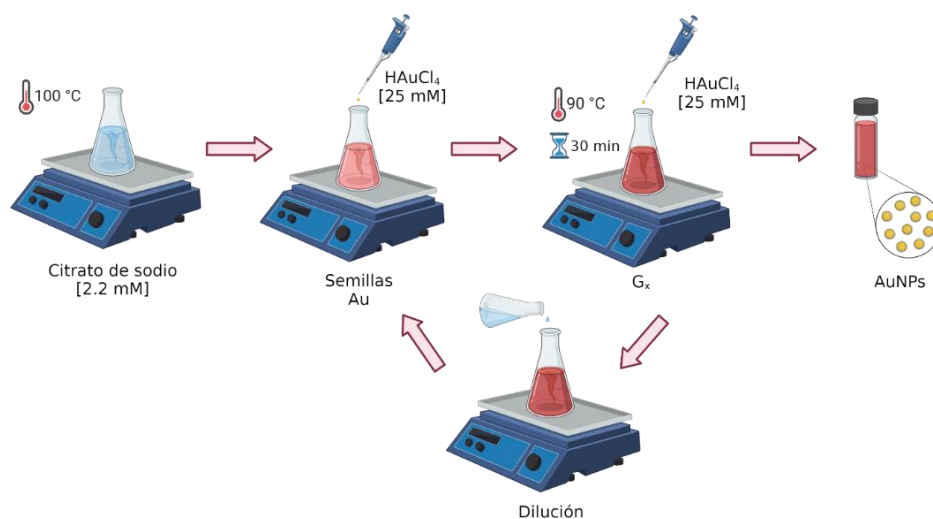


Figura 7. Síntesis de nanopartículas de oro esféricas

2.2 Nanopartículas de oro recubiertas con TiO_2 tipo núcleo@coraza

Los fotocatalizadores $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ se sintetizaron mediante la hidrólisis controlada de un precursor de TiO_2 , diisopropóxido de titanio bis(acetilacetato) (TDAA), en una solución de alcohol isopropílico 4:1 v/v

(isopropanol:H₂O; pH = 9-10) de nanopartículas de oro a temperatura ambiente según lo reportado por Seh et al. (2012). La metodología de recubrimiento tipo núcleo@coraza se ilustra en la Figura 8.

El coloide de AuNPs resultante de la metodología de Bastús et al. (2011) se agitó durante 12 h en una solución acuosa de hidroxipropilcelulosa (0.5% en peso) y al finalizar la agitación se realizaron dos lavados para eliminar el exceso de polímero. La función del recubrimiento con estas cadenas de polímero fue brindar impedimento estérico para estabilizar el coloide de NPs al transferirlas a un medio de alcohol en el siguiente paso, ya que las moléculas de citrato ya no quedan totalmente adsorbidas y desestabiliza la carga. A continuación, la dispersión acuosa de AuNPs se mezcló con isopropanol (alcohol 4:1 NPs en H₂O) y amoníaco (28% en peso) para mantener las condiciones adecuadas de la reacción sol-gel en el recubrimiento de TiO₂, el amoníaco apoyó en la regulación de pH= 9-10 y el isopropanol se utilizó como agente homogeneizador debido a la escasa miscibilidad entre el agua y el precursor de TiO₂. Para recubrir las AuNPs con TiO₂ tipo núcleo@coraza se añadió el precursor bis(acetilacetato) de diisopropóxido de titanio (10 mM en isopropanol) en tres porciones iguales a intervalos de una hora, seguida de una agitación durante 20 h a temperatura ambiente.

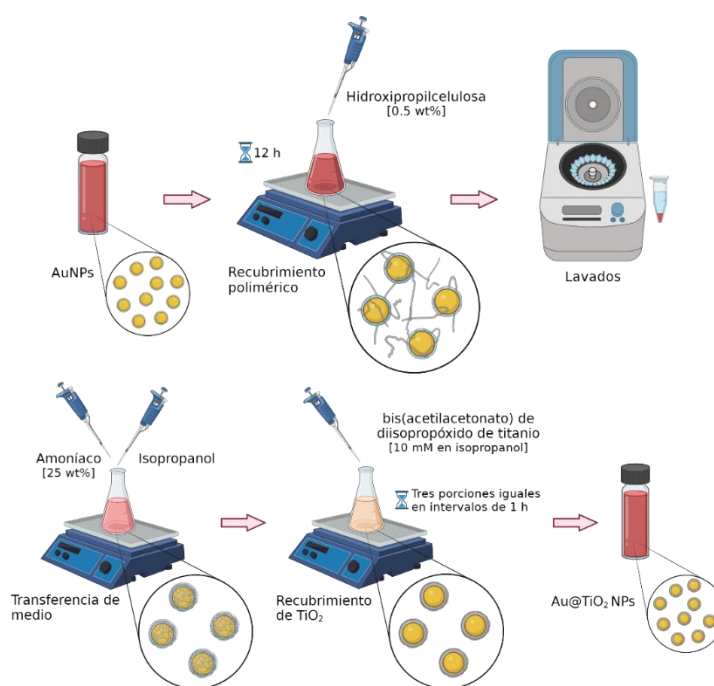


Figura 8. Recubrimiento tipo núcleo@coraza de AuNPs con TiO₂

Se adaptaron los parámetros de la metodología de síntesis de AuNPs de Bastús et al. (2011) con la metodología de recubrimiento de las AuNPs utilizadas por Seh et al. (2012) para el recubrimiento de TiO₂, siguiendo una serie de ecuaciones para calcular estos parámetros con base en los datos reportados en

ambas metodologías. El número de NPs y la superficie disponible de NPs se calcularon de manera directa mediante las Ecuaciones (1)-(3) a partir del dato utilizado de concentración de NPs por Seh et al. (2012) en su metodología.

$$[NPs] = \frac{\#NPs}{V_{Sol}} \quad (1)$$

$$S_{Esf} = (4)(\pi)(r^2) \quad (2)$$

$$S_{Disp} = (S_{Esf})([NPs]) \quad (3)$$

Donde [NPs] = concentración de nanopartículas, #NPs = número de nanopartículas, V_{Sol} = volumen total de la dispersión de nanopartículas, S_{Disp} = superficie disponible de las nanopartículas y S_{Esf} = superficie de una esfera.

También se estimaron los mismos parámetros para los coloides de AuNPs sintetizados con la metodología de Bastús et al. (2011) a partir de la concentración de $[Au^0]$ con las Ecuaciones (4)-(6) para calcular primero el volumen de oro en la dispersión.

$$n_{Au} = (M)(V) \quad (4)$$

$$m_{Au} = (W_{Au})(n_{Au}) \quad (5)$$

$$V_{Au} = \frac{m_{Au}}{\rho_{Au}} \quad (6)$$

Donde n_{Au} = cantidad de oro en moles, M = concentración de Au^0 molar, V = volumen de la dispersión, m_{Au} = masa de oro, W_{Au} = masa atómica del oro, V_{Au} = volumen de oro metálico (Au^0) en la dispersión y ρ_{Au} = densidad del oro.

Posteriormente, con las Ecuaciones (7) y (8) se calculó el número de NPs presente en el coloide y finalmente con las Ecuaciones (1)-(3) se estimó la concentración de NPs y la superficie disponible de las

NPs. Con estos datos se pudo equiparar la superficie disponible de las NPs en nuestros coloides con las condiciones del recubrimiento de TiO₂ reportado por Seh et al. (2012).

$$V_{Esf} = \left(\frac{4}{3}\right) (\pi)(r^3) \quad (7)$$

$$\#NPs = \frac{V_{Au}}{V_{Esf}} \quad (8)$$

Donde V_{Esf} = volumen de una esfera, r = radio de las nanopartículas, $\#NPs$ = número de nanopartículas y V_{Au} = volumen de oro metálico (Au⁰) en la dispersión.

La comparación entre el resultado estimado a partir de la concentración [Au⁰] para nuestros coloides recién sintetizados con la metodología de Bastús et al. (2011) y el requerimiento por la metodología de Seh et al. (2012) se muestra en la Tabla 1. Es necesario concentrar nuestro coloide para equiparar las condiciones de Seh et al. (2012).

Tabla 1. Comparación entre los parámetros de síntesis de AuNPs de Bastús et al. (2011) y las AuNPs utilizadas por Seh et al. (2012) para el recubrimiento de TiO₂.

Parámetro	(Bastús et al., 2011) Diámetro AuNPs = 24 nm	(Seh et al., 2011, 2012) Diámetro AuNPs = 50 nm
[Au ⁰] (mM)	3	0.29
#NPs	8.5 X 10 ¹²	2.2 X 10 ¹³
[NPs] (NPs/mL)	4.2 X 10 ¹²	4.5 X 10 ¹⁰
[S _{Disponible}] (nm ² /mL)	7.7 X 10 ¹⁵	3.5 X 10 ¹⁴

2.3 Caracterización fisicoquímica de los materiales

2.3.1 Espectroscopía de absorbancia de luz ultravioleta-visible (UV-Visible)

La espectroscopia ultravioleta-visible es una técnica analítica donde se ilumina la muestra con rayos

electromagnéticos de varias longitudes de onda en el rango ultravioleta (UV), visible (Vis) e infrarrojo cercano (NIR). La muestra absorbe la luz a una o varias longitudes de onda, generando una relación única entre la muestra y su espectro de absorción.

Esta técnica se utilizó para determinar la concentración de oro [Au^o] y analizar la posición y desplazamiento del LSPR en el espectro de absorción de cada etapa de síntesis de Au@TiO₂NPs. El análisis de la muestra de AuNPs se realizó con una celda de cuarzo de 1 mm de paso óptico; para Au@TiO₂NPs y el TiO₂ tipo P25 se realizó con una celda desechable de plástico de 10 mm de paso óptico. Los espectros de absorción UV-Visible se adquirieron mediante un espectrofotómetro (Agilent, Cary 60). El análisis espectral se realizó en el rango de λ 200 a 800 nm a temperatura ambiente con una configuración de tiempo de integración media.

En el caso del P25, se utilizó el diagrama de Tauc para estimar la banda prohibida. Es un método que traza una gráfica de $(\alpha h\nu)^{1/n}$ frente a la energía del fotón ($h\nu$) a partir de la absorbancia óptica. La intersección de la tangente a la curva proporciona una aproximación de la energía de banda prohibida de la muestra. La Ecuación (9) describe el diagrama de Tauc.

$$(\alpha h\nu)^{\frac{1}{n}} = A(h\nu - E_g) \quad (9)$$

Donde α = coeficiente de absorción, h = constante de Plank, ν = frecuencia de la radiación de fotones incidentes, E_g = energía de banda prohibida. A es una constante dependiente de la energía y también se conoce como parámetro de cola de banda. Otra constante es n , que se conoce como factor de potencia del modo de transición de los materiales.

Los valores de n : para transiciones directas = 1/2, indirectas = 2, directas prohibidas = 3/2 e indirectas prohibidas = 3. El TiO₂ tipo P25 se considera un material de banda prohibida directa. Por lo tanto, el valor de n es 1/2 para trazar el grafico $(\alpha h\nu)^2$ vs $h\nu$ (Hossain et al., 2018).

2.3.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopia electrónica de transmisión es una técnica de alta resolución que utiliza un haz de electrones que atraviesa la muestra formando micrografías, donde las áreas más oscuras de la imagen representan

las zonas de la muestra donde se transmitieron menos electrones por ser más gruesas o con mayor densidad y las áreas claras de la imagen representan las zonas de la muestra donde se transmitieron más electrones por ser zonas más delgadas o con menor densidad. Esta técnica se utilizó para conocer la morfología y la distribución de tamaños de las NPs obtenidas. Para cada muestra, se midió el tamaño de 100 partículas y se obtuvo el diámetro promedio con su desviación estándar.

Para el análisis, se preparó una alícuota a una concentración de 2 mM con la finalidad de obtener una densidad adecuada de NPs por unidad de área distribuidas sobre la rejilla y con una concentración de surfactante menor a 1 mM para poder observar claramente las NPs en el TEM. En el análisis de AuNPs y P25, la muestra se montó colocando una gota del coloide (10 μL) sobre el lado opaco de una rejilla de malla continua *Pure Carbon*, colocada sobre papel *Parafilm* aprovechando su propiedad hidrofóbica para mantener de forma estable la gota y dejarla secar a temperatura ambiente.

Para el análisis de Au@TiO₂NPs, la muestra se montó en una rejilla *Lacey Carbon* para observar el recubrimiento de TiO₂ con mayor nitidez. Se colocaron tres gotas del coloide (10 μL c/gota) en una rejilla colocada sobre papel filtro en intervalos de 2 min esperando que el papel filtro absorba el solvente y se seque la muestra a temperatura ambiente. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL, JEM-2010) con un voltaje de aceleración de 200 keV.

2.3.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El análisis de partículas basado en la dispersión dinámica de luz (DLS) es una técnica que analiza la luz dispersada por las partículas ante un movimiento browniano en la suspensión, creando una correlación con el tamaño hidrodinámico de la partícula. Además, la respuesta de la movilidad electroforética de las partículas bajo un campo eléctrico aplicado proporciona el valor del potencial zeta, que resulta un indicador de la estabilidad de las dispersiones coloidales.

Esta técnica se utilizó para determinar la carga superficial de las distintas NPs y la distribución de tamaño hidrodinámico. Dentro de las condiciones para la lectura de potencial zeta de AuNPs y Au@TiO₂NPs se utilizó la celda *univette* y *omega cuvette Mat.No. 225288*, respectivamente. Mientras que, para el análisis de distribución de tamaño hidrodinámico se utilizaron celdas desechables. Se realizaron tres mediciones para cada muestra obteniendo su promedio y desviación estándar con un analizador de partículas (Anton Paar, Litesizer 500).

2.4 Cultivo celular

2.4.1 Línea celular

Las células 3T3-L1 se adquirieron de American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés), es una línea celular de preadipocitos, derivadas de embrión de ratón que presentan una morfología de fibroblastos de tipo adherente, por lo que también se les conoce como *fibroblastos 3T3-L1* y tienen un gran potencial para diferenciarse en adipocitos.

Se utilizaron pases jóvenes de células 3T3-L1 que fueron cultivadas en cajas de Petri para cultivo celular de 5 y 10 cm de diámetro en incubación a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ y en un ambiente estéril. Como medio de cultivo se utilizó Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) suplementado con 10% de suero de ternera (CS), 1% v/v de antibiótico/antimicótico (penicilina y estreptomycin), 1% v/v de L-glutamina y 1.5 g/L de bicarbonato de sodio (NaHCO₃). El medio de cultivo tiene un pH= 7.4 y fue esterilizado mediante filtración con un tamaño de poro de 0.22 µm.

2.4.2 Descongelación de células

El cultivo celular se obtuvo a partir de crioviales con células 3T3-L1 congeladas en una solución de criopreservación. El proceso comenzó al descongelar los crioviales a temperatura ambiente vertiendo el contenido en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Enseguida se centrifugaron por 5 min a 1500 rpm, al finalizar el tiempo se decantó el sobrenadante para resuspender el pellet celular en 1 mL de medio de cultivo completo y se repitió el proceso una vez más. Finalmente, se adicionaron las células resuspendidas en cajas de Petri para cultivo celular con DMEM suplementado con 10% de suero de ternera para iniciar su crecimiento en incubación a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

2.4.3 Subcultivo celular

Las células en cultivo se adhieren a la superficie de la caja de Petri, por lo que, es necesario despegarlas para transferirlas y continuar su crecimiento, a este procedimiento se le conoce como subcultivo celular y se realizó cuando los cultivos celulares tuvieron una confluencia entre 70-80%, para despegar las células

de la superficie se removió el medio de cultivo para realizar un lavado con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X, por sus siglas en inglés). A continuación se utilizó 1 mL de tripsina/EDTA 1X para disociar los enlaces peptídicos de las proteínas que mantienen adheridas las células a la superficie y facilitar su desprendimiento de la caja de Petri. Se dejó actuar entre 3-5 min en la incubadora a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Una vez concluyó el tiempo, con apoyo mecánico de un movimiento unilateral suave y la recirculación del contenido celular dentro de la caja de Petri, las células se desprendieron y se colectaron en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL; para inactivar la tripsina y evitar el daño a la membrana celular se hicieron un par de lavados con medio de cultivo completo por 5 min a 1500 rpm en centrífuga. El pellet de las células se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo completo para realizar pases celulares y mantener la expansión del cultivo, también se criopreservaron células a -80°C para su posterior uso.

2.4.4 Recuento celular

Se llevó a cabo el conteo de células viables que se obtuvieron del cultivo celular mediante la técnica de exclusión de azul tripano, es una técnica colorimétrica utilizada para la cuantificación de células viables con la que logramos determinar el número de células disponibles para realizar el subcultivo celular y los ensayos experimentales. Con este método las células viables no se tiñen de azul, ya que, la membrana plasmática es impermeable al colorante azul tripano, por este motivo, las células cuya membrana se encuentre dañada se teñirán de azul.

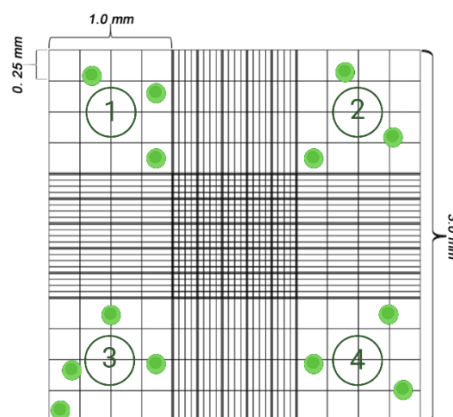


Figura 9. Representación de los cuatro cuadrantes de conteo en la cámara de Neubauer.

Para realizar el conteo de las células viables, se colocó 10 μ L de una disolución de 10 μ L de suspensión celular y 40 μ L de azul tripano en una cámara de Neubauer para conteo celular y se visualizaron por medio

de un microscopio óptico. Para determinar la concentración de células viables por mL se consideró el factor de volumen de la cámara de Neubauer, el factor de dilución y el promedio de células presentes en los cuatro cuadrantes de conteo ubicados en las equinas de la cámara de Neubauer representados en la Figura 9 por los números 1-4.

El resultado de la concentración celular se determinó mediante la Ecuación (10).

$$C = (\bar{X})(10,000)(FD) \quad (10)$$

Donde C = células/mL, \bar{X} = promedio de células presentes en los cuatro cuadrantes, FD = factor de dilución. El factor de conversión es 10,000 porque la dimensión de cada cuadrante es 1 x 1 x 0.1 mm (largo, ancho y altura, respectivamente) y representa un volumen de 0.1 mm³ que equivale a 0.1 µL, por lo que se tiene que multiplicar por 10,000 para obtener el valor en mL.

2.4.5 Criopreservación celular

La línea celular 3T3-L1 se criopreservó a -80°C para mantenerla por un largo periodo de tiempo en una solución de DMEM (40% v/v), Dimetilsulfóxido (DMSO, 10% v/v) y suero de ternera (50% v/v). El proceso comenzó después de realizar el subcultivo celular y se consideró el mínimo de un millón de células para poder criopreservar. El pellet celular se resuspendió en 1 mL de solución de criopreservación y se almacenaron 10⁶ células/mL en cada criovial.

2.5 Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT

Exposición de células 3T3-L1 con fuentes de luz

El ensayo de reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es una prueba colorimétrica que se utilizó para determinar la actividad mitocondrial por la cantidad de MTT reducido, mediante una serie de reacciones enzimáticas como indicador de viabilidad celular al exponer las células a diferentes concentraciones de tratamientos.

Es importante evaluar el efecto en la viabilidad celular por la exposición de las células con la fuente de luz verde (λ 502 nm) y UV (λ 390 nm) de manera independiente, únicamente la interacción célula-luz para determinar si hay un efecto positivo o negativo en la viabilidad celular durante los diferentes periodos de irradiación y tomarlo como control antes de evaluar la exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs y luz.

En una placa de pocillos para cultivo celular se cultivaron 10,000 células 3T3-L1 por pozo, en un volumen final de 100 μ L de medio de cultivo completo, considerando el triplicado de cada tratamiento y control. Posteriormente se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Una vez finalizó el tiempo, se renovó el medio de cultivo en cada pozo. En este trabajo, el control positivo se define como la muestra que no recibe tratamiento, se utilizó: células sin irradiación de luz. El control negativo es la muestra que se trata con detergente Tween 1% para inducir la muerte celular.

La placa de cultivo se introdujo en una caja con interior reflectante (Figura 33) y fue irradiada por 5 min, se repitió el proceso con diferentes placas de cultivo y su respectivo periodo de irradiación (10,15,20,25 y 30 min) a una distancia de 10 cm entre la placa de cultivo y el LED. La luz de excitación fue producida por una fuente LED (SL1-LED) que incluye el kit de LEDs verde (λ 502 nm) y UV (λ 390 nm). Sus espectros de emisión se muestran en la Figura 10, obtenidos de las especificaciones técnicas del fabricante (StellarNet Inc). Después de la irradiación, el medio de cultivo se repuso para evitar el efecto indirecto de la luz sobre las células, que puede estar mediado por los componentes en el medio de cultivo celular.

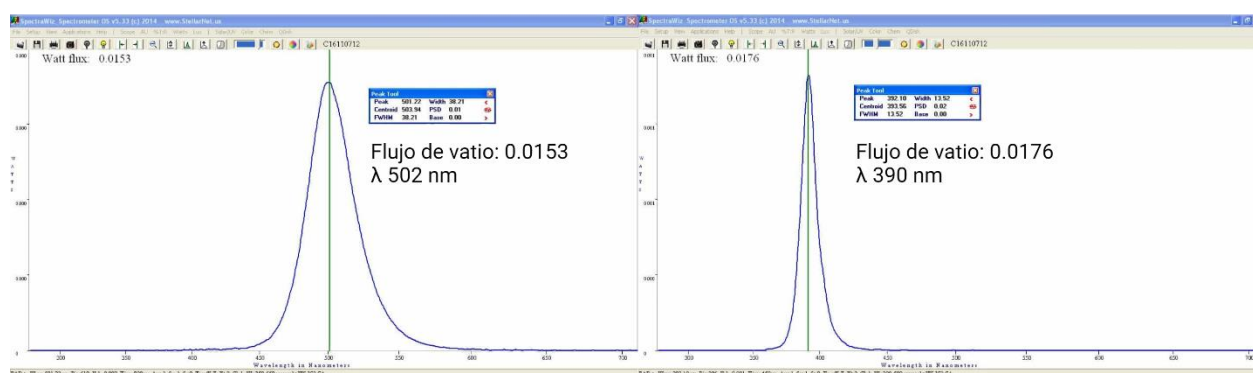


Figura 10. Espectro de emisión del LED verde (502 nm) y UV (390 nm) reportado por el fabricante (StellarNet Inc)

Se realizaron las mediciones de absorbancia en diferentes tiempos después de la irradiación: en el tiempo cero (inmediatamente), a las 12 h y a las 24 h, mientras tanto, se incubaron a 37°C en 5% de CO₂. Para preparar la placa de cultivo antes de su lectura, se reemplazó el medio de cultivo por 10 μ L del compuesto MTT y 90 μ L de medio de cultivo pero suplementado con suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés)

al 10% v/v en cada pozo. Se dejó reposar la placa en incubación durante 4 h a 37°C y 5% de CO₂. Una vez terminó el tiempo de incubación, se añadió 100 µL de isopropanol en cada pozo y se resuspendió 10 veces de manera consecutiva para solubilizar los cristales de formazán, que es el producto de la reducción de MTT. Se dejó reposar durante 30 min en obscuridad y se evaluó la absorbancia en la longitud de onda de 595 nm en un lector de absorbancia para microplacas (BIO RAD, iMark). Los ensayos fueron independientes para cada periodo de irradiación y fuente de luz.

Exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs y fuentes de luz

El ensayo de viabilidad celular para evaluar el efecto de la exposición de células con Au@TiO₂NPs y las fuentes de luz se realizó de manera independiente con cada diodo emisor de luz. El presente ensayo de viabilidad celular proporcionó los rangos de concentración biocompatibles y la concentración óptima con potencial de proliferación. El procedimiento se describe a continuación y se ilustra en la Figura 11.

Día 1. En una placa de pocillos para cultivo celular se cultivaron 10,000 células 3T3-L1 por pozo, en un volumen final de 100 µL de medio de cultivo completo, considerando el triplicado de cada concentración y control. Posteriormente se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

Día 2. Se dispersó la solución stock de Au@TiO₂NPs y se removió el medio de cultivo de la placa celular para añadir un triplicado homogéneo de cada concentración de Au@TiO₂NPs: 10, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 y 300 µg/mL obteniendo un volumen final de 100 µL por pozo en medio de cultivo completo. Las concentraciones de Au@TiO₂NPs se obtuvieron con base al oro. Para obtener cada concentración se consideró el 30% v/v como el límite máximo del coloide de NPs y el restante se completó con medio de cultivo. Se utilizaron dos controles positivos para este ensayo: células sin tratamiento y sin irradiación de luz; y células sin tratamiento irradiadas por luz. Para el control negativo: células con detergente Tween 1% para inducir la muerte celular. La placa en tratamiento se incubó por 24 h a 37°C y 5% de CO₂.

Día 3. Se tomaron fotografías con el microscopio invertido para comparar la morfología de las células expuestas a diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs. Posteriormente se realizaron dos lavados con 200 µL de buffer de fosfatos (PBS 1X) para retirar las NPs que se quedaron fuera de las células y se añadió 100 µL de medio de cultivo completo a cada pozo. La placa de cultivo se introdujo en una caja con interior reflectante y el tiempo de irradiación fue de 10 min. Enseguida se renovó el medio de cultivo completo y se incubó durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂.

Día 4. Se tomaron fotografías con el microscopio invertido para comparar la morfología de las células expuestas con diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs y fuentes de luz. Posteriormente se realizaron dos lavados con 200 µL de buffer de fosfatos (PBS 1X) y se agregó 10 µL del compuesto MTT y 90 µL de medio de cultivo completo pero suplementado con suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) al 10% en cada pozo. Se dejó reposar la placa en incubación durante 4 h a 37°C y 5% de CO₂. Una vez terminó el tiempo de incubación, se añadió 100 µL de isopropanol a cada uno de los pozos y se resuspendió 10 veces de manera consecutiva. La intensidad del color púrpura es proporcional al porcentaje de células viables. Se dejó reposar durante 30 min en oscuridad y se evaluó la absorbancia. Para determinar el porcentaje de viabilidad celular, se normalizaron los valores mediante una resta del control negativo a todas las muestras y el control positivo se tomó como el 100% de viabilidad celular.

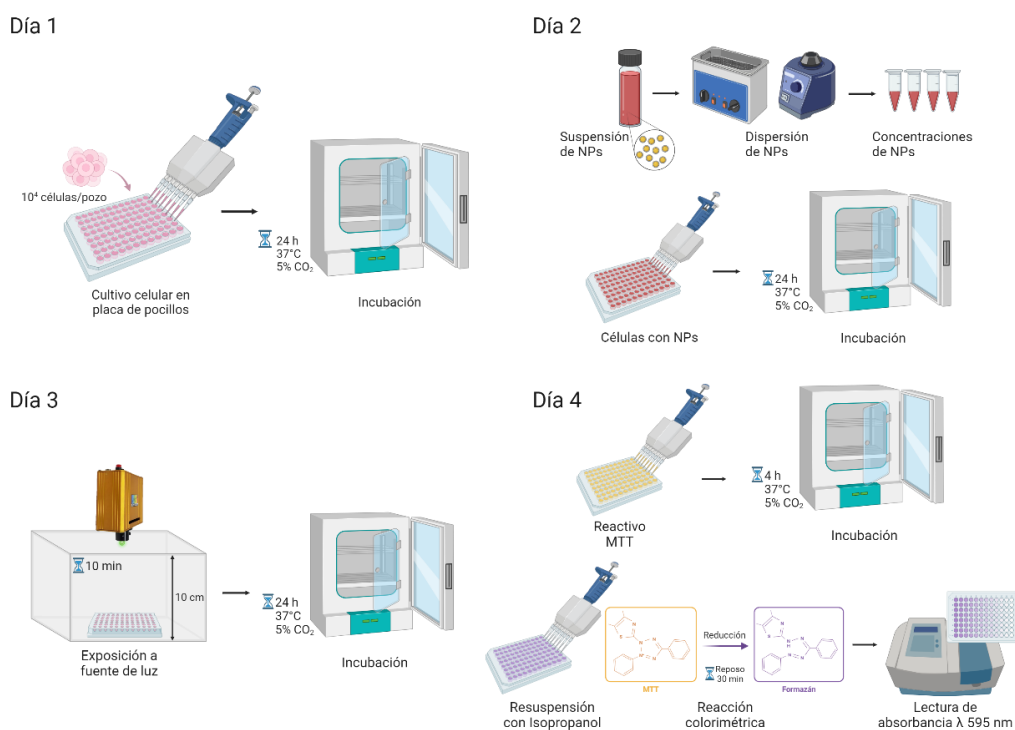


Figura 11. Ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT de la exposición de células con Au@TiO₂NPs y fuentes de luz

Exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs

Se evaluó la viabilidad celular con AuNPs, TiO₂ tipo P25 (80% anatasa y 20% rutilo), TiO₂ (sintetizado del precursor TDAA para la coraza, con la misma metodología de Seh et al. (2012) sin la adición de AuNPs) y Au@TiO₂NPs sin la variable de fuente de luz. Se evaluaron las siguientes concentraciones: 10,30,50,100,200 y 300 µg/mL. En los ensayos de viabilidad celular sin irradiación de luz se omitió el día 3

y se utilizó un control positivo: células sin tratamiento. Y un control negativo: células con detergente Tween 1% para inducir la muerte celular. Todos los ensayos de viabilidad celular se realizaron por triplicado.

2.6 Evaluación de especies reactivas de oxígeno

2.6.1 Medición de ROS por espectrofluorimetría

Exposición de células 3T3-L1 con fuentes de luz

Las especies reactivas de oxígeno se producen naturalmente en las células como subproducto del metabolismo normal durante la respiración aeróbica. Es importante evaluar la generación de ROS intracelular de la exposición de células 3T3-L1 con fuentes de luz verde (λ 502 nm) y UV (λ 390 nm) para determinar si la longitud de onda del diodo emisor de luz induce una sobreproducción de ROS o no tiene un efecto significativo en las células antes de evaluar la exposición de las células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs y fuentes de luz.

La producción intracelular de ROS, se evaluó por medio de un espectrofluorímetro que proporciona información de la medición promedio de la fluorescencia de toda la muestra. Se determinó la cantidad de ROS producidas por efecto del estrés oxidativo en las células, mediante el producto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) producido por la oxidación del compuesto no fluorescente permeable a las células diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) por la acción de las ROS.

En una placa de pocillos para cultivo celular se cultivaron 10,000 células 3T3-L1 por pozo, en un volumen final de 100 μ L de medio de cultivo completo, considerando el triplicado de cada tratamiento y control. Posteriormente se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

Una vez concluyó el tiempo de incubación, se renovó el medio de cultivo en cada pozo. Como control positivo de este ensayo se utilizó: células con DCFDA sin irradiación de luz. La placa de cultivo se introdujo en una caja con interior reflectante y el tiempo de irradiación fue de 10 min. Enseguida se renovó el medio de cultivo completo y se incubó durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Al terminar el periodo de incubación, se removió el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 200 μ L de buffer de fosfatos (PBS 1X). Se

adicionó 100 μL de una solución de medio de cultivo sin suero (medio de cultivo plano) que contiene una concentración final de 25 μM de diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA). Enseguida se incubó por 1 h a 37°C y 5% de CO_2 . Al terminar, se removió el medio y se realizaron dos lavados con 100 μL de PBS 1X. Finalmente se adicionó 100 μL de medio de cultivo plano a cada pozo y se incubó 15 min a 37°C y 5% de CO_2 . Finalmente se procedió a la lectura de la fluorescencia en el espectrofluorímetro (Thermo Scientific, Varioskan Flash) con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

Exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs y fuentes de luz

La evaluación de la generación de especies reactivas de oxígeno por la exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs y fuentes de luz, ayudó a determinar la concentración óptima de nanopartículas que generan las ROS necesarias para mejorar la cicatrización de heridas. El procedimiento se describe a continuación y se ilustra en la Figura 12.

Día 1. En una placa de pocillos para cultivo celular se cultivaron 10,000 células 3T3-L1 por pozo, en un volumen final de 100 μL de medio de cultivo completo, considerando el triplicado de cada concentración y control. Posteriormente se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO_2 .

Día 2. Se dispersó la solución stock de Au@TiO₂NPs y se removió el medio de cultivo de la placa celular para añadir un triplicado homogéneo de cada concentración de Au@TiO₂NPs: 10, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obteniendo un volumen final de 100 μL por pozo en medio de cultivo completo. Las concentraciones de Au@TiO₂NPs se obtuvieron con base al oro. Para obtener cada concentración se consideró el 30% v/v como el límite máximo de coloide de NPs y el restante se completó con medio de cultivo. Se utilizaron dos controles positivos para este ensayo: células sin tratamiento, con DCFDA y sin irradiación de luz; y células sin tratamiento, con DCFDA e irradiadas con luz. La placa en tratamiento se incubó por 24 h a 37°C y 5% CO_2 .

Día 3. Se realizaron dos lavados con 200 μL de buffer de fosfatos (PBS 1X) para retirar las NPs que se quedaron fuera de las células y se añadió 100 μL de medio de cultivo completo a cada pozo. La placa de cultivo se introdujo en una caja con interior reflectante y el tiempo de irradiación fue de 10 min. Enseguida se renovó el medio de cultivo completo y se incubó durante 24 h a 37°C y 5% de CO_2 .

Día 4. Se removió el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 200 μL de buffer de fosfatos (PBS 1X). Se adicionó 100 μL de una solución de medio de cultivo sin suero que contiene una concentración final de 25 μM de diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA). Enseguida se incubó por 1 h a 37°C y 5% de CO_2 . Al terminar, se removió el medio y se realizaron dos lavados con 100 μL de PBS 1X. Finalmente se adicionó 100 μL de medio de cultivo plano a cada pozo y se incubó 15 min a 37°C y 5% de CO_2 . Finalmente se procedió a la lectura de la fluorescencia. Los datos obtenidos directamente del espectrofluorímetro se trataron respecto a la fluorescencia del control positivo obteniendo el resultado de ROS y posteriormente se graficó en porcentaje de ROS relativo a la viabilidad.

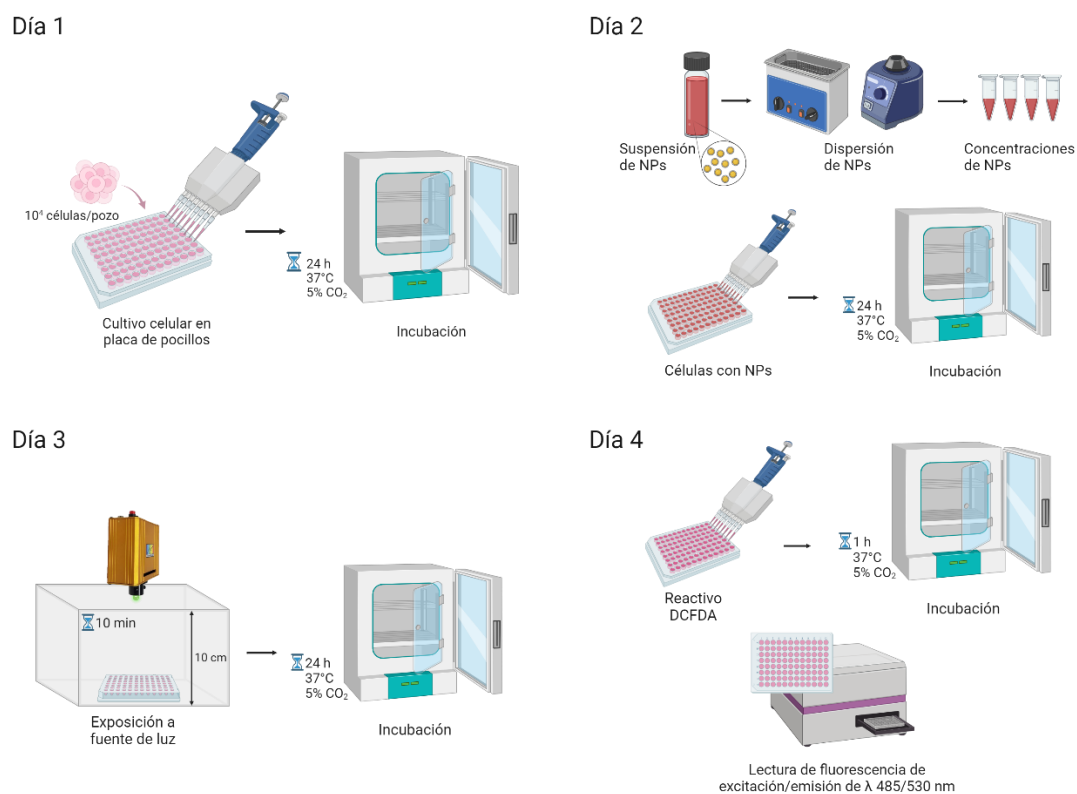


Figura 12. Evaluación de las especies reactivas de oxígeno producidas en la exposición de células 3T3-L1 con las Au@TiO₂NPs y fuentes de luz mediante el espectrofluorímetro

Exposición de células 3T3-L1 con materiales estándar

Se evaluó la generación de especies reactivas de oxígeno con AuNPs, P25, TiO₂ (coraza) y Au@TiO₂NPs sin la variable de luz. Se evaluaron las siguientes concentraciones: 10,30,50,100,200 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En los ensayos de ROS sin irradiación de luz se omitió el día 3 y se utilizó un control positivo: células sin tratamiento con DCFDA.

Au@TiO₂NPs en medio de cultivo

Se monitoreó la producción de ROS por Au@TiO₂NPs sin la presencia de células mediante el procedimiento que se describe a continuación. Se dispersó la solución stock de Au@TiO₂NPs y en una placa de pocillos para cultivo celular se añadió un triplicado homogéneo de cada concentración de Au@TiO₂NPs: 10,30,50,100,200 y 300 µg/mL con un volumen final de 100 µL por pozo, en una solución de medio de cultivo sin suero que contiene una concentración final de 25 µM de diacetato 2',7'-diclorofluoresceína y se utilizó un control de DCFDA. Enseguida se incubó 1 h a 37°C y 5% CO₂. Se procedió a la lectura de la fluorescencia en las mismas condiciones que los ensayos previamente descritos sobre la evaluación de ROS pero en dos periodos de tiempo diferentes: al terminar el periodo de incubación (0 h) y 24 h después de la incubación. Todos los ensayos de evaluación de ROS mediante espectrofluorímetro se realizaron por triplicado.

2.6.2 Determinación de la producción de ROS por citometría de flujo

Exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs y fuentes de luz

Las especies reactivas de oxígeno también fueron evaluadas mediante el citómetro de flujo, un equipo que analiza las células o partículas en suspensión que recorren un flujo continuo a través de un haz de luz láser proporcionando información de los eventos individuales en tiempo real. Se utilizó el canal Blue Laser 1 (BL1) que cuenta con una longitud de onda de excitación de 488 nm/emisión 525 nm para cuantificar la fluorescencia de las células. También se analizó el tamaño de las células mediante el parámetro de la dispersión frontal de la luz (FSC, por sus siglas en inglés). El procedimiento se describe a continuación.

Día 1. En una placa de pocillos para cultivo celular se cultivaron 10,000 células 3T3-L1 por pozo, en un volumen final de 100 µL de medio de cultivo completo, considerando el triplicado de cada concentración y control. Posteriormente se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

Día 2. Se dispersó la solución stock de Au@TiO₂NPs y se removió el medio de cultivo de la placa celular para añadir un triplicado homogéneo de cada concentración de Au@TiO₂NPs: 10, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 y 300 µg/mL obteniendo un volumen final de 100 µL por pozo en medio de cultivo completo. Las concentraciones de Au@TiO₂NPs se obtuvieron con base al oro. Para obtener cada concentración se consideró el 30% v/v como el límite máximo de coloide de NPs y el restante se completó con medio de

cultivo. Se utilizaron tres controles positivos para este ensayo: células sin tratamiento y sin DCFDA; células sin tratamiento, con DCFDA y sin irradiación de luz; y células sin tratamiento, con DCFDA e irradiadas con luz. La placa en tratamiento se incubó por 24 h a 37°C y 5% CO₂.

Día 3. Se realizaron dos lavados con 200 µL de buffer de fosfatos (PBS 1X) para retirar las NPs que se quedaron fuera de las células y se añadió 100 µL de medio de cultivo completo a cada pozo. La placa de cultivo se introdujo en una caja con interior reflectante y el tiempo de irradiación fue de 10 min. Enseguida se renovó el medio de cultivo completo y se incubó durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂.

Día 4. Se removió el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 200 µL de buffer de fosfatos (PBS 1X). Se adicionó 100 µL de una solución de medio de cultivo sin suero que contiene una concentración final de 25 µM de DCFDA. Enseguida se incubó por 1 h a 37°C y 5% de CO₂. Al terminar, se removió el medio de cultivo plano y se realizaron dos lavados con 100 µL de PBS 1X. Inmediatamente se adicionó 200 µL de tripsina en cada pozo y se dejó actuar en incubación por 3-5 min a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se resuspendió cada pozo consecutivamente diez veces. Cada triplicado de pozos con la misma concentración de tratamiento se colectó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL para aforarlo hasta 1 mL con medio de cultivo completo para inactivar la tripsina y se centrifugó por 5 min a 1500 rpm. Finalmente se decantó el medio y se resuspendió en 1 mL de PBS 1X para iniciar el análisis en el citómetro de flujo (Thermo Fisher Scientific Inc., Attune NxT) donde se adquirieron 10,000 eventos por muestra. La estrategia de análisis para la evaluación de ROS se muestra en la Figura 13. Se seleccionaron los eventos únicos (singlets) (Figura 13), después se graficó la complejidad celular interna (SSC-A) vs el tamaño relativo celular (FSC-A) para identificar la población celular de interés (Figura 13). La SSC-A corresponde a la luz dispersada a 90° con respecto a la incidencia del láser. Posteriormente se representó la SSC-A vs BL1-A para obtener la población celular positiva a la fluorescencia por ROS (Figura 13) y finalmente se comparó la fluorescencia del control positivo irradiado por luz frente a la fluorescencia de cada concentración de Au@TiO₂NPs (Figura 13).

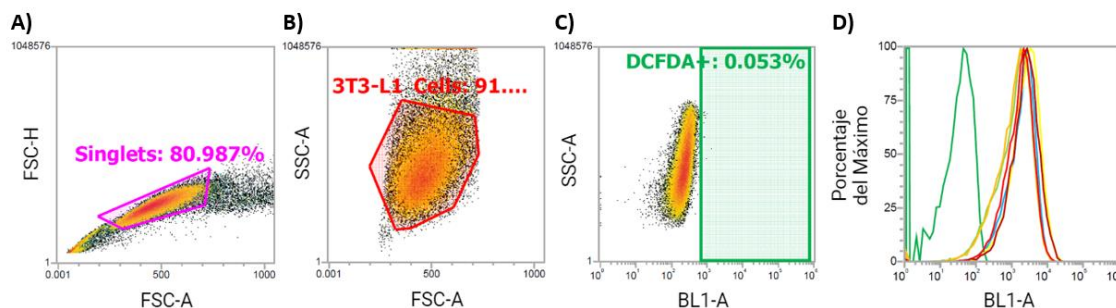


Figura 13. Estrategia para evaluar las especies reactivas de oxígeno mediante citometría de flujo

Exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs

En los ensayos para determinar la producción de ROS, en ausencia de luz, el paso correspondiente al día 3 fue omitido. Se utilizaron dos controles positivos: células sin tratamiento con DCFDA y células sin tratamiento y sin DCFDA. Se evaluaron las Au@TiO₂NPs en las siguientes concentraciones: 10,30,50,100,200 y 300 µg/mL. Todos los ensayos de evaluación de ROS mediante citometría de flujo se realizaron por triplicado.

2.7 Internalización celular por citometría de flujo

Exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs y fuentes de luz

La internalización celular se evaluó mediante citometría de flujo para determinar si las nanopartículas son captadas por las células en su interior, el resultado pudo correlacionar la internalización de las NPs con la viabilidad celular y la generación de especies reactivas de oxígeno. Como parámetro se utilizó la dispersión lateral (SSC, Side Scatter en inglés), es un indicador de complejidad celular interna que mide la cantidad de luz dispersada lateralmente por una célula cuando es irradiada con un láser. También se analizó el tamaño de las células mediante el parámetro de dispersión frontal de luz (FSC, por sus siglas en inglés). El procedimiento se describe a continuación.

Día 1. En una placa de pocillos para cultivo celular se cultivaron 10,000 células 3T3-L1 por pozo, en un volumen final de 100 µL de medio de cultivo completo, considerando el triplicado de cada concentración y control. Posteriormente se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

Día 2. Se dispersó la solución stock de Au@TiO₂NPs y se removió el medio de cultivo de la placa celular para añadir un triplicado homogéneo de cada concentración de Au@TiO₂NPs: 10, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 y 300 µg/mL obteniendo un volumen final de 100 µL por pozo en medio de cultivo completo. Las concentraciones de Au@TiO₂NPs se obtuvieron con base al oro. Para obtener cada concentración se consideró el 30% v/v como el límite máximo de coloide de NPs y el restante se completó con medio de cultivo. Se utilizaron dos controles positivos para este ensayo: células sin tratamiento ni irradiación de luz y células sin tratamiento irradiadas por luz. La placa en tratamiento se incubó por 24 h a 37°C y 5% CO₂.

Día 3. Se realizaron dos lavados con 200 μL de buffer de fosfatos (PBS 1X) para retirar las NPs que se quedaron fuera de las células y se añadió 100 μL de medio de cultivo completo a cada pozo. La placa de cultivo se introdujo en una caja con interior reflectante y el tiempo de irradiación fue de 10 min. Enseguida se renovó el medio de cultivo completo y se incubó durante 24 h a 37°C y 5% de CO_2 .

Día 4. Se removió el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 200 μL de buffer de fosfatos (PBS 1X). Inmediatamente se adicionó 200 μL de tripsina en cada pozo y se dejó actuar en incubación por 3-5 min a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente se resuspendió cada pozo consecutivamente diez veces. Cada triplicado de pozos con la misma concentración de tratamiento se colectó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL para aforarlo hasta 1 mL con medio de cultivo completo y se centrifugó por 5 min a 1500 rpm. Finalmente se decantó el medio y se resuspendió en 1 mL de PBS 1X para iniciar el análisis en el citómetro de flujo, donde se adquirieron 10,000 eventos por muestra. La estrategia de análisis para la internalización celular de $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ mediante citometría de flujo se muestra en la Figura 14. Se observa la selección de los eventos únicos (singlets)(Figura 14). Después se graficó la complejidad celular interna (SSC-A) vs el tamaño relativo celular (FSC-A) para indicar la población celular de interés (Figura 14) y finalmente se comparó la complejidad celular del control positivo irradiado por luz con la complejidad de cada concentración de $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ irradiadas con luz (Figura 14).

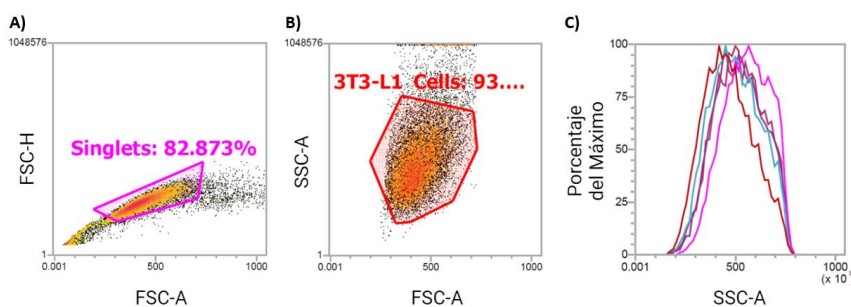


Figura 14. Estrategia para evaluar la internalización celular mediante citometría de flujo

Exposición de células 3T3-L1 con $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$

En los ensayos para determinar la internalización celular, en ausencia de luz, el paso correspondiente al día 3 fue omitido. Se utilizó un control positivo: células sin tratamiento. Sin la variable de fuente de luz se evaluaron las $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ en las siguientes concentraciones: 10,30,50,100,200 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todos los ensayos de evaluación de internalización celular mediante citometría de flujo se realizaron por triplicado.

Capítulo 3. Resultados

Este capítulo describe los resultados obtenidos en la investigación.

3.1 Síntesis y caracterización de Au@TiO₂NPs

Se sintetizaron nanopartículas de oro con morfología esférica estabilizadas con moléculas de citrato siguiendo la metodología de Bastús et al. (2011). Se ajustaron las condiciones de reacción para seguir el criterio de tamaño óptimo de las NPs, el cual indica que se requiere la resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR, por sus siglas en inglés) en 524 nm que corresponde al rango de diámetro entre 20 y 25 nm según lo reportado por Bastús et al. (2011), buscando lograr un efecto plasmónico de manera eficiente al irradiarlas con la fuente de luz verde (λ 502 nm). Como segunda etapa, se recubrieron las AuNPs con TiO₂ por hidrólisis controlada de un precursor de titanio utilizando la metodología de Seh et al. (2012). Para ello, se adaptaron los parámetros de las AuNPs con el proceso de recubrimiento, buscando minimizar el exceso de TiO₂ formando partículas tipo núcleo-coraza (Au@TiO₂NPs).

3.1.1 Respuesta óptica

Se evaluaron las propiedades ópticas monitoreando la posición del pico de absorbancia y se cuantificó la concentración de oro [Au⁰] en base al valor de absorbancia obtenida en la longitud de onda de 400 nm, mediante espectrofotometría UV-Visible. Además, se visualizó directamente la tonalidad de color de las dispersiones coloidales de oro en cada paso de síntesis. Estos resultados los presenta la Figura 15, donde el eje de abscisas indica las longitudes de onda y el eje de ordenadas las unidades arbitrarias de absorbancia. La banda de máxima absorción asociada a la resonancia de plasmón de superficie localizado se desplazó a una mayor longitud de onda y aumentó su intensidad como consecuencia del crecimiento de las partículas, desde la formación de semillas de oro (G₀ - 521 nm) hasta la primera generación de crecimiento (G₁ - 523 nm) donde se detuvo la reacción. Dado que, en esta generación se logró obtener el LSPR dentro del rango óptimo que se correlaciona con el tamaño de las AuNPs deseadas (20-25 nm). Así mismo, la concentración estimada de oro [Au⁰] en cada paso de síntesis coincide con la concentración estequiométrica esperada de 0.17 mM para G₀ y 0.50 mM para G₁. Además, hubo un aumento en la

intensidad del color de la dispersión acuosa; al sintetizar las semillas de oro, la solución toma un color carmesí claro y al terminar la primera generación de crecimiento el color se torna rojo.

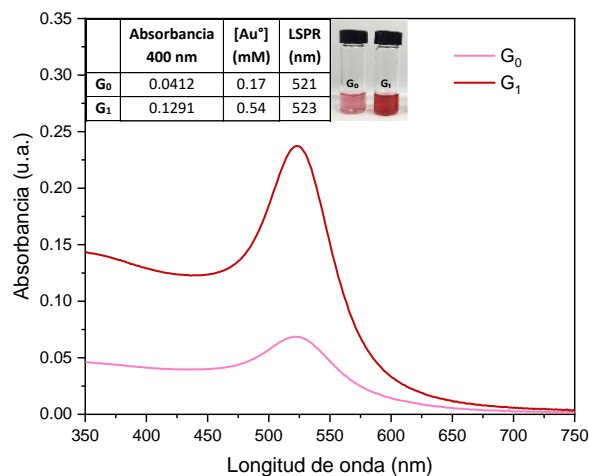


Figura 15. Evolución de la LSPR de las AuNPs en los pasos de síntesis. Así como la concentración de oro [Au⁰] experimental obtenido mediante espectrofotometría UV-Visible. Se incluyen imágenes de las dispersiones coloidales de oro

Con la intención de satisfacer la demanda de AuNPs necesarias para realizar los ensayos *in vitro*, se probó la reproducibilidad de la síntesis obteniendo stocks de diferente volumen: 10, 20 y 50 mL de AuNPs. La respuesta óptica y la concentración de oro [Au⁰] se muestra en la Figura 16, se exhibe que en los tres volúmenes diferentes de AuNPs (G₁) la LSPR se encontró en 524 nm y la concentración de oro [Au⁰] también fue similar, lo que demostró excelente reproducibilidad al escalar la síntesis.

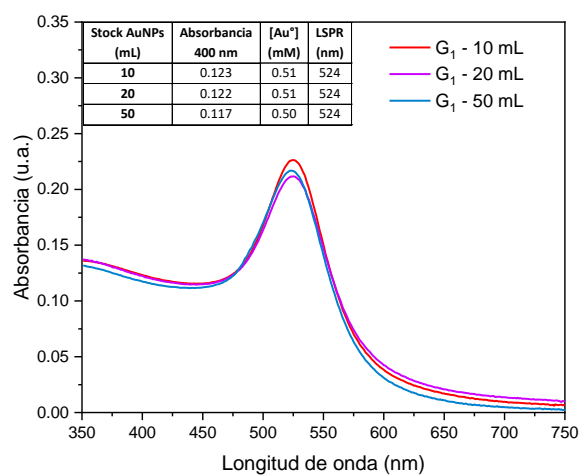


Figura 16. Espectro de absorción de los stocks de diferente volumen de AuNPs (G₁) con su respectiva concentración de oro [Au⁰]. Obtenido mediante espectrofotometría UV-Visible

Para obtener Au@TiO₂NPs tipo núcleo coraza, se realizó una serie de pasos, en cada uno se registró la respuesta óptica y la concentración de oro [Au⁰]. En la primera etapa, el proceso se realizó en un medio de H₂O, el resultado se muestra en la Figura 17 y consta de tres pasos: la síntesis de AuNPs (G₁) donde se obtuvo la LSPR (524 nm) óptima para el tamaño de NPs deseado, y la concentración de oro [Au⁰] fue similar al valor teórico (0.50 mM). En el recubrimiento de las AuNPs con hidroxipropilcelulosa (HPC) se observa un desplazamiento de la LSPR hacia la derecha (526 nm); y el lavado de las Au@HPC NPs para eliminar los residuos de la solución resultó en 527 nm.

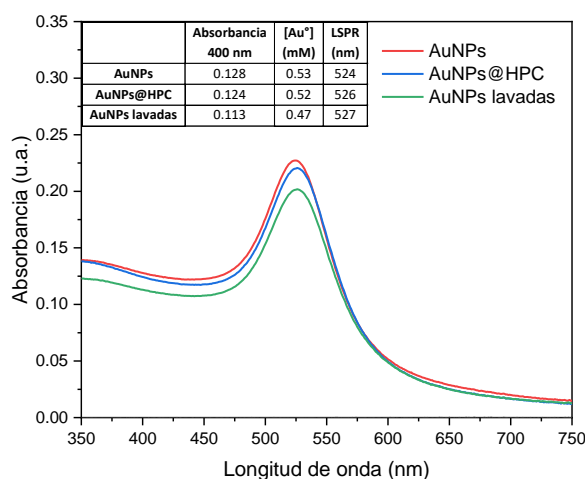


Figura 17. Respuesta óptica y concentración de oro [Au⁰] de la primera etapa (Síntesis de AuNPs, recubrimiento con HPC y lavado de NPs) en un medio de H₂O. Obtenido mediante espectrofotometría UV-Visible

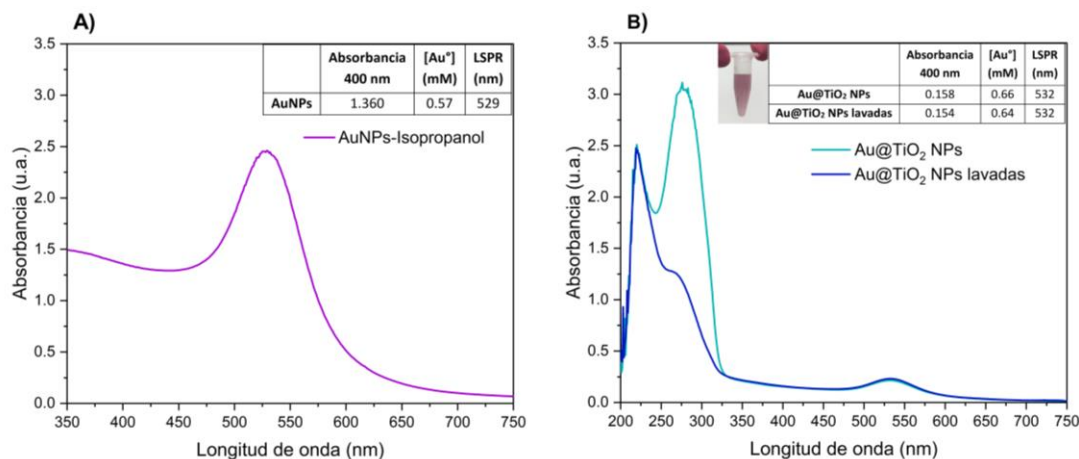


Figura 18. Respuesta óptica y concentración de oro [Au⁰], obtenidos mediante espectrofotometría UV-Visible. A) Segunda etapa (Transferencia a un medio de alcohol). B) Tercera etapa (Recubrimiento con TiO₂)

El resultado de la segunda etapa, se muestra en la Figura 18. En esta fase, se realizó la transferencia de AuNPs a un medio de alcohol (Figura 18-A), donde la LSPR continúa recorriéndose, en este caso hasta 529 nm. En la etapa final, se procedió a recubrir las AuNPs con TiO₂, la respuesta se observa en la Figura 18-B,

donde ya hay presencia del pico representativo de TiO_2 y la LSPR de las $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ fue de 532 nm. Después del lavado se mantuvo en la misma longitud de onda, por lo que, se demuestra que en cada paso de las tres etapas el coloide se mantuvo estable y hubo un cambio de LSPR hacia una longitud de onda mayor.

3.1.2 Distribución de tamaño y morfología

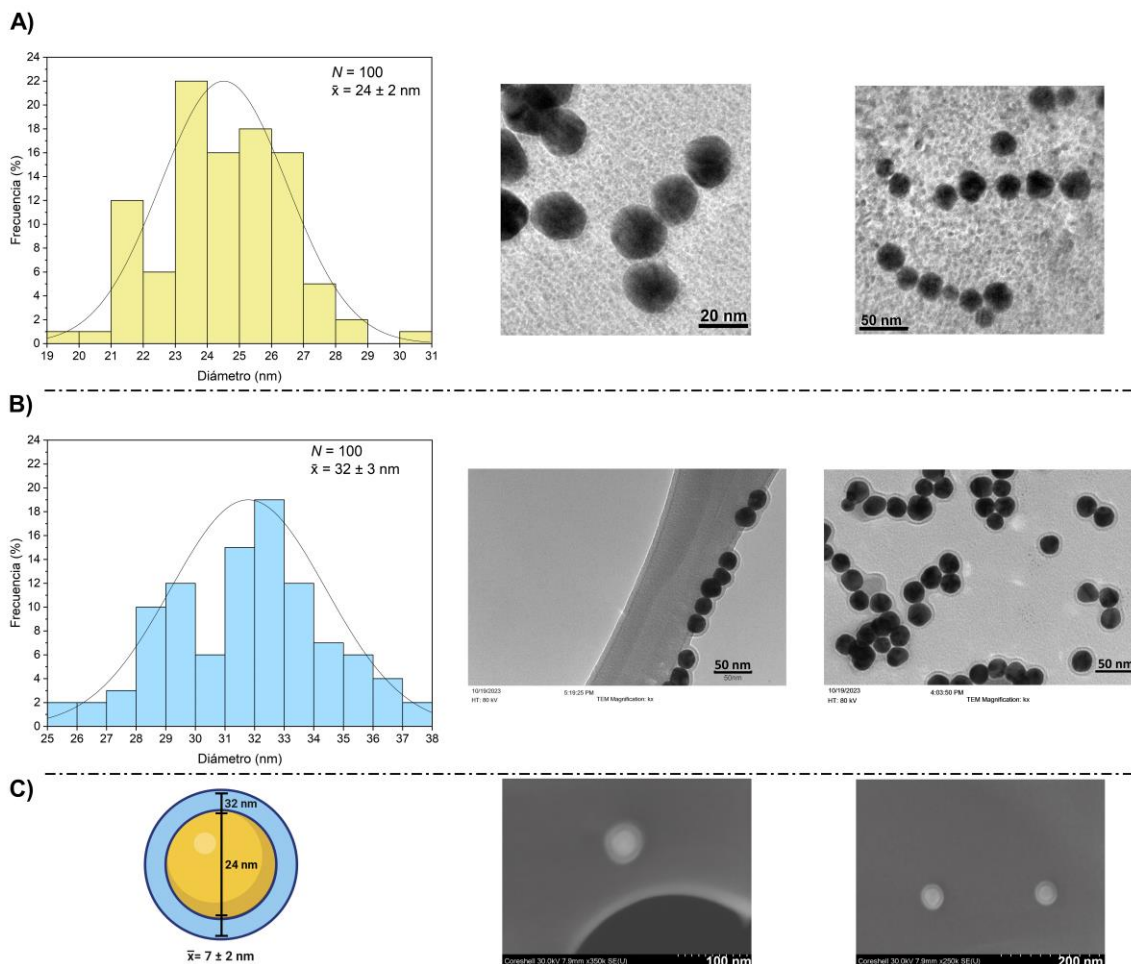


Figura 19. Distribución de tamaños (izquierda) y micrografías (derecha), obtenidos mediante TEM. A) AuNPs. B) $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$. C) Ilustración que indica el aumento de tamaño de las AuNPs al recubrirlas con TiO_2 (izquierda) y micrografías obtenidas mediante STEM de $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ (derecha)

El análisis mediante imágenes representativas de TEM y el estudio estadístico de la distribución de tamaños (el eje de abscisas representa el diámetro y el eje de ordenadas el porcentaje de frecuencia), así como la morfología de $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ obtenida por STEM, se muestra en la Figura 19. Por un lado, las AuNPs presentaron una morfología cuasi-esférica y el histograma indica un diámetro promedio de $24 \pm 2 \text{ nm}$,

como se observa en la Figura 19-A. Por otro lado, después del recubrimiento con TiO_2 , las $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ demostraron una morfología tipo núcleo@coraza. Debido a las densidades electrónicas, el núcleo de oro se observa más oscuro mientras que el recubrimiento de TiO_2 se presenta más claro; y la distribución de tamaños indica que tienen un diámetro promedio de 32 ± 3 nm, tal como se observa en la Figura 19-B. Por lo que, el diámetro de las NPs aumentó en promedio 7 ± 2 nm con el recubrimiento (Figura 19-C). El resultado estadístico del diámetro de las NPs se obtuvo midiendo el diámetro del núcleo y el diámetro total de la misma nanopartícula de la muestra de $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ y se realizó una resta para cada NP medida. Además, con la técnica de microscopía electrónica de transmisión con barrido (STEM), también se visualizaron las partículas de oro recubiertas con TiO_2 , como se observa en la Figura 19-C.

3.1.3 Potencial Z y diámetro hidrodinámico

En la Figura 20 se muestra la caracterización de las nanopartículas mediante un analizador de partículas basado en la dispersión dinámica de luz (DLS). La carga superficial de las AuNPs y las $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ en medio acuoso se muestra en la Figura 20-A, donde el eje de ordenadas representa el potencial Z. El resultado promedio de tres mediciones muestra una buena estabilidad en suspensión con cargas superficiales negativas en los tres casos. Las AuNPs en un medio de H_2O obtuvieron un potencial Z de -27 mV; las $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ en un medio de alcohol resultaron con -21 ± 0.5 mV y las $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ transferidas a un medio de H_2O previo a su evaluación en células, cuentan con una carga superficial de -24 ± 0.5 mV.

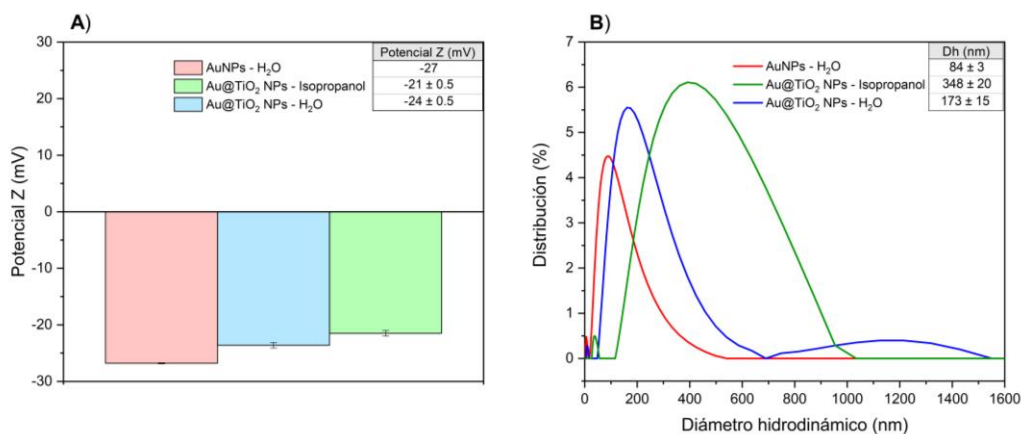


Figura 20. Caracterización de las NPs en diferentes medios, mediante DLS. A) Potencial Z. B) Diámetro hidrodinámico

Además, el promedio de tres mediciones del diámetro hidrodinámico se representa en la Figura 20-B, donde el eje de abscisas representa el diámetro hidrodinámico y el eje de ordenadas el porcentaje de

distribución de tamaños. En este caso, las AuNPs en un medio de H₂O muestran un diámetro hidrodinámico de 84 ± 3 nm, el tamaño de las Au@TiO₂NPs en un medio de alcohol fue de 348 ± 20 nm y las Au@TiO₂NPs en H₂O resultaron con un tamaño de 173 ± 15 nm.

3.2 Caracterización de TiO₂ tipo P25

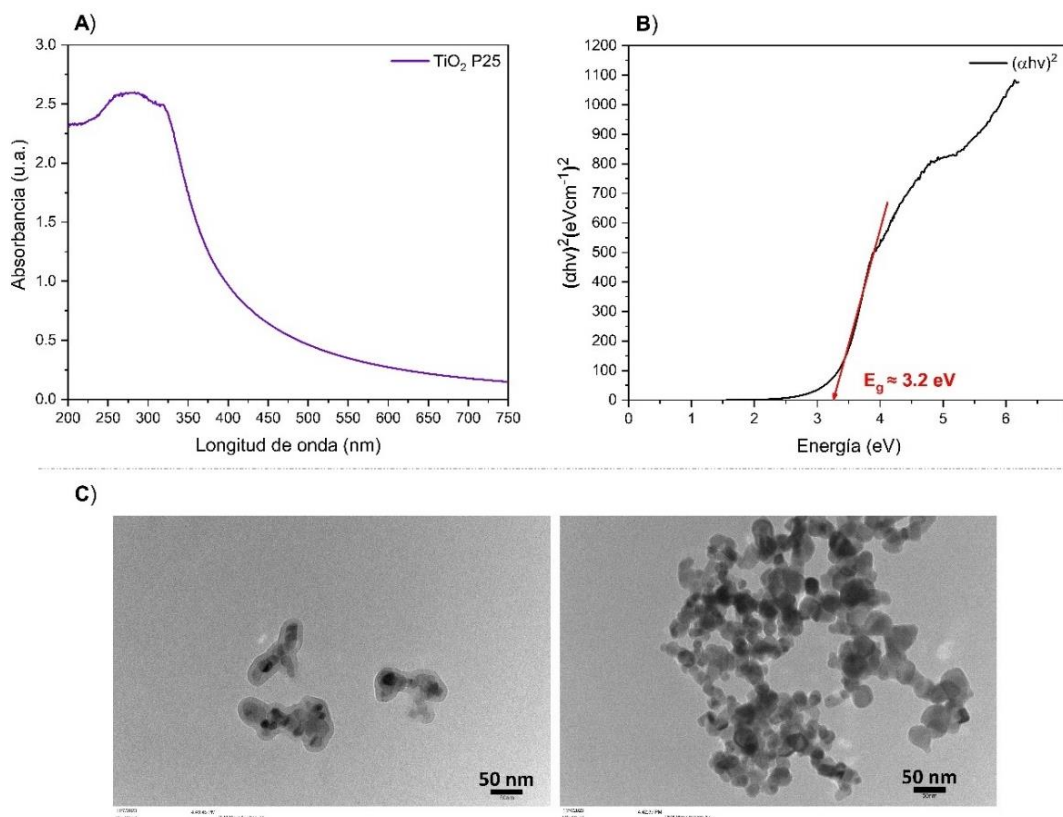


Figura 21. Caracterización de TiO₂ tipo P25. A) Respuesta óptica, mediante espectrofotometría UV-Visible. B) Estimación de la banda prohibida mediante el diagrama de Tauc. C) Micrografías del TEM

El TiO₂ comercial tipo P25, es una combinación de dos fases cristalinas (80% anatasa y 20% rutilo), sus propiedades fisicoquímicas y estructurales se utilizaron como muestra referencia para comparar su efecto con la coraza de las Au@TiO₂NPs en los ensayos *in vitro*. La Figura 21 muestra los resultados de la caracterización de P25. La respuesta óptica indica que su banda de máxima absorción se encuentra en la región UV (Figura 21-A). Con los datos obtenidos de absorbancia se estimó la banda prohibida mediante el diagrama de Tauc, la intersección de la tangente se aproximó al valor de 3.2 eV, como se observa en la Figura 21-B (el eje de abscisas representa la energía de la banda prohibida y el eje de ordenadas representa la absorbancia). Para la estimación de la banda prohibida se tomó en cuenta la naturaleza de la transición

electrónica, se consideró un semiconductor descrito por transiciones directas permitidas. Además, se visualizaron aglomerados de partículas con morfología irregular mediante el TEM (Figura 21-C).

3.3 Viabilidad de fibroblastos expuestos a Au@TiO₂NPs y fuentes de luz

Viabilidad celular de fibroblastos 3T3-L1 expuestos a diferentes materiales estándar

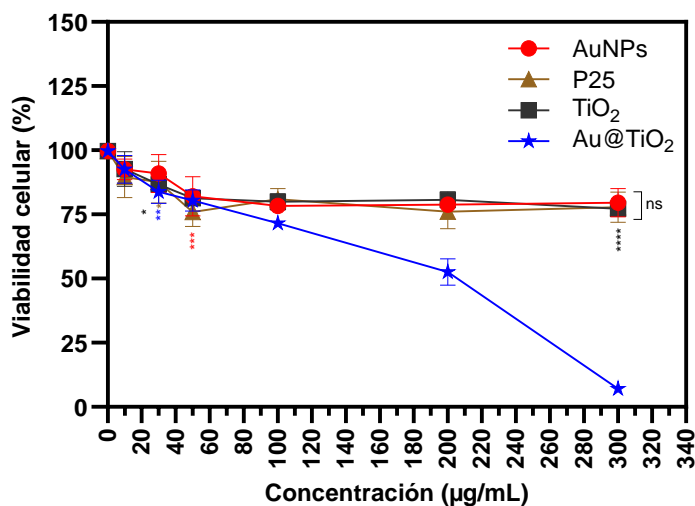


Figura 22. Evaluación de la viabilidad de células 3T3-L1 expuestas por 24 h a diferentes concentraciones de AuNPs, P25, TiO₂ y Au@TiO₂NPs por ensayo de MTT. Los símbolos indican los valores promedio \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres ensayos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican de la siguiente forma: *($P < 0.05$), **($P < 0.01$), ***($P < 0.001$) y ****($P < 0.0001$)

La evaluación de viabilidad celular en una exposición aguda (24 h) con AuNPs, P25, TiO₂ y Au@TiO₂NPs se representa en la Figura 22. La línea roja representa el porcentaje de viabilidad celular inducido por la exposición de los fibroblastos a las AuNPs, se observa un comportamiento similar en las concentraciones de 10-30 µg/mL, en las que no hay un contraste significativo en el porcentaje de células viables con respecto del control ($P > 0.05$). Mientras que se aprecia el efecto citotóxico de manera constante a partir de 50 µg/mL ($P < 0.001$) hasta 300 µg/mL ($P < 0.0001$). La línea café representa el porcentaje de viabilidad celular inducido por la exposición al TiO₂ tipo P25, el efecto citotóxico con este material es notable respecto al control, a partir de la concentración de 30 µg/mL ($P < 0.05$) hasta 300 µg/mL ($P < 0.0001$). Por lo anterior, no existe diferencia significativa de los valores promedio de la viabilidad celular entre AuNPs, P25 y TiO₂; y el porcentaje de células vivas fue superior al 75% en todas las concentraciones. La línea color negro representa el porcentaje de viabilidad de los fibroblastos que fueron expuestos a diferentes

concentraciones de TiO_2 (coraza). También se aprecia el efecto citotóxico a partir de $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.05$) hasta $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.0001$) respecto al control y su respuesta en la viabilidad celular fue de manera similar. La línea azul representa el porcentaje de viabilidad celular inducido por la exposición de los fibroblastos a las $\text{Au}@\text{TiO}_2\text{NPs}$, e indica un efecto citotóxico a partir de la concentración de $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ respecto al control ($P < 0.01$) con una tendencia dependiente de la concentración. La respuesta con $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ estuvo por abajo del 50% de viabilidad celular ($P < 0.0001$).

Viabilidad celular de fibroblastos expuestos a diferentes fuentes de luz

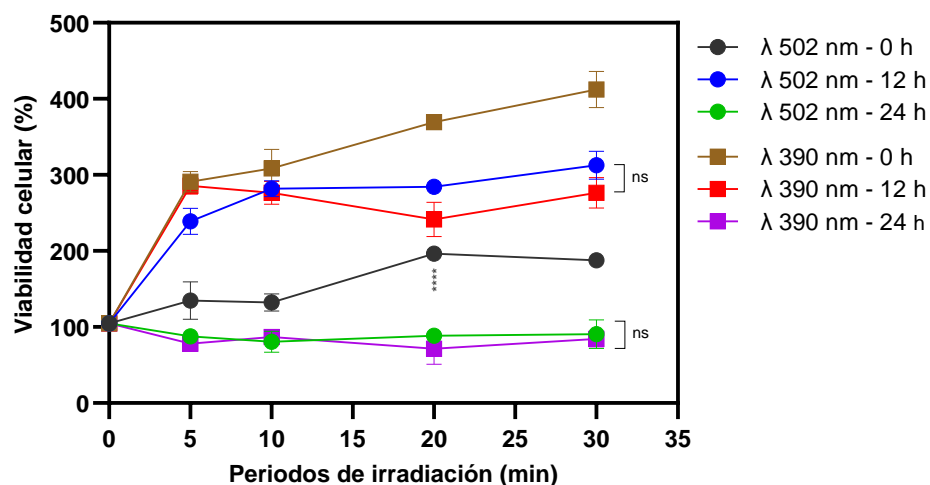


Figura 23. Evaluación de la viabilidad de células 3T3-L1 expuestas a fuentes de luz por diferentes periodos de irradiación y distintos intervalos de medición, por ensayo de MTT. Los símbolos indican los valores promedio \pm desviación estándar (SD) de 10,000 células en triplicado para tres ensayos independientes. Las diferencias significativas se indican de la siguiente forma: ****($P < 0.0001$)

El efecto de la luz verde (λ 502 nm) y luz UV (λ 390 nm) en la viabilidad de los preadipocitos 3T3-L1, expuestos a diferentes periodos de irradiación, fueron evaluados a distintos intervalos de medición mediante el ensayo de MTT (Figura 23). El eje de las abscisas representa el periodo de irradiación y el eje de ordenadas representa el porcentaje de viabilidad celular. La línea color negro representa el ensayo irradiado con luz verde, medido en el lector de absorbancia para microplacas de forma inmediata después de la irradiación y demuestra que la viabilidad celular comenzó a ser significativa ($P < 0.0001$) a partir de un periodo de 20 min de irradiación. En la medición después de 12 h con luz verde, la viabilidad celular fue significativa ($P < 0.0001$) en todos los periodos de tiempo, como lo ilustra la línea azul. Por último, la medición de 24 h después e irradiación con luz verde, que es el tiempo estandarizado para los ensayos de viabilidad celular, se indica con la línea verde y no mostró diferencia significativa con respecto al control ($P > 0.05$) en todos los periodos de tiempo de irradiación. En el caso del ensayo irradiado con luz UV y

medido de manera inmediata, es representado con una línea café, la viabilidad celular es significativa ($P < 0.0001$) en todos los periodos de tiempo de irradiación. Al medir 12 h después de la irradiación UV, la viabilidad celular también es significativa ($P < 0.0001$) en todos los periodos de tiempo de irradiación, como lo ilustra la línea roja. Por último, al hacer la medición 24 h después de la irradiación UV, la viabilidad celular indicada con una línea violeta, no mostró diferencia significativa con respecto al control ($P > 0.05$) en todos los periodos de tiempo de irradiación. Por lo anterior, no existe contraste ($P > 0.05$) en los valores promedio de la viabilidad celular entre ambas fuentes de luz en el tiempo de medición de 12 h y 24 h.

Viabilidad celular ante la exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs y diferentes fuentes de luz

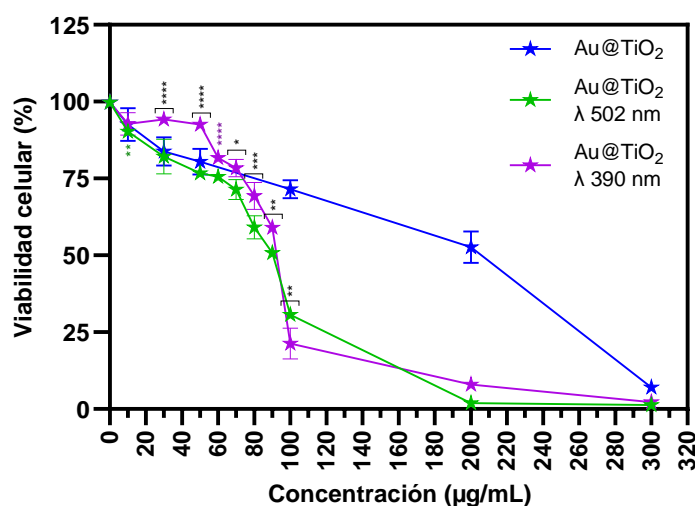


Figura 24. Evaluación de la viabilidad de células 3T3-L1 expuestas a diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs y distintas fuentes de luz mediante el ensayo de MTT. Los símbolos indican los valores promedio \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres ensayos independientes. Las diferencias significativas se indican de la siguiente forma: *($P < 0.05$), **($P < 0.01$), ***($P < 0.001$) y ****($P < 0.0001$)

La respuesta celular provocada por las diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs e irradiación por 10 min con las diferentes fuentes de luz se muestra en la Figura 24 (el eje de abscisas representa las diferentes concentraciones de NPs y el eje de ordenadas representa el porcentaje de viabilidad celular). La línea azul es una referencia a las Au@TiO₂NPs sin irradiación. La línea verde indica la viabilidad de las células expuestas con Au@TiO₂NPs e irradiación de luz verde, fue posible observar el efecto citotóxico dependiente de la concentración desde 10 µg/mL ($P < 0.01$) hasta 300 µg/mL ($P < 0.0001$), donde el porcentaje de viabilidad celular por abajo de 50% fue con 100-300 µg/mL. Por otro lado, la viabilidad de las células expuestas con Au@TiO₂NPs e irradiación de luz UV, se representa con la línea violeta, donde se demuestra que la respuesta en las concentraciones de 10-50 µg/mL es similar y no existen consecuencias en la viabilidad celular respecto al control ($P > 0.05$). A partir de 60 µg/mL fue perceptible el efecto

citotóxico dependiente de la concentración ($P < 0.0001$); además, de 100-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el porcentaje de viabilidad celular se localizó por abajo de 50%. Al comparar la misma concentración con diferente fuente de luz no se obtuvo un contraste significativo en las concentraciones de 10, 60, 200 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P > 0.05$).

Las concentraciones inhibitorias de Au@TiO₂NPs para el 50% de la población celular (IC₅₀) se muestran en la Tabla 2. Los resultados se obtuvieron con la herramienta de regresión no lineal y la curva de concentración-respuesta con análisis de cuatro parámetros.

Tabla 2. Concentraciones inhibitorias medias de Au@TiO₂NPs para la línea celular de fibroblastos al irradiar con diferentes fuentes de luz.

Fuente de luz	IC ₅₀	R ²
Luz verde (λ 502 nm)	92 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.97
Luz UV (λ 390 nm)	90 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.97

3.4 Efecto en la morfología de las células 3T3-L1

Exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs con y sin fuentes de luz

La morfología normal de la línea celular 3T3-L1 es similar a la de fibroblastos, son células estrelladas y muy ramificadas con prolongaciones citoplasmáticas que pueden ser cortas y anchas o largas y delgadas. En las imágenes control (células vivas) se visualiza una monocapa continua y uniforme en la superficie. Se relacionó esta variable cualitativa con el efecto citotóxico mediante la comparación de la morfología celular usando un microscopio óptico invertido. La alteración en la morfología de las células expuestas con Au@TiO₂NPs se registró en la Figura 25. El cambio en la densidad celular respecto al control comienza a ser más evidente a partir de 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por el decremento de uniones celulares y en la concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se perdió la morfología típica de fibroblastos volviéndose más pequeñas y redondas, además mostraron aglomeración y filopodios pequeños.

Los cambios morfológicos que presentaron los fibroblastos al ser expuestos a diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs e irradiadas con luz verde (λ 502 nm) y luz UV (λ 390 nm) se observan en la Figura 25. En el caso de la exposición a luz verde, a partir de la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observa una disminución sutil de la confluencia celular. Desde 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ las prolongaciones celulares disminuyen pronunciadamente

y con 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ las células perdieron su morfología estrellada tomando una forma redonda, aumentó su tamaño y formaron grupos. En el caso de la exposición a luz UV, la densidad celular fue similar al control hasta 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se visualizó una separación amplia entre las células y con 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ las células aumentaron su tamaño y tomaron una forma redonda formando cúmulos celulares.

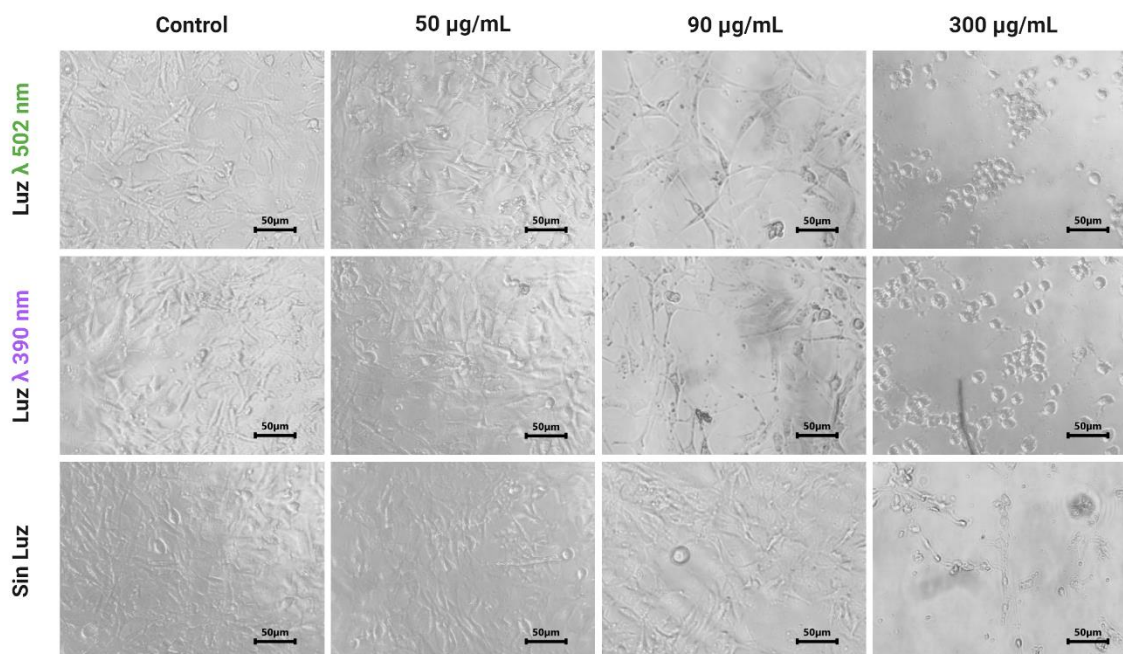


Figura 25. Alteración en la morfología de las células 3T3-L1 expuestas a las Au@TiO₂NPs e irradiación con y sin fuentes de luz, obtenidas por el microscopio óptico invertido. La barra de escala indica 50 μm

3.5 Generación de especies reactivas de oxígeno

3.5.1 Medición de las ROS por espectrofluorimetría

Au@TiO₂NPs en medio de cultivo

El resultado de la producción de especies reactivas de oxígeno inducidas por las Au@TiO₂NPs en medio de cultivo sin la presencia de células es parte del control, y la respuesta se muestra en la Figura 26. Las barras amarillas representan la medición de ROS de manera inmediata al terminar el procedimiento (0 h), y las barras naranjas indican que la medición se realizó 24 h después de terminar el método. Ambos casos se comportaron de manera similar, en ninguna de las concentraciones hubo un contraste significativo de producción de ROS respecto al control ($P > 0.05$).

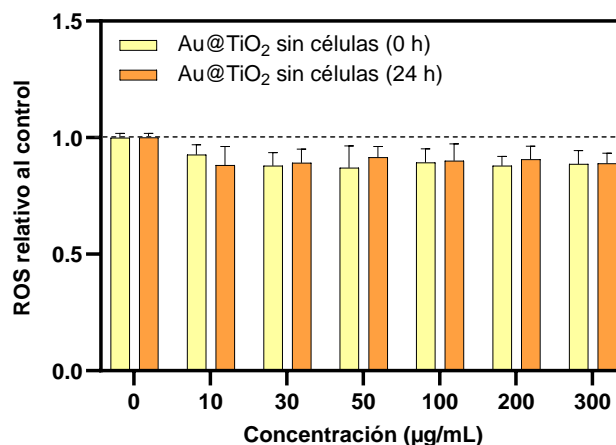


Figura 26. Generación de especies reactivas de oxígeno inducidas por las diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs en un medio de cultivo sin células. Los resultados son expresados con los promedios \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres experimentos independientes

Exposición de células 3T3-L1 con materiales estándar

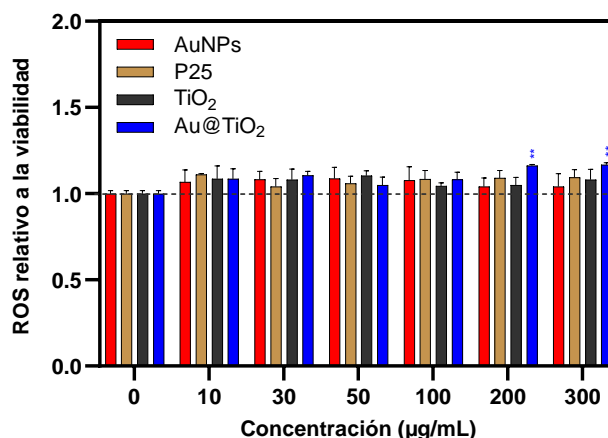


Figura 27. Generación de especies reactivas de oxígeno, inducidas en la exposición de células 3T3-L1 con diferentes concentraciones de AuNPs, P25, TiO₂ y Au@TiO₂NPs durante 24 h mediante el espectrofluorímetro. Los resultados son expresados con los promedios \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican de la siguiente forma: **($P < 0.01$)

La respuesta en la producción de ROS de las células expuestas con los materiales estándar se observa en la Figura 27. Las barras rojas representan la cantidad de ROS relativa al control inducida en los fibroblastos expuestos a las AuNPs, las cafés al TiO₂ tipo P25 y las de color negro al TiO₂ (coraza), estos materiales demuestran una tendencia similar en todas las concentraciones, no se registra una producción de ROS relativo a la viabilidad de manera significativa respecto al nivel basal de las células ($P > 0.05$). En cambio, las

Au@TiO₂NPs que son representadas por las barras azules, desde 10-100 µg/mL mantienen una respuesta similar sin producción de ROS diferente al control ($P>0.05$), pero con 200 y 300 µg/mL se obtuvo un incremento significativo de ROS respecto al control ($P<0.01$). Además, al comparar los valores promedio entre los diferentes materiales, no hubo un contraste significativo de generación de ROS relativo a la viabilidad ($P>0.05$).

Exposición de células 3T3-L1 con fuentes de luz

Es importante tener en cuenta la existencia de una posible sobreproducción de especies reactivas de oxígeno en las células 3T3-L1 por irradiación de luz verde (λ 502 nm) y luz UV (λ 390 nm). La respuesta indica que las células expuestas a la irradiación de luz verde y luz UV durante 10 min no producen una diferencia significativa de ROS respecto al control ($P> 0.05$), como se muestra en la Figura 28. El eje de las abscisas representa el periodo de tiempo de irradiación y el eje de ordenadas indica la fluorescencia generada por acción de ROS relativo a la viabilidad. Las barras verdes representan la exposición con λ 502 nm y las barras violetas con λ 390 nm.

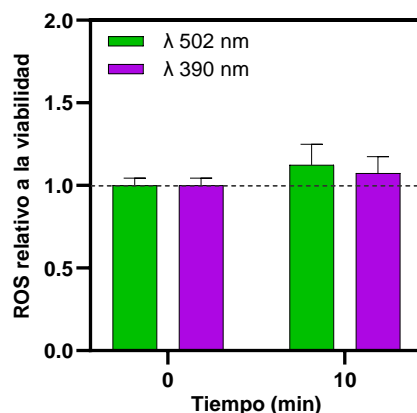


Figura 28. Generación de especies reactivas de oxígeno en la exposición de células 3T3-L1 a luz verde y luz UV por 10 min, obtenidas mediante espectrofluorímetro. Los resultados son expresados con el promedio \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres experimentos independientes

Exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs y fuentes de luz

Al exponer las células a la luz verde y luz UV durante 10 min, y observar que no genera especies reactivas de oxígeno significativas respecto al control, se procedió a determinar la cantidad de las ROS como resultado de la exposición de células con Au@TiO₂NPs y las diferentes fuentes de luz. El resultado se muestra en la Figura 29, el eje de abscisas representa las diferentes concentraciones de NPs y el eje de

ordenadas representa las ROS generadas relativo a la viabilidad. Las barras verdes indican la cantidad de ROS producidas por la irradiación con luz de λ 502 nm. A partir de la concentración de 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hubo un incremento en la producción de ROS de forma significativa respecto al control ($P < 0.0001$) y la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue la que generó mayor cantidad de ROS. En 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disminuyó la producción de ROS respecto a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pero mantuvieron el cambio significativo respecto al control, entre el par de concentraciones no hubo contraste. En el caso de la irradiación con luz de λ 390 nm, la cantidad de ROS producidas intracelularmente se representa con barras violeta. Desde 10-90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la generación de ROS fue similar al control ($P > 0.05$) pero de 100 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hubo un incremento significativo respecto al control ($P < 0.0001$) y no hubo contraste entre ellas. Además, al comparar cada concentración de nanopartículas, entre la luz verde y luz UV, existe un contraste en las concentraciones de 90 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.0001$).

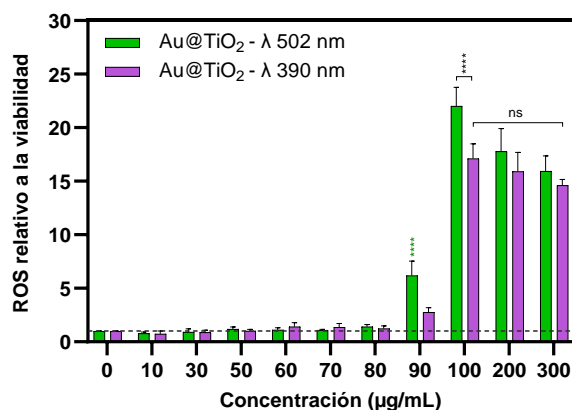


Figura 29. Generación de especies reactivas de oxígeno inducidas en la exposición de células 3T3-L1 con diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs y fuentes de luz, evaluadas mediante el espectrofluorímetro. Los resultados son expresados como los promedios \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican de la siguiente forma: ****($P < 0.0001$)

3.5.2 Medición de las ROS por citometría de flujo

Exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs y fuentes de luz

La técnica de citometría de flujo también nos permitió evaluar las especies reactivas de oxígeno con mayor precisión en la exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs, el resultado se exhibe en la Figura 30, el eje de abscisas representa las diferentes concentraciones de NPs y el eje de ordenadas representa la generación de ROS relativo al control. Las barras verdes de la Figura 30-A indican la generación de ROS al irradiar con luz de λ 502 nm. Las concentraciones de nanopartículas de 10 a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tienen un

comportamiento similar, su producción de ROS no es diferente al control ($P > 0.05$). A partir de $90 \mu\text{g/mL}$ hubo un incremento en la producción de ROS que contrasta con el control ($P < 0.0001$). La mayor producción de ROS fue cuando las células se expusieron a la concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ de nanopartículas. En el par de concentraciones subsecuentes disminuyeron las ROS, aunque mantuvieron una producción significativa respecto al control, este par de concentraciones no mostraron diferencias significativas entre ellas ($P > 0.05$). En el caso de las barras violeta, representan los valores de la producción de ROS en las células que fueron irradiadas con luz UV. La producción de ROS es estadísticamente significativa a partir de las concentraciones de nanopartículas de 100 a $300 \mu\text{g/mL}$ respecto al control ($P < 0.0001$) y no hubo un contraste entre las tres concentraciones ($P > 0.05$). Además, al comparar la respuesta en cada concentración de nanopartículas, entre luz verde y luz UV, existe una diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de 90 , 100 ($P < 0.0001$) y $200 \mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$).

Exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs

La generación de ROS inducida por la exposición a diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs sin la variable de fuente de luz, también se evaluó mediante el citómetro de flujo para obtener una respuesta más precisa. Estos resultados se muestran en la Figura 30-B, se observa que hubo diferencias significativas respecto al control a partir de $200 \mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$). Los resultados obtenidos a través de las distintas técnicas de detección de ROS: espectrofluorimetría y citometría de flujo, revelaron respuestas semejantes.

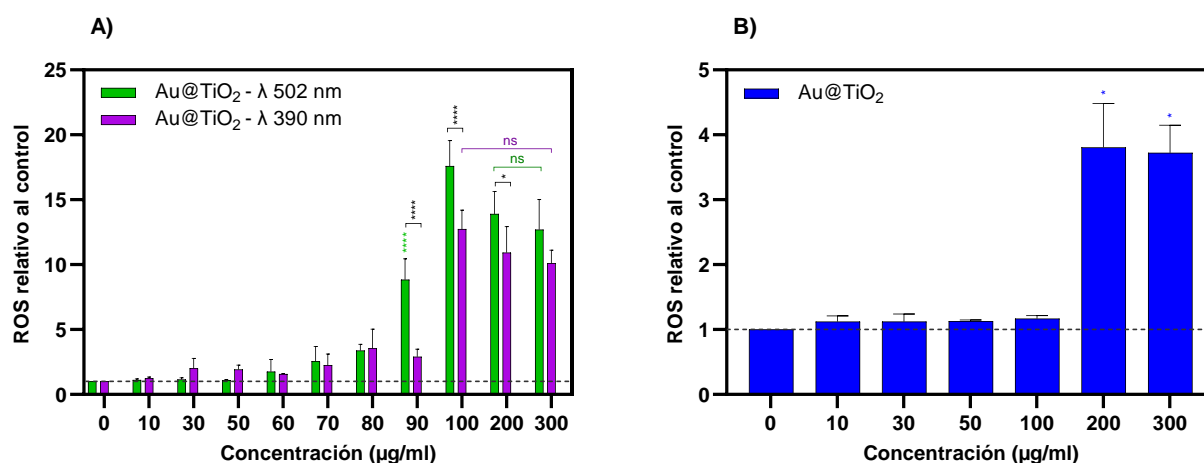


Figura 30. Generación de especies reactivas de oxígeno en la exposición de células 3T3-L1 con diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs. A) Con exposición a las fuentes de luz. B) Sin exposición a las fuentes de luz. Los resultados son expresados con los promedios \pm SD de 10,000 células en triplicado para tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican de la siguiente forma: *($P < 0.05$) y ****($P < 0.0001$)

3.6 Internalización celular medida por citometría de flujo

Exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs y fuentes de luz

Durante la interacción célula-NPs puede ocurrir un cambio en la complejidad celular, lo que se refiere a la granularidad interna de las células, en este caso puede indicar un proceso de internalización de las NPs. La complejidad interna de las células al ser expuestas a diferentes concentraciones de Au@TiO₂NPs y fuentes de luz durante 10 min se presenta en la Figura 31-A, el eje de abscisas indica la concentración de las NPs y el eje de ordenadas la complejidad celular relativa al control.

Las barras verdes representan la irradiación con luz de λ 502 nm, en este caso, no se observa un cambio en las concentraciones de 10-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respecto al control ($P > 0.05$). Por el contrario, a partir de 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el contraste es estadísticamente significativo ($P < 0.001$), siendo la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el nivel máximo de internalización de nanopartículas ($P < 0.0001$), ya que, en las concentraciones subsecuentes se percibe una disminución, pero mantiene el contraste significativo respecto al control. En el caso de las barras violeta, representan la complejidad interna de las células al ser irradiadas con luz UV en presencia de las nanopartículas. Es posible observar que desde la concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es claro el contraste respecto al control ($P < 0.0001$), con un comportamiento similar entre las concentraciones de 50-90 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La internalización máxima de las nanopartículas se registró en 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo, decrece en las concentraciones mayores manteniendo la significancia respecto al control. Además, al comparar la respuesta de cada concentración de nanopartículas, entre la luz verde y luz UV, hubo diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de 30-90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.0001$) y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.01$).

Exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs

Evaluar la complejidad interna de las células expuestas con Au@TiO₂NPs en ausencia de luz nos permitió distinguir el efecto ocasionado por las diferentes fuentes de luz. La Figura 31-B muestra que en todas las concentraciones de NPs evaluadas hay un cambio estadísticamente significativo respecto al control ($P < 0.0001$), lo que sugiere que existe internalización de las NPs en las células, y muestra un comportamiento similar entre las concentraciones de 10-50 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La máxima complejidad celular se registró en 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a partir de ahí comienzan a decrecer los valores manteniendo el contraste respecto al control. Al contrastar los resultados de la Figura 31-A y B se percibe menor complejidad celular después de irradiar con las diferentes fuentes de luz.

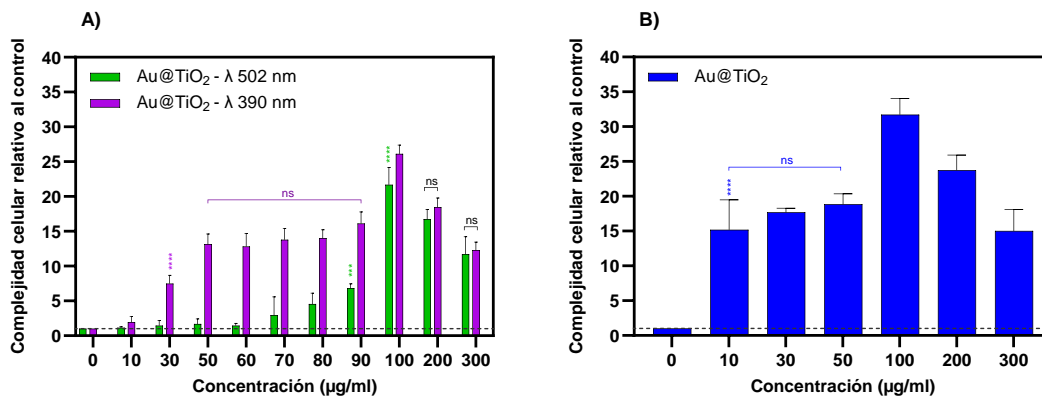


Figura 31. Complejidad interna de células 3T3-L1 tras la exposición con Au@TiO₂NPs mediante citometría de flujo. A) Posterior a la exposición con luz verde y luz UV. B) Sin exposición a las fuentes de luz. Los resultados son expresados con los promedios ± SD de 10,000 células en triplicado para tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican de la siguiente forma: ***($P < 0.001$) y ****($P < 0.0001$)

Capítulo 4. Discusión

En esta investigación trabajamos con dos materiales protagonistas, por un lado las NPs de oro, las cuales presentan propiedades importantes para nuestro trabajo, como la resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR, por sus siglas en inglés). Y por el otro lado, el TiO_2 presenta una banda prohibida de 3.2 eV lo que limita su absorción en el rango UV. También exhibe propiedades relevantes para este estudio, como su actividad fotocatalítica, ambos materiales comparten características como la biocompatibilidad, baja toxicidad y estabilidad química.

La razón para sintetizar nanopartículas de oro y recubrirlas con TiO_2 formando partículas tipo núcleo@coraza es para aprovechar sus propiedades de una manera sinérgica. Dos puntos clave de esta modificación son puntualizadas por X. Zheng et al. (2020), evita la recombinación de huecos de electrones en el TiO_2 al atrapar el electrón fotoexcitado de la AuNP y también aumenta el espectro de absorción hacia la luz visible. Quiere decir que, como el TiO_2 es un semiconductor que absorbe en la región UV, gracias a la incorporación del metal noble (Au) a través del LSPR puede ampliar su absorción en longitudes de onda visible. Esto es deseable para aplicaciones biológicas, por ejemplo, en la cicatrización de heridas, de esta manera se evita utilizar radiación UV, ya que en tiempos de exposición prolongados en la piel es más dañino que la exposición con luz visible. Otra consecuencia de la interacción sinérgica, es la generación de un mayor rendimiento cuántico de ROS, exhibiendo actividad fotocatalítica mejorada por irradiación de luz visible. Un mecanismo que disminuye la recombinación en Au- TiO_2 NPs consta de la excitación del plasmón superficial localizado con luz visible produciendo electrones energéticamente excitados en las AuNPs que pueden ser inyectados a la banda de conducción de TiO_2 , evitando su recombinación al tener la banda de valencia completa. Otro mecanismo plausible corresponde a que la presencia de oro, al ser un gran reservorio de electrones como metal, facilita la separación eficiente de pares electrón-hueco generados en el TiO_2 por luz UV al capturar los huecos fotogenerados, dejando electrones en el TiO_2 y disminuyendo su tasa de recombinación. Debido a que la mayoría de los electrones se generan cerca de la superficie del TiO_2 , pueden migrar eficazmente con menor probabilidad de recombinación (Seh et al., 2012).

El rol de las especies reactivas de oxígeno se presenta en la revisión de Diebold & Chandel (2016), los autores resaltan el desempeño de las mitocondrias en un papel de señalización esencial a través de su producción de ROS, regulando procesos importantes necesarios para la proliferación celular, siempre y cuando la generación de ROS se encuentre dentro del límite de una célula viva, este mecanismo es clave

para el proceso de cicatrización de heridas. Por este motivo, la evaluación *in vitro* se realiza con el modelo de fibroblastos 3T3-L1 porque son células que participan en la respuesta inmune, inflamación, angiogénesis, adipogénesis y reepitelización durante la cicatrización de heridas (Pan et al., 2021; Siebert et al., 2016).

4.1 Síntesis y caracterización fisicoquímica de las Au@TiO₂NPs

Sintetizamos nanopartículas de oro recubiertas con TiO₂. El criterio para la elección de tamaño de AuNPs tiene un papel relevante, se tomó en cuenta la biocompatibilidad, en la revisión de Kiio & Park (2021) consideran que el tamaño óptimo se encuentra en el rango de 10 a 1000 nm para aplicaciones en nanomedicina. También contemplamos un tamaño suficiente para absorber una gran cantidad de luz y que el pico de la LSPR se sintonice con la emisión del LED visible (λ 502 nm).

Las AuNPs obtenidas presentan una morfología cuasi-esférica con tamaño promedio de 24 ± 2 nm, han sido sintetizadas mediante una metodología que permite ajustar la resonancia de plasmón de superficie localizado de acuerdo a nuestro criterio. Con la primera generación de crecimiento de las NPs se alcanza la LSPR en 524 nm que se correlaciona con un tamaño de ≈ 24 nm, este dato coincide con lo reportado en la metodología de Bastús et al. (2011). Durante el proceso de recubrimiento de TiO₂, la LSPR se desplaza en cada paso hacia el rojo. Las partículas tipo núcleo@coraza resultan con una LSPR de 532 nm, con tamaño promedio de 32 ± 3 nm. Por lo que, las NPs aumentaron 7 ± 2 nm de diámetro con el recubrimiento. La coraza es de estructura amorfa y el desplazamiento en la LSPR surge por un aumento general en el índice de refracción del entorno dieléctrico que rodea a las AuNPs, correspondiente al recubrimiento de TiO₂. Estas nanoestructuras tienen capas de TiO₂ con alto índice de refracción (~ 2.5) en todos los lados del núcleo de oro, por lo que el desplazamiento de la LSPR hacia el rojo nos indica el recubrimiento del material (Seh et al., 2012). Además, en el espectro de UV-Visible se detecta una banda de absorción en la región UV característica del TiO₂.

Los resultados de potencial zeta y tamaño hidrodinámico proporcionan datos importantes acerca de las propiedades fisicoquímicas de las NPs en medios acuosos. El valor del potencial Z se debe a las propiedades de las partículas como la densidad de carga y las propiedades de la solución como la fuerza iónica y su composición. La magnitud y el signo de la carga dependen muy a menudo del pH de la solución. A un pH bajo, los grupos hidroxilo superficiales pueden protonarse y cargarse positivamente, mientras que a un pH alto estos sitios están cargados negativamente. Los valores de potencial zeta superiores a ± 30 mV se

consideran moderadamente estables contra la agregación en coloides, debido a la estabilización de la carga, es decir, las fuerzas electrostáticas de repulsión son suficientemente altas para evitar la agregación. La presencia de iones y la concentración de NPs también afecta la esfera hipotética y altera la movilidad electroforética, por lo que, al dispersar las NPs en medio de cultivo, el potencial zeta tiende a cambiar (Lowry et al., 2016). El potencial Z de las AuNPs en un medio de H₂O indica un valor promedio de -27 mV, ya que están cubiertas con iones citrato, lo que les confiere carga superficial negativa. Las Au@TiO₂NPs se forman en un medio de isopropanol con pH=9-10, el potencial Z resulta en -21 mV. Las Au@TiO₂NPs transferidas a un medio de H₂O previo a su evaluación en células, cuentan con una carga superficial de -24 mV.

Mediante DLS, las AuNPs en H₂O registran una distribución bimodal de su diámetro hidrodinámico, correspondientes a partículas individuales, junto con la intensidad del segundo pico que es significativamente mayor, lo que indica un diámetro hidrodinámico promedio de 84 ± 3 nm. En las Au@TiO₂NPs el tamaño promedio de las partículas individuales aumentó por el recubrimiento de TiO₂, en este caso, se encuentran en un medio de alcohol y también se registra una distribución bimodal con un diámetro hidrodinámico de 348 ± 20 nm. Al transferirlas a un medio con H₂O resulta un tamaño promedio de 173 ± 15 nm con una distribución trimodal, los dos primeros picos corresponden a partículas individuales y surge un tercer pico que se atribuye a partículas aglomeradas. El cambio de diámetro hidrodinámico en AuNPs y Au@TiO₂NPs en un medio de H₂O, se debe al recubrimiento por las diferentes propiedades de cada material. El contraste entre las Au@TiO₂NPs en H₂O y en el medio de alcohol se atribuye a la interacción entre los diferentes solventes con las NPs.

El tamaño obtenido mediante DLS es mayor que el tamaño analizado con TEM. La discrepancia se debe a que el DLS mide un tamaño hidrodinámico, es decir, una esfera hipotética que rodea la partícula dura, principalmente una capa de dipolo eléctrico que se adhiere a la superficie; en lugar de medir un tamaño físico en TEM. Además, el DLS es muy sensible a pequeñas cantidades de partículas grandes, como la agregación de varias partículas y esto cambia las mediciones basadas en DLS a tamaños más grandes (Cumberland & Lead, 2009).

El efecto del diámetro hidrodinámico relacionado con la agregación de NPs es diferente al potencial Z, las Au@TiO₂NPs en H₂O tienen un diámetro hidrodinámico más pequeño y muestran cierta agregación, caso distinto a cuando están en el medio de alcohol, donde tienen un diámetro hidrodinámico más grande y se esperaría una mayor agregación en tal solvente. Esta tendencia de agregación corresponde a estudios

previos donde informan que las NPs con diámetro hidrodinámico más pequeño tienen un mayor grado de difusividad que las NPs con diámetro hidrodinámico más grande (Kim et al., 2019).

4.2 Caracterización fisicoquímica del TiO₂ tipo P25

El TiO₂ tipo P25 representa el material modelo utilizado como referencia de la coraza. De acuerdo al fabricante (Sigma-Aldrich), el material tiene fases mixtas de 80% anatasa y 20% rutilo, y las partículas primarias tienen un diámetro de 21 nm. La anatasa exhibe solo una banda prohibida indirecta y generalmente se asigna a una banda prohibida en el rango de 3.2 a 3.7 eV, mientras que el rutilo tiene bandas prohibidas tanto directas como indirectas en el rango de 3.02 a 3.24 eV. Los valores de banda prohibida estimados mediante el diagrama de Tauc que se encuentra en la literatura están entre 2.9 y 3.65 eV y se asignan a transiciones entre bandas directas e indirectas. En el caso de banda prohibida indirecta resulta un valor de ≈ 2.9 eV y una banda prohibida directa muestra un valor de ≈ 3.3 eV. Este método tiene algunas limitantes, como la elección de la parte lineal de la curva porque es subjetivo (Apopei et al., 2014; Klein et al., 2023). La caracterización del P25 registra un borde de absorción característico en la región UV y su banda prohibida es de 3.2 eV. Para estimar la banda prohibida, se considera como un semiconductor descrito por transiciones directas permitidas. Además, las imágenes del TEM presentan aglomerados de partículas con morfología irregular.

4.3 Efecto de la luz en las células

Conocer el efecto de la luz verde y luz UV en las células es necesario antes de la evaluación toxicológica de las NPs. Se ha demostrado que la luz verde (530 nm) se puede aplicar para diversas activaciones de fotosensibilizadores y no induce un aumento detectable en el daño del ADN o la apoptosis celular. Por otro lado, la luz ultravioleta en el rango de 100 a 400 nm puede dañar los componentes biológicos, además, la penetración tisular es restringida, por lo que su uso biomédico es limitado (He et al., 2023; Khorsandi et al., 2022). La toxicidad en las células inducida por luz depende de las condiciones de los ensayos *in vitro*, por ejemplo, en el estudio de K. Cheng et al. (2018), irradian células SUM159 con luz UV (365 nm) durante 30 min y no se observa muerte celular significativa. En este trabajo se muestra que la irradiación con las diferentes longitudes de onda (502 nm y 390 nm) en los diferentes periodos de exposición, inducen un estímulo en la viabilidad celular, esto se observa al hacer la medición a las 0 y 12 h. Mientras que, al tiempo estandarizado de los ensayos *in vitro* (24 h) vuelve a su estado basal. Por lo tanto, la potencia entregada

por los LEDs no es lo suficientemente alta para producir un efecto nocivo en la viabilidad celular de las células 3T3-L1. Esto debido a que los LED emiten luz incoherente con un espectro estrecho y baja intensidad, induciendo un proceso de fotobiomodulación, el cual es un efecto suave sobre las células que regula la actividad biológica con un efecto térmico no destructivo (He et al., 2023).

También evaluamos la generación de especies reactivas de oxígeno producidas por las células al ser expuestas durante 10 min a la irradiación. La luz LED estimula los fibroblastos, ya que los fotones son absorbidos principalmente por las mitocondrias de las células. Por ejemplo, la luz verde excita la porfirina intracelular, lo que puede resultar en la generación de ROS (Van Tran et al., 2021). En el presente estudio, no existe una producción significativa de ROS ocasionado por las diferentes fuentes de luz, esto se puede atribuir a la capacidad de las células de adaptarse al estrés inducido por luz de baja intensidad.

4.4 Efecto en la viabilidad celular

El efecto de las NPs en la viabilidad celular es un factor importante en la evaluación nanotoxicológica. En el trabajo de T. Zheng et al. (2019) evaluaron la exposición de células HeLa con Au@TiO₂NPs tipo núcleo@coraza, con diámetro del núcleo de oro de 30 nm y un espesor promedio de la coraza de TiO₂ de 32 nm. No observaron citotoxicidad en el rango de concentraciones de 50 a 150 µg/mL, mientras que aparece reducción de la viabilidad celular en concentraciones altas (200 µg/mL). Después de la irradiación con láser (635 nm), demuestra un comportamiento de reducción de viabilidad dependiente de la concentración. Así mismo, en el trabajo de Wang et al. (2022) exponen células de carcinoma epidermoide oral humano (KB) con AuNP@TiO₂NPs núcleo@coraza, donde las concentraciones evaluadas son menores y también presentan baja toxicidad para las células sin irradiación. Por el contrario, la viabilidad celular disminuye al ser irradiadas con LED verde (532 nm). En otro estudio, los autores utilizan AuNPs de 53 nm y TiO₂NPs de 50 nm, ambos materiales son evaluados en células de cáncer de mama (SUM159). La máxima concentración analizada de AuNPs es de 120 µg/mL, y la de TiO₂ de 40 µg/mL, en ninguna muestran citotoxicidad (K. Cheng et al., 2018).

Los resultados obtenidos indican que las Au@TiO₂NPs presentan buena biocompatibilidad en el rango de 10-100 µg/mL. La ligera reducción de la viabilidad celular se asocia con la interacción célula-NPs, este efecto es más activo con la internalización de las NPs en las células. Las NPs pueden permanecer dentro de la célula durante mucho tiempo sin exocitosis, lo que provoca el colapso del proceso biológico fundamental en la célula y como consecuencia causa citotoxicidad (J. Liu et al., 2023). En concentraciones

altas (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se registra citotoxicidad de forma abrupta debido a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. Mientras que, al ser irradiadas con luz verde (λ 502 nm) y luz UV (λ 390 nm) se registra citotoxicidad más pronunciada y se puede atribuir al efecto fototérmico y la fotocatalisis. En los tres casos disminuye el porcentaje de viabilidad celular conforme aumenta la concentración de NPs. Los materiales estándar evaluados (AuNPs, P25 y TiO_2) demuestran mejor biocompatibilidad *in vitro*.

4.5 Efecto en la morfología de las células

Otro parámetro importante es la alteración de la morfología celular al ser expuestas con Au@ TiO_2 NPs. Las células 3T3-L1 tienen una morfología típica estrellada y ramificada. Los cambios morfológicos están relacionados con los tipos de muerte celular. La apoptosis implica la rápida demolición de todas las estructuras y orgánulos celulares, la morfología de las células apoptóticas consta en formar pequeños cuerpos redondos y contienen orgánulos citoplasmáticos intactos o fragmentos del núcleo, se reduce la densidad celular y nuclear (picnosis), y sufren de retracción de pseudópodos. Por otro lado, la necrosis suele definirse como un tipo de muerte celular que implica la rotura de la membrana plasmática sin las características de la apoptosis o autofagia. Las principales características de la necrosis incluyen un aumento de volumen celular (oncosis) que finalmente culmina en la rotura de la membrana plasmática y el desmantelamiento desorganizado de los orgánulos inflamados (Galluzzi et al., 2007). Al exponer los fibroblastos con Au@ TiO_2 NPs reducen su tamaño, lo que puede indicar apoptosis, caso contrario cuando se incluye la exposición con luz, donde se observa un aumento de tamaño celular que puede relacionarse con necrosis. En ambos casos cambian a una forma redonda, disminuye la densidad celular y forman grupos entre ellas. Conforme aumenta la concentración de NPs son más notables los cambios morfológicos.

4.6 Internalización celular

Existe internalización en todas las concentraciones de Au@ TiO_2 NPs y la respuesta indica que las células llegan a su límite de absorción de NPs con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La internalización de las NPs en las células se atribuye a que las NPs con un tamaño de 30 a 50 nm exhiben absorción celular eficiente debido al área de superficie específica y el proceso de envoltura de la membrana, también contribuye la formación de la corona proteica al estar en un medio de cultivo. Además, el tamaño también influye en la vía por la que ingresan a las células, las NPs de 30 a 200 nm de diámetro se incorporan intracelularmente mediante endocitosis

dependiente de clatrina o caveolina, donde las NPs se encapsulan en vesículas formadas por la membrana celular que las transporta al interior de las células (Kiio & Park, 2021).

No obstante, ocurre un proceso notable de exocitosis después de la irradiación con luz. Al iluminar con el LED verde, se observa internalización celular a partir de 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que con luz UV se muestra internalización a partir de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En ambos casos, el contenido de NPs intracelular alcanza la saturación con la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta reducción de complejidad celular después de la irradiación con las fuentes de luz se debe a un proceso de exocitosis, que es el transporte de moléculas no esenciales o NPs desde el interior de una célula al exterior para reducir el estrés dentro de la célula; un proceso opuesto a la endocitosis, pero ocurren de forma simultánea. El principal mecanismo de exocitosis de NPs es la vía lisosomal que implica la fusión de la membrana celular, pero pueden excretarse por más de una vía, como la vía del RE/aparato de Golgi, vía de reciclaje rápido y por difusión (J. Liu et al., 2023). Esto puede ocurrir principalmente por la estimulación de las células con luz, de acuerdo con el trabajo de Cho et al. (2023), la estimulación física de las membranas celulares mediante LED azul e infrarrojo cercano (NIR) durante 10 min altera su estructura, provocando una apertura temporal de la membrana. Además, la longitud de onda más larga induce mayor permeabilidad que la longitud de onda corta. Entonces, así como la luz LED puede facilitar la internalización de NPs, también podría facilitar la exocitosis de manera más eficiente con la luz verde que tiene mayor longitud de onda que la luz UV. También puede influir un mayor tiempo de exposición de las células con NPs en los ensayos estandarizados *in vitro* con luz (48 h). Esto se fundamenta en la revisión de J. Liu et al. (2023), al comienzo de la exposición con NPs, la endocitosis domina en las células y a medida que el contenido de NPs intracelular aumenta con el tiempo, aparece la exocitosis de NPs.

4.7 Generación de especies reactivas de oxígeno

Como control, se evaluó la producción de ROS generadas por las Au@TiO₂NPs en un medio de cultivo sin células, donde no obtuvimos una producción de ROS estadísticamente significativa inducida por las NPs. En los materiales estándar no existe sobreproducción de ROS, debido a la ausencia de irradiación con luz y su biocompatibilidad. Esto es consistente con el trabajo de K. Cheng et al. (2018), donde analizan la generación de ROS producidas por AuNPs y TiO₂ en células SUM-159. Sus resultados demuestran ausencia de producción de ROS respecto al control, sin embargo, después de irradiar con luz UV (365 nm) durante 30 min, existe una producción de ROS con TiO₂NPs. Al hacer la evaluación en las células 3T3-L1 expuestas con Au@TiO₂NPs se presenta sobreproducción de ROS en las concentraciones altas (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el estrés

oxidativo es ocasionado por el desequilibrio entre la generación de ROS y los sistemas de defensa antioxidantes.

Tras la irradiación con luz UV, existe sobreproducción de ROS por encima de la IC_{50} (90 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pese a que se identifica internalización de NPs desde 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Puede tomarse en cuenta la posibilidad de una baja producción de ROS en las concentraciones donde existe internalización que es minimizada por las mitocondrias en su adaptación metabólica para reducir el daño celular. Los resultados nos demuestran que si se produce el efecto fotocatalítico al absorber luz UV no es suficiente para un aumento moderado de ROS. En general, las concentraciones que generan ROS inducen la muerte celular de manera abrupta por la sobreproducción. En el caso de irradiar con luz verde, la producción de ROS es mayor en comparación con la luz UV a partir de 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$, presumiblemente por la interacción sinérgica entre el oro y TiO_2 en la actividad fotocatalítica potenciada por la LSPR y/o el efecto fototérmico causado. Debe resaltarse que también se registra sobreproducción de ROS por encima de la IC_{50} (92 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los resultados con luz verde demuestran que, una vez las NPs ingresan en las células, la producción de ROS es eficiente con luz visible, por lo que la producción de ROS depende de la internalización celular.

El efecto de producción de ROS por la vía fotocatalítica de las NPs se comprueba en la investigación de Cushing et al. (2015), donde evaluaron el efecto fotocatalítico producido por $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ tipo núcleo@coraza, los autores implementaron la misma metodología de recubrimiento con TiO_2 que utilizamos en el presente trabajo. Concluyen que, en las $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ al no existir superposición espectral entre la resonancia de plasmón de superficie localizado del núcleo de oro y la banda de absorción de TiO_2 , la transferencia de energía por resonancia inducida por plasmones (PIRET) es imposible con luz visible, pero el contacto directo entre el núcleo de oro y la capa de TiO_2 hace posible la inyección de electrones calientes. Con este mecanismo los electrones del oro se inyectan en la banda de conducción del semiconductor, los cuales son capaces de reaccionar con el medio, produciendo ROS en la superficie del TiO_2 . Por otro lado, al irradiar con luz UV, ocurre el modelo convencional de generación de ROS con TiO_2 , el semiconductor absorbe la luz UV excitando los electrones de la banda de valencia y pasan a la banda de conducción, finalmente la formación de pares electrón-hueco producen ROS.

El mecanismo de generación de ROS con $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ e irradiación con luz verde también se describe en el trabajo de T. Zheng et al. (2019), el efecto de la LSPR de las AuNP extiende la absorción óptica hacia la luz visible, por lo tanto, se producen fotoelectrones que se transfieren desde las AuNP a la banda de conducción del TiO_2 , dejando huecos en las AuNP. Los electrones reactivos en la superficie del TiO_2 se combinan con el oxígeno para formar radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y los huecos pudieran reaccionar con H_2O

liberando radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) por difusión de moléculas de H_2O a través del recubrimiento poroso de TiO_2 , por lo que, estas especies reactivas de oxígeno se pueden generar en la superficie del TiO_2 y Au. Los hallazgos mencionados anteriormente coinciden con T. Zheng et al. (2019), ellos evalúan $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ hasta una concentración de $200 \mu\text{g/mL}$ y no presentan generación de ROS sin ser excitadas, pero la intensidad de la señal aumenta bruscamente en la irradiación con láser de 635 nm. Lo que confirma que las $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ respaldan eficientemente la conversión de energía producida por la irradiación en energía química y en consecuencia liberan ROS.

4.8 Perspectivas futuras

Ahora bien, es interesante la respuesta al irradiar con luz verde en la IC_{50} ($90 \mu\text{g/mL}$), la cual consideramos que se encuentra en la ventana efectiva, donde existe internalización de NPs en las células, se mantiene el 50% de viabilidad celular y se detecta una producción moderada de ROS. Estos resultados son atractivos cuando se correlacionan con lo reportado por X. Liu et al. (2018), las especies reactivas de oxígeno implicadas en estos procesos son el $\cdot\text{OH}$ y O_2^- , las cuales pudieran generarse por medio de la fotocatalisis inducida con luz visible para su participación en la regulación de proliferación, migración y diferenciación celular de los preadipocitos 3T3-L1, procesos que favorecen la cicatrización de heridas.

Por lo anterior, se plantean las perspectivas futuras de la evaluación con la IC_{50} de las $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ irradiadas con luz verde encaminadas hacia la cicatrización de heridas. Lo cual consistiría en el estudio de la alteración en el ciclo celular ocasionado por las $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ para comprender el crecimiento y proliferación de las células 3T3-L1. También es importante comprobar si el recultivo de células registra muerte celular debido a un efecto citotóxico o si ocurre un efecto citostático al ser capaces de continuar proliferando. Además, el ensayo de estría sería útil para proporcionar la respuesta de su capacidad de proliferación celular al simular una herida.

Cabe resaltar que, aunque queremos evitar la luz UV en aplicaciones biomédicas, existe una ventana atractiva de 30 a $50 \mu\text{g/mL}$ al irradiar con luz UV, estas concentraciones no muestran reducción de viabilidad celular respecto al control, en cambio, cuando no son irradiadas muestran reducción de viabilidad celular desde $30 \mu\text{g/mL}$. Debido a los resultados obtenidos con las diferentes fuentes de luz podríamos aprovechar un efecto sinérgico con luz verde y luz UV. También sería importante evaluar la producción de ROS fotocatalíticas generadas por las $\text{Au@TiO}_2\text{NPs}$ al ser irradiadas con las fuentes de luz. Por último, las concentraciones que producen un aumento excesivo de ROS causan estrés oxidativo e

inducen la muerte celular, esta ventana de concentración se puede emplear para aplicaciones con objetivo de destruir células malignas.

4.9 Diagrama de los mecanismos propuestos

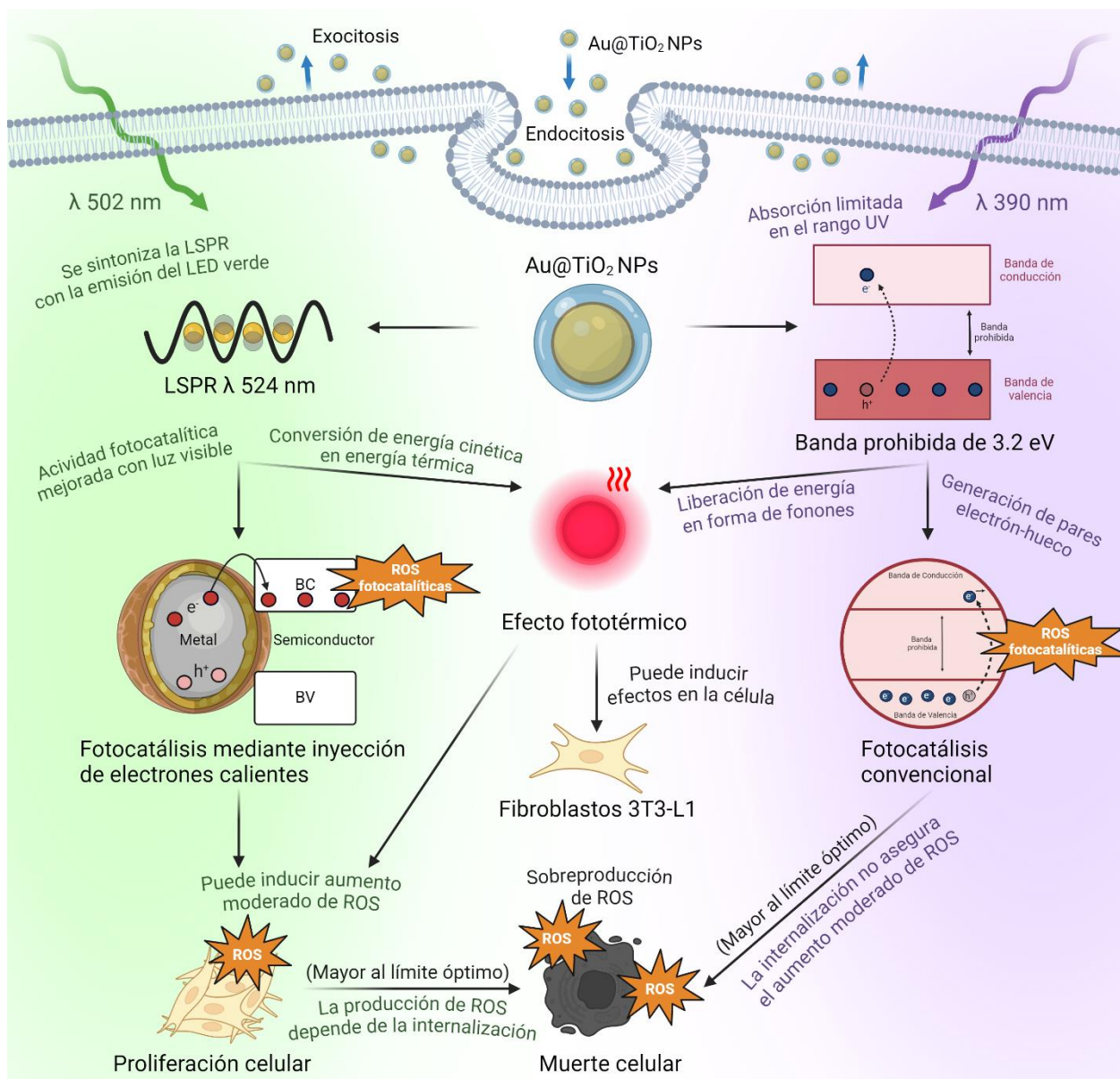


Figura 32. Mecanismos propuestos de acuerdo a los resultados obtenidos, que ocurren en la exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs tras la irradiación con las diferentes fuentes de luz

En resumen, la Figura 32 presenta los mecanismos propuestos de acuerdo con los resultados obtenidos

que ocurren en la exposición de células 3T3-L1 con Au@TiO₂NPs al ser irradiadas con las diferentes fuentes de luz. La interacción comienza con la internalización de Au@TiO₂NPs en las células mediante endocitosis. Al irradiarlas con luz verde o UV se estimula la membrana, lo que promueve el proceso de exocitosis.

Cuando se emite luz verde y su longitud de onda de emisión se sintoniza con la LSPR del Au, produce una actividad fotocatalítica mejorada con luz visible, mediante el mecanismo de inyección de electrones calientes; también ocurre un efecto fototérmico después de que los electrones se excitan y producen resonancia (decaimiento del LSPR), convirtiendo la energía cinética que se genera a energía térmica. Para que exista una producción de ROS significativa dentro de la célula al irradiar con luz verde es necesario que las NPs se internalicen en las células. Además, un aumento moderado de ROS puede favorecer la proliferación celular, de lo contrario, la sobreproducción de ROS induce muerte celular.

Cuando se emite luz UV, los fotones con energía superior a la banda prohibida de 3.2 eV son absorbidos por el TiO₂ y genera pares electrón-hueco mediante el modelo de fotocátalisis convencional lo cual puede generar ROS; o bien, después de la generación de los pares electrón-hueco, a través de la relajación de los electrones excitados puede irse liberando energía en forma de fonones, lo que produce un efecto fototérmico. En este caso, la internalización celular no asegura producción de ROS en cantidades adecuadas, ya que solo se logra generar en las concentraciones altas induciendo muerte celular por sobreproducción de ROS.

Capítulo 5. Conclusiones

Las AuNPs, P25 y TiO₂ (coraza) son biocompatibles en células 3T3-L1 en todas las concentraciones evaluadas.

La exposición de células 3T3-L1 a irradiación de luz verde (λ 502 nm) y UV (λ 390 nm) no reduce la viabilidad celular y mantienen la producción de ROS similar al control.

Las Au@TiO₂NPs con las fuentes de luz generan efectos sinérgicos en la evaluación de ensayos *in vitro*. Donde la LSPR de las AuNPs hace posible la actividad fotocatalítica del TiO₂ en luz visible, mediante el mecanismo de inyección de electrones calientes. Y el efecto fototérmico también se hace presente en las NPs.

La viabilidad de las células 3T3-L1 expuestas a Au@TiO₂NPs decrece de forma dependiente de la concentración de NPs. De acuerdo con las IC₅₀, la exposición de las Au@TiO₂NPs a luz UV es ligeramente más tóxica que la luz verde.

La morfología de las células se altera conforme aumenta la concentración de Au@TiO₂NPs. Estos cambios con y sin fuentes de luz pueden indicar necrosis y apoptosis, respectivamente.

Es altamente probable que la endocitosis sea el mecanismo por el que las Au@TiO₂NPs se internalicen en las células. Sin embargo, es posible que después del estímulo con las fuentes de luz se promueva la exocitosis de las NPs.

La producción de ROS en la exposición de fibroblastos con Au@TiO₂NPs y fuentes de luz es inducida por el efecto fototérmico y/o fotocatalisis.

La irradiación con luz UV no asegura una generación de ROS significativa a pesar de que las NPs hayan sido internalizadas. Con irradiación de luz verde, la producción de ROS depende de la internalización de las NPs, lo que demuestra eficiencia de producción de ROS con luz visible.

Los hallazgos del estudio sugieren que se acepta la hipótesis, ya que la exposición de fibroblastos 3T3-L1 con la IC₅₀ de Au@TiO₂NPs a luz verde produce un aumento moderado de especies reactivas de oxígeno y un efecto fototérmico que puede favorecer la proliferación celular.

Literatura citada

- Anh Nga, N. T., Fathima H, A., & Alahmadi, T. A. (2024). Assessment of possible biomedical applications of green synthesized TiO₂NPs-an in-vitro approach. *Environmental Research*, 248, 118278. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118278>
- Apopei, P., Catrinescu, C., Teodosiu, C., & Royer, S. (2014). Mixed-phase TiO₂ photocatalysts: Crystalline phase isolation and reconstruction, characterization and photocatalytic activity in the oxidation of 4-chlorophenol from aqueous effluents. *Applied Catalysis B: Environmental*, 160–161(1), 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.05.030>
- Bastús, N. G., Comenge, J., & Puentes, V. (2011). Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: Size focusing versus ostwald ripening. *Langmuir*, 27(17), 11098–11105. <https://doi.org/10.1021/la201938u>
- Cheng, G., & Li, B. (2020). Nanoparticle-based photodynamic therapy: New trends in wound healing applications. *Materials Today Advances*, 6, 100049. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2019.100049>
- Cheng, K., Sano, M., Jenkins, C. H., Zhang, G., Vernekohl, D., Zhao, W., Wei, C., Zhang, Y., Zhang, Z., Liu, Y., Cheng, Z., & Xing, L. (2018). Synergistically enhancing the therapeutic effect of radiation therapy with radiation activatable and reactive oxygen species-releasing nanostructures. *ACS Nano*, 12(5), 4946–4958. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02038>
- Cheng, S., Latthe, S. S., Nakata, K., Xing, R., Liu, S., & Fujishima, A. (2024). Recent advancements in design, development and demands of photothermal superhydrophobic materials. *Materials Today Chemistry*, 35, 101868. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2023.101868>
- Cho, H. B., Kim, H. J., Lee, S., Kim, H. R., Lee, S., Park, J. I., & Park, K. H. (2023). Reduction of nanoparticle size and promotion of cell membrane permeability by LED irradiation. *Materials Today Nano*, 24, 100397. <https://doi.org/10.1016/j.mtnano.2023.100397>
- Choi, C. E., Chakraborty, A., Coyle, A., Shamiya, Y., & Paul, A. (2022). Contact-free remote manipulation of hydrogel properties using light-triggerable nanoparticles: A materials science perspective for biomedical applications. *Advanced Healthcare Materials*, 11(8), 2102088. <https://doi.org/10.1002/adhm.202102088>
- Cumberland, S. A., & Lead, J. R. (2009). Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions. *Journal of Chromatography A*, 1216(52), 9099–9105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.021>
- Cushing, S. K., Li, J., Bright, J., Yost, B. T., Zheng, P., Bristow, A. D., & Wu, N. (2015). Controlling plasmon-induced resonance energy transfer and hot electron injection processes in metal@TiO₂ core-shell nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 119(28), 16239–16244. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03955>
- Diebold, L., & Chandel, N. S. (2016). Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.198>

- Elahi, N., Kamali, M., & Baghersad, M. H. (2018). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, *184*, 537–556. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*, *14*(7), 1237–1243. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402148>
- Geppert, M., Schwarz, A., Stangassinger, L. M., Wenger, S., Wienerroither, L. M., Ess, S., Duschl, A., & Himly, M. (2020). Interactions of TiO₂ nanoparticles with ingredients from modern lifestyle products and their effects on human skin cells. *Chemical Research in Toxicology*, *33*(5), 1215–1225. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00428>
- He, X., Jin, S., Dai, X., Chen, L., Xiang, L., & Zhang, C. (2023). The emerging role of visible light in melanocyte biology and skin pigmentary disorders: Friend or foe? *Journal of Clinical Medicine*, *12*(23), 7488. <https://doi.org/10.3390/jcm12237488>
- Hossain, M. K., Mortuza, A. A., Sen, S. K., Basher, M. K., Ashraf, M. W., Tayyaba, S., Mia, M. N. H., & Uddin, M. J. (2018). A comparative study on the influence of pure anatase and Degussa-P25 TiO₂ nanomaterials on the structural and optical properties of dye sensitized solar cell (DSSC) photoanode. *Optik*, *171*, 507–516. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2018.05.032>
- Ilyas, M., Waris, A., Khan, A. U., Zamel, D., Yar, L., Baset, A., Muhaymin, A., Khan, S., Ali, A., & Ahmad, A. (2021). Biological synthesis of titanium dioxide nanoparticles from plants and microorganisms and their potential biomedical applications. *Inorganic Chemistry Communications*, *133*, 108968. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2021.108968>
- Jafari, S., Mahyad, B., Hashemzadeh, H., Janfaza, S., Gholikhani, T., & Tayebi, L. (2020). Biomedical applications of TiO₂ nanostructures: Recent advances. *International Journal of Nanomedicine*, *15*, 3447–3470. <https://doi.org/10.2147/IJN.S249441>
- Khorsandi, K., Hosseinzadeh, R., Esfahani, H. S., Zandsalimi, K., Shahidi, F. K., & Abrahamse, H. (2022). Accelerating skin regeneration and wound healing by controlled ROS from photodynamic treatment. *Inflammation and Regeneration*, *42*(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s41232-022-00226-6>
- Kiio, T. M., & Park, S. (2021). Physical properties of nanoparticles do matter. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, *51*(1), 35–51. <https://doi.org/10.1007/s40005-020-00504-w>
- Kim, S. H., Lee, B., Heo, J. H., Lee, K. E., Shankar, P., Han, K. H., & Lee, J. H. (2019). The effect of ζ-potential and hydrodynamic size on nanoparticle interactions in hydrogels. *Particle and Particle Systems Characterization*, *36*(1), 1800292. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201800292>
- Klein, J., Kampermann, L., Mockenhaupt, B., Behrens, M., Strunk, J., & Bacher, G. (2023). Limitations of the Tauc plot method. *Advanced Functional Materials*, *33*(47), 2304523. <https://doi.org/10.1002/adfm.202304523>
- Lee, K. X., Shameli, K., Yew, Y. P., Teow, S. Y., Jahangirian, H., Rafiee-Moghaddam, R., & Webster, T. J. (2020). Recent developments in the facile bio-synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and their biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, *15*, 275–300. <https://doi.org/10.2147/IJN.S233789>

- Liang, Y., He, J., & Guo, B. (2021). Functional hydrogels as wound dressing to enhance wound healing. *ACS Nano*, 15(8), 12687–12722. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04206>
- Linic, S., Christopher, P., & Ingram, D. B. (2011). Plasmonic-metal nanostructures for efficient conversion of solar to chemical energy. *Nature Materials*, 10(12), 911–921. <https://doi.org/10.1038/nmat3151>
- Liu, J., Liu, Y. Y., Li, C. S., Cao, A., & Wang, H. (2023). Exocytosis of nanoparticles: a comprehensive review. *Nanomaterials*, 13(15), 2215. <https://doi.org/10.3390/nano13152215>
- Liu, X., Long, X., Liu, W., Yao, G., Zhao, Y., Hayashi, T., Hattori, S., Fujisaki, H., Ogura, T., Tashiro, S. ichi, Onodera, S., Yamato, M., & Ikejima, T. (2018). Differential levels of reactive oxygen species in murine preadipocyte 3T3-L1 cells cultured on type I collagen molecule-coated and gel-covered dishes exert opposite effects on NF- κ B-mediated proliferation and migration. *Free Radical Research*, 52(9), 913–928. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1478088>
- Lowry, G. V., Hill, R. J., Harper, S., Rawle, A. F., Hendren, C. O., Klaessig, F., Nobbmann, U., Sayre, P., & Rumble, J. (2016). Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environmental Science: Nano*, 3(5), 953–965. <https://doi.org/10.1039/c6en00136j>
- Mateo, D., Morales, P., Ávalos, A., & Haza, A. I. (2015). Comparative cytotoxicity evaluation of different size gold nanoparticles in human dermal fibroblasts. *Journal of Experimental Nanoscience*, 10(18), 1401–1417. <https://doi.org/10.1080/17458080.2015.1014934>
- Mezni, A., Khazri, A., Khazri, H., Mezni, A., Maalaoui, A., Touyalia, S., Balti, R., Dellali, M., Mahmoudi, E., & Beyrem, H. (2021). Au-TiO₂ nanoparticles exposure induced oxidative stress and neurotoxicity in rat. *Biomarkers*, 26(3), 240–247. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2021.1878557>
- Nejati, K., Dadashpour, M., Gharibi, T., Mellatyar, H., & Akbarzadeh, A. (2022). Biomedical applications of functionalized gold nanoparticles: A review. *Journal of Cluster Science*, 33(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01955-9>
- Pan, Y., Wang, Q., Luan, W., Shi, Y., Liu, J., & Qi, F. (2021). Kindlin-2 regulates the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes: implications for wound healing. *Annals of Translational Medicine*, 9(4), 348–348. <https://doi.org/10.21037/atm-21-176>
- Sagadevan, S., Imteyaz, S., Murugan, B., Anita Lett, J., Sridewi, N., Weldegebriael, G. K., Fatimah, I., & Oh, W. C. (2022). A comprehensive review on green synthesis of titanium dioxide nanoparticles and their diverse biomedical applications. *Green Processing and Synthesis*, 11(1), 44–63. <https://doi.org/10.1515/gps-2022-0005>
- Sarfraz, N., & Khan, I. (2021). Plasmonic gold nanoparticles (AuNPs): Properties, synthesis and their advanced energy, environmental and biomedical applications. *Chemistry - An Asian Journal*, 16(7), 720–742. <https://doi.org/10.1002/asia.202001202>
- Seh, Z. W., Liu, S., Low, M., Zhang, S. Y., Liu, Z., Mlayah, A., & Han, M. Y. (2012). Janus Au-TiO₂ photocatalysts with strong localization of plasmonic near-fields for efficient visible-light hydrogen generation. *Advanced Materials*, 24(17), 2310–2314. <https://doi.org/10.1002/adma.201104241>

- Seh, Z. W., Liu, S., Zhang, S. Y., Bharathi, M. S., Ramanarayan, H., Low, M., Shah, K. W., Zhang, Y. W., & Han, M. Y. (2011). Anisotropic growth of titania onto various gold nanostructures: Synthesis, theoretical understanding, and optimization for catalysis. *Angewandte Chemie - International Edition*, *50*(43), 10140–10143. <https://doi.org/10.1002/anie.201104943>
- Siebert, A., Goren, I., Pfeilschifter, J., & Frank, S. (2016). Anti-inflammatory effects of rosiglitazone in obesity-impaired wound healing depend on adipocyte differentiation. *PLoS ONE*, *11*(12), e0168562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168562>
- Stunova, A., & Vistejnova, L. (2018). Dermal fibroblasts—A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *39*, 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.01.003>
- Van Tran, V., Chae, M., Moon, J. Y., & Lee, Y. C. (2021). Light emitting diodes technology-based photobiomodulation therapy (PBMT) for dermatology and aesthetics: Recent applications, challenges, and perspectives. *Optics and Laser Technology*, *135*, 106698. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2020.106698>
- Wang, P., Zhang, L., Zhang, Z., Wang, S., & Yao, C. (2022). Influence of parameters on photodynamic therapy of Au@TiO₂-HMME core-shell nanostructures. *Nanomaterials*, *12*(8), 1358. <https://doi.org/10.3390/nano12081358>
- Yadid, M., Feiner, R., & Dvir, T. (2019). Gold nanoparticle-integrated scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Nano Letters*, *19*(4), 2198–2206. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b00472>
- Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q., & Li, P. (2020). Reactive oxygen species-related nanoparticle toxicity in the biomedical field. *Nanoscale Research Letters*, *15*(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03344-7>
- Zheng, T., Wang, W., Wu, F., Zhang, M., Shen, J., & Sun, Y. (2019). Zwitterionic polymer-gated Au@TiO₂ core-shell nanoparticles for imaging-guided combined cancer therapy. *Theranostics*, *9*(17), 5035–5048. <https://doi.org/10.7150/thno.35418>
- Zheng, X., Sun, J., Li, W., Dong, B., Song, Y., Xu, W., Zhou, Y., & Wang, L. (2020). Engineering nanotubular titania with gold nanoparticles for antibiofilm enhancement and soft tissue healing promotion. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *871*, 114362. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114362>

Anexos

Anexo A

Diseño experimental para la evaluación de los ensayos *in vitro* con las diferentes fuentes de luz.

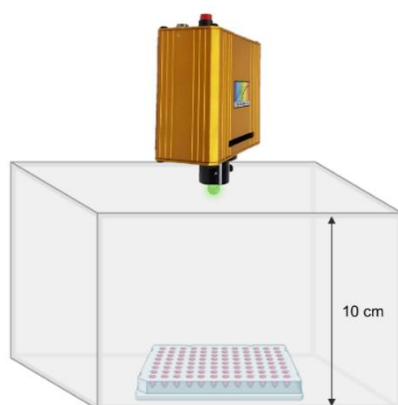


Figura 33. Diseño experimental con fuente LED para los ensayos *in vitro*