



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**“NANOPARTÍCULAS FLUORESCENTES PARA
EL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO DEL
CÁNCER”**

Autor: María Martínez-Cattáneo de Lucas

Tutor: Marco Laurenti

Convocatoria: Febrero 2020

Índice

1. Resumen/Abstract.....	1
2. Introducción.....	2
3. Objetivos.....	3
4. Metodología.....	3
5. Resultados y discusión.....	3
5.1 Fluorescencia.....	3
5.2 Nanopartículas.....	5
5.2.1 Propiedades ópticas de las sondas de nanopartículas.....	6
5.2.2 Superficie funcional de las nanopartículas.....	7
5.3 Detección de biomarcadores cancerígenos extracelulares.....	9
5.3.1 Detección de biomarcadores utilizando QDs.....	10
5.3.2 Detección de biomarcadores utilizando AuNPs.....	11
5.4 Detección de células cancerosas.....	12
5.5 Comportamiento de las nanopartículas en los tejidos tumorales in vivo.....	13
5.6 Toxicidad de las nanopartículas in vivo.....	14
6. Conclusiones.....	16
7. Bibliografía.....	16

1. Resumen

El gran avance de las ciencias de la salud y el desarrollo de la tecnología han derivado en la creación de nuevos sistemas nanotecnológicos para el diagnóstico y el tratamiento de diferentes enfermedades.

A lo largo de esta memoria se exponen algunas nanopartículas con propiedades ópticas fluorescentes que se emplean para la elaboración de sondas que podrían ser muy útiles para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. Se realiza especial hincapié en los puntos cuánticos, las nanopartículas de oro y las nanopartículas de conversión ascendente. Además de mencionar numerosos ejemplos de sus aplicaciones in vitro, se comenta brevemente su toxicidad in vivo, a pesar de haber muy pocos estudios debido a su reciente descubrimiento.

La profunda concienciación sobre esta enfermedad y los avances tecnológicos en este ámbito son lo que han conducido a la elección de este tema a desarrollar, con el objetivo de descubrir nuevos tratamientos que reduzcan los efectos sistémicos y aumenten la efectividad.

Palabras clave: Nanomedicina, nanopartículas, fluorescencia, cáncer.

1. Abstract

The great development of both health sciences and technology leads to the creation of new nanotechnology systems for the diagnostic and treatment of different illnesses.

Through this work are exposed some nanoparticles with fluorescent optical properties used for the creation of probes which could be useful for cancer diagnosis and treatment. Special emphasis is made about quantum dots, gold nanoparticles and upconversion nanoparticles. Besides mentioning numerous examples of its in vitro applications, its toxicity is briefly discussed in vivo, despite the few studies due to its recent discovery.

The deep awareness about this disease and the technological advances in this area are what have led to choose the development of this topic, with the aim of discovering new treatments that reduce systemic effects and increase effectiveness.

Key words: nanomedicine, nanoparticles, fluorescence, cancer.

2. Introducción

Según la Real Academia Española de la lengua (RAE), el cáncer es una “*Enfermedad que se caracteriza por la transformación de las células, que proliferan de manera anormal e incontrolada*”. (1)

El cáncer supone un gran problema de salud a nivel global. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), “el cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo. En 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones”. (2)

En condiciones normales, las células se dividen periódicamente con el objetivo de reemplazar a las células envejecidas o muertas, de manera que se mantenga el correcto funcionamiento de los diferentes órganos y su integridad. Este proceso de división está regulado por diversos mecanismos de control, los cuales indican cuando una célula debe dividirse y cuando no. Del mismo modo, son responsables de la autodestrucción de aquellas células que han sufrido algún daño, con el fin de evitar la propagación del daño a las células descendientes.

Cuando se alteran los mecanismos de control, se inicia una cascada de división y proliferación celular masiva y descontrolada. Dichas células crecen sin control alguno y pueden sufrir nuevas alteraciones que les permiten invadir tejidos u órganos cercanos, así como trasladarse a otras partes del organismo donde seguirán proliferando (metástasis). (3)

El hecho de que el cáncer emerja del propio tejido dificulta tanto la detección como el tratamiento debido a las similitudes entre el tejido sano y el tejido enfermo. A pesar de este hecho el ratio de mortalidad del cáncer puede reducirse considerablemente gracias a los métodos y cribados para la detección temprana del mismo. (4)

Actualmente, la detección del cáncer se basa principalmente en técnicas de imagen o bien en el análisis morfológico de las células (citología) o tejidos (histopatología). Estas técnicas de imagen como la detección por Rayos X, mamografías, Resonancias Magnéticas de Imagen (RMI), endoscopias y ultrasonidos tienen una sensibilidad baja y son limitadas a la hora de diferenciar entre tumores malignos y benignos. Es por ello que los estudios más recientes en el campo de la nanotecnología se han centrado en superar las limitaciones que suponen los métodos actuales de diagnóstico. (5)

Las nanopartículas son aquellas partículas cuya dimensión es menor a 100 nanómetros (6). La sinergia entre las nanopartículas junto con las técnicas basadas en la fluorescencia aportan nuevos métodos que facilitan el diagnóstico, la prevención y el tratamiento del cáncer, ya que permite una actuación en los estadios más tempranos de la enfermedad. También proporciona herramientas para guiar una molécula activa a su lugar de acción y controlar su liberación, disminuyendo la toxicidad sistémica y en consecuencia de los efectos secundarios.

En esta memoria se comentarán los avances en el desarrollo de los métodos basados en la aplicación de nanopartículas para la detección del cáncer mediante espectroscopía de fluorescencia.

3. Objetivos

Debido al problema de salud que supone esta enfermedad, el objetivo de esta memoria es la revisión bibliográfica sobre la investigación de las nuevas técnicas basadas en el empleo de nanopartículas fluorescentes que pudieran permitir tanto el diagnóstico como el tratamiento del cáncer, que superen las limitaciones que suponen los métodos actuales de diagnóstico y que sean menos lesivas para el organismo.

El objetivo final es estudiar estas nuevas técnicas para favorecer la disminución de la mortalidad y mejorar de la calidad de vida de los pacientes.

4. Metodología

Para la realización de este Trabajo de Fin de Grado se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de diversos artículos obtenidos a partir de bases de datos como PubMed, el catalogo Cisne de la Universidad Complutense y UpToDate.

También se han consultado numerosos artículos publicados en la American Chemical Society (ACS) obtenidos de la dirección web <https://pubs.acs.org/>

Para las búsquedas online se han empleado los términos “nanoparticles”, “fluorescence”, “cancer” y “nanotechnology”.

5. Resultados y discusión

5.1. Fluorescencia

Según la Real Academia Española de la lengua (RAE), la fluorescencia es: “Luminiscencia debida a la excitación de una sustancia que absorbe radiaciones, y que cesa al desaparecer dicha excitación”. (1)

Así pues, la fluorescencia es un fenómeno óptico donde las moléculas absorben fotones a una determinada longitud de onda (pasando a un estado excitado) para posteriormente transferir la energía como calor o bien emitiendo la radiación a otra longitud de onda, normalmente superior (menor energía). Es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. (7)

La luminiscencia está dividida en dos categorías; fluorescencia y fosforescencia, en función de la naturaleza del estado excitado. (8)

El proceso que ocurre entre la absorción y la emisión de la luz se puede describir mediante el diagrama de Jablonski. La línea negra de la base denominada S_0 representa el estado fundamental de menor energía, donde la molécula permanece estable. Cuando la radiación electromagnética incide sobre la molécula, se produce un fenómeno de absorción en el cual la molécula puede entrar en un estado electrónico excitado S_2 o S_1 , de una determinada energía vibracional como se puede apreciar por los subniveles del diagrama de Jablonski.

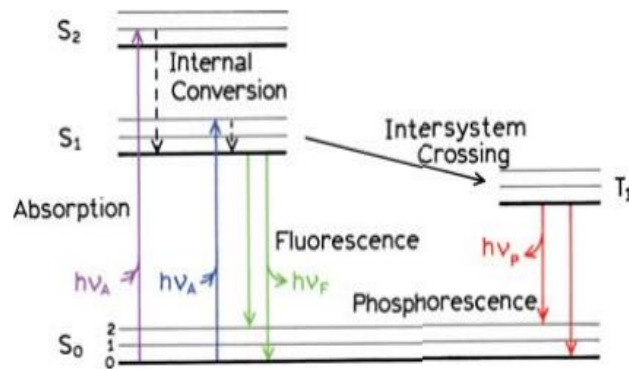


Figura 1: Diagrama de Jablonski. (8)

Teniendo en cuenta que la energía esta cuantizada, pueden ocurrir dos fenómenos para lograr que la molécula alcance el nivel S_1 : conversión interna y relajación vibracional:

- La conversión interna consiste en que para pasar del estado excitado a otro de menor energía, la energía emitida debe convertirse en calor y no se deben liberar fotones.
- La relajación vibracional se produce como consecuencia de los choques o colisiones entre el disolvente y el soluto, donde el disolvente transfiere la energía necesaria para volver al estado basal en forma de calor. En este proceso se pierde todo el exceso de energía vibracional del estado excitado en un tiempo de hasta 10^{-11} segundos. Este hecho indica que antes de que la molécula excitada de la solución pueda emitir un fotón sufrirá una relajación vibracional. La pérdida de energía entre los fotones absorbidos y los emitidos son el resultado de la relajación vibracional y esta diferencia se conoce como diferencia de Stokes.

Ambos fenómenos, conversión interna y relajación vibracional, son formas de emisión basadas en procesos no radiativos. (8) (9)

Por el contrario, la fluorescencia sí es un proceso radiativo de relajación. Ésta puede observarse cuando la emisión es producida debido a la relajación de la molécula excitada a cualquier otro estado vibracional del estado electrónico fundamental. (9)

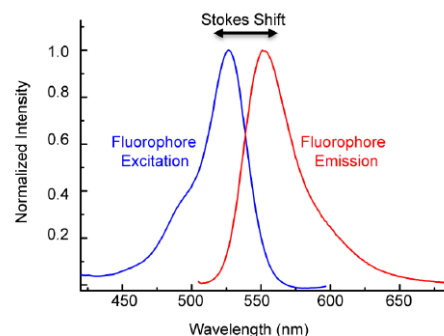


Figura 2: Diferencia de Stokes. (10)

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica muy útil para la detección de biomoléculas, y es ampliamente utilizada con aplicaciones biológicas y biomédicas debido a su elevada resolución espacial y temporal. El empleo de la fluorescencia como método de detección depende de las propiedades físicas de los fluoróforos empleados: fotoestabilidad, rendimiento cuántico, desplazamiento de Stokes y el tiempo de vida de la fluorescencia.

Estas propiedades, con respecto a las ventajas que ofrecen las nanopartículas fluorescentes sobre los fluoróforos orgánicos serán analizadas posteriormente en el capítulo dedicado a las nanopartículas. (11) (12)

Por otro lado, es importante mencionar la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), un fenómeno que ocurre cuando un cromóforo donador excitado transfiere energía (no un electrón) a un cromóforo receptor mediante un proceso no radiactivo, cuando la distancia entre el donante y el receptor es menor de 10nm. Este proceso depende en gran medida de la distancia donante-receptor, de manera que permite el estudio de las estructuras biológicas. La eficiencia FRET viene dada por mi y puede relacionarse con la distancia donante-receptor mediante la siguiente ecuación que se indica a continuación. (13) Además la eficiencia de la energía transferida depende de factores como: la superposición espectral entre el espectro de absorción del fluoróforo aceptor y el espectro de emisión del fluoróforo donador (figura 3), sus orientaciones relativas y la proximidad (la eficiencia es inversamente proporcional a la distancia entre el aceptor y el donador elevado a la sexta potencia). (14)

Ecuación de Förster. (13)

$$mi = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

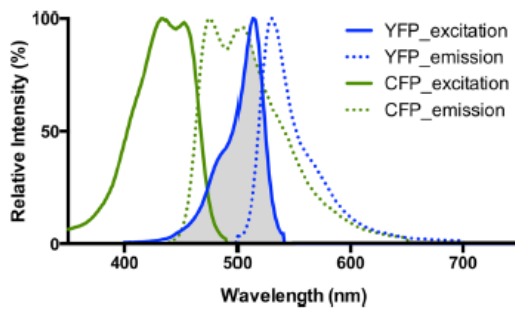


Figura 3: espectros de emisión y absorción de CYP e YFP (par habitualmente utilizado en FRET) con la superposición espectral en gris. (4)

El uso de sondas FRET para detectar células y biomarcadores de cáncer es potente debido a su capacidad de proporcionar resultados reales desde el punto de vista espacio-temporal, a partir de mediciones entre fluoróforos donantes y los aceptores. Esto permite el diseño de bioensayos más sensibles para la detección de biomarcadores y células cancerosas (14). Por ejemplo, mediante esta técnica se puede evaluar el estado de activación de una proteína (Akt) utilizada como biomarcador en pacientes con cáncer de mama, permitiendo una mejor identificación de los pacientes de alto riesgo de manera que puedan recibir una farmacoterapia más específica.

5.2. Nanopartículas

Las nanopartículas juegan un importante papel en la nanomedicina, ya que pueden transportar de manera eficiente agentes terapéuticos o materiales biológicos a sitios específicos; un órgano, tejido o célula diana. Además, algunas nanopartículas tienen funciones activas que facilitan su empleo como “nanosondas” para la aplicación de nuevas terapias.

Actualmente se cuenta con dos tecnologías complementarias; los nanodiagnósticos y las nanopartículas como vehículos para la administración de medicamentos. Esta combinación es conocida con el término “teranóstico”. (15)

Muchas nanopartículas tienen propiedades únicas que permiten lograr diagnósticos más completos y/o nuevas aplicaciones terapéuticas. Además, las nanopartículas sirven como excelentes portadores de otros agentes activos tanto moleculares como macromoleculares, ya que pueden incorporarse dentro de su volumen o unirse a su superficie. Los portadores de nanopartículas o nanoportadores poseen varias ventajas con respecto a los agentes moleculares convencionales en medicina.

- Protección de los principios activos frente a la degradación
- Evitar la actuación prematura del principio activo con el ambiente biológico
- Mejorar la absorción de los principios activos en el tejido seleccionado o en la célula diana
- Control de la farmacocinética del perfil de distribución

Un aspecto único de la nanomedicina es que es multimodalidad, es decir, permite la realización de varios diagnósticos u otras funciones terapéuticas en tándem. (15) (16)

Así pues, la aplicación de la nanotecnología para el diagnóstico del cáncer aporta nuevas oportunidades para mejorar la sensibilidad y la versatilidad de los métodos de detección basados en la fluorescencia. Hay varias características estructurales que se deben tener en cuenta: tamaño, forma, superficie y propiedades ópticas. Revisaremos estas características material-dependientes de las nanopartículas para analizar su utilidad, haciendo especial hincapié en las propiedades ópticas y en la superficie funcional en los dos capítulos siguientes. (4)

5.2.1 Propiedades ópticas de las sondas de nanopartículas

Las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas y semiconductoras dependen en gran medida del tamaño, forma y composición. Concretamente, las propiedades ópticas más relevantes en el diseño de biosensores fluorescentes, la intensidad y estabilidad de la emisión fluorescente, así como la efectividad de la extinción de la fluorescencia en sondas “on-off”, determinan, en parte, la sensibilidad y el dinamismo de un ensayo particular. (4)

Las sondas de nanopartículas que más se emplean para el diagnóstico del cáncer son; puntos cuánticos, nanopartículas de conversión ascendente y nanopartículas de oro.

Los **puntos cuánticos (QDs)** son cristales coloidales semiconductores, constituidos por cientos o miles de átomos. Normalmente son esféricos y sus dimensiones oscilan entre 1 y 20 nanómetros dependiendo del material. Su principal característica es que los electrones que lo constituyen deben mantenerse confinados en las tres dimensiones, lo que genera diversos fenómenos cuánticos. Para que esto pueda ocurrir, el tamaño de los puntos cuánticos debe ser similar al radio del excitón de Bohr. Así pues, se comportan como un único átomo por lo que también son conocidos como “átomos artificiales”. (17) Los puntos cuánticos sufren menos fotoblanqueo que los fluoróforos orgánicos. (18) Por ello, a pesar de que las muestras biológicas a menudo contribuyen a la señal de fondo, la especie auto fluorescente presente en dichas muestras tiene una vida más corta. Así pues, se pueden obtener imágenes de la fluorescencia al separar la autofluorescencia de fondo de la señal positiva del punto cuántico. (19) La técnica anteriormente descrita se denomina microscopía de fluorescencia dependiente del tiempo. Esta propiedad es especialmente importante en la aplicación de puntos cuánticos para mejorar la sensibilidad de detección de biomarcadores, células y tejidos cancerígenos que pueden estar en baja abundancia en los primeros estadios de la enfermedad. (4)

Las **nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs)** surgen como alternativa a las sustancias fluorescentes tradicionales como los puntos cuánticos o los fluoróforos orgánicos. Estos fluoróforos de nueva generación son nanocristales constituidos por iones lantánido (Ln^{3+}), conocidos como dopantes. Son capaces de absorber radiación electromagnética en el infrarrojo cercano (NIR) y emiten radiaciones de mayor energía en el espectro visible y/o en el UV a través de un proceso óptico no lineal. Esta propiedad se denomina emisión “anti-Stokes”

o “emisión ascendente”. Su interés surge para detectar dianas por técnicas espectroscópicas. (20) Por otro lado, muestran un gran potencial para ensayos de imagen y biodetección en aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Además poseen propiedades luminiscentes únicas, que incluyen una elevada profundidad de penetración en los tejidos, señales de fondo bajas, grandes cambios de Stokes y bandas de emisión nítidas, lo que hace que las nanopartículas de conversión ascendente sean una alternativa para superar las limitaciones actuales en las sondas fluorescentes tradicionales. (21)

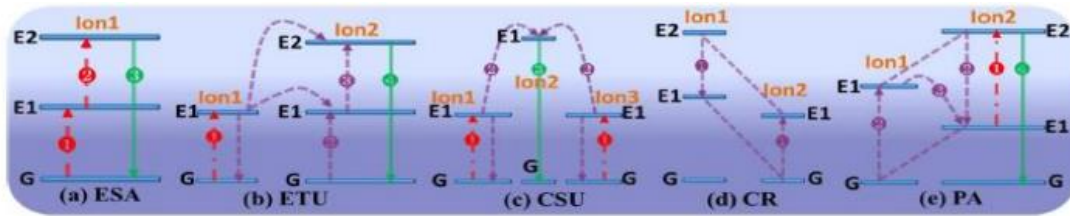


Figura 4: Procedimientos de Conversión Ascendente: a) Absorción en Estado Excitado (ESA), b) Transferencia de Energía de Conversión Ascendente (ETU), c) Conversión Ascendente Cooperativa (CSU), d) Relajación Cruzada (CR) y e) Avalancha de Fotones (PA). (20)

Las **nanopartículas de oro (AuNPs)** también han sido utilizadas en diferentes ensayos fluorescentes para la detección de cáncer. Su absorción oscila entre el UV y el Visible debido a una propiedad relacionada con el tamaño y la forma conocida como resonancia del plasmón superficial (SPR). Esta propiedad consiste en que cuando los electrones libres de la banda de conducción reciben un haz de luz incidente, se produce una excitación colectiva de dichos electrones. Esto provoca una oscilación coherente deslocalizada de los electrones de la superficie de las nanopartículas metálicas (Figura 5). La excitación electromagnética se denomina polaritón del plasmón de superficie. Estas oscilaciones colectivas resultan en una fuerte absorción de luz y una posterior relajación electrónica rápida. (22) Debido a esta fuerte absorción, las nanopartículas de oro también se emplean como extintores de fluorescencia en numerosos ensayos de sondas fluorescentes “on-off”.

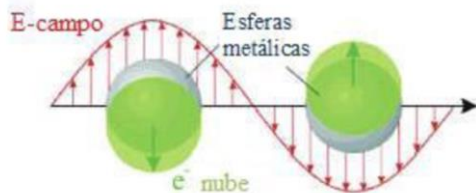


Figura 5: resonancia plasmónica (polarización) de una nanopartícula metálica.

5.2.2. Superficie funcional de las nanopartículas y vectorización (Terapia Dirigida)

Una de las ventajas del uso de nanopartículas para la detección del cáncer es su gran superficie por unidad de masa debido a su pequeño tamaño. Esto permite cubrir la superficie de estas partículas con ligandos que reconocen y/o se unen a las moléculas indicadoras de cáncer, es decir, permite la funcionalización de la superficie. Es importante destacar la curvatura de la superficie, ya que esto permite la unión de los ligandos en disposiciones que no son posibles en otro tipo de sustratos, dando lugar a efectos multivalentes diferentes. Además se pueden adjuntar ligandos de unión múltiple a una célula cancerosa de manera que se permite obtener efectos que mejoran la sensibilidad de los análisis. Ligeras variaciones en la funcionalidad de la superficie de las nanopartículas como los ligandos, el tamaño y la forma, dan lugar a una gran cantidad de ventajas que se aplican a las técnicas de detección. (23)

Se pueden adjuntar numerosos tipos de ligandos a las nanopartículas para su aplicación en el diagnóstico del cáncer, incluyendo péptidos, anticuerpos, aptámeros y pequeñas moléculas que permiten una elevada especificidad de unión de las sondas de nanopartículas a las dianas de interés. Además, algunos ligandos permiten la vectorización de las moléculas a dichas dianas, se trata de una “terapia dirigida”. Según el diccionario de términos del cáncer del National Cancer Institute (NCI) la terapia dirigida es “un tratamiento que usa medicamentos u otras sustancias para identificar y atacar tipos específicos de células cancerosas con menos daño a las células normales”. También indica diferentes tipos de terapias dirigidas; aquellas que bloquean la acción de enzimas, proteínas u otras moléculas involucradas en el crecimiento, o bien aquellas que ayudan al sistema inmunitario a matar las células cancerosas o que aportan sustancias tóxicas directamente a las células cancerosas para matarlas. También afirma que la terapia dirigida puede tener menos efectos secundarios que otros tipos de tratamientos. (24)

A continuación se desarrollaran algunos ejemplos de moléculas empleadas:

Los **péptidos** se emplean para etiquetar células cancerosas basándose en el reconocimiento de sus proteínas transmembrana. El péptido más utilizado es el ácido arginil glicil aspártico (RGD), formado por L-arginina, glicina y ácido aspártico. Este péptido se aisló del dominio de unión celular de la fibronectina, una glucoproteína que se une a las integrinas y está implicada en la unión célula-célula y en la unión célula-matriz extracelular. También tiene sitios de unión para el glucógeno, fibrina y proteoglicanos. (25) Los péptidos RGD tienen mayor afinidad por un tipo de integrinas presentes en la superficie celular ($\alpha_v\beta_3$) altamente expresadas en las células endoteliales tumorales, pero no en las células endoteliales normales. Por otro lado, la regulación positiva de estas integrinas en el cáncer de mama, glioblastoma, tumores pancreáticos y carcinoma de próstata se correlaciona con un aumento de la motilidad celular y la metástasis. (26) Desde que los péptidos RGD son eficaces para atacar a las células cancerosas (en modelos de cultivo de tejidos y en ratones) a través del reconocimiento y unión a las integrinas $\alpha_v\beta$, sirven como herramienta prometedora para el desarrollo de sondas de nanopartículas dirigidas a las células cancerosas. (27)

Del mismo modo, una **proteína** ampliamente utilizada para detectar células cancerosas es la transferrina, una glucoproteína que se une al hierro (Fe^{3+}) en la sangre con elevada afinidad. Después de unirse a dos iones Fe^{3+} , la transferrina es reconocida por sus receptores, los cuales median su absorción en las células mediante endocitosis. Los receptores de transferrina se suelen expresar en la epidermis basal, hepatocitos, páncreas, células de Kupffer, testículos y glándula pituitaria. (28) Sin embargo, sus niveles se encuentran elevados en numerosos cánceres (cáncer de mama, estómago, colon, riñón, ovario, pulmón, páncreas linfoma, piel y vejiga), probablemente debido al aumento de la absorción de hierro necesario por la proliferación celular. (29) La transferrina es una proteína endógena, por lo que no es tóxica ni inmunogénica cuando detecta y se une a células cancerosas.

Por otro lado, los **anticuerpos** también son muy utilizados para el diagnóstico del cáncer tanto in vitro como in vivo, ya que están comercializados y son de fácil adquisición. Tienen elevada especificidad y afinidad por su sustrato. Además, los anticuerpos pueden ser fácilmente conjugados con nanopartículas (AuNPs o QDs) y moléculas fluorescentes, lo que les convierte en los candidatos ideales para el desarrollo de biomarcadores e inmunoensayos celulares. Los anticuerpos también se utilizan para la detección in vivo de células cancerosas ya que su inmunogenicidad es relativamente baja. Para evitar la activación del complemento y por tanto minimizar la inmunogenicidad se emplean fragmentos pequeños que se corresponden con un fragmento variable de la cadena sencilla o bien la región de unión al antígeno. Aunque los

anticuerpos tienen un papel muy importante en la vectorización de las nanopartículas al lugar de acción (terapia dirigida), también son muy eficaces como tratamiento. (30)

También se emplean los **aptámeros** de ácidos nucleicos. Son oligonucleótidos que se unen específicamente al objetivo de interés (proteínas, moléculas pequeñas, células u otros ácidos nucleicos) y que también se pueden utilizar en terapia dirigida. Cada aptámero tiene una estructura tridimensional particular que permite su unión a la diana con elevada afinidad y especificidad. Los aptámeros se obtienen mediante un proceso denominado “evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial” (SELEX).

Los aptámeros son conocidos también como anticuerpos químicos, presentando numerosas ventajas frente a los anticuerpos clásicos en el campo de la terapia dirigida. Es por ello que los aptámeros son los candidatos perfectos para el desarrollo de biomarcadores y células para las cuales los anticuerpos clásicos pueden no estar disponibles. (32)

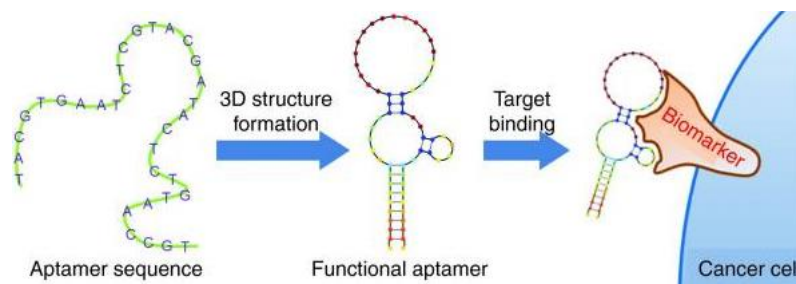


Figura 6: Diagrama esquemático de un aptámero que se une a su objetivo (32).

5.3. Detección de biomarcadores cancerígenos extracelulares

Un enfoque prometedor para la detección temprana del cáncer es identificar y detectar sustancias en la sangre u otros fluidos corporales que estén correlacionados con la presencia de cáncer. Estas sustancias conocidas como biomarcadores, pueden ser proteínas, hidratos de carbono o ácidos nucleicos que están asociados a las células cancerosas. La medida de los niveles de estos biomarcadores en los diferentes fluidos podría permitir la detección de la enfermedad en sus primeras etapas, la identificación de una recurrencia tumoral, predicción del riesgo a un nuevo cáncer o a uno previamente existente y la capacidad de controlar la eficacia del tratamiento. Sin embargo, algunos de los problemas que encontramos son los bajos niveles de biomarcadores en plasma durante los primeros estadios de la enfermedad y su heterogeneidad en el tiempo.

Aunque el desarrollo de los ensayos de biomarcadores se ha enfrentado a problemas tanto fundamentales como técnicos, los investigadores están posicionados en el uso de la nanotecnología debido a las propiedades únicas de algunos tipos de sondas de nanopartículas, ya que entre sus ventajas encontramos la rápida producción, el bajo coste, la capacidad de hacerlo a medida y la capacidad de ofrecer ensayos de alto rendimiento, con alta sensibilidad y selectividad. (4)

En este capítulo se comentarán algunos ejemplos de la detección de biomarcadores cancerígenos extracelulares mediante el uso de puntos cuánticos (QDs) y de nanopartículas de oro (AuNPs).

5.3.1. Detección de biomarcadores cancerígenos utilizando puntos cuánticos

Los puntos cuánticos son muy prometedores como herramientas para la detección de biomarcadores cancerígenos mediante fluorescencia debido a las propiedades anteriormente descritas. Uno de los diseños más comunes es el ensayo tipo “sándwich”. Se trata de un ensayo que puede realizarse en suspensión o bien sobre un sustrato y consta de varios componentes; sustrato, anticuerpo de captura, analito (biomarcador de interés), un segundo anticuerpo de captura, un segundo anticuerpo normalmente marcado con una sonda fluorescente. El proceso es el siguiente: en primer lugar, el anticuerpo primario inmovilizado se une al marcador. A continuación, un segundo anticuerpo de captura, específico para el biomarcador se introduce y se une al objetivo. Después un anticuerpo secundario marcado con una sonda fluorescente, se une al segundo anticuerpo generando una señal fluorescente que es detectada mediante el microscopio o el espectrofotómetro. Este modelo de sándwich ofrece una elevada especificidad debido a la elevada afinidad y selectividad que el anticuerpo primario tiene por el analito, y una alta sensibilidad cuando se emplean puntos cuánticos (QDs) como fluoróforos marcadores del anticuerpo secundario. (4)

Utilizando esta técnica se realizó un ensayo en el que se empleó un conjugado de anticuerpos y puntos cuánticos para detectar dos biomarcadores: el antígeno carcinoembrionario (CEA) y la enolasa específica de neurona (NSE), los cuales se asocian con ciertos cánceres de pulmón. (33)

Otro tipo de inmunosensor basado en la utilización de puntos cuánticos consiste en inmovilizar el analito o el anticuerpo de captura en una superficie. Este tipo de ensayo ofrece algunas ventajas frente al anterior, ya que requiere menor cantidad de muestra de los pacientes y proporciona una detección rápida y de alto rendimiento de los analitos de interés. Este tipo de ensayo se ha empleado para detectar el antígeno específico prostático total (TPSA) en una superficie de carbono desechable. En este ensayo, el anticuerpo primario unido covalentemente a la superficie del sustrato captura el TPSA. Debido a la variabilidad interindividual, los niveles elevados no son indicadores de la presencia de cáncer de próstata, sin embargo sí que se pueden monitorizar los niveles de PSA ya que un ascenso significativo sí que puede ser indicativo de la presencia de la enfermedad. (34)

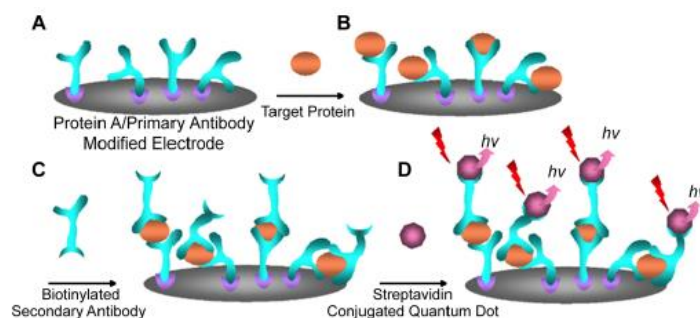


Figura 7: esquema de un inmunosensor QD empleado para detectar el antígeno prostático específico total (TPSA). (A) La proteína A y el anticuerpo anti-TPSA están inmovilizados en una pantalla de carbono. (B) Se introduce el analito en el sensor y se une al anticuerpo de captura y (C) a un segundo anticuerpo. (D) Los QD funcionalizados con estreptavidina unen el analito con el sensor y producen fluorescencia. (34)

Hay veces que se emplean dispositivos microfluídicos, los cuales según el NCI son instrumentos que emplean cantidades muy pequeñas de líquidos en un microprocesador para realizar ciertas pruebas de laboratorio. Puede usar líquidos del cuerpo o bien soluciones que

contengan células o parte de ellas para diagnosticar enfermedades. También se le denomina “laboratorio en un chip”. (24)

Así pues, estos dispositivos permiten reducir la cantidad de muestra necesaria del paciente para la detección de los biomarcadores, basándose en la capacidad de controlar los fluidos a pequeñas escalas. Esto permite reducir los costes y agilizar la obtención de los diagnósticos. Un tipo de dispositivo microfluídico son las tiras reactivas de inmunocromatografía, las cuales aprovechan la capilaridad para transportar las muestras a través de la tira reactiva. Esta tira consta de varias partes; una banda donde se aplica la muestra, una zona de conjugación donde el anticuerpo se une al analito de interés, una línea de test donde se encuentra el sándwich inmovilizado formado por el fluoróforo marcado, el anticuerpo y el analito, y una línea de control positiva para confirmar la fluorescencia que producirá el fluoróforo al unirse al anticuerpo. Este tipo de ensayo se ha realizado para detectar la proteína C-reactiva, la cual es una proteína secretada por el hígado en caso de inflamación y que se asocia con cáncer colorrectal y pulmonar además de con otras patologías como la diabetes o la enfermedad cardiovascular. (4)

5.3.2 Detección de biomarcadores cancerígenos utilizando nanopartículas de oro (AuNPs)

Muchos biosensores utilizan nanopartículas de oro como desactivadores de fluorescencia. Un ejemplo es la sonda de nanopartículas “on-off” para la detección de biomarcadores cancerígenos. Esta sonda se basa en la absorción electrostática inespecífica de las proteínas que actúan como biomarcadores en una biblioteca de nanopartículas de oro marcadas con un fluoróforo. De esta manera, en ausencia de la proteína diana las nanopartículas de oro apagan la fluorescencia del fluoróforo y el sensor estará apagado. Por el contrario, la unión de las proteínas desencadena la disociación del fluoróforo y de las nanopartículas de oro, permitiendo la visualización de la fluorescencia y el encendido del sensor. (35) Este sistema se utilizó para detectar dos biomarcadores: la fosfatasa ácida y la fosfatasa alcalina, isoenzimas que se pueden encontrar en varios órganos y que son indicativas de la presencia de cáncer cuando se encuentran por niveles más elevados de lo normal. (4)

Por otro lado, mediante un ensayo parecido al anterior, basado también en la propiedad “on-off” que aportan las nanopartículas de oro, se pudo diagnosticar un cáncer de vejiga. Para ello se utilizó como analito la hialuronidasa obtenida a partir de muestras de orina, una endoglicosidasa cuya función es degradar el ácido hialurónico. Cuando la hialuronidasa se encuentra en niveles muy superiores a los fisiológicos es indicativo de la presencia de tumores en la vejiga. (4) Así pues, la hialuronidasa, al ser el metabolito de interés, provoca la disociación del fluoróforo y de las nanopartículas de oro permitiendo ver la fluorescencia en el sensor.

5.4. Detección de células cancerosas

Detectar el cáncer de manera temprana permite un mejor tratamiento y por lo tanto una mejoría significativa del estado del paciente. Además, a medida que el cáncer se va desarrollando aumentan las probabilidades de sufrir una metástasis, lo cual empeora drásticamente el pronóstico del paciente. La metástasis consiste en una propagación de las células cancerosas desde el tumor primario al torrente sanguíneo, sistema linfático y/o a otros órganos y tejidos del organismo, donde formarán un tumor secundario (tumor metastásico). Así pues, aunque hay muchos métodos para la detección de metástasis, la mayoría de ellos son efectivos cuando ya

se ha formado el tumor secundario, por ello la detección de las células tumorales circulantes en sangre antes de la formación del tumor secundario es clave para mejorar el pronóstico del paciente.

Otro tipo de células cancerosas son las células madre cancerosas (CSCs), responsables del inicio de la metástasis. Estas células difieren de las otras en algunos genes de expresión, de manera que pueden no ser identificables empleando las técnicas convencionales como PCR y ELISA. A pesar de ello tenemos alternativas gracias al diseño de sondas de nanopartículas con fluorescencia, tales como los QDs y las UCNPs conjugadas con ligandos que reconocen los marcadores de la superficie celular de las células cancerosas. (4)

Aunque se ha mencionado anteriormente, es importante recordar que los puntos cuánticos poseen propiedades ópticas únicas que los convierten en herramientas muy útiles para detectar células cancerosas, incluidas aquellas que se encuentran en bajas proporciones debido a su elevado rendimiento cuántico. También conviene recordar que debido a las propiedades de su superficie pueden unir diferentes ligandos (anticuerpos, aptámeros, péptidos, etc.) para inducir una unión selectiva o bien la absorción por parte de las células cancerosas.

Uno de los primeros ensayos en los que se utilizaron puntos cuánticos para la detección de células cancerosas se realizó para detectar cáncer de mama. Para ello, se conjugaron puntos cuánticos con inmunoglobulina G (IgG) y con estreptavidina para marcar el marcador de cáncer de mama Her2 en la superficie de células cancerosas fijas y vivas SK-BR-3, y posteriormente teñir los microtúbulos y las fibras de actina y detectar antígenos nucleares dentro del núcleo. (36)

También se pueden emplear las nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs) para este fin. Normalmente se eligen para etiquetar mediante fluorescencia debido a su capacidad de excitación desde el infrarrojo cercano (NIR) hasta el infrarrojo (IR) para generar la emisión fluorescente en la región visible, dando como resultado la minimización del ruido de fondo que a veces se observa debido a la auto-fluorescencia celular. (21) Esta propiedad es especialmente ventajosa para la detección de células cancerosas, ya que permite distinguir una población pequeña de células cancerosas entre una población más grande de células sanas.

Además, los perfiles de emisión sintonizables de las UCNP permiten obtener imágenes simultáneas en diferentes colores para detectar las células cancerosas. A raíz de esta propiedad, se realizó un ensayo en el que se observó que excitando diferentes UCNPs con diferentes perfiles de emisión todas las muestras se excitaban a la misma longitud de onda NIR. Posteriormente estas UCNPs se utilizaron para etiquetar las células cancerosas HeLa, del cuello uterino. Se vio que mediante los diferentes perfiles de emisión de las UCNPS, es posible etiquetar simultáneamente varias proteínas de la superficie de las células cancerosas para detectar su malignidad, basándose en la presencia de los diferentes marcadores cancerígenos. (37)

Otro tipo de partículas que no se han mencionado hasta ahora son las nanopartículas magneto-fluorescentes. Tienen la peculiaridad de permitir simultáneamente la detección y la separación de las células cancerosas de las células sanas gracias a sus propiedades magnéticas. Un estudio realizado en 2011 describe el uso de estas nanopartículas para la detección y el aislamiento de las células cancerosas dirigiéndolas al antígeno de membrana específico de la próstata sobreexpresado por las células LNCap o bien al CD3 sobreexpresado por las células T Jurkat en la leucemia. (38)

Además de los QDs, las UCNPs y las nanopartículas magneto-fluorescentes hay otro tipo de nanopartículas que también se pueden emplear para la detección de células cancerosas, como son las nanopartículas conjugadas con polímeros (CNPs), las sondas de nanopartículas biocompatibles de sílice, los nanoclusters de plata (AgNCs) (4) así como las nanopartículas de oro debido a sus propiedades “on-off” anteriormente descritas.

5.5. Comportamiento de las nanopartículas en los tejidos tumorales in vivo.

Para conseguir diagnosticar el cáncer mediante el uso de sondas de nanopartículas fluorescentes hay que tener en cuenta el comportamiento de estas nanopartículas in vivo, ya que los ensayos in vitro no representan el desarrollo de la enfermedad ni la metástasis, aunque son ensayos muy útiles para estudiar las interacciones de las nanopartículas a nivel celular. Es por ello que es necesario utilizar modelos animales para poder entender y estudiar el comportamiento de estas nanopartículas in vivo y poder diseñar la sonda ideal; específica del tumor, con buena distribución y por supuesto, con la menor toxicidad posible. También hay que tener en cuenta que el tamaño, la forma, la carga de superficie así como las diferentes modificaciones superficiales juegan un importante papel a la hora de determinar el comportamiento in vivo de las nanopartículas ya que influyen en las complejas interacciones entre las partículas y el sistema biológico.

Es importante conocer cómo llegan estas nanopartículas a la zona tumoral, ya que pueden hacerlo de manera pasiva o bien de manera activa, como se muestra en la figura 8 (39):

- La manera pasiva se basa en el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) por el cual las nanopartículas se extravasan con mayor facilidad de los vasos sanguíneos de los tejidos tumorales (tienen una permeabilidad alta) que de los vasos sanguíneos de los tejidos sanos debido a su baja permeabilidad.
- La manera activa (vectorización activa) se basa en la funcionalización de las nanopartículas con anticuerpos u otros tipos de ligandos para que sea internalizada por las células diana. (39)

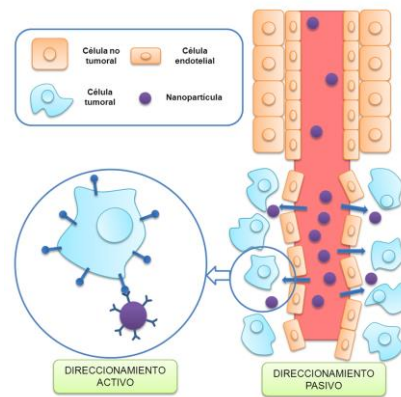


Figura 8.

Aunque las nanopartículas tengan características y propiedades diferentes, su diseño se centra especialmente en la capacidad de transportar de forma selectiva fármacos citotóxicos hacia las células tumorales, lo que permite una mejor destrucción de dichas células y una menor toxicidad de los fármacos en los tejidos sanos, aumentando por tanto su rango de seguridad.

Esta ventaja se basa en el EPR, por el que la presencia de una gran vascularización en el tejido tumoral, debido a la rápida angiogénesis para suplir las necesidades nutricionales de las células, hace que en este tipo de tejidos se acumule una mayor cantidad de nanopartículas que en los tejidos sanos, y consecuentemente mayor cantidad de citotóxicos. Por ello, los fármacos citotóxicos transportados por nanopartículas tienen más facilidad para alcanzar los tejidos tumorales que los fármacos administrados de forma libre. (39) (4) Sin embargo, existe cierta

controversia sobre este fenómeno, ya que solo ha demostrado su efecto en algunos tipos de tumores al tratarse de un fenómeno heterogéneo que varía entre los distintos tipos de cánceres y de pacientes.

En cuanto a la eliminación de las nanopartículas, ésta se realiza principalmente gracias al Sistema Mononuclear Fagocítico (MPS) y renal:

- El MPS se encarga de la eliminación de las nanopartículas de más de 10 nm e incluye órganos como el hígado, bazo y medula ósea ya que son ricos en células fagocíticas como macrófagos, células de Kuffer y monocitos. Cuando las nanopartículas llegan al torrente sanguíneo, entran en contacto con unas proteínas denominadas opsoninas, las cuales forman una corona proteica a su alrededor favoreciendo su reconocimiento por el MPS. Para evitar la eliminación de las nanopartículas deben estar diseñadas para evitar o reducir la interacción con las opsoninas de tal forma que aumente su semivida y se mejora la eficacia. (40)
- El aclaramiento renal se produce de manera pasiva e incluye los procesos de filtración glomerular y secreción tubular. En la filtración de las nanopartículas influye considerablemente el tamaño de las mismas, ya que únicamente podrán ser eliminadas por esta vía las nanopartículas con tamaños inferiores a 8 nm. Además del tamaño, también influye la carga superficial ya que cuanto más carga, mayor unión de proteínas séricas y por lo tanto mayor diámetro hidrodinámico y mayor interacción con la pared glomerular capilar. Este hecho produce una disminución de la capacidad de filtración. (40)

5.6. Toxicidad de las nanopartículas in vivo

Es importante hablar sobre la seguridad de la administración sistémica de las nanopartículas, ya que presentan diferentes perfiles de seguridad in vivo que in vitro. Además hay que tener en cuenta que debido al pequeño tamaño que tienen, las nanopartículas son más susceptibles de producir toxicidad sistémica en vez de limitarse únicamente a los efectos locales.

La toxicidad in vivo requiere el estudio de las interacciones de las nanopartículas con los diferentes componentes celulares de un tejido en un órgano concreto, así como las interacciones con la matriz extracelular. En una liberación sistémica, las nanopartículas se introducen directamente en el torrente sanguíneo, con los órganos de alto flujo sanguíneo (hígado y bazo) como objetivos principales aunque la translocación de las nanopartículas a órganos secundarios también puede producir toxicidad. La hepatotoxicidad puede afectar negativamente a las actividades metabólicas, por el estrés oxidativo o bien por los mecanismos de inmunotoxicidad, inhibiendo la función de los hepatocitos así como la formación de bilis. Normalmente esta toxicidad deriva en enfermedades hepáticas. De igual manera, la toxicidad esplénica se produce cuando el bazo sufre estrés oxidativo debido a la disponibilidad de oxígeno, debido al alto flujo sanguíneo

Por otro lado, la nefrotoxicidad se debe principalmente al estrés oxidativo que produce ROS, así como la inmunotoxicidad que genera una respuesta inflamatoria. Estos procesos pueden causar daño e insuficiencia renal. Además las nanopartículas o sus productos de degradación pueden atravesar la barrera hematoencefálica e introducirse en el sistema nervioso central pudiendo producir numerosos tipos de trastornos neurológicos. (15)

En referencia a la toxicidad de las diferentes partículas:

- En **cuanto a los puntos cuánticos (QDs)**, su toxicidad in vivo se ha estudiado en varios modelos animales como el ratón y la rana, señalando la ausencia de toxicidad significativa a dosis bajas según los estudios de comportamiento, hematología, histología y excreción. Estudios posteriores en primates demostraron la ausencia de cambios tanto histológicos como patológicos, pero también se observó la ausencia de excreción. Esto plantea preocupaciones sobre el efecto a largo plazo debido a la retención de metales pesados en el organismo debido a su estabilidad y a la posible desintegración de las nanopartículas exponiendo el núcleo (generalmente es de cadmio o selenio) al exterior. Uno de los últimos ensayos ha demostrado que un QD de silicio libre de metales pesados de nueva generación es totalmente biocompatible y biodegradable. (15)
- La toxicidad de las **nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs)** se ha investigado con referencia a la actividad citotóxica in vitro e in vivo a largo plazo. La toxicidad in vivo de las UCNPs hidrofílicas se ha estudiado en ratón, en gusanos de la especie *Caenorhabditis elegans* y otros animales pequeños dando como resultado una ausencia de toxicidad. Concretamente se realizó un estudio de toxicidad a largo plazo en ratones en el que los resultados fueron totalmente satisfactorios a todos los niveles; histología, hematología, comportamiento, etc. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la evaluación de la toxicidad in vivo está limitada a animales pequeños como los ratones, los cuales difieren del organismo humano. (41). Además, los lantánidos se pueden acumular en los huesos debido a la formación de sales inorgánicas de fosfato y pueden interactuar con el ADN.
- Las **nanopartículas de oro (AuNPs)** han sido ampliamente utilizadas para numerosas aplicaciones por lo que su toxicidad ha sido ampliamente estudiada tanto in vitro como in vivo. Aunque se pueden encontrar resultados contradictorios, existe un acuerdo general sobre la citotoxicidad dependiente del tamaño de las nanopartículas. Así pues, las nanopartículas de tamaño más pequeño (inferior a 5 nm) son más tóxicas que las de tamaño superior a 15 nm. Esto se debe a que las nanopartículas de menor tamaño pueden ingresar en el núcleo y unirse al ADN creando genotoxicidad, mientras que las de más tamaño no pueden hacerlo debido al impedimento estérico. (15)

El estudio de la toxicidad in vivo es de gran importancia ya que permite establecer el rango terapéutico y realizar una evaluación del riesgo en función de la dosis de exposición, así como estudiar los efectos secundarios que pueden producir las nanopartículas en el organismo.

Aunque hay muchos más estudios sobre la toxicidad de las nanopartículas in vivo, la mayoría han sido realizados en animales pequeños muy diferentes a los seres humanos, por ello no hay casi evidencias científicas de que puedan ser administradas con seguridad a un ser humano con el fin de diagnosticar o tratar la enfermedad.

En seres humanos se ha realizado un único ensayo clínico basado en la terapia "AuroLase". Esta terapia consiste en la administración intravenosa de nanopartículas GSN. Las GSN (AuroShells) están compuestas de un núcleo de sílice y una carcasa de oro y están diseñadas para absorber al máximo la luz del infrarrojo cercano (NIR) y convertirla en calor. En esta terapia, las nanopartículas que absorben en el NIR se acumulan en el tejido tumoral a través de

la vasculatura tumoral permeable y luego se irradian con un láser de NIR. El tumor sufre un calentamiento fototérmico resultando en la muerte celular selectiva hipertérmica, sin calentar el tejido adyacente no tumoral. El perfil de seguridad obtenido tras este ensayo demostró la falta de efectos secundarios en los pacientes. Se trata de un procedimiento seguro y técnicamente factible para la destrucción dirigida de tumores de próstata. (42)

6. Conclusiones

La detección del cáncer desde sus marcadores celulares hasta la metástasis, incluyendo todo lo que la enfermedad abarca, es esencial para diseñar tratamientos eficaces. Gracias a la nanomedicina y mediante estas nanopartículas con propiedades ópticas fluorescentes, se ha demostrado que sí es posible diagnosticar la enfermedad a través de la detección de biomarcadores cancerígenos y/o células cancerosas a partir de las muestras del paciente analizadas en el laboratorio, es decir, in vitro.

El desarrollo de las sondas de nanopartículas fluorescentes ha abierto un mundo nuevo de posibilidades para la mejora del pronóstico y por tanto para mejorar la eficacia del tratamiento. Dichas nanopartículas han demostrado ser particularmente útiles en este campo gracias a sus peculiares propiedades, sin embargo todavía deben estudiarse en más profundidad para comprender su comportamiento frente a la enfermedad y frente al organismo de manera que finalmente puedan ser trasladadas a la clínica como terapia (in vivo).

Así pues, el objetivo a largo plazo de la nanomedicina aplicada a la terapia del cáncer consiste en obtener una terapia personalizada mediante técnicas de reconocimiento específicas de marcadores y/o células cancerosas que permitan un diagnóstico y, a ser posible, una curación simultánea.

7. Bibliografía

- (1) Real Academia Española de la lengua. (2019). Disponible en: <https://www.rae.es/>
- (2) Cáncer [Internet]. Who.int. 2019 [Citado 22 Diciembre 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- (3) Asociación Española contra el Cáncer. (2018). Disponible en: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/prevencion/deteccion-precoz>
- (4) Chinen A, Guan C, Ferrer J, Barnaby S, Merkel T, Mirkin C. Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence. *Chemical Reviews*. 2015; 115(19):10530-10574.
- (5) Xing L, Todd N, Yu L, Fang H, Jiang F. Early detection of squamous cell lung cancer in sputum by a panel of microRNA markers. *Modern Pathology*. 2010; 23(8):1157-1164.
- (6) Solmeblas expertos en Biotecnología [Internet]. SOLMEGLAS Biotecnología. 2020 [Citado 22 Diciembre 2019]. Disponible en: <https://solmeblas.com/>
- (7) Bacic F, Cabrera P, Zamorano C, Villar J. Fluorescencia. *Scian.cl*. (2014) Disponible en: <http://www.scian.cl/archivos/uploads/1409836870.8698>
- (8) Lakowicz J. Principles of fluorescence spectroscopy (3rd ed). New York: Springer; 2006.

- (9) Escudero Ballesteros, L. *Principios de Fluorescencia*. Universidad Complutense de Madrid. 2018.
- (10) Berezin M, Achilefu S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chemical Reviews*. 2010;110(5):2641-2684.
- (11) Akers WJ , Berezin MY , Lee H, Guo K, Almutairi A, Fréchet JMJ et al. Aplicaciones biológicas de imágenes de fluorescencia de por vida más allá de la microscopía. En *Reporteros, Marcadores, Colorantes, Nanopartículas y Sondas Moleculares para Aplicaciones Biomédicas II*. 2010. 757612. (Progreso en óptica e imagen biomédicas - Actas de SPIE). <https://doi.org/10.1117/12.849453>
- (12) Yao J, Yang M, Duan Y. Chemistry, Biology, and Medicine of Fluorescent Nanomaterials and Related Systems: New Insights into Biosensing, Bioimaging, Genomics, Diagnostics, and Therapy. *Chemical Reviews*. 2014; 114(12):6130-6178.
- (13) Fluorescence Resonance Energy Transfer [Internet]. Chemistry LibreTexts. 2019 [Citado 2 Enero 2020]. Disponible en: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Fundamentals/Fluorescence_Resonance_Energy_Transfer](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Fundamentals/Fluorescence_Resonance_Energy_Transfer)
- (14) Piston D, Kremers G. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007; 32(9):407-414.
- (15) Chen G, Roy I, Yang C, Prasad P. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chemical Reviews*. 2016; 116(5):2826-2885.
- (16) Peer D, Karp J, Hong S, Farokhzad O, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*. 2007; 2 (12):751-760.
- (17) Pombo V y Goyanes V. *Puntos cuánticos: nueva aportación de la nanotecnología en investigación y medicina*. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 5 (1) 2011: 69-102
- (18) Efros, A. L.; Rosen, M. The Electronic Structure of Semiconductor Nanocrystals. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 2000, 30, 475–521.
- (19) Dahan M, Laurence T, Pinaud F, Chemla D, Alivisatos A, Sauer M et al. Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots. *Optics Letters*. 2001; 26(11):825.
- (20) Álvarez Montero, C. *Principios de fluorescencia en partículas de conversión ascendente y aplicaciones biomédicas*. Universidad Complutense de Madrid. 2017.
- (21) Wang, M.; Abbineni, G.; Clevenger, A.; Mao, C. B.; Xu, S. K. Upconversion Nanoparticles: Synthesis, Surface Modification and Biological Applications. *Nanomedicine* 2011, 7, 710–729.
- (22) Cornejo L. Resonancia del plasmón de la superficie (RPS) [Internet]. *Nuevas Tecnologías y Materiales*. [Citado 2 Enero 2020]. Disponible en: <https://nuevatecnologiasymateriales.com/resonancia-del-plasmon-de-la-superficie-rps-propiedades-optoelectronicas/>
- (23) Lytton-Jean A, Mirkin C. A Thermodynamic Investigation into the Binding Properties of DNA Functionalized Gold Nanoparticle Probes and Molecular Fluorophore Probes. *Journal of the American Chemical Society*. 2005; 127(37):12754-12755.
- (24) NCI Dictionary of Cancer Terms [Internet]. National Cancer Institute. [Citado 5 Enero 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/targeted-therapy?redirect=true>
- (25) Liu S. Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Integrin $\alpha\beta 3$ -Targeted Radiotracers: Maximizing Binding Affinity via Bivalency. *Bioconjugate Chemistry*. 2009; 20(12):2199-2213.
- (26) Seguin L, Desgrosellier J, Weis S, Cheresch D. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends in Cell Biology*. 2015; 25(4):234-240.

- (27) Zitzmann, S. Ehemann, V. Schwab, M. (2002). Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-peptide binds to both tumor and tumor-endothelial cells in vivo. *Cancer research*. 62. 5139-43.
- (28) Gatter K, Brown G, Trowbridge I, Woolston R, Mason D. Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *Journal of Clinical Pathology*. 1983; 36(5):539-545.
- (29) Daniels T, Delgado T, Helguera G, Penichet M. The transferrin receptor part II: Targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clinical Immunology*. 2006; 121(2):159-176.
- (30) Carter P. Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6(5):343-357.
- (31) Xiang D, Shigdar S, Qiao G, Wang T, Kouzani A, Zhou S et al. Nucleic Acid Aptamer-Guided Cancer Therapeutics and Diagnostics: the Next Generation of Cancer Medicine. *Theranostics*. 2015; 5(1):23-42.
- (32) Sun H, Zhu X, Lu P, Rosato R, Tan W, Zu Y. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2014; 3:e182.
- (33) Li H, Cao Z, Zhang Y, Lau C, Lu J. Simultaneous detection of two lung cancer biomarkers using dual-color fluorescence quantum dots. *The Analyst*. 2011; 136(7):1399.
- (34) Kerman K, Endo T, Tsukamoto M, Chikae M, Takamura Y, Tamiya E. Quantum dot-based immunosensor for the detection of prostate-specific antigen using fluorescence microscopy. *Talanta*. 2007; 71(4):1494-1499.
- (35) You C, Miranda O, Gider B, Ghosh P, Kim I, Erdogan B et al. Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer 'chemical nose' sensors. *Nature Nanotechnology*. 2007; 2(5):318-323.
- (36) Wu X, Liu H, Liu J, Haley K, Treadway J, Larson J et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology*. 2002; 21(1):41-46.
- (37) Wang M, Mi C, Zhang Y, Liu J, Li F, Mao C et al. NIR-Responsive Silica-Coated NaYbF₄:Er/Tm/Ho Upconversion Fluorescent Nanoparticles with Tunable Emission Colors and Their Applications in Immunolabeling and Fluorescent Imaging of Cancer Cells. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2009; 113(44):19021-19027.
- (38) Song E, Hu J, Wen C, Tian Z, Yu X, Zhang Z et al. Fluorescent-Magnetic-Biotargeting Multifunctional Nanobioprobes for Detecting and Isolating Multiple Types of Tumor Cells. *ACS Nano*. 2011; 5(2):761-770.
- (39) Doello K, Cabeza L, Ortiz R, Arias J, Melguizo C, Prados J. Magnetic Nanoparticules in Cancer Diagnosis and Treatment. *ACTUALIDAD MÉDICA*. 2015; 100(796):139-144.
- (40) Gutierrez López, G. *Nanomedicinas contra el cáncer*. Universidad Complutense de Madrid. 2018.
- (41) Chen G, Qiu H, Prasad P, Chen X. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chemical Reviews*. 2014; 114(10):5161-5214.
- (42) Rastinehad A, Anastos H, Wajswol E, Winoker J, Sfakianos J, Doppalapudi S et al. Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019; 116(37):18590-18596.