



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Fotorreparación de lesiones del ADN por sistemas modelo

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Piñero Piquer, Enrique

Tutor/a: Forment Millet, José Javier

Cotutor/a externo: LHIAUBET, VIRGINIE LYRIA

Director/a Experimental: LIZONDO ARANDA, PALOMA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural



INSTITUTO DE
TECNOLOGÍA
QUÍMICA

TRABAJO FIN DE GRADO

FOTORREPARACIÓN DE LESIONES DEL ADN POR SISTEMAS MODELO

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Grado en Biotecnología

Curso académico: 2021/2022

Autor:

ENRIQUE PIÑERO PIQUER

Tutor Académico:

JOSÉ JAVIER FORMENT MILLET

Cotutora Externa:

VIRGINIE LHIAUBET

Directora Experimental:

PALOMA LIZONDO ARANDA

València, 13 de junio de 2022

Trabajo no confidencial

Título del TFG: Fotorreparación de lesiones del ADN por sistemas modelo

Resumen del TFG: La peroxidación lipídica es un proceso biológico que ocurre ininterrumpidamente en nuestro cuerpo como resultado de la oxidación de la membrana celular por especies reactivas de oxígeno (EROs). La degradación de los ácidos grasos poliinsaturados conduce a aldehídos reactivos, como el malondialdehído o el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). El 4-HNE puede interactuar con las bases del ADN formando daños endógenos conocidos como aductos de tipo eteno (ϵ -aductos). Estas lesiones están presentes en muchos tejidos humanos inflamados, lo que los convierte en biomarcadores para detectar algunos tipos de cánceres. Además, estos daños ubicuos exhiben propiedades altamente mutagénicas e inducen transiciones o transversiones de bases en células de mamíferos. En consecuencia, la comprensión de su reparación es de gran interés. Las lesiones de tipo eteno pueden ser reparadas enzimáticamente por el AlkB mediante un mecanismo oxidativo que regenera la nucleobase nativa. Curiosamente, se ha demostrado que el eteno aducto 1-N²-eteno-2'-desoxiguanosina (ϵ dG) puede reaccionar in vitro con oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) dando lugar a la 2'-desoxiguanosina (dG). Con estos antecedentes, este trabajo aborda la fotoquímica de los aductos de tipo eteno para comprender mejor sus propiedades fotobiológicas y diseñar sistemas modelo para su reparación. Se utiliza el rosa de Bengala, un fotosensibilizador capaz de fotogenerar oxígeno singlete, y se conjuga a nanopartículas para aprovechar sus propiedades fotofísicas y fotobiológicas.

Palabras Claves: Daño al ADN; fotoenzima; fotosensibilización; mutagénesis; oxígeno singlete

Abstract: Lipid peroxidation is a biological process that occurs uninterruptedly in our body because of cell membrane oxidation by reactive oxygen species (ROS). Polyunsaturated fatty acid degradation leads to reactive aldehydes, such as malondialdehyde or 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE). The 4-HNE can interact with DNA bases forming the endogenous damages known as etheno adducts (ϵ -adducts). These lesions are present in many inflamed human tissues, making them convenient biomarkers for some types of cancers. Moreover, these ubiquitous damages exhibit highly mutagenic properties and induce base transitions or transversions in mammal cells. Consequently, the understanding of their repair is of a great interest. The etheno lesions can be repaired enzymatically by the AlkB by means of an oxidative mechanism leading back to the native nucleobase. Interestingly, it has been shown that the etheno adduct 1-N²-etheno-2'-deoxyguanosine (ϵ dG) can react in vitro with singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) giving rise to 2'-deoxyguanosine (dG). With this background, this work addresses the photochemistry of etheno adducts to better understand their photobiological properties and to design model systems for their repair. Rose Bengal, a photosensitizer, which can photogenerate singlet oxygen, is used. Its conjugation to nanoparticles is performed with the aim to enhance its photophysical and photobiological properties.

Key words: DNA damage; photoenzyme; photosensitization; mutagenesis; singlet oxygen

Autor del TFG: Alumno: Enrique Piñero Piquer

Localidad y fecha: València, 13 de junio de 2022

Tutor Académico: Profesor D. José Javier Forment Millet

Cotutora Externa: Virginie Lhiaubet

Directora experimental: Paloma Lizondo Aranda

TFG no confidencial

DEDICATORIAS

A mi familia, por saber encontrar siempre la forma de adaptarnos entre nosotros, nosotras y a cualquier situación. Su apoyo incondicional es el resultado de ello.

A mis amigas y amigos por ser uno de los puntos de partida de mi vida, en especial a mis amigas y compañeras Ana y Dafne, por apoyarme de la mejor manera posible en mi etapa más complicada.

A José, por acompañarme y compartir conmigo momentos tan importantes de mi vida

A Virginie y Paloma, por su paciencia y disponibilidad. Muchas fuerzas con la recta final de tu tesis, futura Dra. Lizondo.

Y a la clase trabajadora en ciencia, contra su explotación, por su organización y por su emancipación.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Nanopartículas.....	1
1.1.1. Definición y naturaleza.....	1
1.1.2. Aplicaciones de las Nanopartículas en la Medicina.....	1
1.1.2.1. Uso de nanopartículas en terapias fotodinámicas (TFD)	2
1.2. Fotoquímica y nanopartículas.....	3
1.2.1. Fotoquímica molecular.....	3
1.2.2. Mecanismos de fotosensibilización.....	4
1.2.2.1. Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)	5
1.2.3. Fotoquímica de nanopartículas y el rosa de Bengala.....	6
1.3. Fotodaños de ADN y Aductos de eteno.....	7
1.3.1. Fotodaños.....	7
1.3.2. Aductos de tipo eteno (ϵ -aductos)	8
1.4. Reparación de fotodaños del ADN.....	10
1.4.1. Mecanismos de reparación de los aductos de eteno.....	10
2. Objetivos.....	13
3. Materiales y Métodos.....	14
3.1. Caracterizaciones.....	14
3.1.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	14
3.1.2. Espectrofotómetro UV-Vis.....	14
3.1.3. Potencial Z.....	14
3.1.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	15
3.2. Reactivos y síntesis de nanopartículas (NPs)	16
3.2.1. Reactivos y casas comerciales.....	16
3.2.2. Síntesis de nanopartículas de óxido de sílice (SiO_2 NPs)	16
3.2.3. Síntesis de Ag@SiO_2 NPs.....	16
3.2.3.1. Síntesis semillas de oro (Au Seeds)	16
3.2.3.2. Síntesis de nanopartículas de plata (Ag NPs)	17
3.2.3.3. Recubrimiento de SiO_2 de las AgNPs	17
3.2.3.4. Aminación de nanopartículas	17
3.2.4. Conjugación del rosa de Bengala (RB) a las nanopartículas.....	18
3.3. Reparación de los ϵ-aductos mediante fotólisis en estado estacionario.....	21

4. Resultados y Discusión.....	23
4.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas.....	23
4.1.1. Síntesis de las nanopartículas de óxido de sílice (SiO ₂ -RB NPs)	23
4.1.2. Síntesis de nanopartículas de plata recubiertas con óxido de sílice y funcionalizadas con rosa de Bengala (Ag@SiO ₂ -RB NPs)	24
4.2. Reparación de los aductos tipo eteno del ADN.....	26
4.2.1. Reparación de los aductos de tipo eteno con SiO ₂ -RB NPs.....	26
4.2.2. Reparación de aductos de eteno con nanopartículas de Ag@SiO ₂ -RB NPs.....	30
5. Conclusiones.....	33
6. Bibliografía.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Representación gráfica de los diferentes materiales y moléculas que recubren, se adhieren o se enlazan a las nanopartículas (NP). La naturaleza de estas especies proporciona propiedades a las nanopartículas a las que se asocian, pudiendo ser fotosensibilizadores (PS, de sus siglas en inglés), moléculas adheridas covalentemente, polímeros, recubrimientos de SiO ₂ , etc. (Zhou et al., 2016).....	1
Figura 2. Ilustración de una terapia fotodinámica (TFD) aplicada en tumores (Sorrin, 2020)	3
Figura 3. Diagrama de Jablonski en el que se muestran los diferentes tipos de transiciones electrónicas que se pueden dar entre orbitales moleculares (S _n o T _n): hv (energía proporcionada para la promoción electrónica a orbitales de mayor energía); IC (conversión interna); ISC (cruce entre sistemas) y desactivaciones radiativas como la fluorescencia (F) o la fosforescencia (P) (Ikehata & Ono, 2011).....	4
Figura 4. Representación de los mecanismos de fotosensibilización dependientes del oxígeno molecular (Tipo I y Tipo II) y sus correspondientes EROs producidos (Aparici, 2018)	5
Figura 5. Diagramas de los orbitales moleculares ocupados por los electrones del oxígeno molecular en estado fundamental (O ₂) (izquierda) y el oxígeno singlete (¹ O ₂) (derecha). En concreto, podemos observar que, en el O ₂ , los dos electrones que lo ocupan están desapareados y separados una en cada uno de los dos orbitales 2p π antienlazante (π*) y con el mismo espín. En el caso del oxígeno singlete, observamos que los dos electrones están apareados en uno de los orbitales π*, quedando el otro libre. Esto último explica el mayor poder oxidante del oxígeno singlete (Linerós, 2021).....	6
Figura 6. Espectro de absorción normalizado del rosa de Bengala (RB) en disolución acuosa (rojo) y disolución etílica (azul)	7
Figura 7. Representación gráfica de la capacidad de penetración en el tejido epitelial por parte de las diferentes radiaciones ultravioletas (UVA, UVB y UVC) (Linerós, 2021).....	7
Figura 8. Representación esquemática del proceso químico de generación del 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) a partir de la reacción de los EROs (ROS) fotogenerados con los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de las membranas plasmáticas (Zhong & Yin, 2015)	8

Figura 9. Representación gráfica de la fórmula molecular de los aductos de eteno de los 2-desoxinucleósidos (sin grupos fosfato enlazados al monosacárido) de: a) 1-N6-etileno-2'-desoxiadenosina (ϵ dA), b) 3-N4-etileno-2'-desoxicitidina (ϵ dC), c) 1-N2-etileno-2'-desoxiguanosina (ϵ dG) (di Mascio et al., 2019).....	9
Figura 10. Representación esquemática del posible mecanismo de reparación del aducto de eteno del desoxirribonucleósido 1-N2-etileno-2'-desoxiguanosina (ϵ dG) mediante la presencia como reactivo del oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), obteniendo finalmente el desoxirribonucleósido canónico de la desoxiguanosina (dG)(Martinez et al., 2003).....	11
Figura 11. Representación gráfica de la estrategia de reparación de ϵ -aductos mediante la producción de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) a partir de la irradiación lumínica ($h\nu$) de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Ag@SiO}_2\text{-RB}$	12
Figura 12. Fórmula de la ley de Lambert y Beer, en la que A es absorbancia (adimensional), es el coeficiente de absorbancia ($L\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) correspondiente a una determinada longitud de onda (λ), l es la longitud de la cubeta (cm) y C la concentración del sustrato (M)	14
Figura 13. Ejemplos de las rectas de calibrado y sus ecuaciones realizadas con las señales detectadas de nucleósidos a concentraciones de 0,5 μM , 2 μM , 4 μM , 5 μM , 8 μM . La absorbancia fue medida en el espectrofluorímetro acoplado al HPLC en función de la concentración (μM) de cada una de las disoluciones de nucleósidos inyectados: A) ϵ dA B) ϵ dC C) ϵ dG D) dA e) dC f) dG. Cada gráfico lleva adjunto la fórmula del ajuste lineal, donde la y es la absorbancia y la x, la concentración	15
Figura 14. Representación gráfica de los procesos de síntesis, recubrimiento y funcionalización de las NPs descritos en el apartado 2.1.	15
Figura 15. Representación gráfica del proceso de aminación de la superficie de SiO_2 de las NPs mediante el uso de APTES (Alemany et al., 2021).....	18
Figura 16. Representación gráfica del proceso de conjugación del rosa de Bengala (RB) de nanopartículas funcionalizadas con grupos aminos mediante el uso de EDC (Planas et al., 2016).....	18
Figura 17. Espectros de absorción de sobrenadantes acuosos extraídos en diferentes secuencias de lavado del rosa de Bengala en las $\text{SiO}_2\text{-RB}$ NPs.....	19
Figura 18. Representación gráfica de la disminución de la concentración (C_{NP}) de rosa de Bengala (RB) en la disolución con las nanopartículas de SiO_2 funcionalizadas por cada una de las secuencias lavados realizadas.....	20
Figura 19. Representación gráfica de la disminución de la concentración de rosa de bengala (C_{NP}) en la disolución con las nanopartículas de Ag@SiO_2 funcionalizadas por cada uno de los lavados realizados.....	21

Figura 20. A la izquierda, sistema de purgado de los viales, mediante el cual se desplaza el oxígeno de los viales que se irradiarán en anaerobiosis. A la derecha, imagen del fotorreactor Luzchem LZC 4V encendido con los 6 viales de muestra dentro.....	22
Figura 21. Imágenes tomadas de las observaciones mediante TEM 200 de las SiO ₂ NPs 9 en diferentes aumentos y sus correspondientes diámetros en nm.....	23
Figura 22. Representación gráfica de los valores del potencial Z en mV medido para las diferentes NPs sintetizadas.....	24
Figura 23. Imágenes tomadas de las observaciones mediante TEM 120 (A-C) y TEM 200 (D-F) de las muestras de las Ag NPs (A-C) y de las Ag@SiO ₂ NPs (D-F). Cada una de las imágenes son observaciones a diferentes aumentos de las nanopartículas de la misma síntesis. En las imágenes B y E se muestran en verde los diámetros de las nanopartículas en nm.	25
Figura 24. Espectros de absorción de las Ag NPs en suspensión acuosa y de las Ag@SiO ₂ NPs en suspensión etílica medidos mediante espectrofotómetro UV-Vis. Estos espectros fueron normalizados con su valor máximo de absorción correspondiente	26
Figura 25. Representación gráfica de los valores del potencial Z en mV medido para las diferentes NPs sintetizadas.....	26
Figura 26. Representación gráfica en cascada de los espectros cromatográficos de HPLC obtenidos a diferentes tiempos de irradiación con SiO ₂ NPs para los experimentos: A) Experimental: εdA B) Control: εdA C) Experimental: εdC D) Control: εdC E) Experimental: εdG F) Control: εdG	27
Figura 27. Representación gráfica de las concentraciones de nucleósidos dañados y reparados en función del tiempo de irradiación con SiO ₂ NPs para los experimentos: A) Experimental: εdA B) Control: εdA C) Experimental: εdC D) Control: εdC E) Experimental: εdG F) Control: εdG	28
Figura 28. Representación gráfica en cascada de los espectros cromatográficos de HPLC obtenidos a diferentes tiempos de irradiación con SiO ₂ NPs para los experimentos: A) Experimental: εdG B) Control: εdG	30
Figura 29. Representación gráfica de las concentraciones de nucleósidos dañados y reparados en función del tiempo de irradiación con Ag@SiO ₂ NPs para los experimentos: A) Experimental: εdA B) Control: εdA C) Experimental: εdC D) Control: εdC E) Experimental: εdG F) Control: εdG	31

Tabla 1. Tiempos de retención en el HPLC para cada uno de los desoxirribonucleósidos estudiados.....15

Tabla 2. Valores de los coeficientes de absorción molar (ϵ_λ) para cada disolvente, longitud de onda para la absorción máxima del RB para cada disolvente (λ_{\max}) y valor del paso óptico (l).19

Tabla 3. Datos correspondientes al lavado del rosa de Bengala no conjugado en la síntesis de SiO₂-RB NPs, en el que se muestran las absorción de cada sobrenadante (A) obtenido tras cada secuencia de lavado (nº falcon), la dilución empleada, el disolvente utilizado, su correspondiente concentración de RB (C_x), la concentración de rosa de Bengala conjugado a las NPs (C_{NP}), la concentración inicial de rosa de Bengala (C_0), la concentración total de rosa de Bengala lavado (C_{xtotal}) y la concentración final de rosa de Bengala conjugado a las NPs ($C_{NPtotal}$)20

Tabla 4. Datos correspondientes al lavado del rosa de Bengala no conjugado en la síntesis de Ag@SiO₂-RB NPs, en el que se muestran las absorción de cada sobrenadante (A) obtenido tras cada secuencia de lavado (nº falcon), la dilución empleada, el disolvente utilizado, su correspondiente concentración de RB (C_x), la concentración de rosa de bengala conjugado a las NPs (C_{NP}), la concentración inicial de rosa de Bengala (C_0), la concentración total de rosa de Bengala lavado (C_{xtotal}) y la concentración final de rosa de Bengala conjugado a las NPs ($C_{NPtotal}$)21

Tabla 5. Concentración de ϵ -aducto a tiempos finales (t) de irradiación en presencia de rosa de Bengala.....29

Tabla 6. Concentración de nucleósido reparado a tiempos finales (t) de irradiación en presencia de rosa de Bengala.....29

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

λ	Longitud de onda
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
8-oxo-dG	8-oxo-desoxiguanina
A	Adenina
ACN	Acetonitrilo
Ag	Plata
Ag@SiO ₂ NPs	Nanopartículas de plata recubiertas por óxido de sílice
Ag@SiO ₂ -NH ₂ NPs	Nanopartículas de plata recubiertas por óxido de sílice aminadas en su superficie
AgNO ₃	Nitrato de plata
AgNPs	Nanopartículas de plata
AND	Ácido desoxirribonucleico
APTES	3-aminopropil-trimetoxilano
Au	Oro
Au Seeds	Semillas de oro
AuNPs	Nanopartículas de oro
BER	Reparación por la escisión de la base nitrogenada
C	Citosina
CPD	Dímeros de tipo ciclobutano de pirimidina
Cu	Cobre
D ₂ O	Agua deuterada
dA	Desoxiadenosina
dC	Desoxicitidina
dG	Desoxiguanosina
dT	Desoxitimidina
ERO	Especie Reactiva de Oxígeno
FADH	Flavín Adenín dinucleótido
G	Guanina
GGR	Reparación global del genoma
H ₂ O	Agua
HAuCl ₄ · H ₂ O	Ácido cloroáurico hidratado
HCl	Ácido Clorhídrico
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IC	Conversión interna
IFD	Inactivación fotodinámica de organismos
ISC	Cruce intersistemas
K. pneumoniae	Klebsiella pneumoniae
MES	Ácido 2-metanosulfónico
n	Orbital molecular no enlazante
NaBH ₄	Borohidruro de sodio
NER	Reparación por la excisión de nucleótido
NH ₄ OH	Hidróxido de amonio
NPs	Nanopartículas
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OH ⁻	Radical hidroxilo
p.e.	Por ejemplo
PS	Fotosensibilizador

PVP	Polivinilpirrolidona
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RB	Rosa de Bengala
S. aureus	Staphylococcus aureus
S ₀	Subnivel energético de menor energía en un orbital singlete
SiO ₂	Óxido de sílice
SiO ₂ -NH ₂ NPs	Nanopartículas de óxido de sílice aminadas en su superficie
SiO ₂ -NPs	Nanopartículas de óxido de sílice
S _n	Subnivel energético en un orbital singlete
T	Triplete
T ₀	Subnivel energético de menor energía en un orbital triplete
TCR	Reparación acoplada a la transcripción
TEM120	Microscopio Electrónico de Transmisión de Emisión de Campo de 120kV
TEM200	Microscopio Electrónico de Transmisión de Emisión de Campo de 200kV
TEOS	Tetraetil ortosilicato
TFD	Terapia fotodinámica
TiO ₂	Óxido de titanio
T _n	Subnivel energético en un orbital triplete
TTET	Transferencia energética triplete-triplete
u.a.	Unidades de arbitrarias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana tipo I
w/v	Peso/volumen
ε	Coefficiente de absorción molar
εdA	1-N6-etileno-2'-desoxiadenosina
εdC	3-N4-etileno-2'-desoxicitidina
εdG	1-N2-etileno-2'-desoxiguanosina
π	Orbital molecular pi
π*	Orbital molecular pi antienlazante
σ	Orbital molecular sigma
σ*	Orbital molecular sigma antienlazante

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Nanopartículas

1.1.1. Definición y naturaleza

La **nanotecnología** engloba técnicas ingenieriles realizadas en el margen de una escala nanométrica en al menos una de sus dimensiones, que equivaldría a 100 nanómetros o menos (Williams, 2008). Las propiedades que presenta están ligadas a esta pequeña dimensión, tanto los niveles cuánticos (Williams, 2008), como físicos, químicos y biológicos (Abbasi et al., 2016).

Dentro de los materiales encuadrados en esta tecnología, encontramos las **nanopartículas** (NPs). Estas pueden tener formas, naturalezas y usos muy diversos sin embargo en este trabajo se utilizarán dos tipos de nanopartículas esféricas; metálicas, y ópticamente activas, y de óxido de silicio (SiO_2). Los elementos químicos más estables en la síntesis de NPs metálicas son el oro (Au), la plata (Ag) y el cobre (Cu), destacando en las dos primeras su capacidad de absorción espectral en función de su tamaño, su resistencia a la oxidación y su capacidad de resonancia plasmónica con la luz (Pissuwan et al., 2006).

Mientras que las NPs metálicas son ampliamente reconocidas por sus propiedades espectroscópicas, las SiO_2 NPs se caracterizan por sus amplios volúmenes y superficies específicas a los que se pueden llegar, el control del tamaño resultante de la nanopartícula durante su síntesis y una buena biocompatibilidad (Wang et al., 2015). Además, las nanopartículas pueden disponer de recubrimientos superficiales de otros materiales y/o moléculas soportadas en ellas que les aporten en su conjunto propiedades deseadas (*Figura 1*) (Planas et al., 2016).

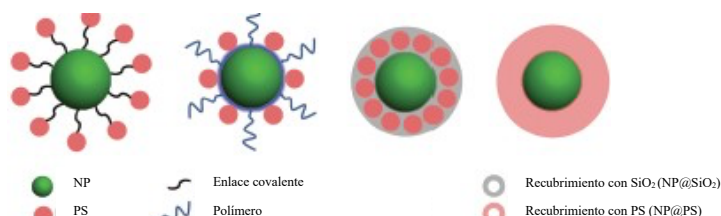


Figura 1. Representación gráfica de los diferentes materiales y moléculas que recubren, se adhieren o se enlazan a las nanopartículas (NP). La naturaleza de estas especies proporciona propiedades a las nanopartículas a las que se asocian, pudiendo ser fotosensibilizadores (PS, de sus siglas en inglés), moléculas adheridas covalentemente, polímeros, recubrimientos de SiO_2 , etc. (Zhou et al., 2016)

1.1.2. Aplicaciones de las Nanopartículas en la Medicina

Las aplicaciones de estos nanomateriales son muy diversas, pueden embarcar desde la física hasta la medicina. Ejemplos de esta últimas es su uso en la **inactivación fotodinámica de microorganismos (IFD) y en las terapias fotodinámicas (TFD)**, unas terapias centradas en provocar la muerte y/o inactivación de células mediante la irradiación lumínica de nanopartículas. Algunos de estos mecanismos están basados en la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) mediante la irradiación de las nanopartículas. Destaca el papel del oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), una ERO que, una vez producida por la irradiación de las nanopartículas, tendría la capacidad de reaccionar con las biomoléculas del medio celular en el que se generara.

En el caso de las nanopartículas metálicas, en especial en las de plata (AgNPs), sus propiedades ópticas y eléctricas les permiten ser empleadas en múltiples aplicaciones médicas como biosensores, en cosméticos, farmacéutica (p.e., inhibición de la replicación del VIH-1), en la detección vírica, en el

escaneado de células cancerosas, en la síntesis de hidrogeles para su aplicación en ingeniería tisular, en secuenciación del ADN, en odontología, y un largo etcétera (Abbasi et al., 2016). No obstante, destaca el uso de las AgNPs en la IFD como agente tóxico para una gama amplia de microorganismos, habiendo sido aplicado con eficacia para la inactivación de bacterias tanto Gram + como Gram - (Macía et al., 2019). Respecto al uso de las nanopartículas en TFDs, destaca sobre todo su uso para la erradicación de tumores mediante la producción de EROs o incluso mediante la optoporación de las membranas de estas células. (Bucharskaya et al., 2016)

Respecto a las nanopartículas de sílice (SiO₂ NPs) se han sintetizado durante más de 60 años con aplicaciones muy distintas. Aún así siempre ha destacado su uso en medicina para la distribución dirigida de fármacos, en el escaneado médico de imágenes y su uso como material bioactivo en la ingeniería tisular (Wang et al., 2015). La aplicación in vivo ha dado lugar a resultados positivos tanto en la baja citotoxicidad, su biodegradabilidad, distribución fisiológica y excreción (Wang et al., 2015).

1.1.2.1. Uso de nanopartículas en terapias fotodinámicas (TFD)

Para hablar de este tipo de terapias, antes cabe mencionar el papel de las **especies reactivas de oxígeno (EROs)** en la fisiología celular. La presencia de estas especies en las células puede implicar dos papeles, dependiendo de la concentración a la que se encuentran. Cuando su concentración es pequeña y controlada, toman parte en la homeostasis y proliferación de las células, constituyendo mensajeros en la señalización y jugando un papel importante en la inmunidad mediada por células (Zhou et al., 2016). No obstante, unas concentraciones elevadas de EROs pueden derivar en un daño oxidativo del medio celular y las consecuentes necrosis, apoptosis o carcinogénesis.

A parte de lo mencionado, las **células cancerosas** pueden ser destruidas gracias a la acción oxidativa por la administración o generación de altas concentraciones de EROs (Zhou et al., 2016). Estas concentraciones de EROs han de ser muy altas debido a la alta capacidad reductora de este tipo de células. Teniendo esto en cuenta, una estrategia contra las células cancerosas es la producción exógena de EROs y es aquí donde entran las **terapias fotodinámicas (TFD)**.

La TFD consiste en la generación de EROs mediante el empleo de **fotosensibilizadores (PS)**. Estos fotosensibilizadores consisten en sustancias o materiales capaces de captar la luz y desencadenar una reacción fotoquímica (Zhou et al., 2016). En la TFD los fotosensibilizadores se suelen soportar sobre nanopartículas. De esta forma, encontramos ejemplos de superficies de nanopartículas de silicato, de TiO₂, poliméricas como poliacrilamida (Hou et al., 2020), metales plasmónicos como el oro y la plata, moléculas orgánicas como el rosa de Bengala (RB) conjugadas a la superficie de las nanopartículas (Planas et al., 2016), todas ellas pudiendo ser empleadas para la erradicación del cáncer.

Además de abordar la erradicación de tumores mediante el aporte de las EROs en las células cancerosas, el fundamento de las TFDs puede ser empleado para fines clínicos muy diversos, ya sea la descomposición de ácidos grasos, el tratamiento de la artritis reumatoide, la erradicación bacteriana y la regulación inmunológica (Hou et al., 2020). En el caso del presente trabajo, como ya se explicará más adelante, la producción de EROs por parte de las nanopartículas será utilizado para **promover la reparación de daños al ADN**, basándonos en la capacidad reactiva que tienen los EROs frente a biomoléculas (Baptista et al., 2017) y en la aplicación de PSs en el tratamiento de cánceres de piel (Abrahamse & Hamblin, 2016).

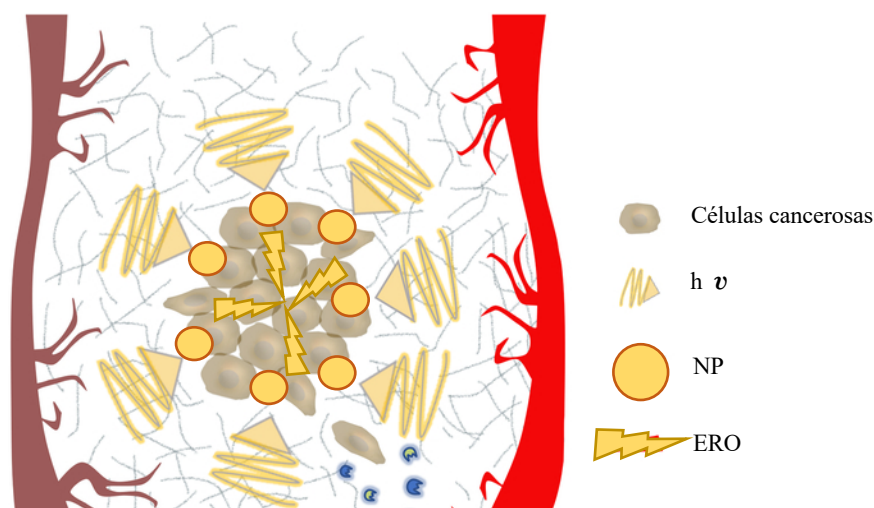


Figura 2. Ilustración de una terapia fotodinámica (TFD) aplicada en tumores (Sorrin et al., 2020)

1.2. Fotoquímica y nanopartículas

1.2.1. Fotoquímica molecular

La fotoquímica molecular es un ámbito de la química que se centra en el estudio de reacciones químicas en las que participan moléculas excitadas por la **absorción de radiación** en el espectro UV-Vis e infrarrojo (Turro et al., 2009). Los **orbitales moleculares** son el resultado de la unión lineal entre orbitales atómicos, existiendo los orbitales enlazantes (σ y π), los antienlazantes (σ^* y π^*) y los no enlazantes (n). En estado fundamental, los electrones de los orbitales moleculares están emparejados (siguiendo el principio de exclusión de Pauli) y con espines antiparalelos. Cuando un electrón de un orbital molecular ocupado absorbe un fotón a una determinada frecuencia, este **promociona a un orbital molecular no ocupado de mayor energía** al anterior. Cabe destacar que cada orbital molecular, como niveles moleculares de energía, disponen además de subniveles energéticos vibracionales y rotacionales. Existen dos tipos de estado excitado: el **estado excitado singlete (S_n)** se da cuando el electrón que ha promocionado a otro orbital molecular mantiene aún su multiplicidad y su espín es antiparalelo al espín del electrón con el que estaba emparejado en el estado fundamental. El **estado excitado triplete (T_n)** se da cuando el electrón cambia su multiplicidad y el espín del electrón promocionado pasa a ser paralelo respecto al del que estaba emparejado.

Así, un electrón promociona a otro orbital más energético, la molécula se encuentra en un estado excitado singlete inestable (S_n), por lo que se dan transiciones a niveles energéticos menores. Estos fenómenos de **relajación** pueden ser explicados mediante el **diagrama de Jablonski** (Figura 3). Primero el electrón suele relajarse vibracionalmente, pasando al nivel vibracional de menor energía dentro del estado excitado singlete o triplete en el que se halla (V_0). En este punto, las transiciones que se pueden dar son (Mai & González, 2020):

- **Conversión interna (IC, de sus siglas en inglés internal conversion):** es un proceso no radiativo que consiste, o bien, en la transición de un electrón desde un estado vibracional de un estado excitado al estado vibracional isoenergético de otro estado excitado de misma multiplicidad más bajo en energía (p.e. del V_0 del S_2 al V_3 de S_1 o V_0 del S_1 al estado fundamental S_0).
- **Cruce entre sistemas (ISC, de sus siglas en inglés intersystem crossing):** consiste en la transición desde un estado excitado singlete a un estado excitado triplete, o viceversa. Este fenómeno tampoco es radiativo e implica la modificación de la multiplicidad del espín del electrón.

- **Desactivaciones radiativas:** estos procesos tienen lugar desde el subnivel V0 del estado excitado singlete (S_1) o triplete (T_1) más bajo (ley de Kasha), siendo por **fosforescencia (P, de su sigla en inglés phosphorescence)** para la desactivación desde T_1 a S_0 y por **fluorescencia (F)** si en el caso de S_1 a S_0 .

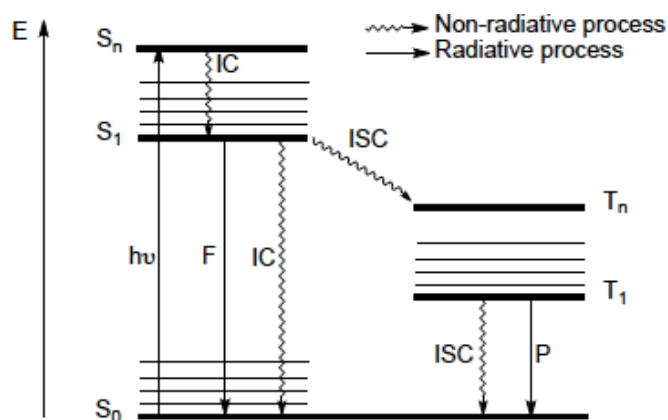


Figura 3. Diagrama de Jablonski en el que se muestran los diferentes tipos de transiciones electrónicas que se pueden dar entre orbitales moleculares (S_n o T_n): $h\nu$ (energía proporcionada para la promoción electrónica a orbitales de mayor energía); IC (conversión interna); ISC (cruce entre sistemas) y desactivaciones radiativas como la fluorescencia (F) o la fosforescencia (P) (Ikehata & Ono, 2011)

1.2.2. Mecanismos de fotosensibilización

La **fotosensibilización** es un proceso en el que se dan cambios químicos en una entidad molecular debido a la absorción de una radiación por parte de otra entidad molecular, denominada **fotosensibilizador (PS)** (McNaught & Wilkinson, 2014). Respecto a la reactividad de los PSs con biomoléculas, se pueden diferenciar **tres tipos de reacciones** (Turro et al., 2009):

- **Transferencia energética:** es una reacción en la que se produce una transferencia de energía desde una molécula dadora excitada a una molécula aceptora. Este proceso puede ocurrir tanto **entre estados excitados singletes (SSET, de sus siglas en inglés de Singlet-Singlet Energy Transfer)** o **tripletes (TTET, de sus siglas en inglés de Triplet-Triplet Energy Transfer)** siempre y cuando el estado excitado del dador tenga mayor energía que el estado energético al que se transfiere en el aceptor. En bioquímica, la TTET desde un fotosensibilizador hacia las nucleobases del ADN da lugar a la formación de los dímeros de pirimidina de tipo ciclobutano (CPD), que son unas lesiones mutagénicas.
- **Tipo I (Figura 4):** son reacciones de fotosensibilización **dependientes del oxígeno molecular** en las cuales se produce la formación de **especies o intermediarios radicalarios** como los HO^\bullet u O_2^\bullet o los **radicales neutros o iónicos** del sustrato y/o del PS. Estas especies se generan mediante procesos de abstracción de hidrógeno o procesos fotorredox.
- **Tipo II (Figura 4):** al igual que en el de tipo I, es una reacción de fotosensibilización **dependiente de la presencia de oxígeno molecular**. En este caso, se genera **oxígeno singlete (1O_2)** mediante la excitación previa de un PS. Esta especie es altamente reactiva y capaz de oxidar a la mayoría de las biomoléculas.

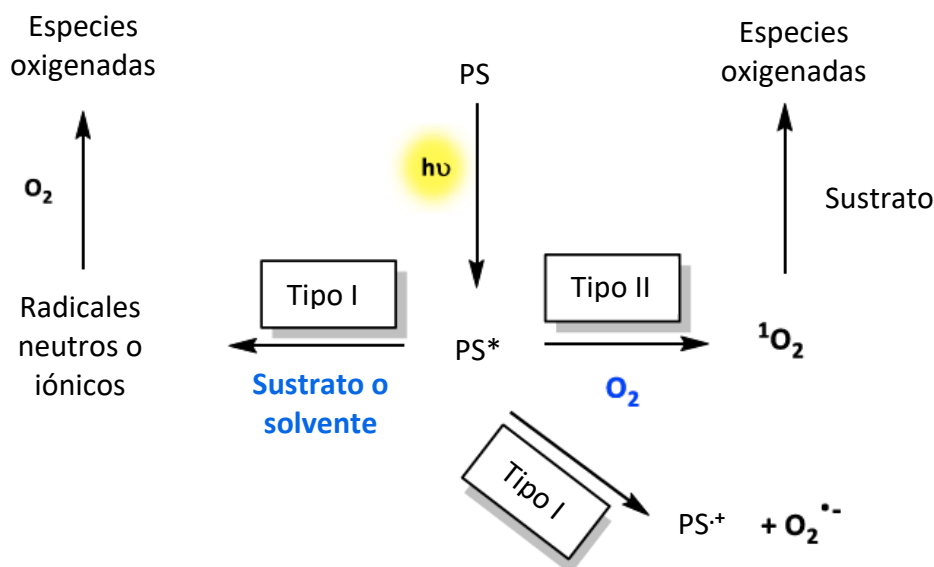


Figura 4. Representación de los mecanismos de fotosensibilización dependientes del oxígeno molecular (Tipo I y Tipo II) y sus correspondientes EROs producidos (Aparici, 2018)

1.2.2.1. Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

El oxígeno molecular (O_2), en su **estado fundamental**, presenta un estado triplete estable en el que dos electrones con espines paralelos se encuentran en **diferentes orbitales 2p π antienlazantes (π^*)**, lo que conlleva que la molécula sea paramagnética (*Figura 5*) (Turro et al., 2009). Por lo tanto, sólo podrá oxidar a otras moléculas captando electrones con espín antiparalelo al de sus electrones en π^* . En definitiva, esto resulta en una reactividad limitada.

No obstante, el **oxígeno singlete** es una forma **excitada** del oxígeno molecular originada por transferencia de energía desde un PS. Mediante esta transferencia energética, los dos electrones que ocupaban separados orbitales 2p π antienlazantes en el oxígeno molecular ahora ocupen el **mismo orbital 2p π antienlazante** (*Figura 5*), y por lo tanto con espín antiparalelo.

Esto conlleva que el oxígeno singlete disponga de **mayor poder oxidativo**, ya que los electrones que capturen no han de tener un espín concreto. En definitiva, a nivel bioquímico, el oxígeno singlete podrá actuar como **ERO frente a biomoléculas** como proteínas, ácidos grasos y ácidos nucleicos (Mai & González, 2020). Esto último, puede implicar tanto su poder para crear lesiones de material biológico, como su aplicación para terapias fotodinámicas (TFD), tal y como se ha indicado en el apartado 1.1.2.1.

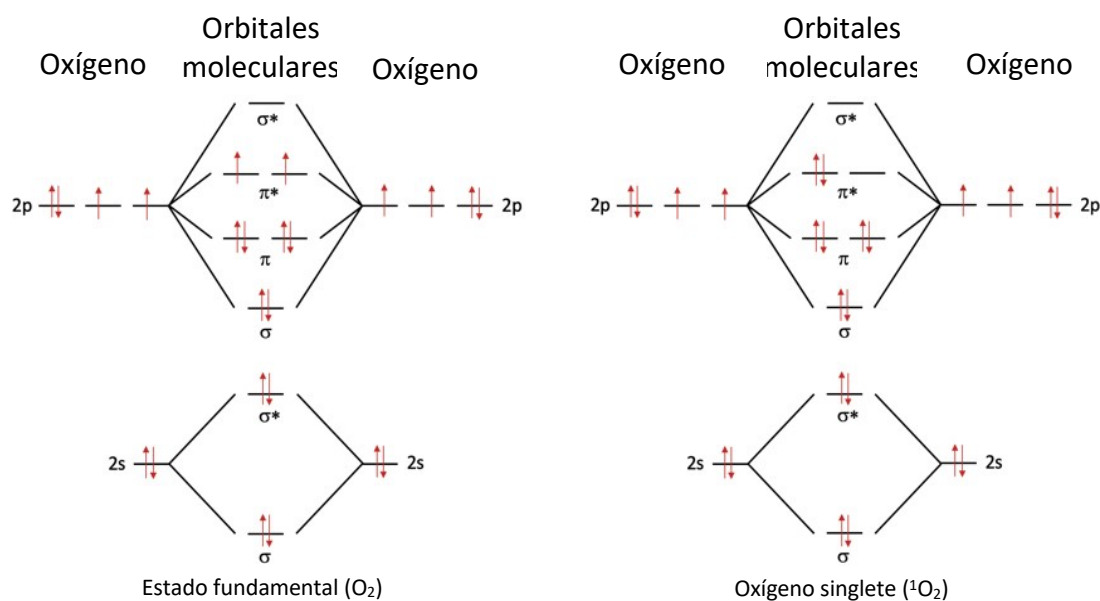


Figura 5. Diagramas de los orbitales moleculares ocupados por los electrones del oxígeno molecular en estado fundamental (O_2) (izquierda) y el oxígeno singlete (1O_2) (derecha). En concreto, podemos observar que, en el O_2 , los dos electrones que lo ocupan están despareados y separados una en cada uno de los dos orbitales $2p$ π antienlazante (π^*) y con el mismo espín. En el caso del oxígeno singlete, observamos que los dos electrones están apareados en uno de los orbitales π^* , quedando el otro libre. Esto último explica el mayor poder oxidante del oxígeno singlete (Linerós, 2021)

1.2.3. Fotoquímica de nanopartículas y el rosa de Bengala

Las **nanopartículas metálicas, conocidas también como plasmónicas**, tienen la capacidad de absorber la luz a diferentes frecuencias y concentrar su energía en regiones concretas cerca de su superficie. Esta absorción conlleva a la oscilación de electrones en resonancia con la radiación aplicada y la consecuente oscilación de carga, que corresponde al plasmón, en la superficie de la nanopartícula. Las nanopartículas plasmónicas tienen por lo tanto la capacidad de **transferir energía** mediante fotoprocesos como la absorción, transiciones vibracionales y emisiones lumínicas. Las moléculas que se encuentren a una distancia adecuada de los plasmones pueden ser expuestas a una intensidad lumínica muy alta procedente de estas (Planas et al., 2016).

Existen nanopartículas capaces de funcionar como fotosensibilizadores y producir, mediante su irradiación, oxígeno singlete. Mediante la absorción de radiación UV-Vis por parte de las nanopartículas fotosensibilizadoras y la transferencia de esta energía a moléculas de O_2 cercanas, se promueve el paso del estado fundamental del oxígeno molecular hasta el estado excitado de oxígeno singlete (Planas et al., 2016). Estudios previos han demostrado que las nanopartículas metálicas o plasmónicas, cuando son excitadas mediante irradiación, pueden llegar a **aumentar** la concentración del oxígeno singlete producido **10 veces** (Kabanov & Heyne, 2020). Incluso, dependiendo de su grosor, el **recubrimiento** de las nanopartículas metálicas con **silicato (SiO_2)** puede aumentar la capacidad fotosensibilizadora del plasmón (Macía et al., 2019; Planas et al., 2016).

En el presente trabajo se emplearán nanopartículas metálicas, de Ag, recubiertas con SiO_2 y funcionalizadas con un PS, rosa de Bengala (RB). El mecanismo en la generación de 1O_2 diferirá un poco de lo explicado anteriormente ya que el PS será el responsable de la formación del 1O_2 y no la NP. La NP al ser metálica y estar recubierta de SiO_2 lo que hará será potenciar la capacidad del PS para producir más 1O_2 .

Dentro de los PS empleados para esta funcionalización, podemos encontrar moléculas como el rosa de Bengala. El RB es una molécula orgánica que presenta una gran banda de absorción de radiaciones en torno a 550 nm (con unos valores de coeficiente de absorción molar a 549 nm de $\epsilon_{549} = 95000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ con H_2O como disolvente y a 557 nm $\epsilon_{557} = 104700 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ con EtOH como disolvente

(Figura 6) (Ludvíková et al., 2016). Esta absorción genera RB en estado singlete excitado ($^1\text{RB}^*$) que a su vez da lugar, mediante un cruce intersistema (ISC), a un estado triplete ($^3\text{RB}^*$), con alta capacidad de dar lugar a $^1\text{O}_2$ a partir de O_2 mediante un mecanismo de fotosensibilización de tipo II.

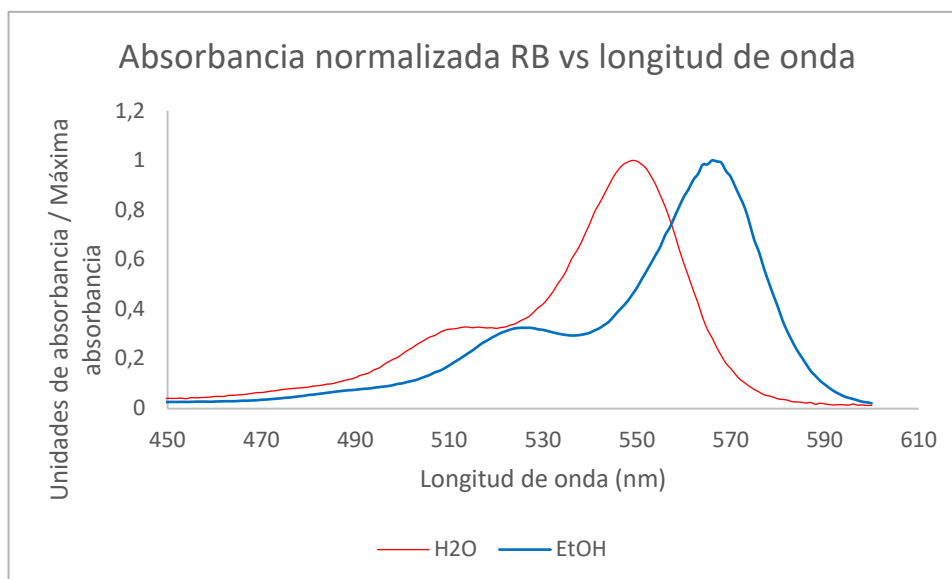


Figura 6. Espectro de absorción normalizado del rosa de Bengala (RB) en disolución acuosa (rojo) y disolución etílica (azul)

El rosa de bengala puede ser conjugado a la superficie de NPs con fin de aumentsr la producción de $^1\text{O}_2$ en terapias como la TFD y la IFD, aprovechando la capacidad fotosensibilizadora del RB. En este contexto, las NPs no plasmónicas, como las de SiO_2 , servirán únicamente de soporte del RB. En el caso de estar conjugadas a NPs plasmónicas, **el efecto plasmónico contribuirá en aumentar la capacidad fotosensibilizadora del RB.** (Macía et al., 2019).

1.3. Fotodaños del ADN y Aductos de eteno

1.3.1. Fotodaños

Los daños al ADN inducidos por la luz son causados en mayor medida por los rayos **UVA y UVB**, que van desde el espectro de 290-320 nm (UVB) y de 320-400 nm (UVA). Esto es debido a que en diferentes regiones atmosféricas el ozono y el oxígeno absorben por completo las radiaciones que van de 100-290 nm (UVC), e incluso absorben hasta el 95 % de los UVB. Las consecuencias de la exposición a este tipo de radiaciones en humanos es el daño del ADN y su consecuente carcinogénesis, especialmente en la aparición de **cáncer de piel** (Ikehata & Ono, 2011)

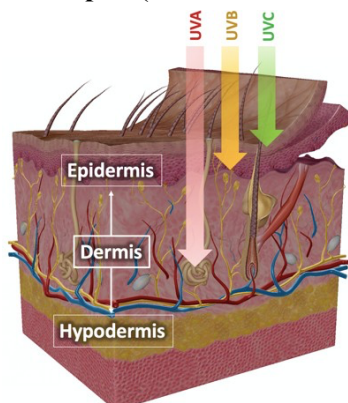


Figura 7. Representación gráfica de la capacidad de penetración en el tejido epitelial por parte de las diferentes radiaciones ultravioletas (UVA, UVB y UVC) (Linerós, 2021)

Los fotodaños en el ADN se pueden clasificar en daño directo, cuando la radiación UV es el causante directo del daño al ADN, o daño indirecto, cuando el daño es fotosensibilizado (Ikehata & Ono, 2011). Por otra parte, las modificaciones producidas por estas radiaciones son puntuales, es decir, afectan a **nivel nucleotídico**. Respecto a los **daños directos**, los principales fotoproductos generados por la radiación **UVB** son los dímeros bipyrimidínicos (de tipo ciclobutano o aductos (6-4)) y, en menor medida, los dímeros de adenina y las pirimidinas fotohidratadas. Respecto a los rayos **UVA**, los únicos fotoproductos generados son los dímeros de tipo CPD (Lee, W. & Matsika, 2020).

En cuanto a los **daños indirectos**, se generan mediante **fotosensibilización** como ya se ha detallado en el apartado 1.2.2.: procesos de **TTET** pueden dar lugar a dímeros de timina de tipo ciclobutano y mediante los procesos de fotosensibilización **tipo I y tipo II**, se originan daños de tipo oxidativo en las nucleobases, debido a la formación de **EROs** (oxígeno singlete, radical hidroxilo, etc.) o de transferencia electrónica.

1.3.2. Aductos de tipo eteno (ϵ -aducto)

Existen daños oxidativos en las células que, además de poder ser desencadenados por radiaciones lumínicas, pueden darse por estados de estrés oxidativo generados por factores tanto exógenos como por procesos fisiológicos endógenos, como lo son los **aductos de tipo eteno (ϵ -aducto)**. No obstante, la génesis de estas especies puede ser **exógena**, ya sea a partir de xenobióticos, productos químicos del ambiente o radiaciones como las UV (Lu et al., 2022).

La génesis de los **ϵ -aductos** es debida al **4-HNE (4-hidroxi-2-nonenal)** (Figura 8). El 4-HNE es generado mediante la **oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)**, de sus siglas en inglés de polyunsaturated fatty acids), propios de las membranas plasmáticas (Zhong & Yin, 2015) oxidadas por la presencia de EROs, dan lugar a **hidroxiperóxidos** que, posteriormente, se descomponen dando lugar a **aldehídos muy reactivos como el 4-HNE**. Estos productos pueden reaccionar e **incorporarse a centros nucleofílicos del ADN**, como lo son las bases nitrogenadas, dando lugar a aductos (Rundle, 2006). Mediante este mecanismo, se incorporan dos carbonos de su cadena alquilo del 4-HNE, generando la formación de un anillo **exocíclico** (Shivange et al., 2016).

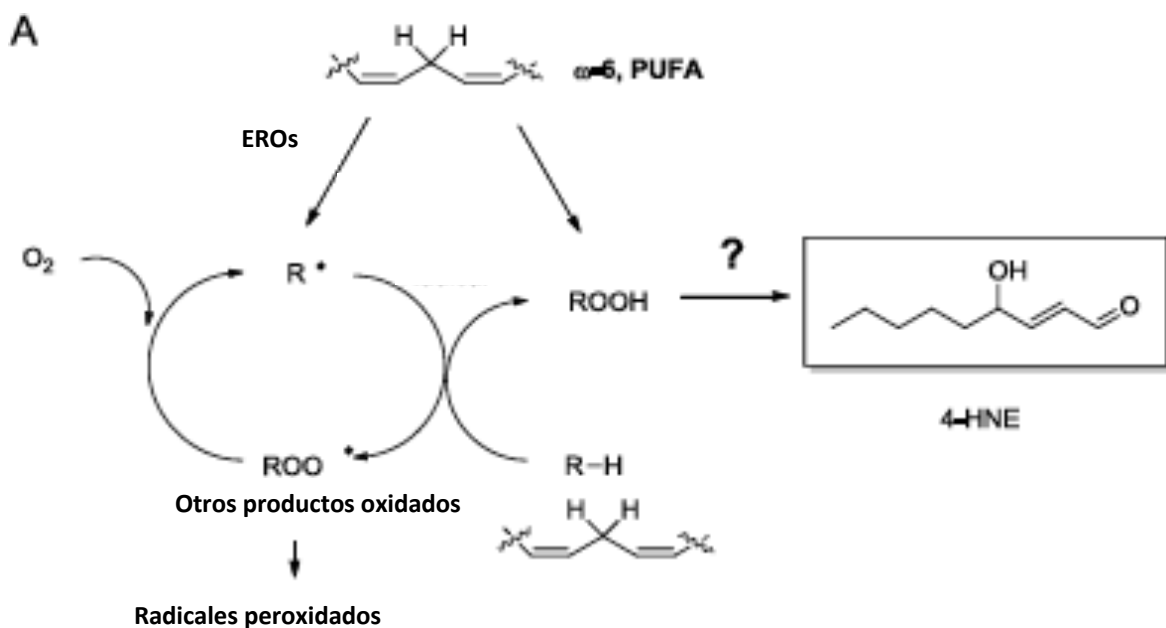
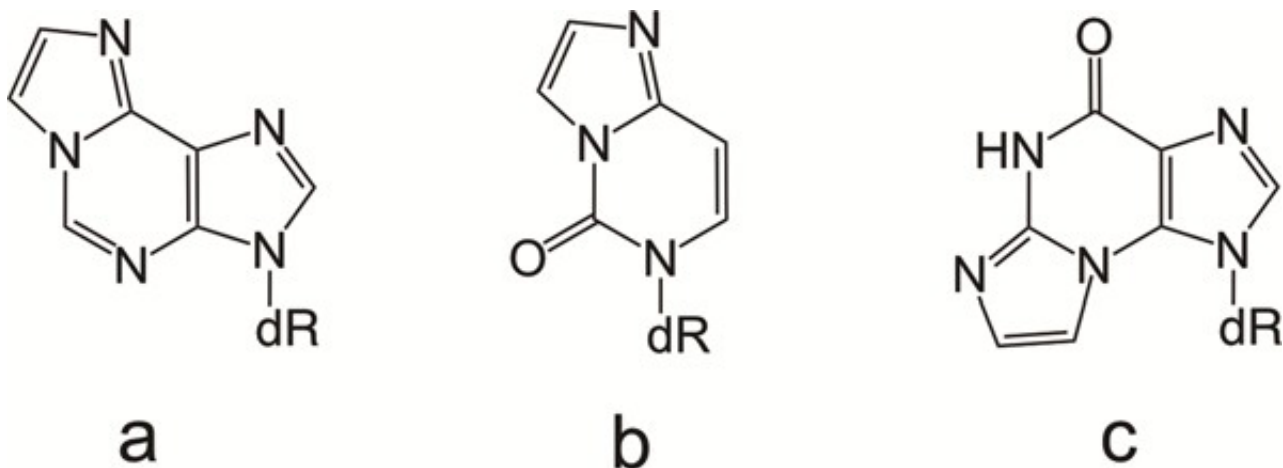


Figura 8. Representación esquemática del proceso químico de generación del 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) a partir de la reacción de los EROs (ROS) fotogenerados con los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de las membranas plasmáticas (Zhong & Yin, 2015)

Los productos de este proceso, como el malondialdehído, el 4-HNE o derivados de prostaglandinas constituyen biomarcadores muy eficientes del estrés oxidativo celular y su relación con inflamaciones, apoptosis o incluso procesos carcinogénicos (Tsikas, 2017). Respecto al 4-HNE, este es un **producto mutagénico y genotóxico** para células animales y humanas, teniendo una afinidad reactiva con las bases nitrogenadas canónicas en el siguiente orden: G>C>A>T (Zhong & Yin, 2015). Estas reacciones dan lugar a los **aductos de tipo eteno** (Chung et al., 1996). Los aductos de tipo eteno originados por la peroxidación lipídica son (Figura 9) (Lu et al., 2022):

- **Aductos de desoxiadenosina (dA):** da lugar a la 1-N6-etileno-2'-desoxiadenosina (ϵ dA) lo que desencadena en el ADN las siguientes mutaciones: una transición AT a GC, una transversión AT a TA o una transversión AT a GC
- **Aductos de desoxicitidina (dC):** da lugar a la 3-N4-etileno-2'-desoxicitidina (ϵ dC), lo que desencadena en el ADN la siguiente mutación: una transversión CG a AT.
- **Aductos de desoxiguanosina (dG):** da lugar a la 1-N2-etileno-2'-desoxiguanosina (ϵ dG), lo que desencadena en el ADN la siguiente mutación: una transversión GC a TA o una transversión GC a CG.



dR = 2-Desoxirribosa

Figura 9. Representación gráfica de la fórmula molecular de los aductos de eteno de los 2-desoxinucleósidos (sin grupos fosfato enlazados al monosacárido) de: a) 1-N6-etileno-2'-desoxiadenosina (ϵ dA), b) 3-N4-etileno-2'-desoxicitidina (ϵ dC), c) 1-N2-etileno-2'-desoxiguanosina (ϵ dG) (di Mascio et al., 2019)

Estos daños se encuentran en el ADN nuclear y, en menor medida en el ADN mitocondrial. Etiológicamente, las consecuencias de las mutaciones derivadas de estos aductos de eteno generados por peroxidación lipídica es la **supresión de genes antitumorales y la generación de mutaciones carcinogénicas**. De tal manera, vemos la influencia de la presencia de 4-HNE en la formación de los aductos de eteno en el gen p53 (Zhong & Yin, 2015). Este aducto da lugar a una mutación en la tercera base del codón 249 de dicho gen. El gen p53 es un importante supresor tumoral para gran cantidad de cánceres, en especial el carcinoma hepatocelular. Esta mutación afecta a procesos fisiológicos celulares como lo son la apoptosis, la reparación de ADN y la parada del ciclo celular.

1.4. Reparación de fotodaños del ADN

En el estudio de la reparación de los daños nucleotídicos en el ADN causados por las radiaciones UV, se han reportado varios **mecanismos endógenos** en diferentes organismos, incluidos los mamíferos:

- **Vía oscura de escisión:** mediante estos mecanismos, se reparan los nucleótidos mutados mediante la **escisión del nucleótido (NER)**, de sus siglas en inglés Nucleotide Excision Repair) o la **de la base nitrogenada (BER)**, de sus siglas en inglés Base Excision Repair). NER actúa sobre daños que alteran la estructura tridimensional del ADN, tales como los CPDs, los dímeros (6-4), las lesiones oxidativas y algunos aductos. Esta escisión es llevada a cabo o mediante la **reparación acoplada a la transcripción (TCR)**, de sus siglas en inglés Transcription Coupled Repair) o la **reparación global del genoma (GGR)**, de sus siglas en inglés Global Genoma Repair). Estos mecanismos se dan mediante la escisión de una región de aproximadamente 30 nucleótidos y la síntesis de la hebra dañada a partir de la complementaria mediante una polimerasa. Respecto al BER, este mecanismo repara mutaciones en bases oxidadas, metiladas o modificadas con aductos (Chung et al., 1996) mediante N-glicosilasas y un conjunto de enzimas reparadoras como la polimerasa y la ligasa,
- **Fotorreactivación** (Kavakli et al., 2019): este tipo de reparaciones están mediadas mediante un tipo de flavoproteínas enzimáticas activadas por la luz denominadas **fotoliasas**. Estas enzimas emplean la luz azul como medio de obtención de energía para reparar el daño. El mecanismo de reparación se basa en reacciones redox que establece el coenzima FADH de la fotoliasa con el daño específico. Los daños característicos que emplean de sustratos son los bupirimidínicos. Dependiendo del tipo de daño que reparen, estas se clasifican en CPD fotoliasas o (6-4) fotoliasas. Estos enzimas están presentes en gran cantidad de seres vivos como bacterias, arqueas, plantas, invertebrados, algunos mamíferos, etc. No obstante, no han sido detectados en mamíferos placentarios como los humanos (Chaves et al., 2011)

1.4.1 Mecanismos de reparación de los aductos de eteno

Respecto a los **mecanismos endógenos** de reparación de los ϵ -aductos, se han reportado en múltiples ocasiones la existencia de enzimas glicosilasas encargadas de la escisión de bases nitrogenadas (**BER**), dando lugar a sitios apurínicos y apirimidínicos (Chung et al., 1996). En células humanas existen glicosilasas capaces de reparar los ϵ -aductos originados por la peroxidación lipídica: ϵ dA; ϵ dC y ϵ dG (Chung et al., 1996). No obstante, el ejemplo más claro de reparación de los aductos de eteno es el del mecanismo llevado a cabo por **el enzima AlkBH**, el homólogo en humanos del AlkB presente en *E. coli* conocido por su capacidad reparadora de aductos formados por alquilación (di Mascio et al., 2019; Martínez et al., 2003). Este mecanismo, observado en *Escherichia coli*, es un proceso oxidativo dependiente de la presencia de oxígeno. Tras la desalquilación de los etenos ϵ dA y ϵ dC, se obtienen los nucleótidos dA y dC y el grupo eteno es desprendido en forma de glioxal (Shivange et al., 2016).

El empleo de **fotosensibilizadores exógenos** puede ser una estrategia interesante para la reparación de estos aductos. Además del posible uso de moléculas conocidas por su potencial en generar EROs, como el rosa Bengala (RB) (Ludvíková et al., 2016) es interesante estudiar las posibilidades que tendrían la **aplicación de las nanopartículas en la reparación de aductos de eteno mediante la optimización de la producción de estas especies** como lo es el oxígeno singlete. En lo que respecta a este último, se ha descrito la regeneración de dG mediante la **reacción entre el oxígeno singlete y el ϵ dG** (Figura 10) (di Mascio et al., 2019)

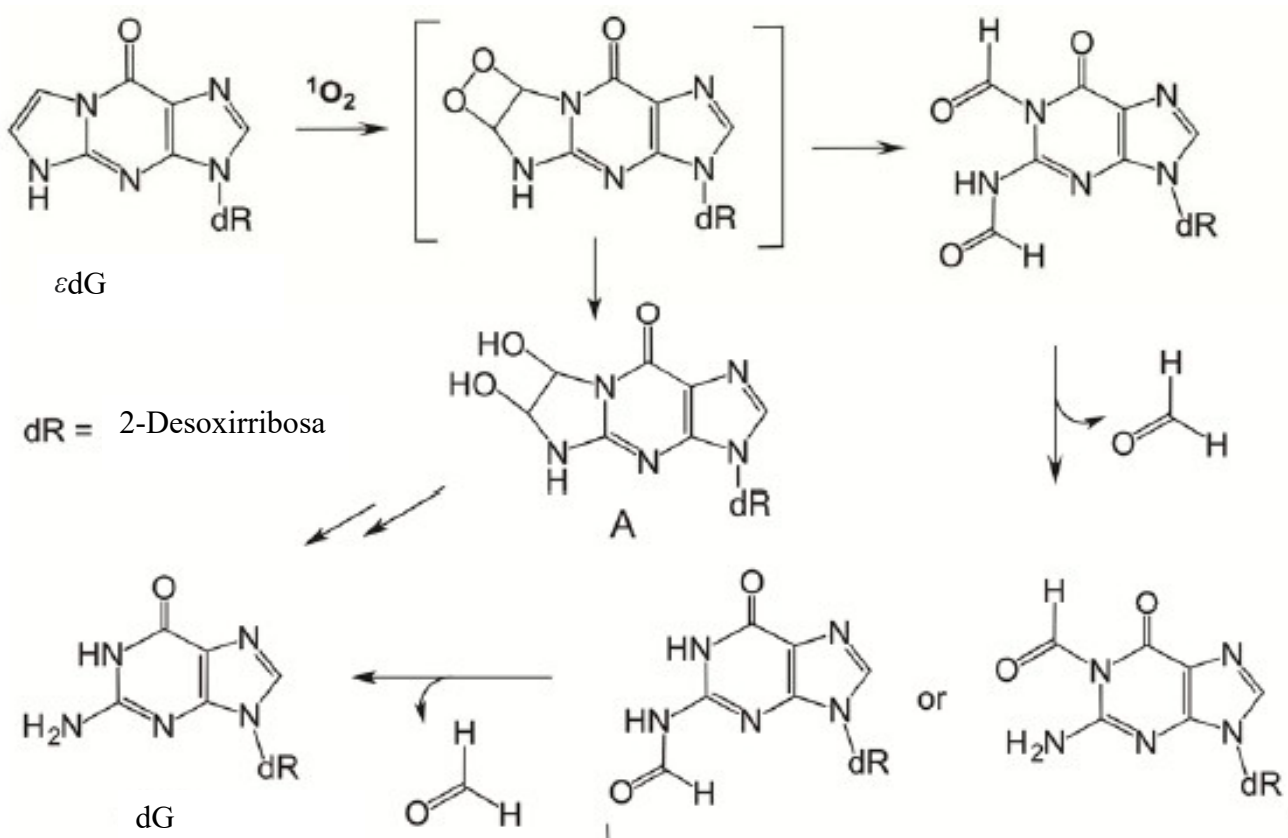


Figura 10. Representación esquemática del posible mecanismo de reparación del aducto de eteno del desoxirribonucleósido 1-N2-etileno-2'-desoxiguanosina (ϵ dG) mediante la presencia como reactivo del oxígeno singlete (1O_2), obteniendo finalmente el desoxirribonucleósido canónico de la desoxiguanosina (dG) (Martínez et al., 2003)

Teniendo en cuenta, tal y como se ha visto en esta introducción, la capacidad del **RB** de producir, mediante su irradiación, $^1\text{O}_2$, la reactividad del $^1\text{O}_2$ con el **εdG** dando lugar a **dG reparado** y el refuerzo en la capacidad fotosensibilizadora del RB cuando está **conjugado a una NP plasmónica**, llegamos a la propuesta de este trabajo. Esta se basa en la irradiación de SiO_2 -RB NPs por una parte y de Ag@SiO_2 -RB NPs por otra con el fin de evaluar el incremento de la formación de $^1\text{O}_2$, con el objetivo último de optimizar el proceso de reparación de ε-adtuctos por un mecanismo oxidativo.

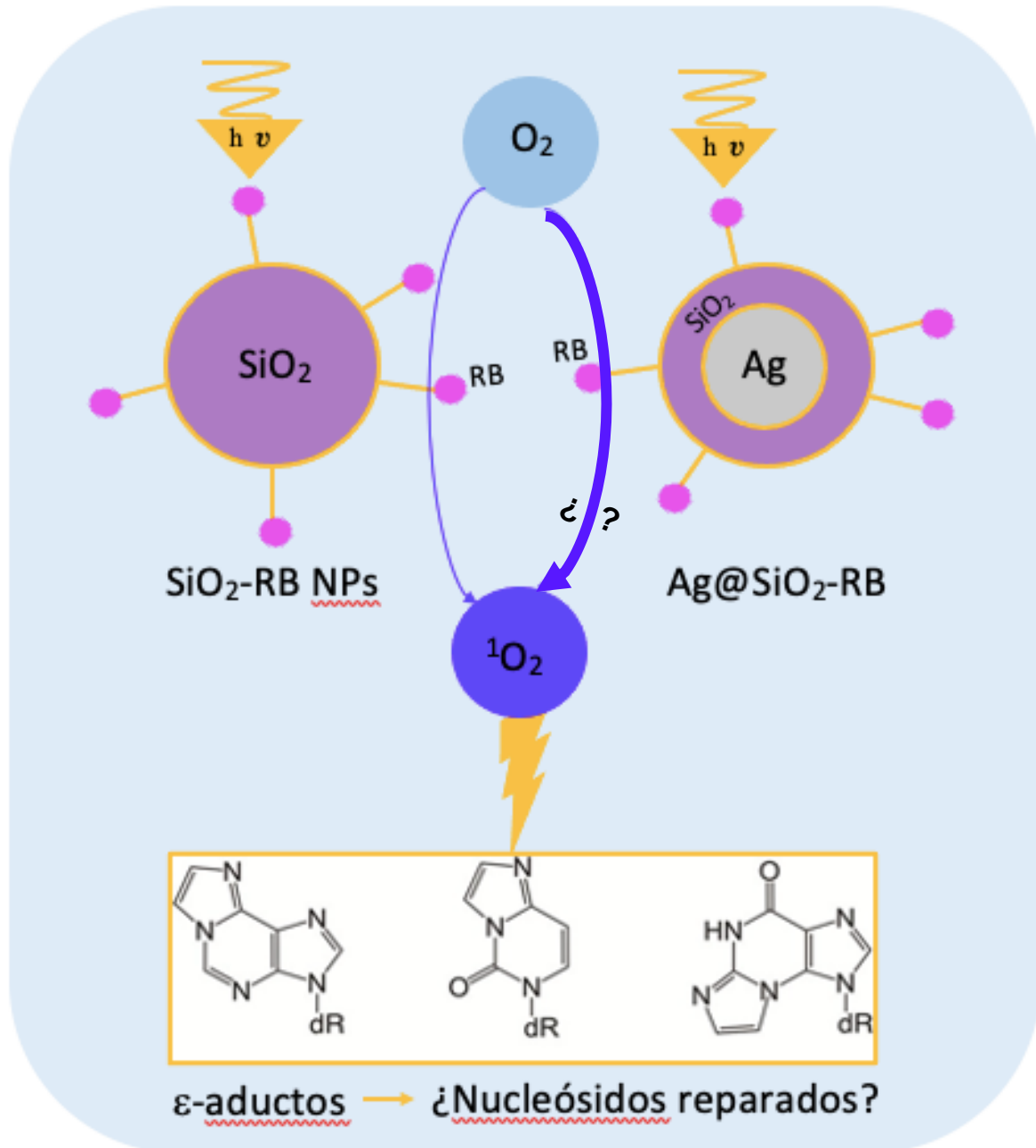


Figura 11. Representación gráfica de la estrategia de reparación de ε-adtuctos mediante la producción de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) a partir de la irradiación lumínica ($h\nu$) de SiO_2 -RB NPs y Ag@SiO_2 -RB NPs

2. Objetivos

Como objetivo general, se plantea estudiar la fotorreparación de ϵ -aductos por nanopartículas de SiO_2 NPs y de Ag@SiO_2 NPs funcionalizadas con rosa de Bengala y evaluar el efecto del plasmón en la eficiencia de la fotorreacción. El estudio cuenta con los siguientes objetivos específicos:

- 1) Síntesis y caracterización de: NP de óxido de sílice (SiO_2 -RB NPs) y NP de plata recubiertas con óxido de sílice (Ag@SiO_2 -RB NPs). Ambas funcionalizadas con rosa de Bengala.
- 2) Estudio de la reparación de los daños del ADN ϵ -aductos (ϵdA , ϵdC , ϵdG) por oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Para ello se pretende irradiar las nanopartículas previamente sintetizadas en presencia de estos daños y oxígeno molecular (O_2).
- 3) Verificación del mecanismo de reparación por $^1\text{O}_2$ mediante irradiaciones de los ϵ -aductos en presencia de ambas NPs en un medio anaeróbico (bajo N_2).
- 4) Demostración del efecto sinérgico entre el RB y la Ag@SiO_2 NP al incrementar la producción de $^1\text{O}_2$ comparando la eficiencia de ambas nanopartículas en el proceso de reparación.

3. Materiales y Métodos

3.1. Caracterización

3.1.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de barrido (TEM) permite obtener **imágenes mediante el uso de haces de electrones**. Estos haces de electrones inciden sobre una muestra delgada, convenientemente preparada. Al interactuar con la muestra, dependiendo de la naturaleza de esta, los electrones se verán dispersados de diferentes formas. Los electrones que hayan atravesado la muestra serán captados por una cámara CCD y, mediante un programa informático, se convertirán estas señales electrónicas en diferentes escalas de grises en función de la densidad del material. De esta manera, se constituye una imagen de la muestra que puede llegar a **escalas nanométricas**, una resolución inalcanzable para los microscopios ópticos. Además, las imágenes proporcionadas por el TEM nos informan sobre la naturaleza cristalina o amorfa de las muestras.

El modelo empleado en este proyecto fue el Microscopio Electrónico de Transmisión de Emisión de Campo de 120kV (TEM120) y el de 200kV (TEM200), de la marca JEOL, del Servicio de Microscopía Óptica de la UPV.

3.1.2. Espectrofotómetro UV-Vis

El espectrofotómetro UV-Vis mide la **absorción de radiaciones un rango de longitudes de onda incluido en el ultravioleta-visible** (200 nm-780 nm) por parte de una muestra en disolución. El compuesto de interés, en función de su estructura, absorbe a determinadas longitudes de onda (λ), promoviendo los electrones de sus orbitales moleculares de tipo HOMO (de sus siglas en inglés Highest Occupied Molecular Orbital) a orbitales vacíos de mayor energía. Midiendo y comparando las diferencias para cada longitud de onda de las intensidades de la luz incidente (I_0) y de la luz transmitida (I_T) de la muestra, se obtiene una magnitud adimensional, la absorbancia (A). A su vez, las medidas de absorbancia permiten determinar la concentración de un compuesto en disolución si se conoce el coeficiente de absorbancia molar (ϵ_λ), un valor específico para cada compuesto a un paso óptico (l) y en un disolvente y longitud de onda definidos. La relación lineal de estas magnitudes viene determinada por la ley de Lambert y Beer (*Figura 12*). Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro, *Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis* situado en el ITQ-UPV, utilizando cubetas de cuarzo de paso óptico de 1 cm.

$$A) A = \log\left(\frac{I_T}{I_0}\right) = \epsilon_\lambda * l * C$$

*Figura 12. Fórmula de la ley de Lambert y Beer, en la que A es absorbancia (adimensional), ϵ es el coeficiente de absorbancia ($L * mol^{-1} * cm^{-1}$) correspondiente a una determinada longitud de onda (λ), l es la longitud de la cubeta (cm) y C la concentración del sustrato (M)*

3.1.3. Potencial Z

La medida del potencial Z consiste en **estudiar el nivel de repulsión o atracción de partículas en suspensión**. Este análisis se realiza mediante la aplicación de un campo eléctrico a la suspensión. Esto genera unos movimientos debido a las cargas de las partículas, cuyas **velocidades serán proporcionales a las cargas de las mismas**.

El equipo empleado para estas mediciones fue el espectrofotómetro *Zetasizer Nano ZS* situado en el ITQ-UPV, equipado con un láser HeNe de 632 nm como fuente de luz trabajando con un detector con un ángulo de 173° (Malvern Panalytical)

3.1.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica instrumental de **separación de los compuestos presentes en una mezcla**. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil (eluyente) que actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución migran de acuerdo con las interacciones no covalentes de los compuestos con la columna. Según la interacción de las especies a separar con la fase móvil en la que están disueltas y los grupos funcionales de los que dispone la columna cromatográfica, sus tiempos de retención en la fase estacionaria serán diferentes. La presencia de un detector espectrofotométrico a la salida de la columna permite detectar las absorbancias a una determinada longitud de onda de las especies que van eluyendo y así extraer un cromatograma a una longitud de onda establecida en función de los compuestos de interés. Mediante este último, con los datos de los tiempos de retención y absorbancias para cada uno de los picos, se pueden realizar **análisis cualitativos y cuantitativos** de las especies separadas.

El equipo de HPLC empleado fue el *Agilent 1100 Series* situado en el ITQ de la UPV. Las condiciones de uso en el estudio de las irradiaciones y sus calibraciones fueron: una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 μ) de Agilent, un eluyente isocrático 95/5 agua/acetonitrilo, estando el agua acidificada a pH 3 con ácido trifluoroacético, un flujo de 0.4 mL/min, y un $\lambda_{\text{detección}}=260$ nm

Gracias a los datos de absorbancia proporcionados por el HPLC se obtuvieron **las rectas de calibrados** y sus correspondientes ajustes lineales para cada tipo de nucleósido empleado en el estudio. En las gráficas que se muestran como ejemplos, para construir las rectas y sus ecuaciones se emplearon las señales detectadas para concentraciones de nucleósidos de **5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M** y de **0,5 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 8 μ M** (*Figura 13*). Estos calibrados sirvieron también para tener una referencia de los tiempos de retención de cada nucleósido en el HPLC, recogidos en la *Tabla 1*.

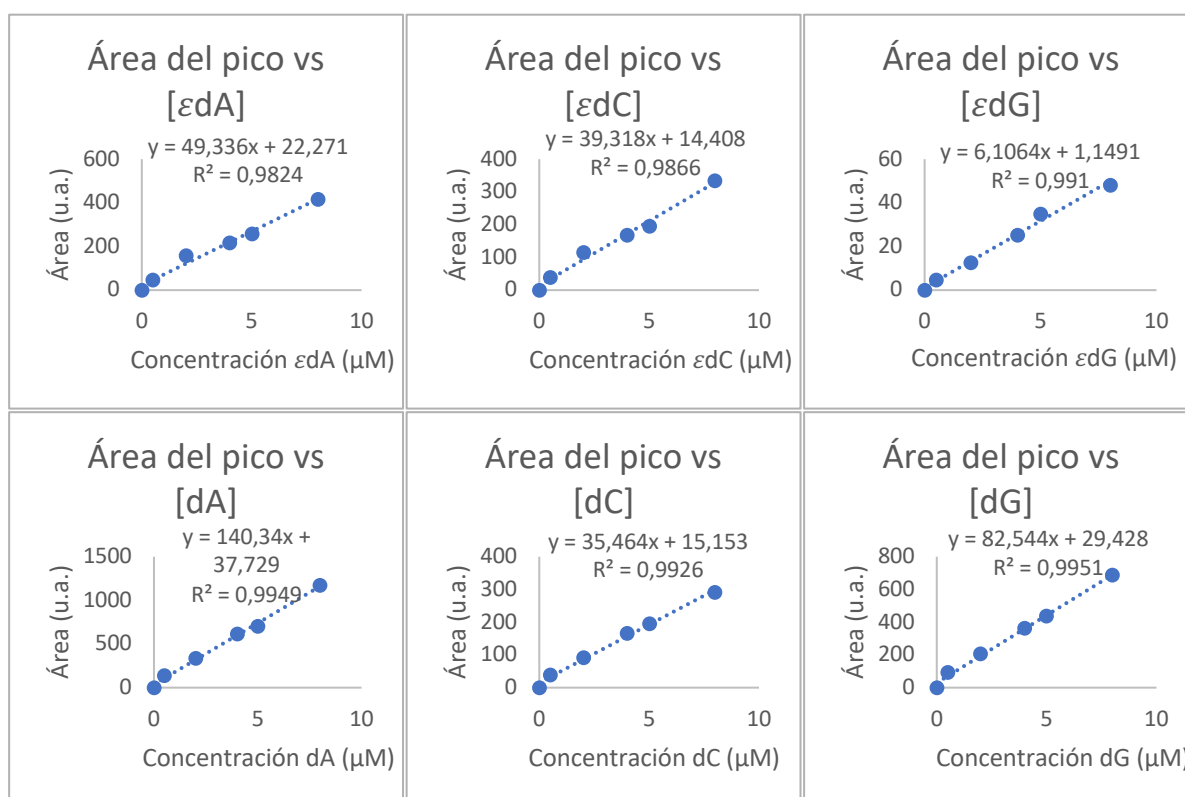


Figura 13. Ejemplos de las rectas de calibrado y sus ecuaciones realizadas con las señales detectadas de nucleósidos a concentraciones de 0,5 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 8 μ M. La absorbancia fue medida en el espectrofluorímetro acoplado al HPLC en función de la concentración (μ M) de cada una de las disoluciones de nucleósidos inyectados: A) ϵ dA B) ϵ dC C) ϵ dG D) dA e) dC f) dG. Cada gráfico lleva adjunto la fórmula del ajuste lineal, donde la y es la absorbancia y la x, la concentración

Tabla 1. Tiempos de retención en el HPLC para cada uno de los desoxirribonucleósidos estudiados

Desoxirribonucleósidos	Tiempo de retención (min)	
	No dañado	Dañado: ε- aducto
dA	5,5	6
dC	4,35	6,2
dG	5,55	12,7

3.2. Reactivos y síntesis de nanopartículas (NPs)

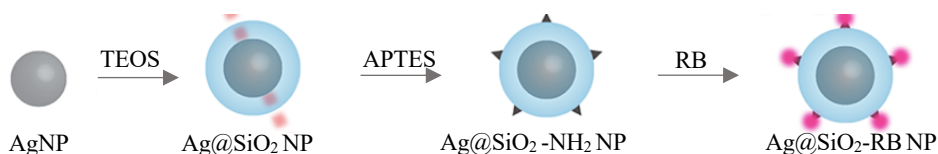


Figura 14. Representación gráfica de los procesos de síntesis, recubrimiento y funcionalización de las NPs descritos en el apartado 3.2. (Planas et al., 2016)

3.2.1. Reactivos y casas comerciales

Tetraetil ortosilicato (TEOS, Sigma-Aldrich); Etanol (EtOH, Sigma-Aldrich, 100%(w/v)); hidróxido de amonio (NH₄OH, Sigma-Aldrich, 30%(w/v)); ácido tetracloroáurico (III) (HAuCl₄·H₂O, Sigma-Aldrich); polivinilpirrolidona (PVP; Alfaesar); acetonitrilo (ACN; Sigma-Aldrich); nitrato de plata (AgNO₃, Sigma-Aldrich); 3-aminopropil-trimetoxilano (APTES, Sigma-Aldrich); ácido 2-etanosulfónico (tampón MES, Sigma-Aldrich), rosa de Bengala (RB, Sigma-Aldrich); *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC, Sigma-Aldrich); 1-*N*6-etileno-2'-desoxiadenuina (εdA, Sigma-Aldrich); 3-*N*4-etileno-2'-desoxicidina (εdC, Sigma-Aldrich); 1-*N*2-etileno-2'-desoxiguanosina (εdG, síntesis propia (S. H. Lee et al., 2005)); borohidruro de sodio (NaBH₄, Sigma-Aldrich, 0,1 M), tubos de centrifuga (Falcón™, 50 mL), columna HPLC (ZORBAX Eclipse Plus C18, Agilent), tubos fluorescentes (FSL T5 8W/765, excitación en todo el rango del Vis)

3.2.2. Síntesis de nanopartículas de óxido de sílice (SiO₂ NPs)

Toda la síntesis de nanopartículas se ha realizado con el protocolo descrito en Macia et al., 2020 para la síntesis de las SiO₂ NPs, se introdujeron 40 mL de etanol 100% (w/v) en un matraz redondo con una agitación de 400 r.p.m. Tras ello, se adicionaron 1,6 mL de tetraetil ortosilicato (TEOS, 0,18 M) y 3 mL de NH₄OH 30% (w/v). El **TEOS proporciona el óxido de sílice**, favoreciendo así la nucleación de las nanopartículas conocido como el proceso de **Stöber** (Alemany, 2021; Kabanov et al., 2018) Finalmente, se dejó en agitación durante toda la noche a una temperatura de 28°C aplicando baño maría. Posteriormente, se repartió la reacción en dos tubos para centrifuga (tubos Falcón™ de 50 mL) y se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 minutos, se extrajo el sobrenadante, se resuspendió el material sedimentado en 50 mL de etanol 100% (w/v) y se repitió este mismo lavado dos veces más. El material sedimentado del último lavado fue finalmente suspendido en etanol 100% (w/v), ya que las SiO₂ NPs suelen sedimentar más fácilmente en suspensión acuosa.

3.2.3 Síntesis de Ag@SiO₂ NPs

3.2.3.1. Síntesis semillas de oro (Au Seeds)

En primer lugar, se prepararon las semillas de oro, una suspensión de nanopartículas de oro, que servirán como precursores en la nucleación de las Ag NPs. En un matraz de vidrio de 20 mL, se adicionaron 5 mL de agua miliQ y se aplicó una agitación de 600 r.p.m. posteriormente se añadieron 5 mL de una disolución al 5% (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP) y sucesivamente 10 μ L de una disolución 0,25 M de ácido tetracloroaurico(III) ($\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), componente responsable de la aportación de **oro en la formación de las semillas**. Tras ello, se adicionaron rápidamente 600 μ L de NaBH_4 0,1 M. En este paso, es importante observar como la reacción va adquiriendo gradualmente un color rosa pálido o marrón claro. Finalmente se dejó la disolución resultante agitándose a temperatura ambiente durante 15 minutos.

3.2.3.2. Síntesis de nanopartículas de plata (Ag NPs)

Se añadieron 20 mL de agua miliQ en un balón de vidrio de 100 mL, previamente lavado con agua regia. Se aplicó una agitación de 800 r.p.m. y se añadieron 20 mL de PVP 5% (w/v) y 10 mL de acetonitrilo (ACN), 2 mL de ácido ascórbico 0,1 M y 1,2 mL de nitrato de plata (AgNO_3) 0,1 M, componente que **suministrará la plata** para la formación de la nanopartícula gracias a su reducción por parte del ácido ascórbico (Planas et al., 2016). Tras estas adiciones, se introdujeron 6 μ L de la disolución procedente de la síntesis de las semillas de oro. Finalmente, se dejó la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos, observando como adquiere de forma gradual y sucesiva un color amarillo pálido y, posteriormente, marrón grisáceo. Tras la síntesis, las reacciones fueron divididas en 2 tubos de centrifuga de 50 mL y se centrifugaron a 5000 r.p.m. durante 75 minutos. Se extrajo el sobrenadante y resuspendió el material sedimentado en 25 mL de agua miliQ. Tras ello, se combinó el contenido en un mismo tubo y se realizaron dos secuencias de lavado, siendo los centrifugados a 5000 r.p.m. durante 60 minutos. El material sedimentado final será resuspendido en 50 mL de agua miliQ.

3.2.3.3. Recubrimiento de SiO_2 de las Ag NPs

Primeramente, se preparó una disolución de 33,5 μ L TEOS en 15 mL de etanol absoluto. De esta disolución se tomaron 10 mL con una jeringa de 20 mL que fue colocada en una bomba perfusora. Por otra parte, se vertieron 25 mL de las AgNPs sintetizadas en el paso anterior en un matraz Erlenmeyer de 300 mL bajo agitación a 600 r.p.m. A esta solución, se añadieron 100 mL de etanol 100% (w/v) y 2 mL de NH_4OH 30% (w/v). Se llevó a cabo la adición controlada con un flujo de 3 mL/h de TEOS a la disolución de AgNPs. Una vez terminada la adición se tapó el Erlenmeyer con papel de aluminio y se dejó bajo agitación durante 2 horas. En este proceso químico, se da también la **vía Stöber** (Kabanov et al., 2018), incorpora el óxido de sílice proporcionado por el TEOS como recubrimiento de estas NPs.

Se dividió la síntesis en 4 tubos y se centrifugaron durante 75 minutos a 5000 r.p.m., quitando el sobrenadante y se resuspendiendo los materiales sedimentados en 35 mL de etanol absoluto. Se volvió a repetir este lavado tres veces, siendo el penúltimo una secuencia de centrifugado de 60 minutos a 5000 r.p.m. y siendo el último centrifugado a 30 minutos a 4000 r.p.m. Los materiales sedimentados finalmente obtenidos fueron resuspendidos en 35 mL de etanol 100% (w/v).

3.2.3.4. Aminación de nanopartículas

Se procedió a la aminación de la superficie de las nanopartículas de SiO_2 y Ag@SiO_2 . Para las primeras, se adicionaron 3 mL de 3-aminopropil-trimetoxilano (APTES) a 100 mL de la suspensión de SiO_2 NPs bajo una agitación de 500 r.p.m., y, de forma inmediata, 600 μ L de NH_4OH 30% (w/v). La aminación de Ag@SiO_2 se llevó a cabo de manera similar, siendo 20 mL de suspensión de Ag@SiO_2 NPs, 600 μ L de APTES y, 120 μ L de NH_4OH 30% (w/v). El APTES se conjuga al óxido de sílice de las NPs y así, permite **incorporar grupos aminos a su superficie** (Figura 15) (Alemany et al., 2021). Finalmente, se dejó ambas reacciones toda la noche bajo agitación y tapadas con un septum. Al día siguiente, se dividió la reacción en dos tubos de centrifuga, se les adicionó etanol 100% (w/v) hasta completar un volumen de 30 mL y se llevaron a cabo 5 secuencias de lavado, dos de ellas en etanol 100% (w/v) y las tres restantes en agua miliQ, unificando los volúmenes de los dos tubos antes del último centrifugado. Todos

los centrifugados fueron llevados a cabo durante 30 minutos a 5000 r.p.m. Finalmente, se resuspendió el material sedimentado en 6 mL de una disolución tampón de ácido 2-etanosulfónico (MES) con un pH 6.

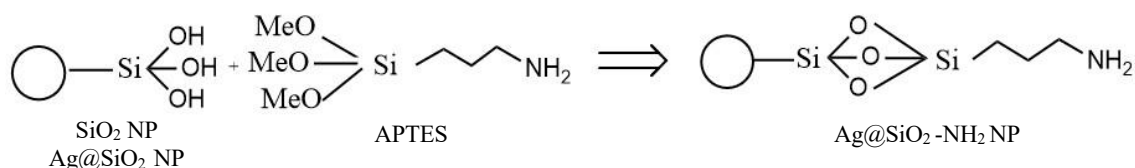


Figura 15. Representación gráfica del proceso de aminación de la superficie de SiO_2 de las NPs mediante el uso de APTES (Alemany et al., 2021)

3.2.4. Conjugación del rosa de Bengala (RB) a las nanopartículas

Este protocolo se aplicó tanto a las $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ NPs como a las $\text{Ag@SiO}_2\text{-NH}_2$ NPs. En un matraz de vidrio de 20 mL, se añadió 6 mL de buffer MES (pH 6) y se disolvieron en este volumen 6,1 mg de RB (1 mM en 6 mL) y 2,6 g de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarboiimida (EDC). Tras la media hora de reacción, se centrifugaron las NPs durante 30 minutos a 5000 r.p.m, se quitó el sobrenadante y se resuspendieron las nanopartículas con la disolución de RB con EDC. La conjugación del RB se lleva a cabo gracias a la presencia del EDC, una molécula activadora que desencadena la formación de un enlace de tipo amida entre el grupo grupo carboxilato de la RB y los grupos aminos del recubrimiento (Figura 16) (Planas et al., 2016). Finalmente, se cubrió el tubo con papel de aluminio y se dejó la reacción de conjugación 3 horas, sonicando cada 30 minutos para mantener las NPs en suspensión. Tras esto, la reacción siguió produciéndose durante 3 días a temperatura ambiente bajo agitación.

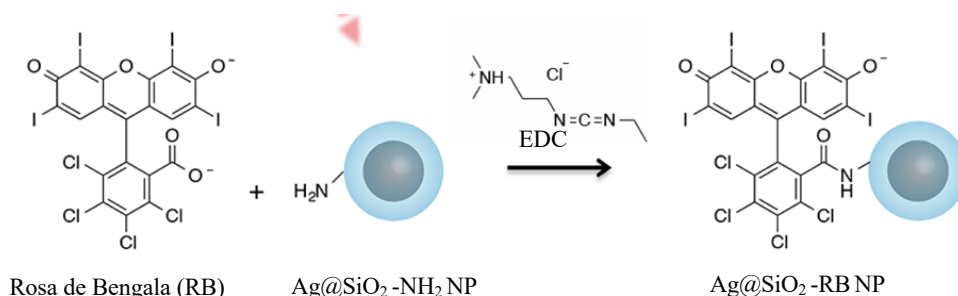


Figura 16. Representación gráfica del proceso de conjugación del rosa de Bengala (RB) de nanopartículas funcionalizadas con grupos aminos mediante el uso de EDC (Planas et al., 2016)

Para eliminar el rosa de Bengala no conjugado a las nanopartículas, se llevaron a cabo varias secuencias de lavado, en la que los tubos de las síntesis fueron centrifugados a 5000 r.p.m. durante 30 minutos, se extrajeron sus sobrenadantes, y su material sedimentado de NPs fueron resuspendidos en agua o etanol para comenzar el siguiente lavado. Para cada lavado, se realizaron medidas de espectrofotometría UV-Vis del sobrenadante para determinar la concentración de RB no conjugado. Así, se midieron los espectros de absorción (Figura 17) y se calculó la concentración de RB (C_x), a partir de la absorbancia en la longitud de onda máxima (λ_{max} , Tabla 2) y utilizando la ley de **Lambert-Beer** (Figura 12), con un valor de **paso óptico (l) de 1 cm** y un **coeficiente de absorción molar (ϵ)** en el máximo de absorbancia del RB según disolvente del sobrenadante (Tabla 2). Así, se utiliza la suma de las concentraciones de RB presentes en cada lavado C_x , para determinar la concentración conjugada a las NPs, $C_{\text{NP final}} = C_0 - C_{\text{total}}$, con $C_0 = 1 \text{ mM}$

Tabla 2. Valores de los coeficientes de absorción molar (ϵ) para cada disolvente, longitud de onda para la absorción máxima del RB para cada disolvente (λ_{\max}) y valor del paso óptico (l).

λ_{\max} RB en H ₂ O-D ₂ O	549	nm
λ_{\max} RB en EtOH	557	nm
ϵ_{549} H ₂ O-D ₂ O	95000	cm ⁻¹ mol ⁻¹ dm ³
ϵ_{557} EtOH	104700	cm ⁻¹ mol ⁻¹ dm ³
l cubeta	1	cm

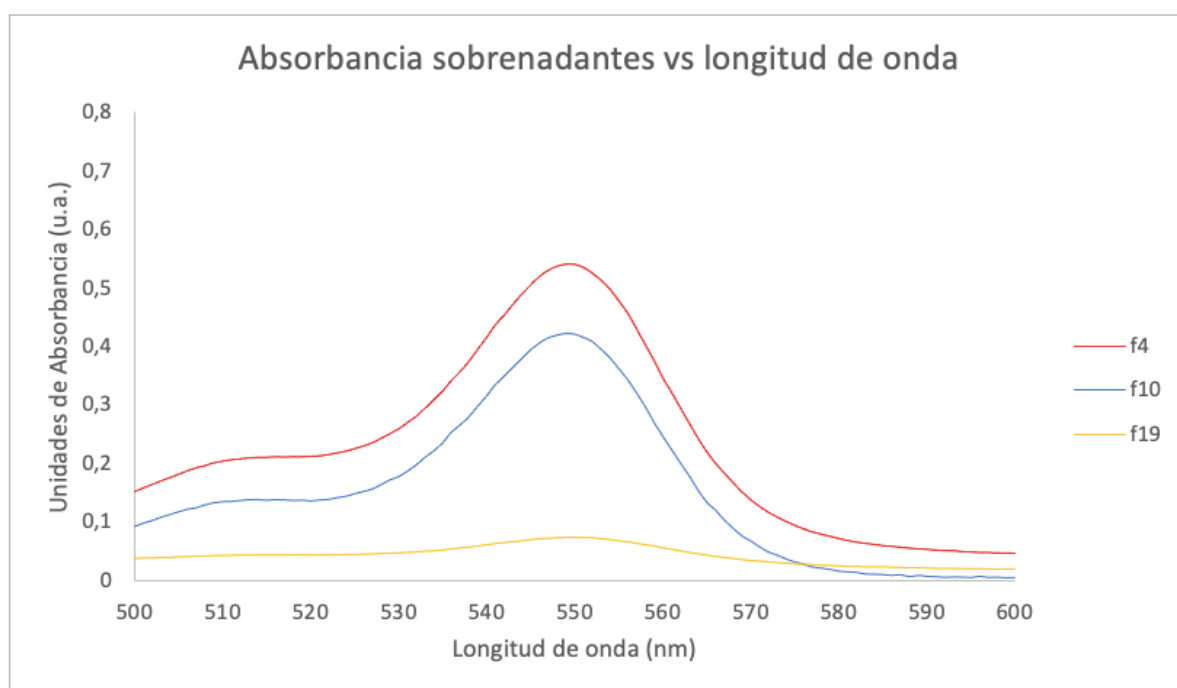


Figura 17. Espectros de absorción de sobrenadantes acuosos extraídos en diferentes secuencias de lavado del rosa de Bengala en las SiO₂-RB NPs

En el lavado en la síntesis de las SiO₂-RB NPs de la secuencia número 11 (*f11*), se observó que la concentración de RB restante, C_{NPtotal} se mantenía estable en torno a un valor ligeramente superior a 0,3 mM (*Figura 18* y *Tabla 3*). Tras evidenciar esta tendencia en los lavados siguientes, se finalizó el lavado y se resuspendieron las nanopartículas funcionalizadas en D₂O. Por lo tanto, la **concentración de rosa de bengala conjugado** a las nanopartículas fue de **0,3 mM**.

Tabla 3. Datos correspondientes al lavado del rosa de Bengala no conjugado en la síntesis de SiO₂-RB NPs, en el que se muestran las absorbancia de cada sobrenadante (A) obtenido tras cada secuencia de lavado (n° falcon), la dilución empleada, el disolvente utilizado, su correspondiente concentración de RB (C_x), la concentración de rosa de Bengala conjugado a las NPs (C_{NP}), la concentración inicial de rosa de Bengala (C₀), la concentración total de rosa de Bengala lavado (C_{xtotal}) y la concentración final de rosa de Bengala conjugada a las NPs (C_{NPtotal})

Nº falcon	Voriginal (mL)	C _{NP} (mM)	A	C _x (mM)	Dilución	Disolvente
f1	6	1,000 (C ₀)	0,997	0,021	0,5	H ₂ O
f2	6	0,979	0,104	0,001	1	H ₂ O
f3	6	0,978	0,896	0,428	0,02	EtOH
f4	6	0,550	0,541	0,057	0,1	H ₂ O
f5	6	0,493	0,312	0,033	0,1	H ₂ O
f6	6	0,460	0,195	0,020	0,1	H ₂ O
f7	6	0,440	0,513	0,049	0,1	EtOH
f8	6	0,391	0,926	0,009	1	EtOH
f9	6	0,382	0,294	0,006	0,5	EtOH
f10	6	0,376	0,421	0,044	0,1	H ₂ O
f11	6	0,332	0,625	0,013	0,5	H ₂ O
f12	6	0,319	0,386	0,008	0,5	H ₂ O
f13	6	0,311	0,279	0,006	0,5	H ₂ O
f14	6	0,305	0,235	0,005	0,5	H ₂ O
f15	6	0,300	0,289	0,003	1	H ₂ O
f16	6	0,297	0,266	0,003	1	H ₂ O
f17	6	0,294	0,389	0,004	1	H ₂ O
f18	6	0,290	0,118	0,004	1	H ₂ O
f19	6	0,286	0,073	0,003	1	H ₂ O
C _{totales}	6	0,300 (C _{NPtotal})		0,717 (C _{xtotal})		D ₂ O

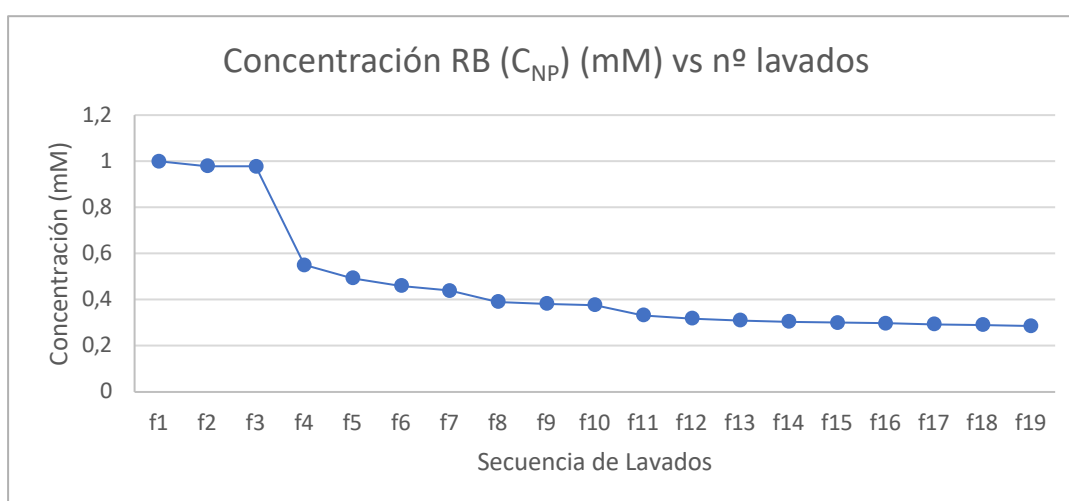


Figura 18. Representación gráfica de la disminución de la concentración (C_{NP}) de rosa de Bengala (RB) en la disolución con las nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas por cada una de las secuencias lavados realizadas

En el lavado de las Ag@SiO₂ NPs, a partir del lavado 7, se observó que la concentración restante de C_{NPtotal} RB no variaba (Figura 19 y Tabla 4), por lo que en este punto se consideró que el rosa de Bengala no conjugado fue retirado de la síntesis. El precipitado de NPs del último lavado fue finalmente resuspendido en D₂O. La **concentración de RB conjugado** a las nanopartículas fue de **0,9 mM**.

Tabla 4. Datos correspondientes al lavado del rosa de Bengala no conjugado en la síntesis de Ag@SiO₂-RB NPs, en el que se muestran las absorbancia de cada sobrenadante (A) obtenido tras cada secuencia de lavado (n° falcon), la dilución empleada, el disolvente utilizado, su correspondiente concentración de RB (C_x), la concentración de rosa de Bengala conjugado a las NPs (C_{NP}), la concentración inicial de rosa de Bengala (C₀), la concentración total de rosa de Bengala lavado (C_{xtotal}) y la concentración final de rosa de Bengala conjugada a las NPs (C_{NPtotal})

Nº falcon	V _{original} (mL)	C _{NP} (mM)	A	C _x (mM)	Dilución	Disolvente
f1	25	1 (C ₀)	0,280	0,002	1	H ₂ O
f2+3	50	0,997	0,000	0,000	1	H ₂ O
f4	25	0,997	2,030	0,078	0,25	EtOH
f5	25	0,919	0,980	0,009	1	EtOH
f6	25	0,910	1,130	0,011	1	EtOH
f7	25	0,899	0,007	0,000	1	H ₂ O
C _{totales}	25	0,9000 (C _{NPtotal})		0,101 (C _{xtotal})		D ₂ O

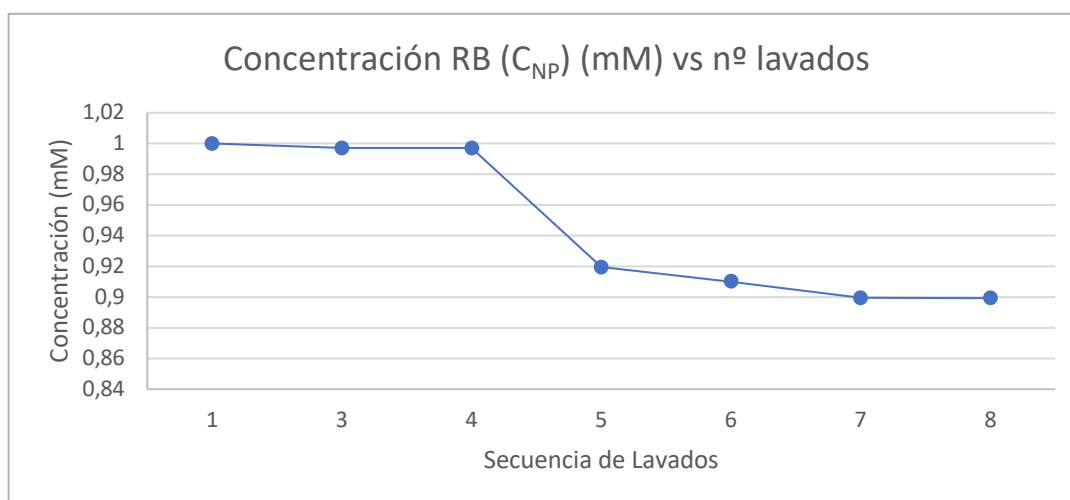


Figura 19. Representación gráfica de la disminución de la concentración de rosa de bengala (C_{NP}) en la disolución con las nanopartículas de Ag@SiO₂ funcionalizadas por cada uno de los lavados realizados

El material sedimentado en los últimos ciclos de lavado fue resuspendido en 6 mL de agua deuterada (D₂O).

3.3. Reparación de los ε-aductos mediante fotólisis en estado estacionario

Las suspensiones de SiO₂-RB NPs y de Ag@SiO₂-RB NPs se prepararon en agua deuterada ajustando los volúmenes para tener **una ratio de 2:1 entre el ε-aducto y la NP**. Para cada tipo de nanopartícula, se prepararon disoluciones con los diferentes ε-aductos a reparar: 1-N6-etileno-2'-desoxiadenosina (εdA), 3-N4-etileno-2'-desoxicitosina (εdC), 1-N2-etileno-2'-desoxiguanina (εdG). A su vez, para cada tipo de disolución de ε-aducto, se realizó una irradiación en condiciones aeróbicas y anaeróbicas

burbujeando con N_2 (ver *Figura 20*, izquierda) durante 30 minutos con el fin de estudiar la reparación en condiciones anaeróbicas. Este último tipo de irradiación sirvió como control con el fin de atestiguar si la reparación de los ϵ -aductos, en el caso de ser detectada, es debida a la formación de oxígeno singlete como consecuencia de la fotosensibilización del oxígeno molecular y no a otros procesos fotoquímicos independientes del oxígeno.

Debido a la absorbancia del RB en el rango visible, es importante que el proceso de preparación y purgado de los viales sea llevado a cabo en oscuridad, por ejemplo, cubriendo los viales con papel de aluminio.

Tras la preparación de los 6 viales para cada tipo de nanopartícula, se introdujeron estos en un fotorreactor (Luzchem LZC 4V) conteniendo 8 tubos fluorescentes *FSL T5 8W/765* (λ_{ex} : 400-700nm) (*Figura 20*) para comenzar su **irradiación**. Se extrajo, con una jeringa, una alícuota de 1 mL para cada tiempo de irradiación y se depositó en un tubo eppendorf. Los tubos se centrifugaron y se descartaron los pellets, con el fin de evitar la inyección de las nanopartículas precipitadas en el sistema de HPLC. Finalmente, los sobrenadantes fueron depositados en viales de HPLC para su posterior estudio.



Figura 20. A la izquierda, sistema de purgado de los viales, mediante el cual se desplaza el oxígeno de los viales que se irradiarán en anaerobiosis. A la derecha, imagen del fotorreactor Luzchem LZC 4V encendido con los 6 viales de muestra dentro

4. Resultados y Discusión

4.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas

4.1.1. Síntesis de las nanopartículas de óxido de sílice (SiO₂-RB NPs)

En las siguientes síntesis, se siguieron los protocolos especificados en el *apartado 3.2. de Materiales y Métodos*. En primer lugar, se realizó una síntesis de SiO₂ NPs. Posteriormente se procedió a la aminación de estas nanopartículas, obteniendo SiO₂ NP (o SiO₂-NH₂ NPs) con ligandos acabados en un grupo -NH₂ terminal en su superficie proporcionando así un punto de anclaje para, finalmente, conjugar las nanopartículas con rosa de Bengala, obteniendo SiO₂-RB NPs.

Los diferentes materiales se caracterizaron mediante **TEM y potencial Z** con el fin de estudiar su morfología y correcta funcionalización. Por una parte, se preparó una muestra de las SiO₂ NPs para ser analizada mediante microscopía electrónica de transmisión (**TEM 200**). En la observación de estas nanopartículas (*Figura 21*), se distinguió una **morfología muy uniforme y esférica**. Los diámetros rondaban los **110-140 nm**. (*Figuras 21B y 21C*).

En cuanto a la medición **potencial Z** de las NPs (*Figura 22*), se determinó un valor de -42,9 mV para las SiO₂ NPs, -2,2 mV para las SiO₂-NH₂ NPs, 10,2 mV para las SiO₂-RB NPs. Esta variación indica que en cada caso la superficie de la NP contiene una especie distinta demostrando que **las funcionalizaciones han sido efectuadas correctamente en las NPs**.

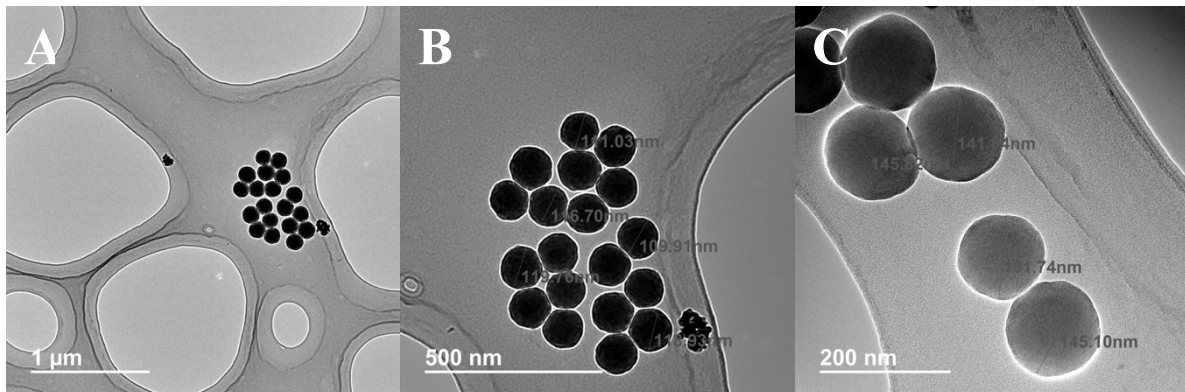


Figura 21. Imágenes tomadas de las observaciones mediante TEM 200 de las SiO₂ NPs 9 en diferentes aumentos y sus correspondientes diámetros en nm

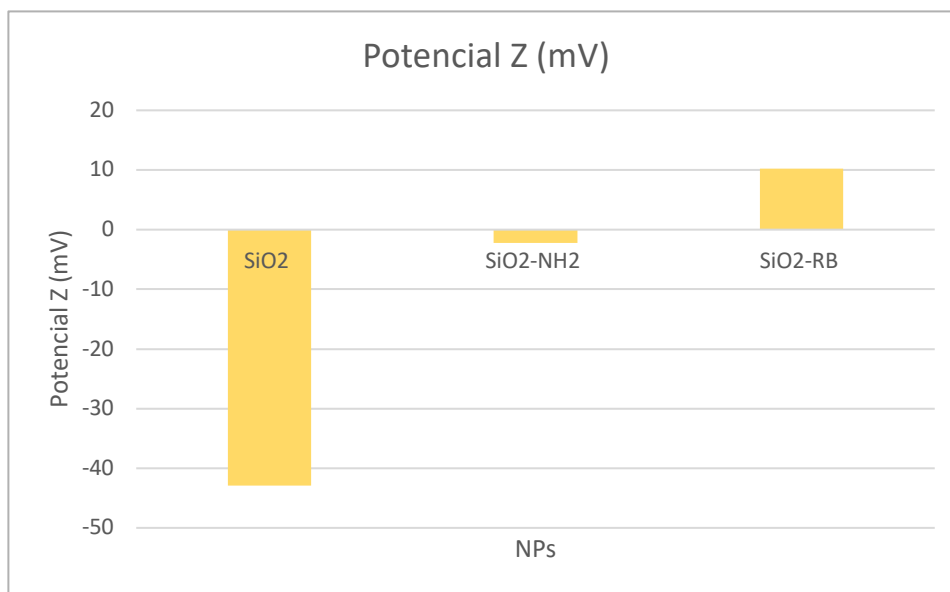


Figura 22. Representación gráfica de los valores del potencial Z en mV medido para las diferentes NPs sintetizadas

4.1.2. Síntesis de nanopartículas de plata recubiertas con óxido de sílice y funcionalizadas con rosa de Bengala (Ag@SiO₂-RB NPs)

Las síntesis que se describen a continuación fueron realizadas siguiendo los protocolos especificados en el apartado 3.2. de Materiales y Métodos. Se realizó una síntesis de semillas de oro (Au Seeds) y, se emplearon para la nucleación de nanopartículas de plata (Ag NPs). Posteriormente se realizó el recubrimiento de óxido de sílice (SiO₂) de las Ag NPs, obteniendo Ag@SiO₂ NPs. A continuación, se aplicó el mismo protocolo de aminación que para las SiO₂ NPs. Y por último se procedió a la conjugación de rosa de Bengala, obteniendo así Ag@SiO₂-RB NPs.

Se realizaron estudios mediante **TEM, potencial Z y absorbancia UV-Vis** para caracterizar y comprobar las funcionalizaciones y modificaciones en las Ag, Ag@SiO₂ y Ag@SiO₂-RB NPs. Estudiando la morfología de estas nanopartículas mediante microscopía electrónica de transmisión (**TEM120**) (Figura 23) se observaron muestras de las Ag NPs (Figura 23 A-C) y de las Ag@SiO₂ NPs (Figura 23 D-F). En la Figura 3 A-C se observan nanopartículas mayoritariamente **esféricas y cristalinas**, en su minoría se detectó la presencia de nanopartículas cilíndricas “rods”, materiales típicos que se dan como pequeñas impurezas en esta síntesis. También se definió un diámetro medio de **55 nm**. Respecto a las Ag@SiO₂ NPs Figura 23 D-F, su morfología era esférica en general. Se observó que el **recubrimiento de SiO₂** se manifestaba en la superficie de la nanopartícula con un **color grisáceo más claro** que el núcleo de plata. Respecto al diámetro de estas nanopartículas, el recubrimiento de sílice aportó a la nanopartícula un **grosor** de aproximadamente **10 nm**, por lo que el diámetro total de la nanopartícula estaba comprendido entre **75-80 nm**.

Comparado el tamaño de las nanopartículas SiO₂ NPs con Ag@SiO₂ NPs se observa como estas últimas son más pequeñas. Pero esto no influirá en los experimentos de reparación ya que independientemente del tamaño de la nanopartícula la cantidad de fotosensibilizador, es decir de rosa de Bengala, será la misma.

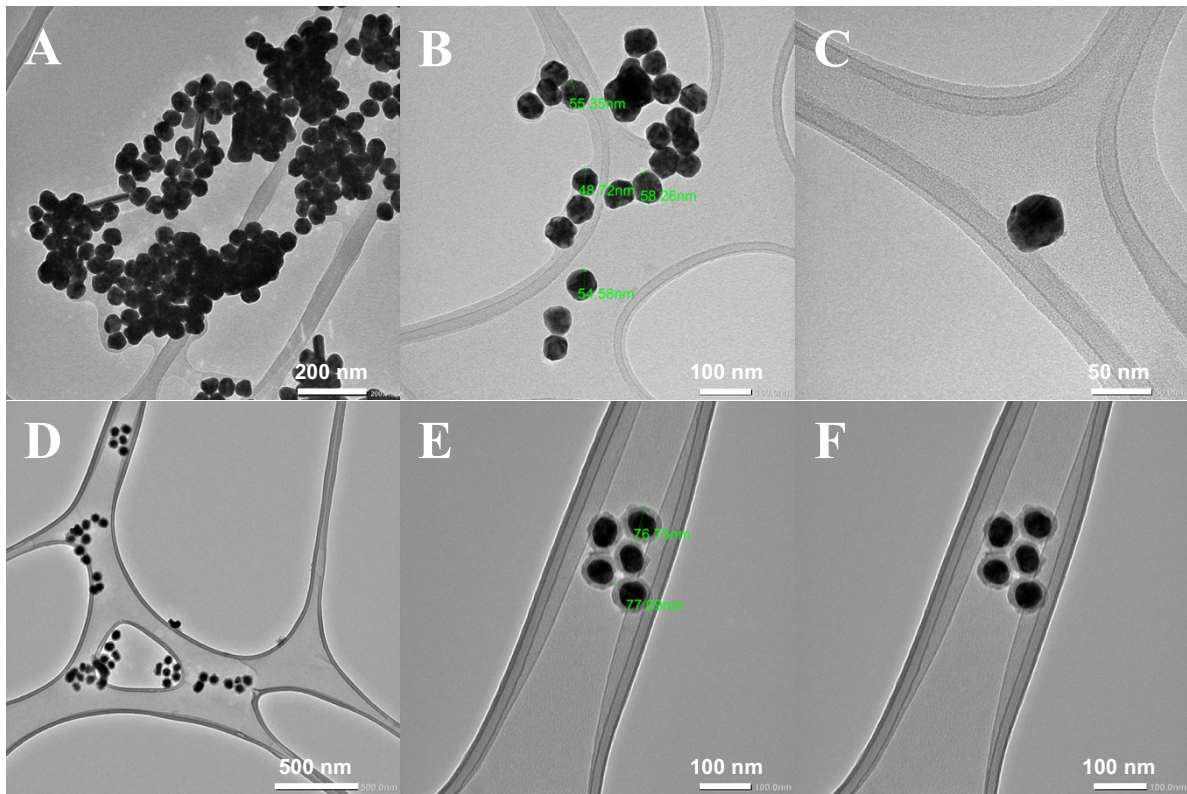


Figura 23. Imágenes tomadas de las observaciones mediante TEM 120 (A-C) y TEM 200 (D-F) de las muestras de las Ag NPs (A-C) y de las Ag@SiO₂ NPs (D-F). Cada una de las imágenes son observaciones a diferentes aumentos de las nanopartículas de la misma síntesis. En las imágenes B y E se muestran en verde los diámetros de las nanopartículas en nm.

Como se ha comentado en la introducción, este tipo de nanopartícula es metálica siendo así ópticamente activa por lo tanto otro método que se usó para su caracterización fue la **espectrofotometría UV-Vis** (Figura 24). Se midió la absorbancia de las nanopartículas en suspensión en un disolvente acuoso para Ag NPs y etílico para Ag@SiO₂ NPs, debido a su recubrimiento con sílice. La longitud de onda en la que se dio el máximo de absorción fue en 420 nm para las Ag NPs y de 435 nm para las Ag@SiO₂ NPs coincidiendo ambas con los valores descritos en la bibliografía corroborando así que el recubrimiento con óxido de sílice de las nanopartículas de plata fue **realizado correctamente**. En las medidas del **potencial Z** (Figura 25), observamos diferencias entre los potenciales entre las Ag NPs (0,2 mV), Ag@SiO₂ NPs (-25,4 mV) y Ag@SiO₂-RB NP (-16,2 mV). La variación de los valores del potencial entre las diferentes NPs indica su **correcta funcionalización o modificación**.

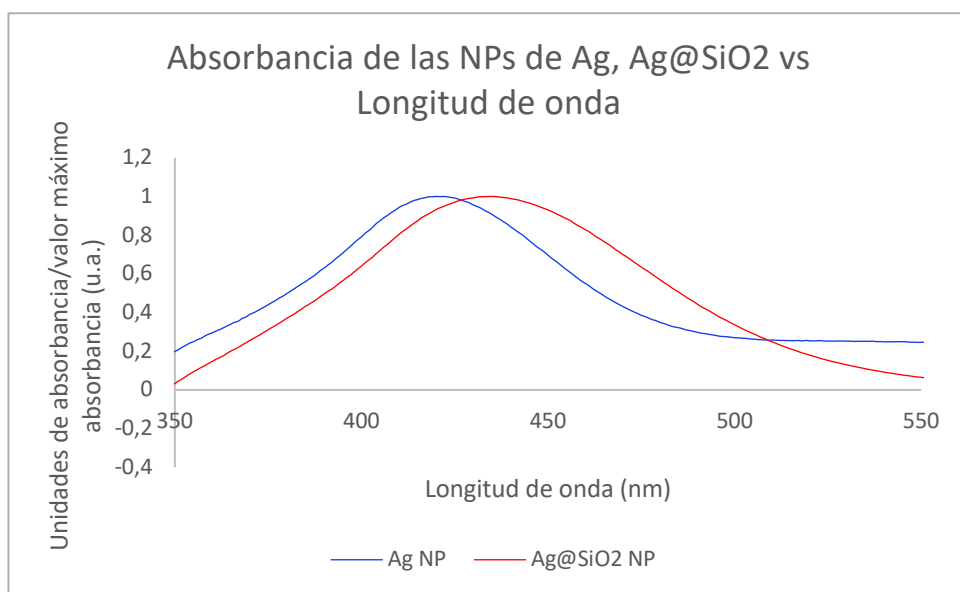


Figura 24. Espectros de absorción de las Ag NPs en suspensión acuosa y de las Ag@SiO₂ NPs en suspensión etílica medidos mediante espectrofotómetro UV-Vis. Estos espectros fueron normalizados con su valor máximo de absorción correspondiente

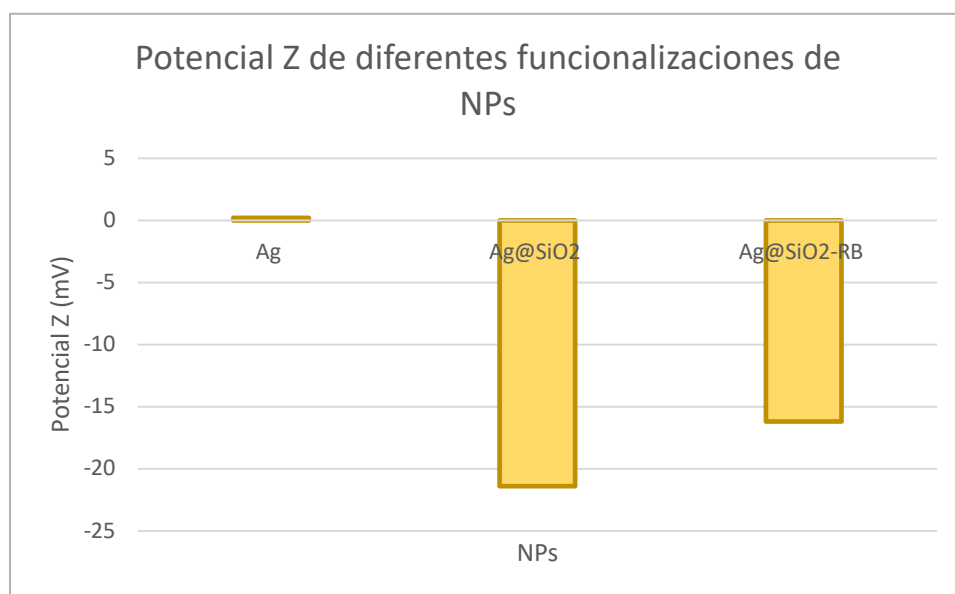


Figura 25. Representación gráfica de los valores del potencial Z en mV medido para las diferentes NPs sintetizadas

4.2. Reparación de los aductos tipo eteno del ADN

4.2.1. Reparación de los aductos de tipo eteno con SiO₂-RB NPs

Tras los calibrados, se procedió a preparar y a realizar las **irradiaciones de las SiO₂-RB NPs con ϵ -aductos**. Se prepararon un total de **6 irradiaciones**, dos por cada tipo de nucleósido dañado (**ϵ dA, ϵ dC y ϵ dG**). Una de estas irradiaciones se dio en condiciones aeróbicas (denominadas como **experimentales**), mientras que la otra se dio en condiciones anaeróbicas (nombradas y empleadas como **control**). Como se ha mencionado en los objetivos, nuestra hipótesis es que la especie responsable de la reparación sea el ¹O₂, por lo tanto, el experimento **control** consiste en irradiaciones en condiciones anaeróbicas dónde no se espera ninguna reactividad de los aductos.

Cada vial de irradiación disponía de una concentración de su nucleósido dañado correspondiente de **20 μM** y una concentración de **RB de 10 μM** proveniente de una disolución madre de 0,3 mM, de tal manera que la ratio de concentraciones de estos componentes en esta reacción fue de **2:1**.

A partir de los tiempos de retención para cada nucleósido determinados en la *Tabla 2 del apartado 3.2.4. de Materiales y Métodos*, se corroboró en todos los experimentos, tal y como se ve en la *Figura 26*, que conforme aumentaba el tiempo de irradiación, iba aumentando el área de un nuevo pico, cuyo tiempo de retención era correspondiente al del nucleósido reparado, e iba disminuyendo el área del pico en el tiempo de retención del ϵ -aducto.

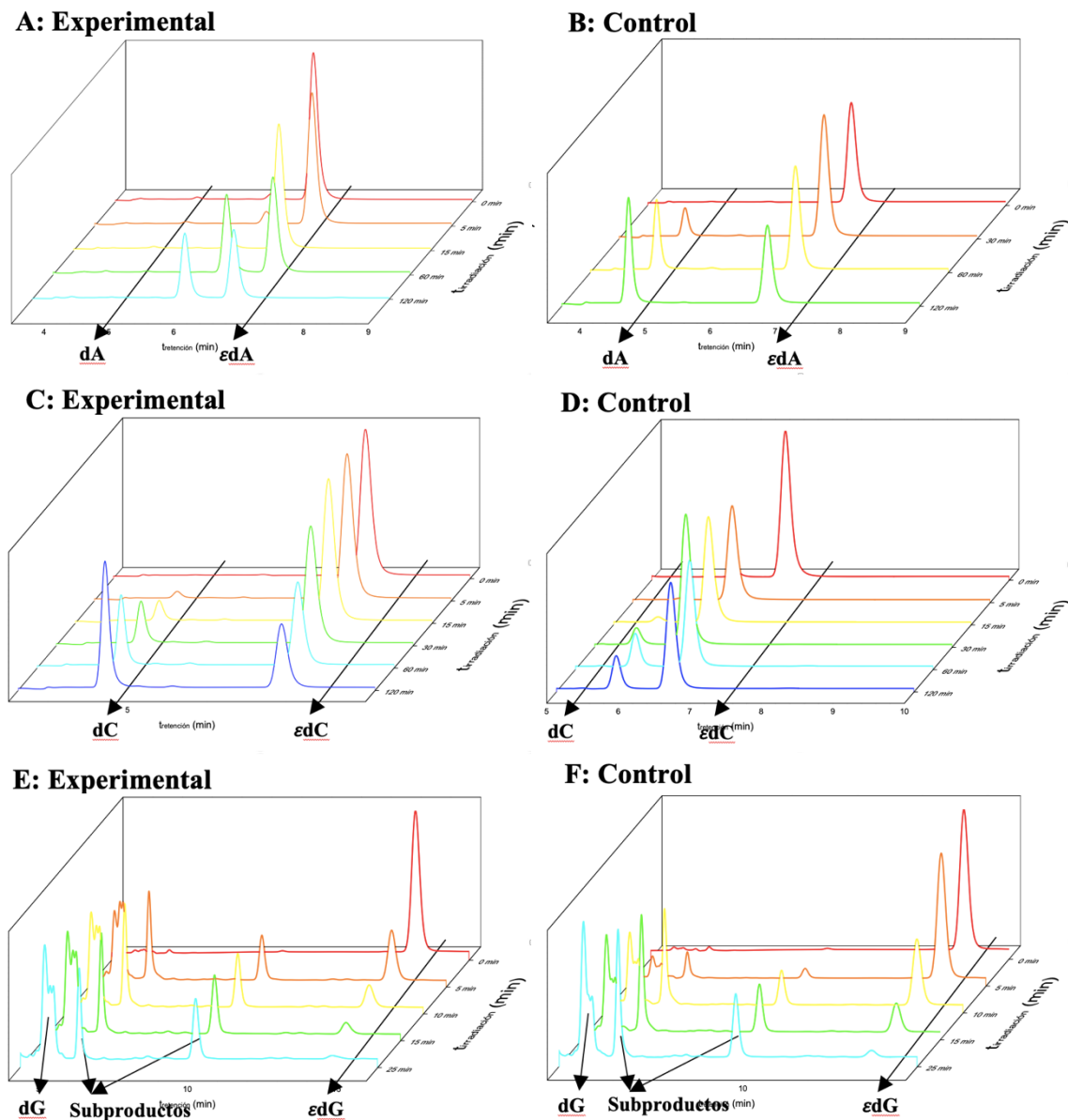


Figura 26. Representación gráfica en cascada de los espectros cromatográficos de HPLC obtenidos a diferentes tiempos de irradiación con SiO_2 NPs para los experimentos: A) Experimental: ϵdA B) Control: ϵdA C) Experimental: ϵdC D) Control: ϵdC E) Experimental: ϵdG F) Control: ϵdG

Finalmente, se midieron las áreas de cada pico en cada tiempo de la irradiación y mediante las rectas de calibrados expuestas en la *Figura 13 del apartado 3.1.4. de Materiales y Métodos*, se obtuvieron las concentraciones correspondientes. En la *Figura 27*, para cada experimento, se representó la concentración resultante del nucleósido dañado y reparado para cada tiempo de irradiación.

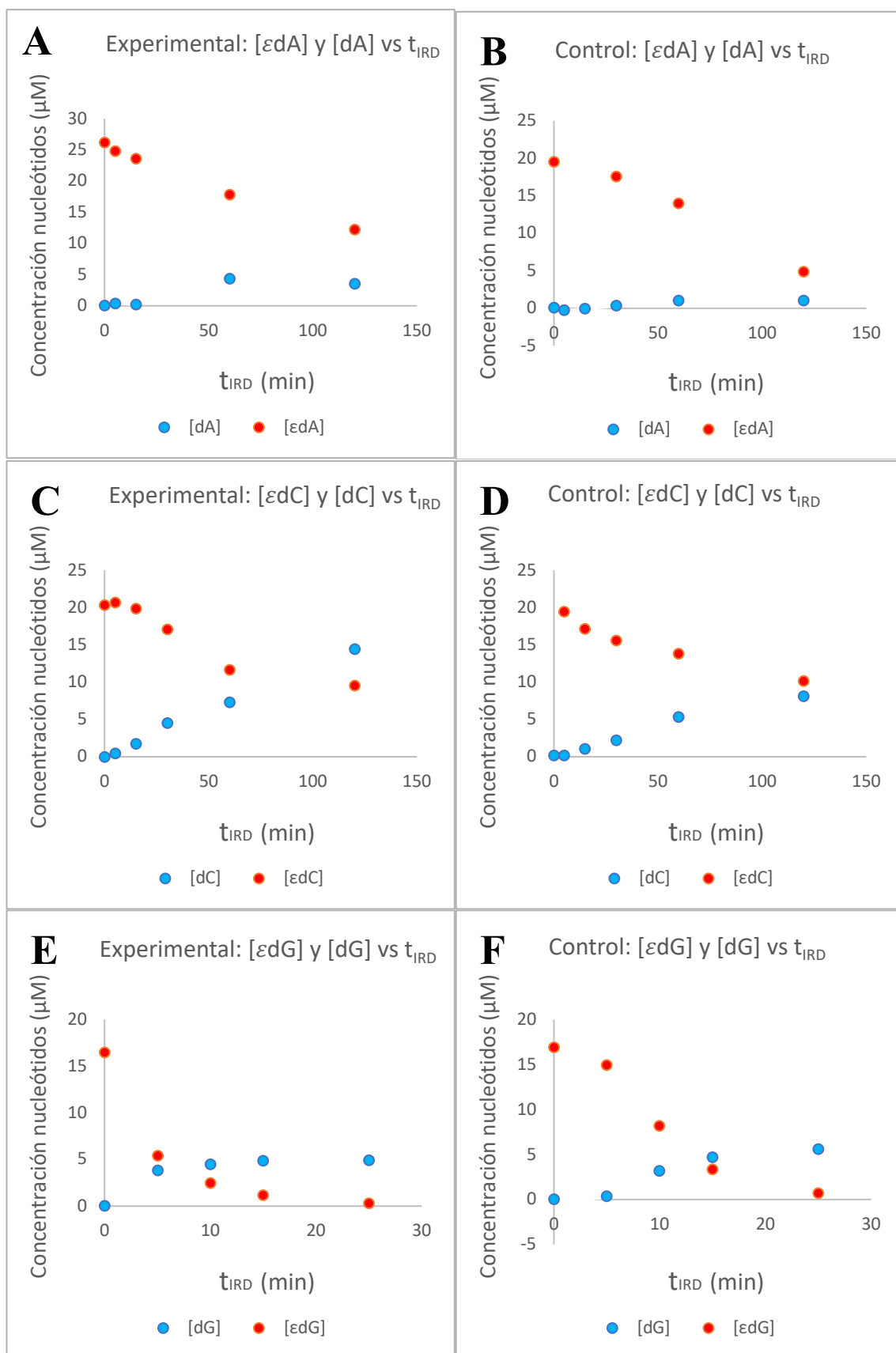


Figura 27. Representación gráfica de las concentraciones de nucleósidos dañados y reparados en función del tiempo de irradiación con SiO₂ NPs para los experimentos: A) Experimental: εdA B) Control: εdA C) Experimental: εdC D) Control: εdC E) Experimental: εdG F) Control: εdG

Al comparar las irradiaciones **experimentales** (Figura 27 A, C y E) con las irradiaciones **control** (Figura 27 B, D y F), se observa reparación tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, evidenciando que el $^1\text{O}_2$ **no es la única especie implicada en el mecanismo de reparación** de los ϵ -aductos por el rosa de Bengala.

Analizando en los cromatogramas la **concentración final de ϵ -aductos** (Tabla 5) y la **cinética de reparación**, se puede afirmar que **no existen datos que demuestren la mejor reparación de los ϵ -aductos en presencia de oxígeno**, al menos para las irradiaciones con ϵdA y ϵdC .

Tabla 5. Concentración de ϵ -aducto a tiempos finales (t) de irradiación en presencia de rosa de Bengala

	experimental	control
ϵdA (t =120 min)	12,3 μM	4,9 μM
ϵdC (t =120 min)	9,5 μM	10,1 μM
ϵdG (t =25 min)	0,3 μM	0,7 μM

En las irradiaciones con ϵdG , sí que cabe destacar que la **velocidad** a la que se **consume ϵdG es mayor en las experimentales**, consumiéndose un 67,2% de ϵdG en los primeros 5 minutos. Mientras que en el control la reducción en esos primeros 5 minutos es del 11,9% del total de ϵdG .

También conviene destacar que **el rendimiento de reparación de los ϵ -aductos es mayor en presencia de oxígeno**, al menos para las irradiaciones con ϵdA y ϵdC , es decir en el caso del experimental como se observa en la Tabla 6. En estos casos se observa el doble de concentración generada tanto de dA como de dC en el experimental respecto al control. Para las irradiaciones con ϵdG , las concentraciones finales del nucleósido reparado son similares tanto en el experimental como en el control

Tabla 6. Concentración de nucleósido reparado a tiempos finales (t) de irradiación en presencia de rosa de Bengala

	experimental	control
ϵdA (t =120 min)	3,6 μM	1,0 μM
ϵdC (t =120 min)	14,5 μM	8,1 μM
ϵdG (t =25 min)	4,9 μM	5,6 μM

Tomando como referencia las irradiaciones experimentales, se observa que globalmente existe una **mayor reparación** en los experimentos con ϵdG (Figura 27E) que con el resto de ϵ -aductos ya que su consumo es mayor. Por ejemplo, tras 15 minutos de irradiación el consumo total del daño es: para ϵdG de un 93,0% mientras que para ϵdA y ϵdC es 10,1% y 2,5%, respectivamente.

Aun así, si se hace un **balance de masas** entre el consumo de los ϵ -aductos y la concentración de los nucleósidos reparados, se observa que este **no es cuantitativo**. Por ejemplo, para ϵdA y ϵdC experimentales, al final de la irradiación se consume aproximadamente un 50% tanto de ϵdA y ϵdC , pero por otra parte se ha reparado un 14% de la cantidad inicial de ϵ -aductos en dA y un 71% reparado de dC . Estos desbalances podrían ser explicados por la presencia de impurezas o la formación de subproductos en las irradiaciones. No obstante, si se observan los cromatogramas de las Figura 26A y 26C, no se observa **ningún indicio** de que se hayan formado **subproductos** con una absorbancia a la longitud de onda de detección.

Para el caso de ϵdG , aunque la tendencia en cuanto al balance de masas es parecida, en su cromatograma sí que se observan picos de **algunos subproductos**, uno en el minuto 6 del tiempo de irradiación y el segundo a 10 min. Esto es debido a que dG es la base del ADN con un menor potencial de oxidación, es decir la **más fácil de oxidar**. Por lo tanto, los subproductos que se observan en el cromatograma de la Figura 26 E y F podrían ser debidos a una “segunda” oxidación de dG por el rosa de Bengala. Por

eso, nunca se alcanzan concentraciones altas de dG, puesto que cuando este se forma, se oxida rápidamente dando lugar a subproductos como la 8-oxo-2'-desoxiguanosina (conocida como 8-oxo-dG).

Debido al bajo volumen de SiO₂-RB NPs obtenido en la síntesis, solo se pudo realizar una réplica por cada tipo de irradiación, por lo que, con el fin de corroborar la significancia estadística de estos resultados, sería conveniente realizar más réplicas de estas en las mismas condiciones.

4.2.2. Reparación de aductos de eteno con Ag@SiO₂-RB NPs

Tras los calibrados, se procedió a preparar y a realizar las irradiaciones de las Ag@SiO₂-RB NPs con ϵ -aductos. Se prepararon un total de **6 irradiaciones**, dos irradiaciones por cada tipo de nucleósido dañado (**edA, edC y edG**) en el que una de ellas se realizó en condiciones aeróbicas (**experimental**) y la otra en anaerobiosis (**control**). Teniendo en cuenta la concentración final de RB en las Ag@SiO₂-RB NPs era de 0,9 mM, se pretendía adicionar en el vial de irradiación los volúmenes necesarios para que la ratio de concentraciones entre los ϵ -aductos y el RB de las nanopartículas fuera de 2:1, respectivamente (20 μ M de ϵ -aductos y 10 μ M de RB). No obstante, debido a un error experimental, la ratio adicionada fue de **8:3**, habiendo en cada irradiación una concentración del ϵ -aducto correspondiente de **8 μ M y 3 μ M de RB**.

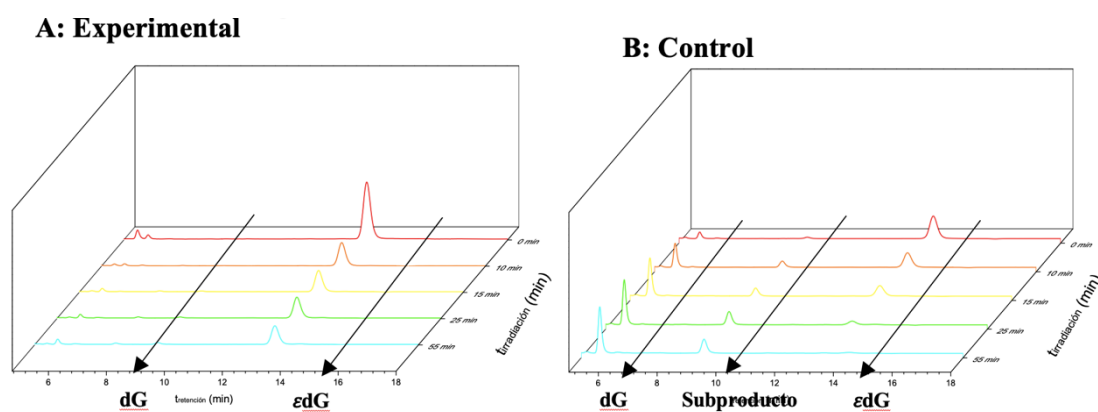


Figura 28. Representación gráfica en cascada de los espectros cromatográficos de HPLC obtenidos a diferentes tiempos de irradiación con SiO₂ NPs para los experimentos: A) Experimental: ϵ dG B) Control: ϵ dG

Se corroboró en todos los experimentos, que conforme aumentaba el tiempo de irradiación, iba aumentando el área de un nuevo pico cuyo tiempo de retención correspondía al del nucleósido reparado e iba disminuyendo el área del pico del ϵ -aducto (Figura 28).

Finalmente, se midieron las áreas de cada pico en cada tiempo de la irradiación y mediante las rectas de calibrados expresadas en la Figura 13 del apartado 3.1.4 de Materiales y Métodos, se obtuvieron las concentraciones correspondientes. En la Figura 29, para cada experimento, se representó la concentración resultante del nucleósido dañado y reparado para cada tiempo de irradiación.

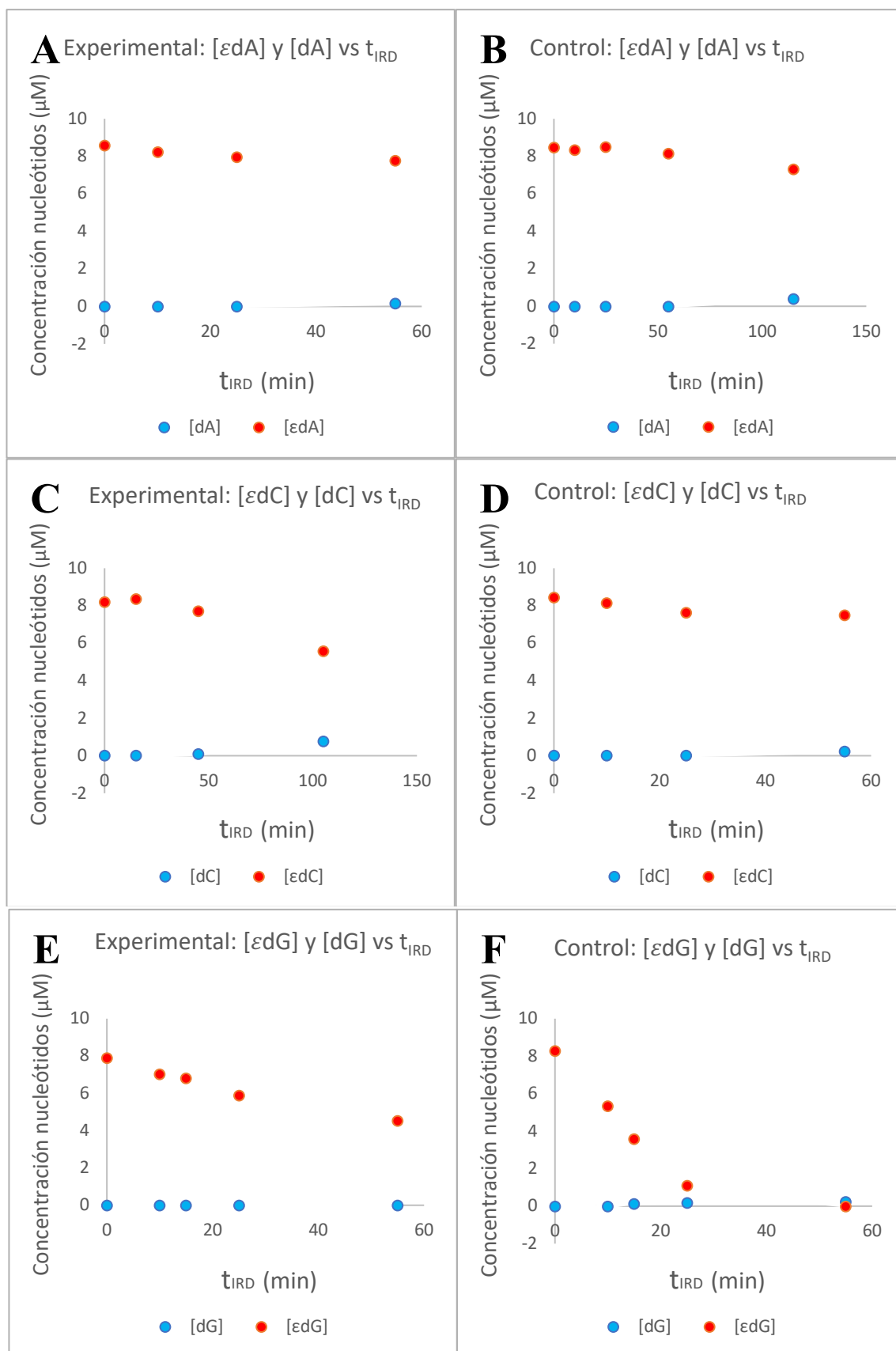


Figura 29. Representación gráfica de las concentraciones de nucleósidos dañados y reparados en función del tiempo de irradiación con Ag@SiO₂ NPs para los experimentos: A) Experimental: εdA B) Control: εdA C) Experimental: εdC D) Control: εdC E) Experimental: εdG F) Control: εdG

Cabe destacar que, tanto en las irradiaciones de ϵ dA y ϵ dC experimentales como en las irradiaciones control (*Figura 29A-D*), la concentración de ϵ -aducto inicial $\sim 8 \mu\text{M}$ **se mantiene más o menos estable** conforme pasa el tiempo de irradiación. La concentración de nucleósidos reparados generados, aunque sea detectable y aumente ligeramente conforme pasa el tiempo de irradiación, sus **valores son muy pequeños**, inferiores en todas las irradiaciones a $1 \mu\text{M}$.

En cuanto a ϵ dG (*Figura 29E y 29F*), la concentración generada de dG no aumenta de la misma manera en la que disminuye la concentración de ϵ dG, lo que podría ser explicado, en parte, por la formación de subproductos en el proceso de reparación (*Figura 28A y B*) como se ha explicado en el apartado anterior.

A pesar de ello, para los tres ϵ -aductos se observa un rendimiento de reparación muy bajo esto puede ser explicado por la **poca cantidad de rosa de Bengala** frente a la cantidad de ϵ -aducto. Comparando estos experimentos con los realizados con las SiO_2 -RB NPs, la concentración de rosa de Bengala conjugado a las Ag@SiO_2 -RB NPs ($3 \mu\text{M}$) es muy inferior a los $10 \mu\text{M}$ adicionados en las irradiaciones con las SiO_2 -RB NPs del apartado 4.2.1., por eso, el rendimiento de reacción es mayor para las SiO_2 -RB NPs. La baja concentración de rosa de Bengala en las Ag@SiO_2 NPs produce una cantidad reducida de oxígeno singlete, que además tendrá una probabilidad reducida de reaccionar con los ϵ -aductos antes de desactivarse.

Así, debido al error experimental que llevó a tener distintas ratios de rosa de Bengala: ϵ -aducto, **no es posible comparar** la efectividad de las Ag@SiO_2 -RB NPs frente a las SiO_2 -RB NPs.

Como pasaba en las irradiaciones con las SiO_2 NPs, en las irradiaciones control para Ag@SiO_2 NPs se observa una pequeña diferencia entre el total de ϵ -aducto reparado, siendo la conversión mayor para las irradiaciones experimentales que para los controles donde no hay oxígeno molecular, excepto en las irradiaciones con ϵ dG.

Debido al bajo volumen de Ag@SiO_2 NPs obtenido en la síntesis, solo se pudo realizar una réplica por cada tipo de irradiación, por lo que, con el fin de corroborar la significancia estadística de estos resultados, sería conveniente realizar más réplicas, en las concentraciones y ratios adecuadas de reactivos.

5. Conclusiones

- 1) Síntesis y modificaciones de las nanopartículas de óxido de sílice con rosa de Bengala conjugado a su superficie (SiO₂-RB NPs) y de nanopartículas de plata recubiertas con óxido de sílice con rosa de Bengala conjugado a su superficie (Ag@SiO₂-RB NPs) realizadas correctamente y demostrado mediante su caracterización.
- 2) A pesar de la baja concentración de Ag@SiO₂-RB se observa una pequeña tendencia de reparación de los nucleósidos con aductos de eteno como consecuencia de la irradiación de estas nanopartículas. No se evidencian diferencias muy significativas entre los experimentos llevados a cabo en condiciones anaeróbicas y aeróbicas. Demostrando que el ¹O₂ no es la única especie implicada en la reparación de los ε-aductos.
- 3) Reparación de los nucleósidos con aductos de eteno en presencia de las NPs de SiO₂-RB en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, aunque con mayor rendimiento bajo la presencia de oxígeno debido a la producción de oxígeno singlete.
- 4) Supuesta mayor velocidad de reparación de los aductos de eteno en las irradiaciones con el nucleósido 1-N²-etileno-2'-desoxiguanina (εdG) ya que, entre todas las bases nucleicas, la base con un potencial de oxidación más bajo y por tanto más fácil de oxidar es la guanina. Se piensa que en el caso de los ε-aductos esta tendencia podría reproducirse.
- 5) Por último y como se ha comentado con anterioridad, se ha observado una menor reparación en las irradiaciones con las Ag@SiO₂-RB NPs. Este menor nivel de reparación fue debido, no a un menor nivel de eficacia demostrado de reparación por parte de estas nanopartículas, sino a una menor concentración de rosa de Bengala conjugado a las NPs adicionado (8 μM de ε-aducto :3 μM de RB conjugado a las NPs para las irradiaciones con Ag@SiO₂-RB NPs vs 20 μM de ε-aducto:10 μM de RB conjugado a las NPs para las irradiaciones con SiO₂-RB NPs). Con el fin de poder demostrar la mayor o menor eficacia de estas NPs en la reparación de los aductos de eteno, sería necesario repetir las irradiaciones con las Ag@SiO₂-RB NPs con la misma ratio de concentraciones que en las irradiaciones SiO₂-RB NPs.
- 6) El consumo de ε-aducto bajo condiciones anaeróbicas implica la existencia de un mecanismo de reparación diferente al que implica al ¹O₂.
- 7) Debido al poco volumen disponible de NPs sintetizado y con el fin de obtener conclusiones con significancia estadística, es necesario realizar réplicas de cada una de las irradiaciones.

6. Bibliografia

- Abbasi, E., Milani, M., Aval, S. F., Kouhi, M., Akbarzadeh, A., Nasrabadi, H. T., Nikasa, P., Joo, S. W., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K., & Samiei, M. (2016). Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 42, Issue 2, pp. 173–180). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200>
- Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. In *Biochemical Journal* (Vol. 473, Issue 4, pp. 347–364). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>
- Alan D. McNaught & Andrew Wilkinson. (2014). Compendium of Chemical Terminology. In *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). <https://doi.org/10.1351/goldbook.P04652>
- Aleman, L., Murgía, J. R., & Botella, P. (2021). *Nanomedicinas para terapia dirigida de glioblastoma multiforme*. Universitat Politècnica de València- Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC) .
- Aparici, M. I. (2018). *Photochemistry of 1,3-Dicarbonyl Compounds: DNA Photodamage vs. Photoprotection* Universitat Politècnica de València- Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC). <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/105782>
- Baptista, M. S., Cadet, J., di Mascio, P., Ghogare, A. A., Greer, A., Hamblin, M. R., Lorente, C., Nunez, S. C., Ribeiro, M. S., Thomas, A. H., Vignoni, M., & Yoshimura, T. M. (2017). Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. In *Photochemistry and Photobiology* (Vol. 93, Issue 4, pp. 912–919). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/php.12716>
- Bucharskaya, A., Maslyakova, G., Terentyuk, G., Yakunin, A., Avetisyan, Y., Bibikova, O., Tuchina, E., Khlebtsov, B., Khlebtsov, N., & Tuchin, V. (2016). Towards effective photothermal/photodynamic treatment using plasmonic gold nanoparticles. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17081295>
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L. O., van der Horst, G. T. J., Batschauer, A., & Ahmad, M. (2011). The cryptochromes: Blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 335–364. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103759>
- Chung, F.-L., Chen, H.-J. C., & Nath, R. G. (1996). Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. In *Carcinogenesis* (Vol. 17, Issue 10). <https://academic.oup.com/carcin/article/17/10/2105/272930>
- di Mascio, P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Medeiros, M. H. G., & Cadet, J. (2019). Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins. In *Chemical Reviews* (Vol. 119, Issue 3, pp. 2043–2086). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00554>

- Hou, Y. J., Yang, X. X., Liu, R. Q., Zhao, D., Guo, C. X., Zhu, A. C., Wen, M. N., Liu, Z., Qu, G. F., & Meng, H. X. (2020). Pathological mechanism of photodynamic therapy and photothermal therapy based on nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, *15*, 6827–6838. <https://doi.org/10.2147/IJN.S269321>
- Ikehata, H., & Ono, T. (2011). The mechanisms of UV mutagenesis. In *Journal of Radiation Research* (Vol. 52, Issue 2, pp. 115–125). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1269/jrr.10175>
- Kabanov, V., & Heyne, B. (2020). Impact of Incoherent Coupling within Localized Surface Plasmon Resonance on Singlet Oxygen Production in Rose Bengal-Modified Silica-Coated Silver Nanoshells (SiO₂@Ag@SiO₂-RB). *ACS Applied Nano Materials*, *3*(8), 8126–8137. <https://doi.org/10.1021/acsnm.0c01544>
- Kabanov, V., Press, D. J., Huynh, R. P. S., Shimizu, G. K. H., & Heyne, B. (2018). Assessment of encapsulated dyes' distribution in silica nanoparticles and their ability to release useful singlet oxygen. *Chemical Communications*, *54*(49), 6320–6323. <https://doi.org/10.1039/c8cc03413c>
- Kavakli, I. H., Ozturk, N., & Gul, S. (2019). DNA repair by photolyases. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 115, pp. 1–19). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.10.003>
- Lee, S. H., Arora, J. A., Oe, T., & Blair, I. A. (2005). 4-Hydroperoxy-2-nonenal-induced formation of 1,N²-etheno-2'-deoxyguanosine adducts. *Chemical Research in Toxicology*, *18*(4), 780–786. <https://doi.org/10.1021/tx0497088>
- Lee, W., & Matsika, S. (2020). Stabilization of the Triplet Biradical Intermediate of 5-Methylcytosine Enhances Cyclobutane Pyrimidine Dimer (CPD) Formation in DNA. *Chemistry - A European Journal*, *26*(62), 14181–14186. <https://doi.org/10.1002/chem.202002834>
- Lineros, M., Miranda, A., & Lhiaubet-Vallet, V. (2021). *Photoremovable protecting groups for carbonyl compounds of biological interest*. Universitat Politècnica de València- Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC) .
- Lu, K., Hsiao, Y. C., Liu, C. W., Schoeny, R., Gentry, R., & Starr, T. B. (2022). A Review of Stable Isotope Labeling and Mass Spectrometry Methods to Distinguish Exogenous from Endogenous DNA Adducts and Improve Dose-Response Assessments. In *Chemical Research in Toxicology* (Vol. 35, Issue 1, pp. 7–29). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00212>
- Ludvíková, L., Friš, P., Heger, D., Šebej, P., Wirz, J., & Klán, P. (2016). Photochemistry of rose bengal in water and acetonitrile: A comprehensive kinetic analysis. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *18*(24), 16266–16273. <https://doi.org/10.1039/c6cp01710j>
- Macía, N., Bresoli-Obach, R., Nonell, S., & Heyne, B. (2019). Hybrid Silver Nanocubes for Improved Plasmon-Enhanced Singlet Oxygen Production and Inactivation of Bacteria. *Journal of the American Chemical Society*, *141*(1), 684–692. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b12206>

- Macia, N., Kabanov, V., & Heyne, B. (2020). Rationalizing the Plasmonic Contributions to the Enhancement of Singlet Oxygen Production. *The Journal of Physical Chemistry C*, 124(6), 3768–3777. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b10724>
- Mai, S., & González, L. (2020). Molecular Photochemistry: Recent Developments in Theory. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 59, Issue 39, pp. 16832–16846). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/anie.201916381>
- Martinez, G. R., Loureiro, A. P. M., Marques, S. A., Miyamoto, S., Yamaguchi, L. F., Onuki, J., Almeida, E. A., Garcia, C. C. M., Barbosa, L. ívea F., Medeiros, M. H. G., & di Mascio, P. (2003). Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 544(2–3), 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.05.005>
- Pissuwan, D., Valenzuela, S. M., & Cortie, M. B. (2006). Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 24, Issue 2, pp. 62–67). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.12.004>
- Planas, O., Macia, N., Agut, M., Nonell, S., & Heyne, B. (2016). Distance-Dependent Plasmon-Enhanced Singlet Oxygen Production and Emission for Bacterial Inactivation. *Journal of the American Chemical Society*, 138(8), 2762–2768. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b12704>
- Rundle, A. (2006). Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1–2), 23–36. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.05.031>
- Shivange, G., Monisha, M., Nigam, R., Kodipelli, N., & Anindya, R. (2016). RecA stimulates AlkB-mediated direct repair of DNA adducts. *Nucleic Acids Research*, 44(18), 8754–8763. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw611>
- Sorrin, A. J., Kemal Ruhi, M., Ferlic, N. A., Karimnia, V., Polacheck, W. J., Celli, J. P., Huang, H. C., & Rizvi, I. (2020). Photodynamic Therapy and the Biophysics of the Tumor Microenvironment. In *Photochemistry and Photobiology* (Vol. 96, Issue 2, pp. 232–259). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/php.13209>
- Tsikis, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>
- Turro, N. J., Ramamurthy, V., & Scaiano, J. C. (2009). *Principles of Molecular Photochemistry: An introduction*. University Science Books.
- Wang, Y., Zhao, Q., Han, N., Bai, L., Li, J., Liu, J., Che, E., Hu, L., Zhang, Q., Jiang, T., & Wang, S. (2015). Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. In *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (Vol. 11, Issue 2, pp. 313–327). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.09.014>
- Williams, D. (2008). The relationship between biomaterials and nanotechnology. In *Biomaterials* (Vol. 29, Issue 12, pp. 1737–1738). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.003>

- Zhong, H., & Yin, H. (2015). Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. In *Redox Biology* (Vol. 4, pp. 193–199). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.011>
- Zhou, Z., Song, J., Nie, L., & Chen, X. (2016). Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 45, Issue 23, pp. 6597–6626). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c6cs00271d>