

ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DE PUNTOS DE CARBONO DOPADOS CON Gd³⁺

KAROL JULISSA BAQUERO CASTILLO

Trabajo Dirigido

Tutor

**Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD
Laura Victoria Rivera Amezcuita, PhD**



**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
2022**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por permitirme llegar hasta donde estoy, por brindarme la sabiduría y la oportunidad de alcanzar cada logro propuesto hasta el día de hoy.

De igual manera, agradezco a mi familia, por todo el apoyo, el amor y las enseñanzas que han sido parte fundamental para mi crecimiento personal y escolar desde mi etapa de infancia hasta el día de hoy, a portas de culminar mi etapa Universitaria. Han sido mi ejemplo a seguir y a ellos debo mi esfuerzo y las ganas de ser mejor cada día.

En segundo lugar, aunque no menos importante me permito agradecer a las siguientes personas:

* A mis amigos más cercanos Corin, Nicolás, Paula, Laura, Yosline, Andrés, Lina y Valentina, con quienes compartí desde los primeros días, grandes experiencias y valiosos aprendizajes, han sido mi grata compañía en este proceso de crecimiento.

* A mis docentes tutoras Diana Rodríguez y Laura Rivera por guiarme, instruirme y brindarme su apoyo incondicional. Por darme la inspiración y por cultivar en mí el amor por la investigación en mi profesión. Del mismo modo al profesor Alejandro por cada una de las enseñanzas en este proceso final de mi carrera.

* A mi apoyo en el laboratorio, Juan y Sonia, semilleros SyNERGIA y SiBIO y a mis compañeros de laboratorio Johan, Valentina, Lina y Andrea por cada aprendizaje compartido.

* A Natalia Ochoa por brindarme un poco de su saber para encaminar mi proyecto y de igual manera hacer su aporte importante para alcanzar los propósitos y objetivos planteados en el mismo.

* A cada uno de mis compañeros con quienes compartí durante la carrera, a quienes tengo presentes siempre en mis recuerdos y a quienes tengo un gran aprecio. Gracias a ellos por compartir su experiencia y conocimiento ya que de una u otra manera aportaron un granito de arena para que llegar hasta aquí fuera posible

* De manera especial agradezco nuevamente a mis amigos Nicolás y Corin por ser mi mano derecha y regalarme su acompañamiento para la construcción y realización del presente proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Estado del arte.....	5
1.1.1. Radioterapia.....	6
1.1.2. Puntos de Carbono.....	6
1.1.3. Pruebas de Citotoxicidad.....	7
1.1.3.1. Ensayo MTT.....	7
1.1.4. Análisis Estadístico Bayesiano.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. General.....	9
2.2. Específicos.....	9
3. METODOLOGÍA.....	10
3.1. Síntesis y caracterización de PC y PC: Gd ³⁺	10
3.1.1. Caracterización de las propiedades ópticas de los PC y PC: Gd ³⁺	13
3.2. Pruebas de citotoxicidad.....	14
3.3. Análisis estadístico.....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1. Síntesis y caracterización de los PC y PC: Gd ³⁺	17
4.2. Pruebas de citotoxicidad.....	19
4.3. Análisis estadístico.....	23
4.3.1. Prueba ANOVA.....	24
4.3.2. Prueba de normalidad, T Student, Cohen d.....	25
4.3.3. Análisis Bayesiano.....	26
5. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS.....	27
6. CONCLUSIONES.....	28
REFERENCIAS.....	29
ANEXOS.....	32

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es el término que se utiliza para designar un amplio grupo de enfermedades que afectan cualquier parte del organismo; es una alteración biológica y genética de las células que componen los tejidos de los órganos. Las células se comienzan a dividir de forma descontrolada, extendiéndose a diferentes zonas del cuerpo, modificando a nivel sistémico el comportamiento estructural y funcional. La multiplicación del número de células cancerosas llega a generar un desequilibrio en el organismo, que al no ser tratado ocasiona la muerte [1].

Cuando el cáncer se detecta en una fase temprana es más probable que responda al tratamiento, lo que podría aumentar las probabilidades de supervivencia, reducir la morbilidad y mejorar significativamente la vida de los pacientes [2].

En la actualidad, existen distintos métodos para el tratamiento del cáncer, entre los cuales se destacan las intervenciones quirúrgicas, la radioterapia, la quimioterapia, la inmunoterapia y la terapia hormonal. A su vez, se reporta que, de la totalidad de pacientes que acuden a estos tratamientos oncológicos, más del 50% recibe radioterapia, lo que la cataloga como uno de los métodos más usados para el tratamiento del cáncer [3].

La radioterapia actúa imposibilitando la migración y proliferación celular a partir de uso de la radiación de alta energía, la cual ejerce un efecto directo sobre el ADN nuclear proporcional a la dosis de radiación ionizante [4].

No obstante, se han evidenciado limitaciones y variables que deben ser estudiadas, como la disminución de los efectos secundarios en el tejido sano y el efecto radioresistente de las células tumorales. Para superar estas limitaciones se hace uso de agentes radiosensibilizantes, los cuales pueden ser compuestos o nanomateriales que, al interactuar con las células cancerosas, concentran el efecto de la radiación sobre estas, aumentando la eficiencia del tratamiento y disminuyendo la afectación del tejido sano [5].

Entre el uso de nanomateriales sintetizados o dopados con metales pesados, se encuentran las nanopartículas de oro y las nanopartículas de plata que han mostrado sensibilidad al ser un tipo de nanomateriales que aumentan la generación de emisiones secundarias sometiendo las células a una irradiación de fotones de alta energía sin afectar las células sanas [6], [7]. No obstante, sus concentraciones en los diferentes tejidos se elevan, siendo desfavorable para el comportamiento celular [8]. Por esta razón, se han estudiado otros elementos químicos que puedan ser utilizados para complementar las propiedades de los nanomateriales, encontrando entre ellos los lantánidos, como el gadolinio ($Z=64$), que presentan un alto número atómico.

Este potencial radiosensibilizante con el que se puede dopar nanopartículas con baja citotoxicidad y biocompatibilidad, mejoran la eficacia entre dosis localizada y daño celular, ya que cumplen el mismo efecto de aumentar la generación de re-emisiones secundarias cuando se someten a una irradiación de fotones de alta energía, disminuyendo el efecto secundario en tejido sano y aumentando el control de la dosis del tratamiento en las células cancerosas [9].

Con el objetivo de aprovechar las propiedades del gadolinio, el cual también es un elemento de estudio frecuente en agentes de contraste, se estudia su funcionalización en la superficie, pasivación o dopaje en los puntos de carbono. Estos últimos son nanopartículas con un tamaño inferior a 10 nanómetros, los cuales se caracterizan por poseer beneficios como la sintetización y funcionalización superficial sencilla, baja citotoxicidad y biocompatibilidad [10], [11]. Los puntos de carbono, '*carbon dots*', '*CDs*' o '*PC*', han surgido como una alternativa novedosa frente a otras

nanopartículas debido a sus propiedades fotoluminiscentes, estructurales y funcionales que permiten interacciones fisicoquímicas a nivel molecular y celular [12]. También se destaca la participación de los PC en aplicaciones de diseño de nanoplataformas multifuncionales para encapsulación en la liberación de fármacos, como medios de contraste y, en este caso en particular, en la radioterapia [13], [14].

Sin embargo, es necesario realizar estudios de citotoxicidad de los puntos de carbono que contienen gadolinio y de la nanoplataforma completa, para que su interacción no afecte el comportamiento estructural y funcional de las células. Durante su proceso de síntesis y funcionalización, los PC pueden generar respuesta adversa en las células debido a que, se relacionan con agentes químicos y físicos que pueden afectar la proliferación y viabilidad celular. Llegando a ser indispensable corroborar el efecto que tienen estos nanomateriales sobre las células [15].

Además, se debe verificar que, disminuya la liberación de los iones gadolinio al estar en el dopado de los puntos de carbono, ya que, se ha reportado en investigaciones relacionadas a los iones gadolinio como agente de contraste, que aumenta la toxicidad en los pacientes con deficiencias renales y pueden inhibir los canales de calcio conduciendo a fibrosis [14]. Por esta razón, se han diseñado pruebas que miden la viabilidad celular infiriendo procesos secundarios como evaluar su efecto citotóxico [15], [16], [13].

Este trabajo realizado en conjunto con los semilleros SyNERGIA y SiBIO de la Universidad del Rosario, que hace parte de un proyecto macro relacionado con el tratamiento del cáncer por radioterapia, junto a Concordia University Canadá, Université Côte d'Azur Francia y el centro de control del Cáncer, se cimenta en la realización de estudios de citotoxicidad basados en ensayos MTT cuyos resultados serán discutidos utilizando principalmente el análisis bayesiano. Puesto que, en estudios anteriores, se ha evidenciado que, al solo incluir la información obtenida por la cantidad de repeticiones establecidas en los ensayos MTT, el análisis ha sido variable, difícilmente comparable y, por consiguiente, ambiguo en su veracidad.

Este modelo condicional, que demuestra si la cantidad de pruebas realizadas generan una buena potencia estadística, se va a complementar en el análisis estadístico, para que se permita cuantificar el número de pruebas necesarias que se deben realizar para respaldar los resultados de la evaluación de la citotoxicidad de PC: Gd^{3+} y PC en la línea celular VERO y el cultivo de células primarias de un paciente con tumor glial.

1.1. Estado del arte

El cáncer es un término relacionado con un grupo extenso de enfermedades originadas condicionalmente por el crecimiento descontrolado de células, en casi cualquier tejido del cuerpo humano [21]. Esta formación de células puede llegar a extenderse a diferentes zonas a la de origen, llegando a cambiar la morfología y el comportamiento de las células hasta generar la muerte del organismo donde se desarrollan [22]. De acuerdo a las estadísticas de los años de vida ajustados por discapacidad (DALYs), el cáncer representa la mayor carga a nivel clínico, económico y social [23], [24] y, según el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, se reportaron que para el año 2020, habría 19,3 millones de casos nuevos de cáncer y casi 10 millones de defunciones [23].

Para el tratamiento del cáncer se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas, entre las que se incluyen las intervenciones quirúrgicas, la radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal, entre otros. Sin embargo, la radioterapia hace parte de los tratamientos más

utilizados, con el manejo en más de la mitad de los pacientes con cáncer, incluyendo a los pacientes a quienes se les realiza cirugía [24]

1.1.1. Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento del cáncer que se ha utilizado para controlar la proliferación de las células cancerosas. A partir de la administración de radiación de fotones de alta energía, como rayos X, rayos gamma (γ) o partículas subatómicas que tienen un efecto lesivo directo sobre el ADN nuclear, se mide el desarrollo de la eficacia de la radioterapia respondiendo al daño producido en las células cancerosas con el foco del tratamiento, la intensidad necesaria para eliminarlas y disminuir la afectación de las células sanas [25]

Entre las alternativas estudiadas para complementar la radioterapia, se encuentra el uso de radiosensibilizadores, específicamente los puntos de carbono, los cuales han surgido como una estrategia reciente estudiada, que presentan características con un potencial de efectividad y de baja toxicidad, entre otros beneficios [26]

1.1.2. Puntos de Carbono

Uno de los métodos que se han encontrado para mejorar las características del tratamiento del cáncer por radioterapia es la incorporación de nanomateriales que permiten focalizar la radiación expuesta y aumentar los resultados de efectividad del tratamiento al cáncer [27]

Los PC son nanopartículas de tamaño inferior a 10 nanómetros con propiedades fotoluminiscentes, gracias a la conformación de sus átomos de carbonos sp^2 y sp^3 favorecen la absorción y emisión de luz en el espectro UV-Vis. Los PC han sido de interés para la investigación en la biología y la medicina, estudiando sus propiedades estructurales y funcionales que permiten interacciones fisicoquímicas a nivel molecular y celular [28], siendo participes en el diseño de nanoplataformas multifuncionales para encapsulación en la liberación de fármacos, como medios de contraste y en la radioterapia [29]. Además, han mostrado una mejor biocompatibilidad respecto a otros materiales, con procesos de síntesis más sencillos y económicos.

Los puntos de carbono presentan propiedades químicas, eléctricas y ópticas que, complementados con elementos de número atómico alto, permiten su uso en radioterapia para mejorar la respuesta al tratamiento, aumentando la radiosensibilidad y la detección de células cancerosas [30]. Un ejemplo de ello es el gadolinio, el cual, además de ser un elemento que es ampliamente utilizado en medios de contraste para resonancias magnéticas, es empleado en el dopaje de PC. Esta complementación de los PC junto con los iones de gadolinio permite controlar los efectos secundarios que pueden ocasionar los iones u otras nanopartículas a nivel sistemático en el cuerpo, al mismo tiempo que aumenta el daño celular y la dosis localizada en las células cancerosas [31][32]

Las propiedades de absorción de los puntos de carbono, que hacen parte de las propiedades ópticas, están influenciadas principalmente por el contenido de grupos funcionales superficiales, el tamaño de los dominios conjugados π y los cambios en el contenido de oxígeno/nitrógeno del núcleo de carbono. Los PC generalmente exhiben una fuerte absorción en la región ultravioleta entre 200 y 400 nm, que puede extenderse a la región visible e incluso, caracterizarse con emisión roja o NIR, al rango de 500 a 800 nm [33], [34].

Como una de las propiedades más atractivas de los PC, está la fluorescencia. Los PC emiten fluorescencia azul o verde, sin embargo, estudios han demostrado con éxito que, abundantes fuentes de carbono y diversos métodos sintéticos promueven los comportamientos de fluorescencia de los PC, permitiendo modificarlos dependiendo el interés de la investigación [34]

1.1.3. Pruebas de Citotoxicidad

Para estudiar la biocompatibilidad y viabilidad celular de agentes externos que al interactuar con las células pueden afectar su comportamiento, se realizan pruebas biológicas *in vitro*, en las que se encuentran las pruebas de citotoxicidad. Se han utilizado diferentes líneas celulares sanas y cancerosas, como las de fibroblastos embrionarios de Ratón (3T3-I1) o las células epiteliales de riñón de mono verde africano (VERO); y líneas celulares tumorales, como, adenocarcinomas de diferentes zonas del cuerpo del ser vivo; generalmente, de ratón, mono y humano [35], [36]

Las pruebas de citotoxicidad para evaluar la viabilidad celular se clasifican en 4 tipos de ensayos, dependiendo el método utilizado y el resultado obtenido; los ensayos luminométricos unidos a la producción de ATP, el cual reacciona con la luciferina si hay células vivas luego de los efectos de las condiciones en estudio, los ensayos fluorométricos como los ensayos que utilizan sustratos fluorogénicos para detectar la reacción enzimática cuando las células mueren, los ensayos que excluyen colorante por la permeabilidad de la membrana celular como el ensayo de azul tripano que es impermeable en células vivas, y los ensayos colorimétricos, como el ensayo MTT y XTT que, evalúan la viabilidad celular por medio de su actividad metabólica, en donde las enzimas de las células viables reducen un reactivo cromogénico formando un producto con un color específico [37], [38].

1.1.3.1. Ensayo MTT

El ensayo MTT hace parte de los ensayos colorimétricos que utilizan la actividad metabólica para evaluar la viabilidad celular. Las células reducen el reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio), lo que da como resultado la formación de los cristales de Formazán, principalmente en la mitocondria a partir de la enzima succinato deshidrogenasa y otras deshidrogenasas [39]. Posterior a la recolección de las pruebas MTT, se realiza un análisis estadístico en el cual el objetivo es verificar la parametricidad de los datos de absorbancia tomados de la producción de formazán. Esto se logra realizando una prueba de normalidad seguida de métodos estadísticos de comparación de datos como la prueba de t de Student para comparar las medias y analizar los resultados [40].

Las aplicaciones del ensayo MTT están relacionadas con el estado celular como la viabilidad, la toxicidad y el metabolismo celular, que ha estado enfocado en que el proceso se lleva dentro de la mitocondria, sin embargo existen investigaciones con la influencia de agentes químicos y deshidrogenasas, dentro y fuera de la mitocondria que también influye en la reducción del reactivo de MTT, siendo necesario seguir con la exploración del ensayo, ya que es utilizado para determinar si la exposición de sustancias externas pueden generar o no, la muerte celular [41]

Si bien, el ensayo MTT es utilizado con frecuencia para inferir la citotoxicidad en las células, se han revelado otras limitaciones del ensayo y factores que pueden influir en los resultados y afectar su interpretación [42]. Entre las variables que se han evaluado se encuentran el número de siembra de células, el tiempo de incubación de los agentes que se están evaluando, la composición de los medios de cultivo celular, el tiempo de incubación del reactivo MTT, teniendo en cuenta los errores técnicos. Otros factores relacionados en el ensayo MTT con la reducción del reactivo, son las moléculas físico-químicas y enzimas que interactúan en las diferentes actividades celulares entre el espacio intramembranal de la mitocondria y de la célula en general [40]. Por esta razón, es necesario seguir estudiando la prueba y la interpretación de los datos para evitar conclusiones engañosas.

En el caso del análisis de los datos, por lo general, se utilizan pruebas que parametrizan los datos experimentales a partir de la formulación frecuentista estadística. Las pruebas estadísticas que se utilizan para complementar los resultados de las pruebas de citotoxicidad son, la prueba de normalidad, la ANOVA, t Student y d Cohen. Se puntualizan los parámetros y exhiben intervalos de confianza estáticos que, dependiendo el manejo dado, se pueden malinterpretar y disminuyen la confiabilidad del estudio. Dependiendo el objetivo de la investigación, la información es limitada para argumentar la variabilidad de la prueba y mejorar la importancia de su eficacia [14], [15] [30].

En el ensayo MTT realizado a los puntos de carbono sintetizados en el estudio de Liu et al. [38], se reporta que estos presentaron una baja citotoxicidad. Aunque esta sea una característica deseable, la literatura hace una invitación a seguir profundizando, ya que los factores que evitan la dilución de los cristales de Formazán, es con el uso de nanotubos de carbono, generando inconsistencias si se comparan con los resultados con puntos de carbono. En el caso de Rodríguez [15] [35], registra una diferencia significativa de más del 200% entre las desviaciones estándar de las 2 réplicas técnicas con triplicados desarrolladas de las pruebas, impidiendo su análisis e interpretación, concluyendo que se necesita revisar el procedimiento llevado a cabo en el ensayo MTT y explorar otros factores utilizando diferentes concentraciones y diferentes tiempos de exposición que evalúen la adquisición de resultados más congruentes y representativos.

1.1.4. Análisis Estadístico Bayesiano

Continuando con las observaciones realizadas por las diferentes investigaciones referenciadas, entre los aspectos que menos han sido evaluados, se encuentran las diferentes formas de interpretación de los datos y su análisis estadístico, que permiten sustentar la base teórica y práctica que se está investigando, siguiendo el protocolo ya establecido tanto para la prueba MTT como para la síntesis, caracterización y funcionalización de los puntos de carbono. En este caso, es de utilidad el conocimiento y desarrollo del análisis bayesiano, complementario al análisis de varianza y normalidad que se les realiza a los datos, descrito matemáticamente a partir de la ecuación 1. [40], [41], [42]

$$P(A|B) = \frac{P(B|A)*P(A)}{P(B)} \quad (1)$$

Donde:

- $P(A)$ es la probabilidad que ocurra el evento A;
- $P(B)$ es la probabilidad que ocurra el evento B, siendo B la probabilidad total e incluyendo todos los eventos de la probabilidad de B, es decir, la suma de probabilidades de los eventos $\sum_{j=1}^n P(B|A_j) * P(A_j)$
- $P(A|B)$ es la probabilidad que ocurra el evento A dado que ha ocurrido el evento B;
- $P(B|A)$ es la probabilidad que ocurra el evento B dado que ha ocurrido el evento B;

Con el uso de un análisis Bayesiano, podemos incluir datos experimentales provenientes de conocimientos previos, teóricamente y por medio de la intuición [41], la cual es información que permite calcular valores de los parámetros y describir la incertidumbre, con la información que se va obteniendo y la que se incluye, realizando una distribución de probabilidad [42]. El ajuste y la posibilidad de reducir la incertidumbre son una opción para mejorar la fiabilidad de los resultados.

2. OBJETIVOS

2.1. General

Estudiar la citotoxicidad con el ensayo MTT de PC y PC: Gd³⁺ en el cultivo de células primarias de un paciente con tumor glial y en la línea celular VERO.

2.2. Específicos

- a) Establecer los parámetros de la prueba de citotoxicidad con el ensayo MTT, identificando los factores necesarios para determinar la validez de la prueba
- b) Realizar pruebas de citotoxicidad de PC y PC: Gd³⁺ por medio del ensayo MTT en la línea celular VERO y el cultivo de células primarias de un paciente con tumor glial.
- c) Analizar la validez del ensayo MTT por medio de la prueba estadística bayesiana
- d) Establecer el efecto de las pruebas citotóxicas para identificar el número de pruebas que permiten determinar la validez de la prueba de citotoxicidad con el ensayo MTT.

3. METODOLOGÍA

Para la realización y cumplimiento de los objetivos, la metodología del presente trabajo se divide en 3 fases (Figura 1). Esta metodología inicia con el proceso de síntesis de PC y PC: Gd³⁺ a partir ácido cítrico, urea y ácido dietiltri Aminopentaacético de gadolinio como precursores de carbono, nitrógeno e iones gadolinio respectivamente. Se continúa con la ejecución de las pruebas de citotoxicidad que tiene como objetivo la recolección de datos para su posterior análisis y, finalmente, la etapa de interpretación estadística y conclusión de los datos obtenidos para establecer la cantidad de pruebas necesarias que determinen la validez de la prueba de citotoxicidad con el ensayo.

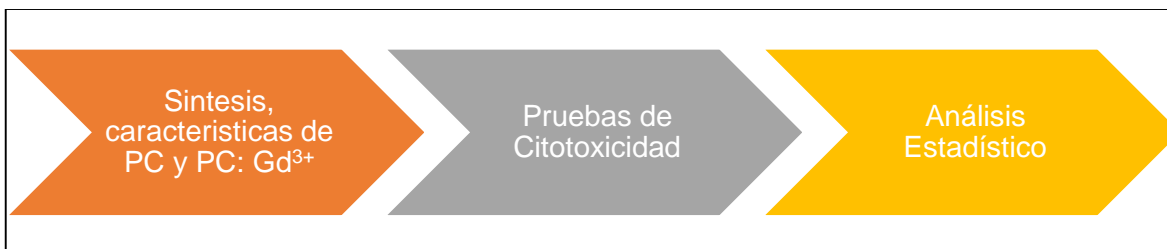


Figura 1. Diagrama de flujo de las fases del proyecto

3.1. Síntesis y caracterización de PC y PC: Gd³⁺

El procedimiento de síntesis de PC y PC: Gd³⁺, se basa en la investigación en curso de la estudiante Natalia Ochoa de la Maestría en Ingeniería Biomédica, programa de la Universidad del Rosario en convenio con la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito. Los PC se sintetizan por medio del método de reacción por microondas (Anton Paar, Microwave 50), a partir de 1,2 g de urea (Sigma Aldrich, 99,5%), 0,6 g de ácido cítrico monohidratado (Scharlau), que es una relación 2:1 respectivamente y utilizando 6mL de solvente N, N dimetilformamida (Scharlau). En el caso de los PC: Gd³⁺, se agrega 0.09 g de sal de dihidrógeno hidratada de ácido dietiltri Aminopentaacético de gadolinio, correspondiente a un porcentaje de peso de Gd³⁺ de 5% y 0.5 mL de agua destilada, manteniendo la masa (1.8 g) y el volumen total (6mL) de la reacción respecto a la primera síntesis.

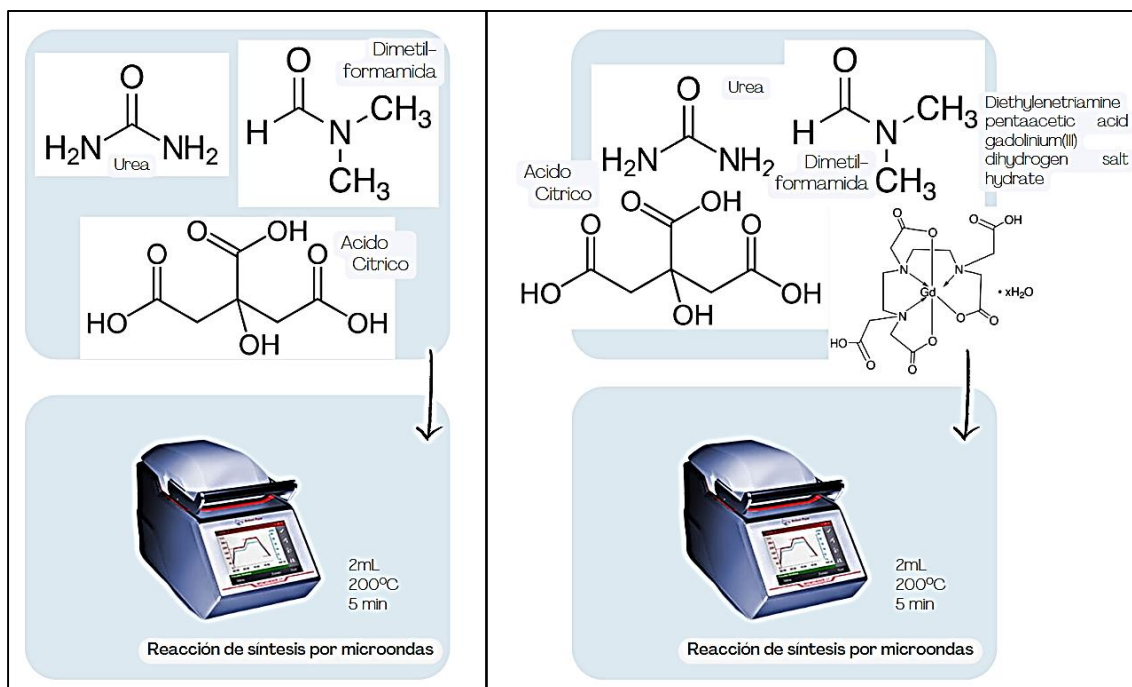


Figura 2. Reactivos que se homogenizan para sintetizarse en el reactor por microondas. Reacciones de (A) síntesis de PC y (B) síntesis de PC: Gd³⁺

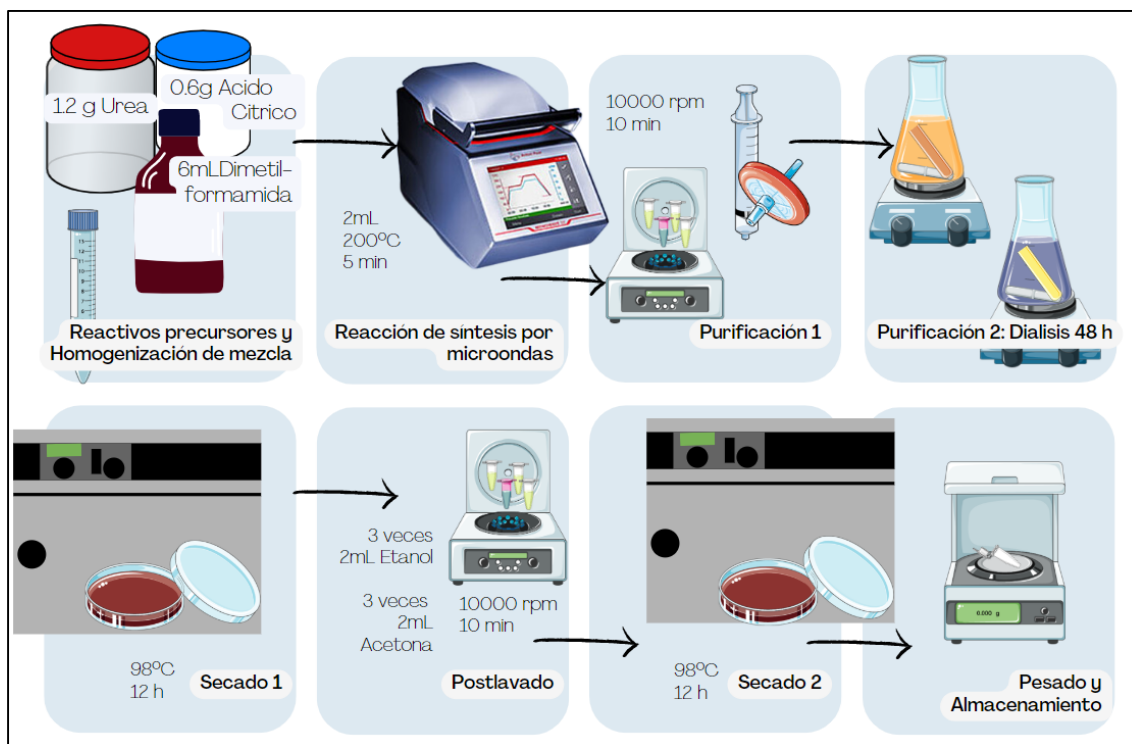


Figura 3. Esquema general de proceso de síntesis de PC y PC: Gd³⁺

En las figuras 2 y 3 se presentan los esquemas generales del proceso sintético de PC y PC:Gd³⁺. La mezcla de los reactivos se sonica por 20 minutos (Elmasonic Easy 30H), posteriormente reacciona en el reactor microondas a 200°C por 5 minutos. El producto de la reacción es centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, seguido por el filtrado del sobrenadante de la muestra

centrifugada con filtro de 0.22 μm . El filtrado es dializado por 24h contra agua destilada. El dializado es secado en horno convencional a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 12 h. Posteriormente, se realizan un lavado con etanol y acetona que se describe en la figura 4. El producto final es secado en horno convencional y almacenado en nevera a 4 $^{\circ}\text{C}$.

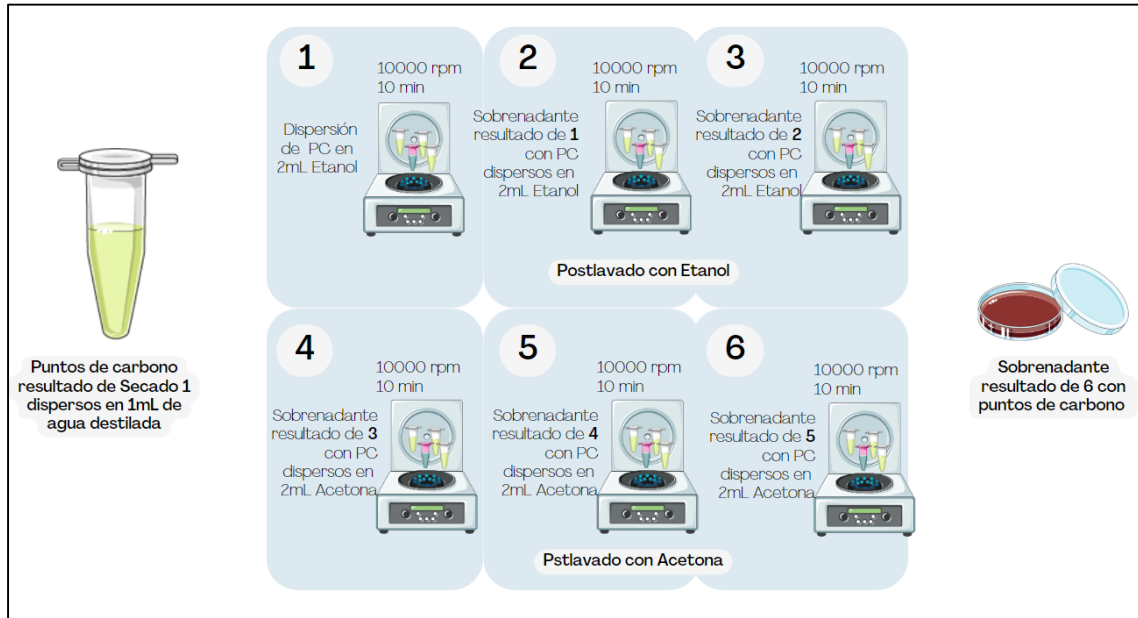


Figura 4. Diagrama del procedimiento de lavado de los PC y PC: Gd^{3+}

Para la recolección de las nanopartículas se estructuró un sistema por días en el que se realizó la síntesis, purificaron y secado descrito en el esquema general de proceso de síntesis (Figura 3), comenzando con la síntesis de puntos de carbono sin dopar, seguido por la de puntos de carbono dopados con iones gadolinio, tal como se puede observar en Figura 5.

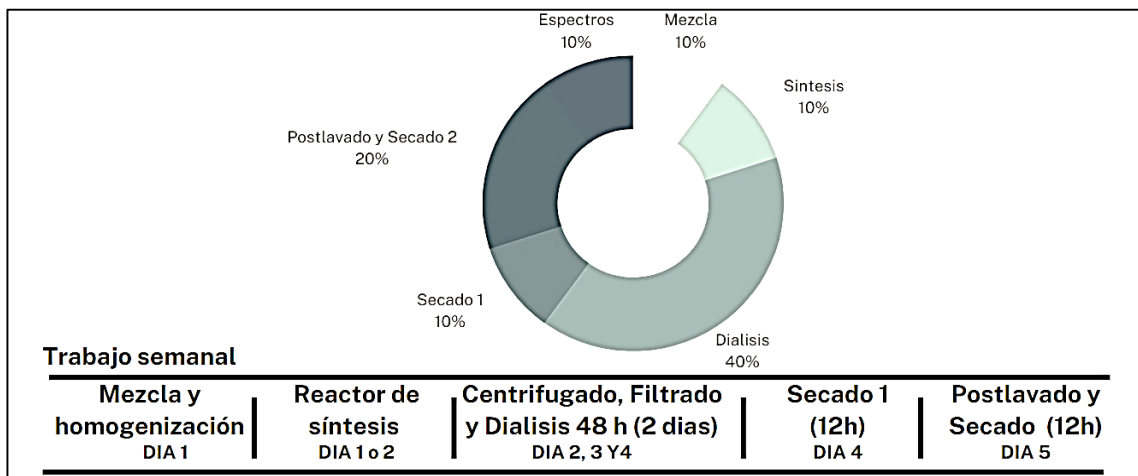


Figura 5. Cuadro y gráfica resumen del trabajo semanal realizado en el laboratorio para la síntesis de PC y PC: Gd^{3+}

3.1.1. Caracterización de las propiedades ópticas de los PC y PC: Gd³⁺

Para evaluar la absorción y emisión los PC y PC: Gd³⁺ se empleó el espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES, junto con una fuente de luz de deuterio y lámparas halógenas, y el software Ocean View.

Para los espectros de absorción se tomaron medidas en un rango de 200- 550 nm, utilizando una celda de cuarzo de 1cm de paso óptico. Los datos obtenidos fueron procesados con el software Origin Lab ®. Las concentraciones de las soluciones usadas para evaluar los espectros de absorción PC y PC: Gd³⁺ fue de 0.05 mg/ml para ambas. El esquema del montaje experimental de absorción se muestra en la figura 6. Para la obtención de los espectros de fluorescencia se usó el espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES con su equipamiento de luz monocromática de 365nm, 405nm, 533nm y 635nm y su software Ocean View. Los espectros fueron medidos usando las mismas soluciones usadas para la caracterización de los espectros de absorción. El esquema del montaje experimental de fluorescencia se muestra en la figura 7.

Por último, el espectro FTIR de los puntos de carbono secos es obtenido por el espectrómetro FTIR Nicolet iS5 de ThermoScientific, que mide la cantidad de energía absorbida luego de la generación de las vibraciones entre los elementos que compone los puntos de carbono, permitiendo conocer los grupos funcionales presentes [43]

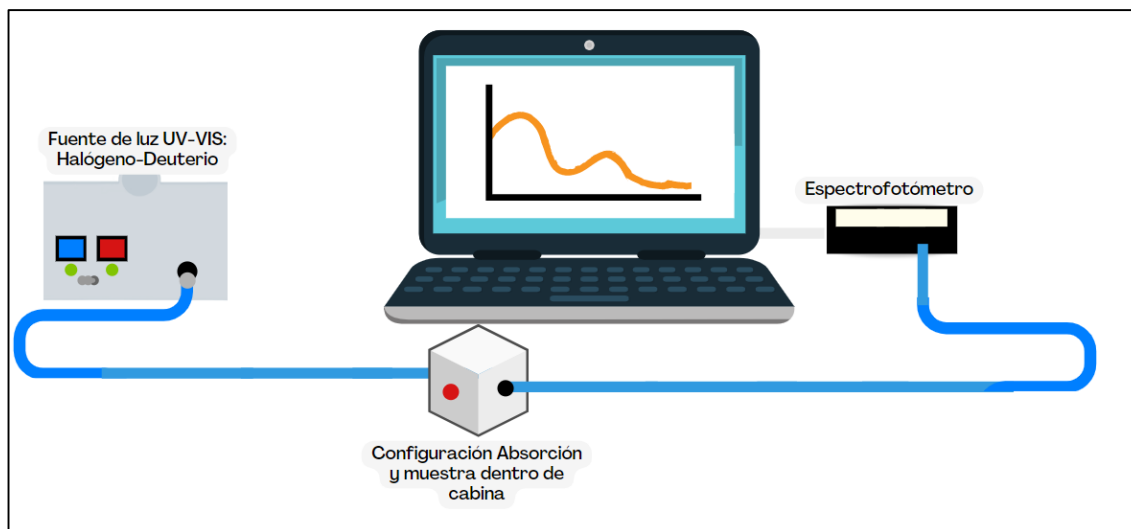


Figura 6. Esquema del montaje del espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES configurado para medir espectros de absorción

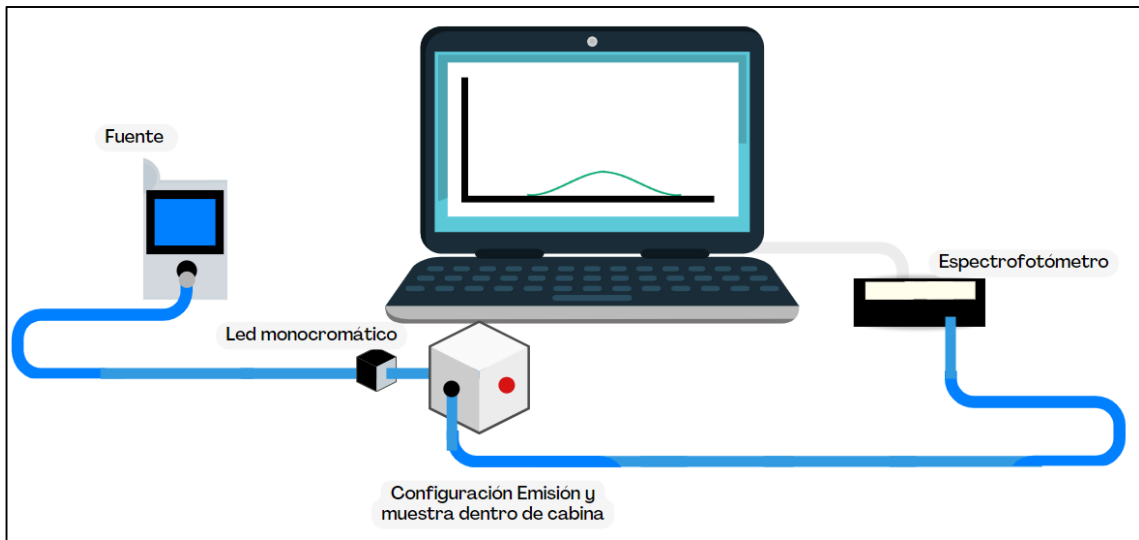


Figura 7. Esquema del montaje del espectrofotómetro FLAMES-S-XR1-ES configurado para medir espectros de fluorescencias

3.2. Pruebas de citotoxicidad

Inicialmente, los PC y los PC: Gd³⁺ se dispersan en agua destilada filtrada manteniendo una concentración de 5 mg/mL y posteriormente, las soluciones son filtradas con un filtro estéril de 0.22µm

Para los estudios de viabilidad celular se utilizaron un cultivo de células primarias de un paciente con tumor glial (G200) y la línea celular VERO, caracterizada por ser células epiteliales del riñón de un mono verde africano, las cuales se conservan en crioviales congelados a -80 °C en nitrógeno líquido. En primer lugar, se descongelan en forma rápida en el baño serológico a 37°C para transferirse a un falcón estéril con medio de cultivo (DMEM) complementado con suero bovino fetal y antibiótico (Primocin). Esta suspensión celular es centrifugada a 1500 rpm durante 10min a temperatura ambiente para descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con aproximadamente 200000 células en 10mL de medio DMEM completo. Posteriormente, se transfieren a un plato de cultivo y se incuban con una temperatura de 37°C y 5 % de CO² por 24 horas.

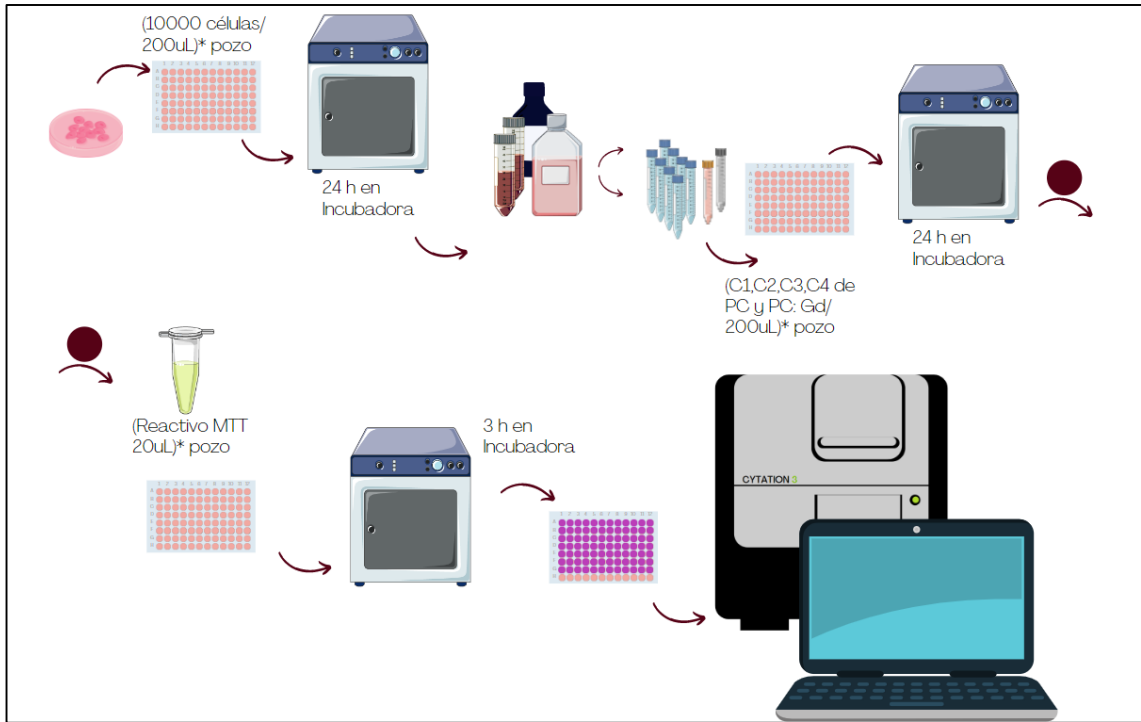


Figura 8. Esquema general del procedimiento del ensayo MTT

Para evaluar la toxicidad de los PC y PC: Gd³⁺ en las células tumorales, se lleva a cabo el protocolo del ensayo MTT, resumido en la figura 8. Las células sembradas se exponen a las concentraciones que se van a evaluar de (5, 50, 150 y 250) µg/mL, el control positivo, es la exposición de las células al tratamiento con peróxido de hidrógeno y el control negativo, las células sin ninguna exposición a tratamiento. Las condiciones se repiten cada una en 3 pozos para adquirir sus 3 respectivas replicas técnicas. Pasado un periodo de incubación de 24 h, se añade 20 µL de la solución de MTT compuesto del reactivo MTT y PBS a una concentración de 5mg/mL y se incuba nuevamente 3 horas para que sea metabolizado.

Se succiona el medio y adecuan los pozos agregando 200 µL de DMSO para que, finalmente, se lea la densidad óptica, midiendo el producto resultante a 560nm y 670nm en el Lector Multimodal Cytation 3 (Figura 9) [35]

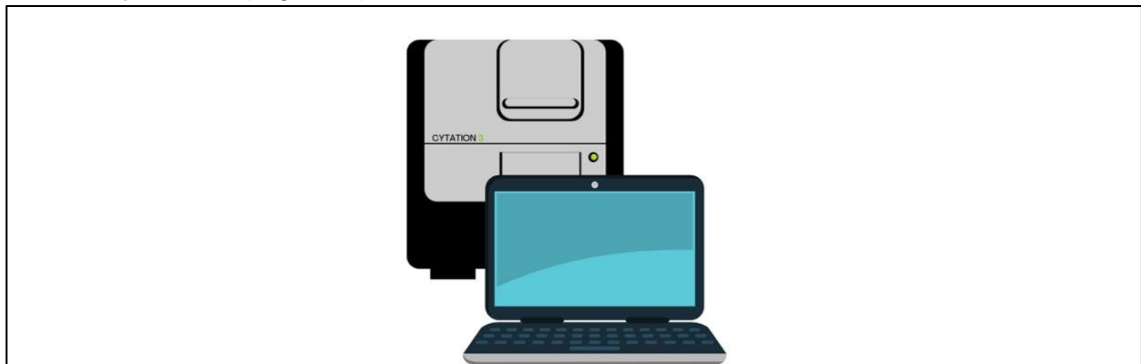


Figura 9. Representación del equipo Cytation 3

3.3. Análisis estadístico

Con la finalidad de comparar los ensayos realizados, se recopilaron al menos 3 réplicas, correspondiente al número total de pruebas alcanzadas para la línea celular VERO y el cultivo de células primarias G200. Posteriormente, se realizan cinco pruebas estadísticas para el análisis de las pruebas de citotoxicidad.

Comenzó con la prueba de normalidad, que determinó si los datos son paramétricos y sus distribuciones presentaron un comportamiento normal, seguido por las pruebas ANOVA, que compararon los resultados entre las 10 variables determinadas para el ensayo MTT. Las cuales son, el control negativo, el control positivo, las concentraciones de (5, 50, 150 y 250) $\mu\text{g/mL}$ de PC y las mismas concentraciones de PC: Gd^{3+} . A partir de la prueba de variabilidad se adquirieron valores relevantes para el análisis como los promedios de las réplicas, los valores p (un $p > 0.05$, prueba estable) y F (un F cercano a 0, poca variabilidad).

Las pruebas T student y Cohen d, se ejecutaron para examinar las diferencias de la viabilidad celular entre concentraciones y si afectan este cambio de la viabilidad.

Finalmente, se realiza la prueba bayesiana utilizando los datos del control negativo como referencia para comparar las diferencias de los datos arrojados por cada una de las concentraciones de los PC y PC: Gd^{3+} en las 2 líneas celulares trabajadas, que a partir de sus resultados determinó si el número de pruebas de citotoxicidad realizadas evidenció una buena potencia estadística.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en las etapas planteadas en la metodología. Contiene el establecimiento de los parámetros necesarios para realizar las pruebas de citotoxicidad, incluyendo las características de los PC y PC: Gd³⁺, los cuales van a ser los tratamientos que se van a evaluar a diferentes concentraciones, los resultados de las pruebas de citotoxicidad a partir de los ensayos MTT y finalmente el análisis entre todas las pruebas.

4.1. Síntesis y caracterización de los PC y PC: Gd³⁺

Tabla 1. Tabla con los pesos, la suma y el promedio de las masas obtenidas de PC y PC: Gd³⁺

Masas de PC (mg)		Masas de PC: Gd ³⁺ (mg)	
4	3,1	5,1	5,7
4,4	3,5	5,7	4,9
3,5	5	3,5	4,8
4	6	5,2	3
4,8			
Suma de masas			
32,3		30,1	
Promedio de masas			
4,04		5,02	

Al finalizar el proceso de síntesis, se obtuvo un valor de masa promedio entre 4 a 5 mg, en una relación de 6mL de mezcla inicial antes de reaccionar, el cual se determinó con los valores de masa final descritos en la tabla 1 y permitió seguir con la obtención de los resultados de las propiedades ópticas de los PC y PC: Gd³⁺.

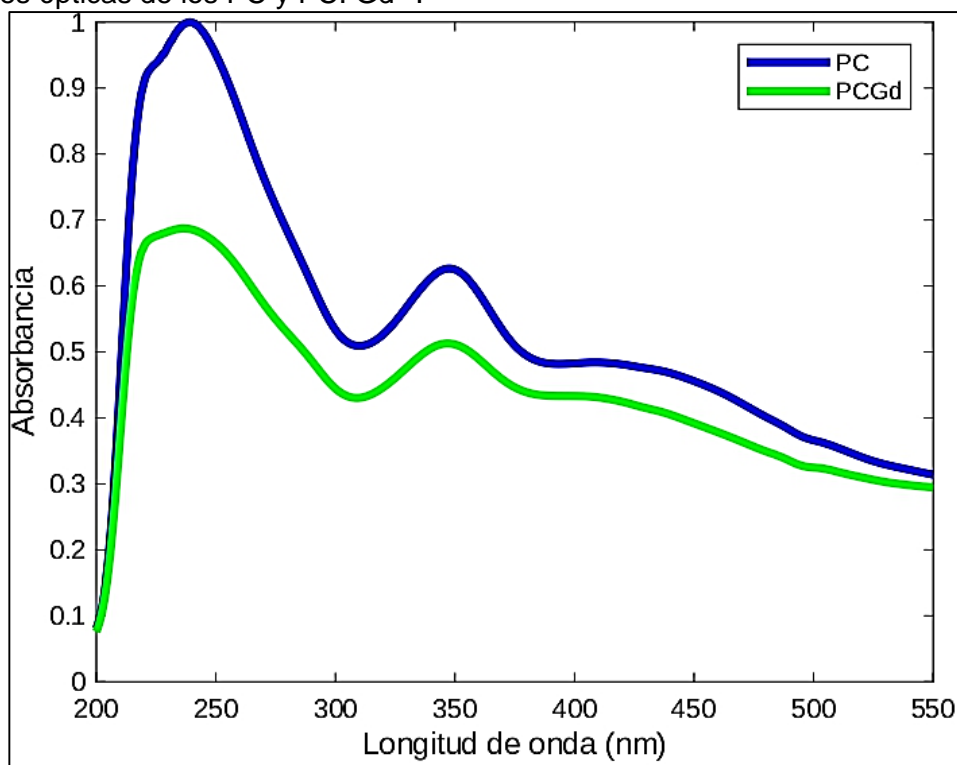


Figura 10. Espectro de absorción de PC y PC: Gd³⁺

Los espectros de absorción obtenidos de la espectroscopia por absorbancia de los PC y PC: Gd³⁺, se visualizan en la figura 10. Realizando la comparación entre las dos señales, se mantienen las tres bandas características de los PC estudiados, correspondientes a las interacciones entre los enlaces C=C, C=O y C=N, respectivamente. Estas interacciones se producen entre los elementos que aportan los reactivos precursores de la síntesis, formándose en el núcleo y en la superficie de los puntos de carbono [44]. Es importante señalar que, aunque los puntos de carbono con iones gadolinio fueron modificados al agregarles el precursor de este elemento complementario no afectó la estructura y la formación de las bandas. Además, su disminución de la intensidad es evidenciada por la formación de enlaces que disminuyeron al interactuar con los iones gadolinio.

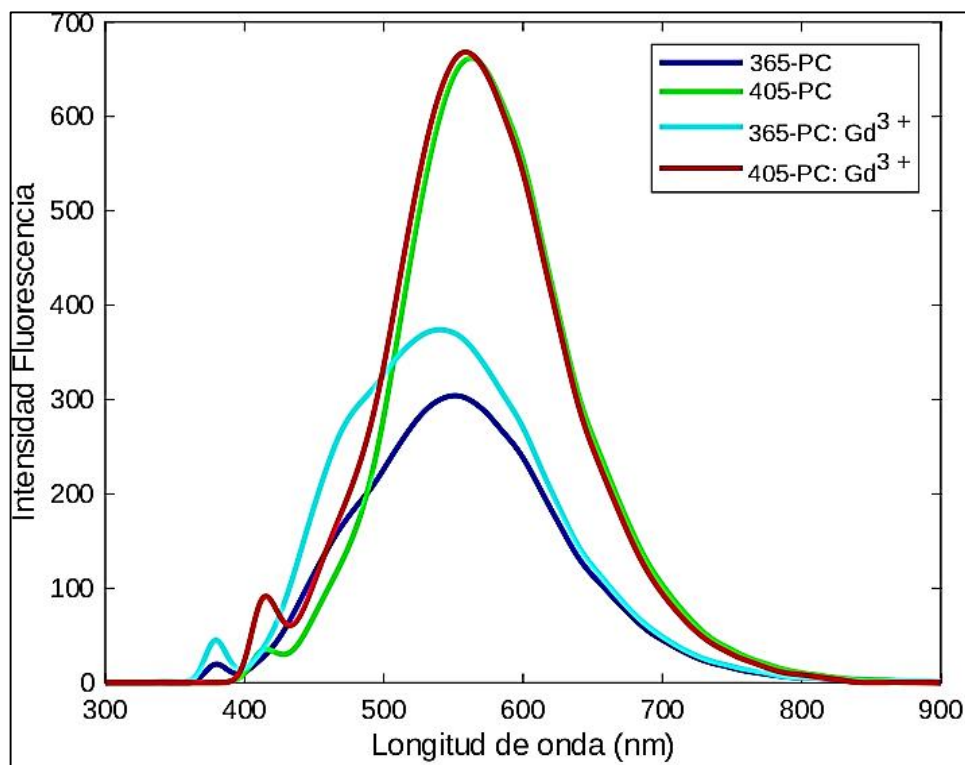


Figura 11. Espectro de fluorescencia de PC y PC: Gd³⁺

A partir de la exposición de las longitudes de excitación de 365 nm en PC y PC: Gd³⁺ se reportan los rangos que abarca la fluorescencia de 400nm a 700nm y en la longitud de 405nm un rango de 430nm a 730nm, presentando diferencias en el aumento de intensidad generado por PC respecto PC: Gd³⁺ con el diodo de 365nm y a 405nm (Figura 11).

En la figura 12, se visualiza el espectro infrarrojo de los PC y los PC: Gd³⁺ que permite conocer los grupos funcionales superficiales. El comportamiento de las vibraciones evidenciado entre los PC y PC: Gd³⁺ es comparable y similar, debido a que presentan los mismos componentes de sintetización, y a pesar de la pasivación realizada al segundo tipo de puntos de carbono. Los grupos funcionales encontrados en la superficie de los PC son los ácidos carboxílicos, radicales metilos y las amidas, provenientes de los reactivos, ácido cítrico y dimetilformamida, que dominan una banda amplia e intensa aproximadamente de 3400 a 2400 cm⁻¹ y corresponde a las vibraciones tipo tensión de los enlaces O-H, C-H y N-H. Este tipo de vibraciones se caracterizan

por los cambios entre la distancia de los átomos que interactúan. Los grupos funcionales presentes entre las vibraciones generadas en 1690 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} se visualizan gracias a las vibraciones de los enlaces $\text{C} = \text{O}$ de grupos carbonilos y, aminas aromáticas con enlaces $\text{C} = \text{N}$ y $\text{N} = \text{O}$ [43].

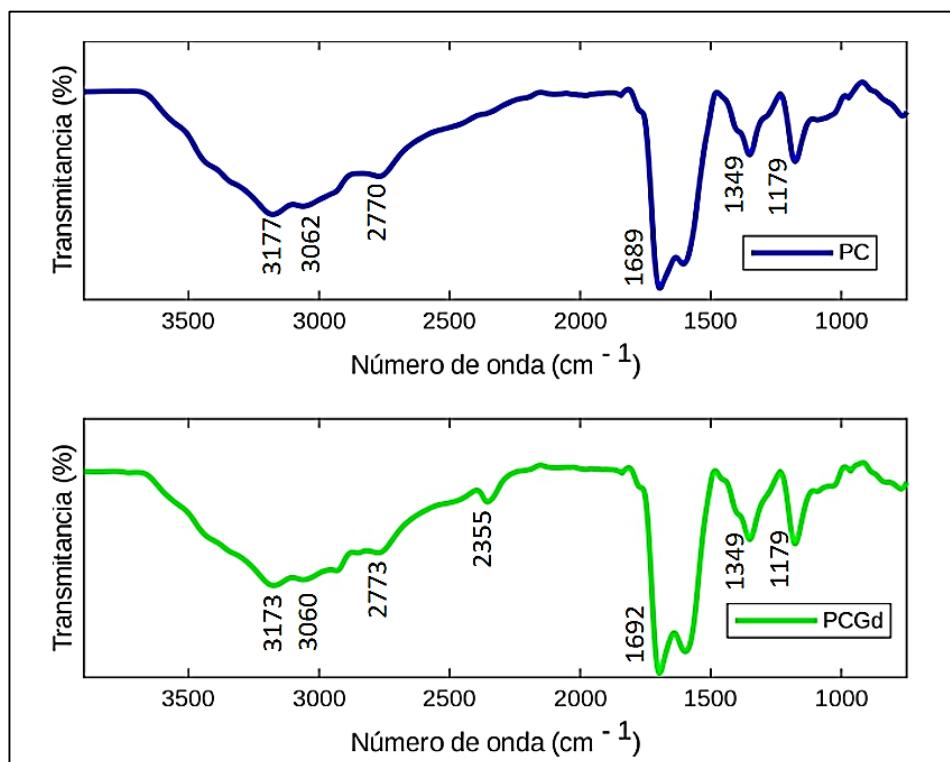


Figura 12. Espectro de FTIR de PC y PC: Gd^{3+}

4.2. Pruebas de citotoxicidad

Para las pruebas de citotoxicidad, se realizó el ensayo MTT con las células cancerosas del cultivo primario de un tumor glial nombrado G200 y la línea celular VERO en condiciones normales, utilizada como representación de las células sanas. Cada prueba se realizó en 3 días en total (Figura 13).

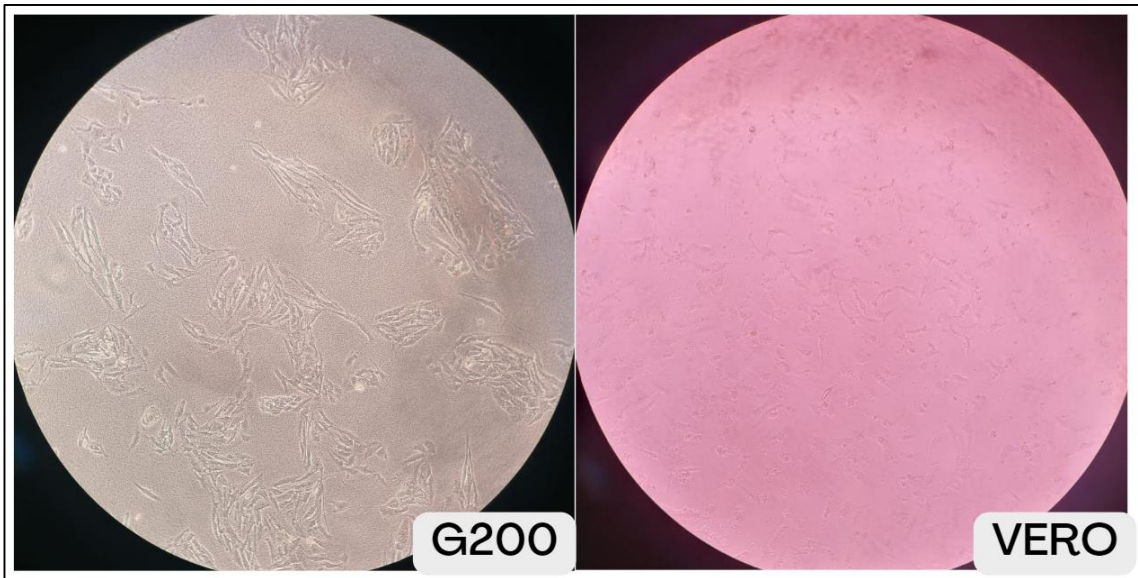


Figura 13. Imagen de microscopio de cultivo primario de un tumor glial nombrado G200 y la línea celular VERO en condiciones normales.

El primer día correspondió al sembrado de células y procedimiento de mantenimiento celular para posteriores pruebas (Figura 14)

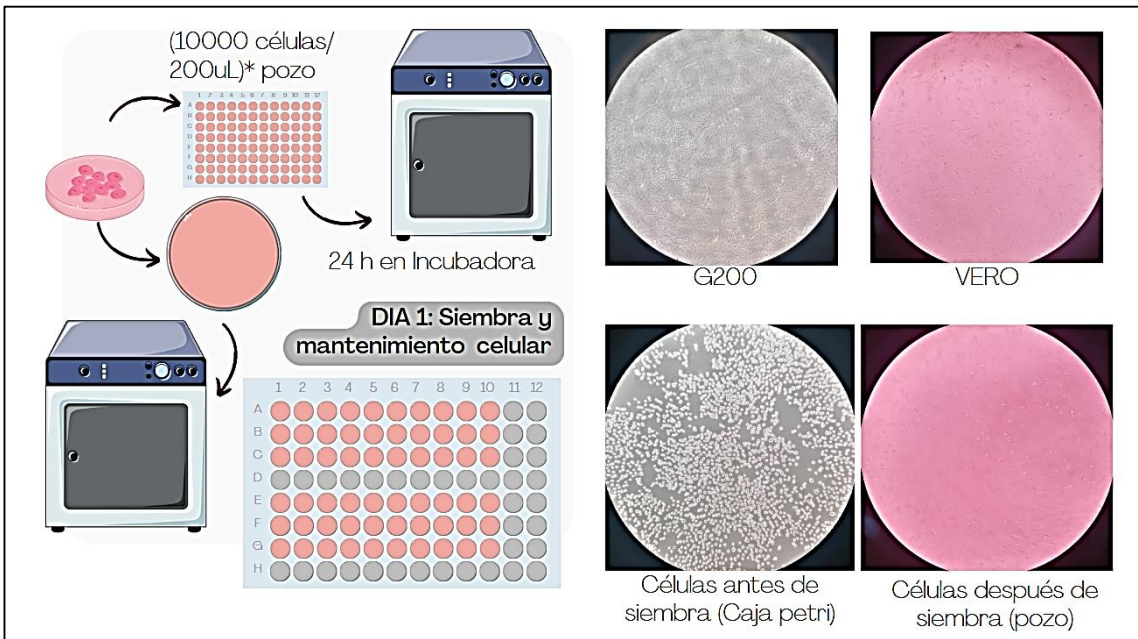


Figura 14. Diagrama del proceso realizado en el día 1 del ensayo MTT e imágenes reales de microscopio de cultivo primario de un tumor glial nombrado g200 y línea celular VERO

Los parámetros principales para la ejecución de las actividades del día 1, comprendieron que, primero, la confluencia del cultivo celular estuviera en un valor superior al 70% y/o con la cantidad superior de 500000 células para el desarrollo de la prueba y la reserva para pruebas posteriores; que dependía de la frecuencia de ejecución de pruebas entre la semana, ya que por cada prueba de MTT se necesitaron 350000 células contadas.

Seguido, la permanencia de las condiciones que no afectara el comportamiento celular con la preparación de los materiales e instrumentos que se utilizaron, en los que se incluyen, los protocolos de trabajo en el área de cultivo y la temperatura de 37°C con la que se trabajó para manipular las células en los diferentes procedimientos.

Dentro del sembrado celular en la caja de 96 pozos y el pase celular, se desplegaron los pasos en común de mantenimiento celular, con la limpieza de las células que están adheridas a la caja Petri, continuado por la separación de las células que permite efectuar el conteo y la distribución para los dos procedimientos, gracias al efecto la solución de enzimas proteolíticas y colagenolíticas (Accutase) incubando a 37°C por 5 min para esperar la respuesta celular de desprendimiento celular.

El contador de células permitió determinar la cantidad de volumen necesario que contenían las 300000 células para los 30 pozos de la prueba, que dependió de la viabilidad celular calculada por el software, utilizando la cámara de Neubauer. Esta alícuota medida se dispersaba homogéneamente en el DMEM necesario para alcanzar el volumen total de 6 mL que disminuye los errores entre las réplicas, distribuyendo 200 µL con aproximadamente 10000 células por cada pozo.

Adicionalmente a la posterior incubación que se les realizó a las células para su adherencia, los días 1 de la prueba culminaron con la distinción de las cajas marcando el número de pase realizado y la nominación de las células utilizadas, trabajando en un rango de pases celulares del sexto al doce.

El segundo día, se incorporaron los tratamientos con los puntos de carbono que comienzan a interactuar con las células, a las concentraciones de (5, 50, 150 y 250) µg/mL, teniendo en cuenta que se establecieron el control negativo como las células sin puntos de carbono y el control positivo, exponiendo a las células, la solución de medio DMEM con peróxido de hidrógeno al 10%. (Figura 15)

Del mismo modo que en el día 1, fue primordial brindarles a las células una interacción que mantenga las condiciones de temperatura y cumpliendo los protocolos de trabajo en el área de cultivo. Posterior a la preparación de los materiales, los instrumentos y el espacio, se desechó el medio de las células adheridas sembradas en los días 1 y como se observa en la figura del día 2 se agregaron 3 réplicas técnicas de 200 µL de cada concentración de PC y PC: Gd³⁺.

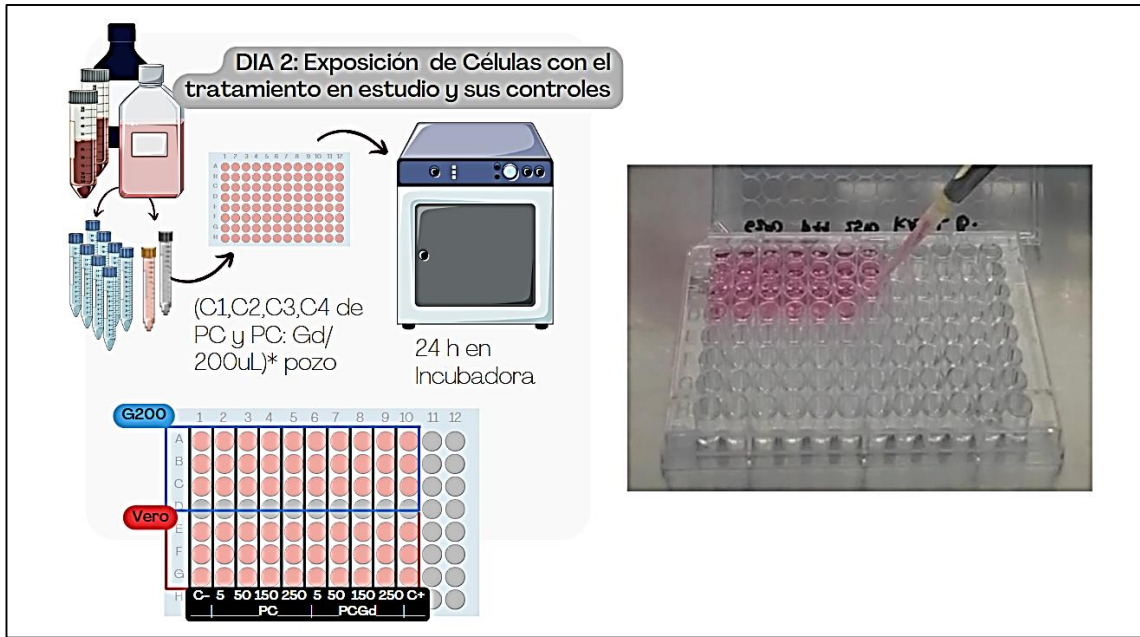


Figura 15. Diagrama del proceso realizado en el día 2 del ensayo MTT e imagen real de aplicación de medio con células en Caja de 96 pozos, comparable a la aplicación de medio con PC y PC: Gd³⁺

En el último día, se cumplió con la medición de la densidad óptica de la cantidad de formazán proveniente de las células que sobrevivieron o no al tratamiento con los PC como se observa en la figura 16.

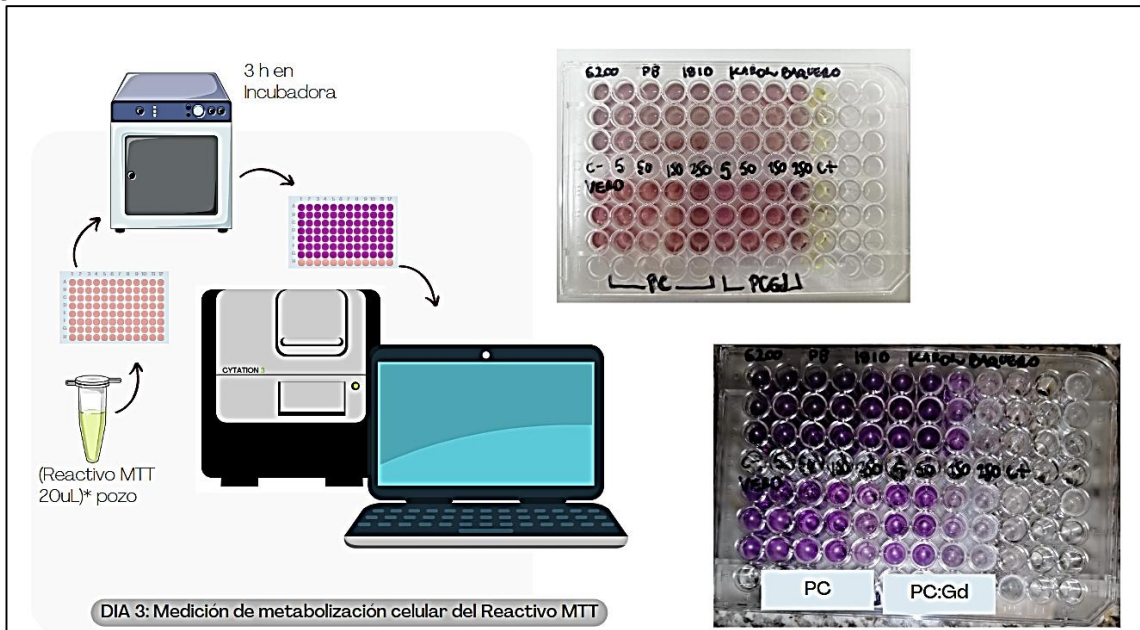


Figura 16. Diagrama del proceso realizado en el Día 3 del ensayo MTT e imágenes reales de la caja de 96 pozos, antes y después de la incubación que permitió la formación de formazán a partir de la metabolización mitocondrial del reactivo MTT

La primera parte de tercer día y al igual que en los días anteriores, se preservaron las condiciones de temperatura de los materiales y el espacio, siguiendo con la preparación de la concentración del reactivo MTT que fue agregado a continuación, aplicando 20 μL en cada pozo.

Pasadas las 3 horas de incubación, la tonalidad del medio con el reactivo MTT cambió de rosado-naranja a naranja-café, variando la intensidad visible de la coloración dependiendo la concentración observada, proveniente de la coloración violeta representativa de la producción de Formazán. Esta variación característica se mantuvo luego del desecho del medio de los pozos y la mezcla homogenizada del producto resultante con 200 μL de DMSO por cada pozo.

4.3. Análisis estadístico

En los anexo1 y anexo2, se incluyen los resultados de los valores normalizados de todas las pruebas realizadas, con los dos cultivos que se emplearon, 6 ensayos MTT con G200 y 3 ensayos MTT con VERO. Adicionalmente, en la figura 17 se muestran los resultados obtenidos por uno de los ensayos MTT que se realizaron para evaluar el efecto citotóxico de los PC y PC: Gd^{3+} .

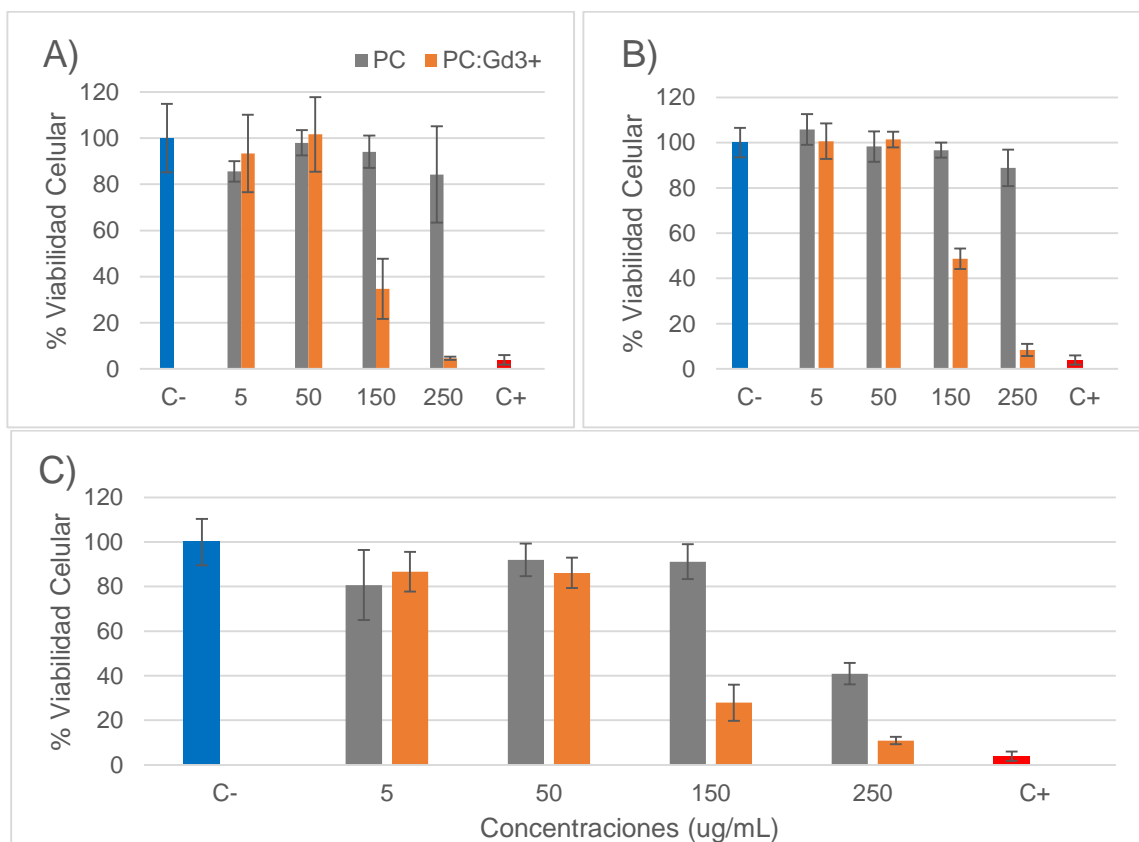


Figura 17. Gráficas de barras de error de la medición de la absorbancia del formazán para los ensayos MTT en células A) G200-pueba 1, B) G200-pueba 3 y C) VERO-pueba 1

Como se contempla en la figura 17 y comparando las gráficas A y B, a medida que se realizaron las pruebas de citotoxicidad, se evidenció la disminución de las desviaciones estándar que proviene de la enseñanza y práctica de la ejecución de los ensayos MTT.

Refiriéndose a las variables estudiadas, la conducta general de los resultados de la formación de formazán en PC: Gd³⁺, a medida que aumentaba las concentraciones evidenciaron un descenso más pronunciado respecto a los resultados en PC y, si se considera desde los dos grupos de células estudiadas, entre las variables se exhibió un comportamiento similar.

Luego de la recopilación de datos, en los anexos 3 y 4, las pruebas estadísticas que se llevaron a cabo incluyeron, el análisis de 3,4,5 y 6 réplicas realizadas para el cultivo de células primarias G200 y el análisis con 3 réplicas para la línea celular VERO.

4.3.1. Prueba ANOVA

La prueba ANOVA se hizo con el objetivo de hacer el análisis de varianza entre réplicas para evaluar cómo se distribuyeron los resultados y si es posible, realizar más pruebas o si a partir de los datos recolectados, se deducía que no eran comparables. Teniendo como marco de referencia el comportamiento de los resultados del control negativo y el control positivo, para confirmar y desestimar la última declaración y darle sentido el realizar las pruebas posteriores.

Haciendo alusión a los resultados de viabilidad celular sin exposición a ninguna de las concentraciones con PC y PC: Gd³⁺, con el control negativo, se pueden observar dos tablas resultado de la prueba ANOVA ejecutada con los datos de las 6 réplicas (N) de los ensayos MTT en las células G200, utilizando la información obtenida por la variable control negativo, dando como resultado el promedio y la desviación estándar por cada una de las 3 réplicas técnicas realizadas (pozo). La tabla describe los promedios de viabilidad celular y la variabilidad de la compilación de los datos relacionados con la variable estudiada.

A pesar de que, en la tabla del control negativo se presentó un promedio superior a 100 en el segundo pozo con un valor de 106, las tres réplicas arrojaron valores similares. Al hacer el análisis de los promedios contando con las desviaciones estándar indica que, los datos se vinculan, pero cuando analizamos la varianza de los resultados con F igual a 4 y p igual a 0.04, la prueba reporta resultados inestables.

Respecto a los resultados del control positivo, obtuvieron bajos promedios de viabilidad, que hacen referencia a que se presentaron células muertas que no sobrevivieron al efecto citotóxico del peróxido de hidrógeno y al momento de interactuar con el reactivo MTT se evidenció la ausencia de Formazán. El valor p superior a 0.05 y la variabilidad con un F de 0.1, mostró la estabilidad de los datos y que las réplicas mantienen un patrón afín de comportamiento entre los mismos experimentos.

Respecto a las cuatro concentraciones de PC, en PC_5 referenciando los puntos de carbono con 5 µg/mL, se mantienen valores promedio de viabilidad cercanos y superiores a 90, con elevación de los valores de desviación estándar, valores p superiores a 0.05 y al mismo tiempo no hay diferencia estadísticamente significativa en F de varianza y manteniendo los comportamientos de la técnica de replicación. Para PC_50, teniendo en cuenta que en el pozo 2 se contó con la réplica faltante, se presentó una diferencia en la desviación estándar marcada respecto a los otros dos pozos que sí presentaron valores de resultado en las 6 réplicas de las pruebas realizadas. No obstante, los resultados en los promedios obtenidos presentaron resultados similares y superiores a 90.

Para los PC_150 y PC_250, la viabilidad disminuyó, las desviaciones estándar aumentaron, se mantuvieron la similitud en las réplicas y no hubo diferencias estadísticamente significativas

Para el análisis de los puntos de carbono con Gadolinio, se presenta PCGd_5 y PCGd_50, tienen una viabilidad más alta, no hay diferencias entre réplicas y no hay diferencias estadísticamente significativas. En PCGd_150 y PCGd_250, los promedios y las réplicas mantuvieron la similitud en los resultados, sin embargo, se observó que los promedios que representan la viabilidad celular pasaron de valores superiores de 90 en las concentraciones de 5 y 50 a valores de 28 y posteriormente, a valores inferiores de 10 evidenciando el impacto del tratamiento con puntos de carbono con gadolinio.

En resumen, los resultados del análisis de la variabilidad para todas las concentraciones de PC y PC: Gd³⁺, evidenciaron replicabilidad.

En los resultados para las células VERO el control negativo se comportó con valores de viabilidad altos y variabilidad baja, al igual que el control positivo, sin embargo, estos últimos mantuvieron la tendencia de la viabilidad inferior a 10, como se esperaba.

Comparando los resultados de G200 con las VERO la viabilidad disminuye para todas las concentraciones y las desviaciones estándar son muy grandes, infiriendo que el comportamiento biológico podría estar afectando estos resultados, al ser una línea celular diferente a la tumoral y que entre menos replicas la variabilidad de los promedios para estas células es mayor. Pero así mismo, como uno de los objetivos es determinar la cantidad de pruebas necesarias para realizar el ensayo MTT, a partir del comportamiento de los resultados, con 3 réplicas se ven diferencias significativas grandes en esta línea celular, VERO, que al igual se va a confirmar con las posteriores pruebas estadísticas.

4.3.2. Prueba de normalidad, T Student, Cohen d

Utilizando la prueba de normalidad para analizar las distribuciones de las variables y consecutivamente el control negativo que son nuestros valores de base respecto a las concentraciones de PC y PC: Gd³⁺, se evidencia a partir de los valores de p que casi todas tienen comportamientos de distribución normal exceptuando los resultados de PC_250 y PCGd_250 que tienen una distribución no normal.

Para saber si es necesario realizar el análisis con la estadística bayesiana se debió tener en cuenta las estimaciones de d cohen que estima el valor del tamaño del efecto del control negativo respecto a cada una de las concentraciones de PC y PC: Gd³⁺. Adquiriendo que en PC_5 y PC_50, no hay diferencias pero en PC_150 y PC_250, se obtuvieron valores de 24.9% de 1.227 con 6 réplicas. En el análisis de las concentraciones de los puntos de carbono con gadolinio hay diferencias evidentes en la concentración de 250 con las concentraciones de 5, 50 y 150, que alteran los valores de la significancia estadísticas.

Respecto al análisis estadístico con 3 réplicas no se tienen valores estadísticamente significativos al correr la prueba y justificar la ejecución del análisis bayesiano. Si se utiliza 3 réplicas para estudiar la viabilidad con células G200, se exhibe una falta de potencia estadística que no es suficiente para demostrar que hay un efecto en la viabilidad celular debido a que la cantidad de las réplicas es limitada. Los promedios no cambian entre ellos y las desviaciones estándar son muy grandes

Las diferencias tuvieron un valor proporcional de aumento al incluir 4, 5 y 6 réplicas y la d de cohen fue mayor, uno de los factores fue el resultado faltante en la prueba 4. En el caso de la concentración de 250 el tamaño de efecto ya se considera elevado, considerando que los valores no van a cambiar, para que finalmente, utilizando 6 réplicas presentaron diferencias significativas entre las concentraciones, permitiendo diferenciarlas y evaluar sus resultados frente al aumento

de la concentración de los puntos de carbono como tratamiento. En el caso de la línea celular VERO, como se observó en la prueba de varianza las diferencias entre las concentraciones, también evidenció diferencias significativas con 3 réplicas.

4.3.3. Análisis Bayesiano

Al realizar el análisis condicional bayesiano en el cultivo primario G200, se buscó evaluar las diferencias con el efecto del comportamiento de las concentraciones de PC y PC: Gd³⁺ en las células dado el control negativo con las 6 réplicas en el caso de G200 y con las 3 réplicas en VERO. La evidencia de que sucede el evento es moderada entre el control negativo comparado con 5 y 50, sin embargo, se observa en las gráficas que si se agregan más réplicas van a encontrar menos diferencias. Al faltar el dato de la cuarta prueba en la concentración de 150, hay una diferencia en el comportamiento de la tendencia que se normaliza al comportamiento anterior. Para la concentración de 250, la hipótesis nula es completa, haciendo referencia a que, si se agregan más réplicas, en el estudio de esta concentración no van a cambiar los resultados obtenidos. Por último, en el análisis de los datos de puntos de carbono con gadolinio en las células G200, PC y PC: Gd³⁺ en la línea celular VERO, mostraron una diferencia significativa alta en el efecto de las concentraciones, en el caso de las diferentes concentraciones de PC se visualizaron el comportamiento parecido en sus gráficas de distribución.

5. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

Para trabajos futuros se recomienda incluir en la caracterización de los puntos de carbono, las pruebas que permitan conocer la morfología y tamaño de PC y PC: Gd³⁺ con el objetivo de complementar la información y verificar las características de los puntos de carbono. Se debería realizar siguiendo el mismo protocolo de síntesis.

Al realizar las pruebas estadísticas a los resultados de la exposición de los tratamientos con puntos de carbono en células G200, se propone hacer una nueva réplica para analizar si la variación entre las réplicas disminuye en la variable de PC_150, que presentó el dato faltante. Así mismo, es importante verificar que los datos resultantes del análisis de la densidad óptica estén completos y en el caso de que evidencien datos faltantes es necesario repetir la prueba para que no vaya a afectar el análisis.

Por último, luego de realizar las pruebas de normalización, d de cohen y bayesiana, se debería realizar al menos dos réplicas más de los ensayos MTT con células VERO, para verificar el resultado obtenido con un aumento en la potencia estadística.

6. CONCLUSIONES

La investigación respecto a cuáles son las variables que pueden influir en el comportamiento del ensayo MTT, permitió establecer los parámetros que se iban a evaluar en la prueba de citotoxicidad, incluyendo la presencia del gadolinio en los puntos de carbono, las 4 concentraciones de PC y PC: Gd³⁺, y el efecto en la línea celular VERO y en un cultivo de células tumorales de tejido glial.

Luego de la realización de las pruebas de citotoxicidad se recopilaron la información de los resultados en dos bases de datos conteniendo las 6 réplicas de ensayo MTT con G200 y 3 réplicas con VERO respectivamente, las cuales a su vez incluyen la información del número de réplica, la réplica técnica a la que pertenece los resultados y las absorciones resultado de la exposición de las concentraciones de los puntos de carbono con y sin gadolinio, que permite realizar el análisis de la validez del ensayo MTT por medio de las pruebas estadísticas

Las pruebas estadísticas realizadas a las bases de datos con la información del trabajo experimentado de los ensayos MTT con G200 y VERO para PC y PC: Gd³⁺, demostraron un comportamiento que evidencia la reproducibilidad de la prueba al tener valores $p > 0.05$ y valores pequeños de F, seguido por la comparación en el análisis de las concentraciones de PC: Gd³⁺ respecto a las de PC con G200 que mostraron la disminución progresiva de la viabilidad celular a medida que aumentaba la concentración.

Por último, los diferentes comportamientos de los resultados respecto a G200 y VERO que luego de analizar la variabilidad y los resultados en las diferentes pruebas estadísticas, permitieron llegar a la conclusión que, en VERO 3 réplicas, en G200 para evaluación de la concentración de 250 y G200 con 6 réplicas teniendo en cuenta todas las concentraciones, muestran diferencias significativas y reproducibilidad de las pruebas que permite determinar la validez de la prueba de citotoxicidad con el ensayo MTT utilizando PC y PC: Gd³⁺ en la línea celular VERO y el cultivo de células primarias de un paciente con tumor glial.

REFERENCIAS

- [1] Sun Y, Zhao D, Wang G, Wang Y, Cao L, Sun J, Jiang Q, He Z. Recent progress of hypoxia-modulated multifunctional nanomedicines to enhance photodynamic therapy: opportunities, challenges, and future development. *Acta Pharm Sin B*. 2020 Aug;10(8):1382-1396. doi: 10.1016/j.apsb.2020.01.004. Epub 2020 Jan 13. PMID 32963938; PMCID: PMC7488364.
- [2] Gyamfi J, Kim J, Choi J. Cancer as a Metabolic Disorder. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 21;23(3):1155. doi: 10.3390/ijms23031155. PMID: 35163079; PMCID: PMC8835572.
- [3] Ngwa W, Boateng F, Kumar R, Irvine DJ, Formenti S, Ngoma T, Herskind C, Veldwijk MR,
- [4] Hildenbrand GL, Hausmann M, et al. Smart radiation therapy biomaterials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017;97:624–37.
- [5] Martin OA, Martin RF. Cancer radiotherapy: understanding the price of tumor eradication. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:261. doi: 10.3389/fcell.2020.00261
- [6] Adams GE. Chemical radiosensitization of hypoxic cells. *Br Med Bull*. 1973;29(1):48–53. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a070956
- [7] Ma N, Wu FG, Zhang X, Jiang YW, Jia HR, Wang HY, Li YH, Liu P, Gu N, Chen Z. Shape-
- [8] dependent radiosensitization effect of gold nanostructures in cancer radiotherapy: comparison of gold nanoparticles, nanospikes, and nanorods. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9:13037– 48. 21.
- [9] Choi HS, Liu W, Liu F, Nasr K, Misra P, Bawendi MG, Frangioni JV. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. *Nat Nanotechnol*. 2010;5:42–7.
- [10] F. Simeone, A. Costa, “Quantifying uncertainty in dose–response screenings of nanoparticles: a Bayesian data analysis”. *Nanotoxicology*, p. 1-17, 2022
- [11] Sun Y, Zhao D, Wang G, Wang Y, Cao L, Sun J, et al. Recent progress of hypoxia-modulated multifunctional nanomedicines to enhance photodynamic therapy: opportunities, challenges, and future development. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2020 [citado el 28 de octubre de 2022];10(8):1382–96. Disponible en:<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2020.01.004>
- [12] Kwatra, A. Venugopal, S. Anant, “Nanoparticles in radiation therapy: A summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer”, *Transl. Cancer Res*. 2, 330–342, 2013, doi: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.201.08.06>
- [13] F. Du, M. Zhang, A. Gong, Y. Tan, J. Miao, Y. Gong, S. Zou, L. Zhang, L. Zhang, C. Wu, M. Sun, H. Ju, Engineered gadolinium-doped carbon dots for magnetic resonance imaging-guided radiotherapy of tumors, *Biomaterials*. 121 (2017) 109– 36 120. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.008>
- [14] D. Fengyi, et al. "Engineered gadolinium-doped carbon dots for magnetic resonance imaging-guided radiotherapy of tumors." *Biomaterials*, Vol 121, pp. 109-120, 2017.
- [15] Y. Rodriguez, “Evaluación de la citotoxicidad de puntos de carbon (CD) en las líneas celulares tumorales U-87 Y MCF-7”. 2021.
- [16] S.B. de M. Barros, *Toxicología, Rev. Bras. Ciências Farm.*Vol. 38. pp. 500–500, 2002, Doi:<https://doi.org/10.1590/s1516-93322002000400015>.
- [17] M. Ghasemi, et al. "The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis." *International journal of molecular sciences*, Vol 22, no. 23 p. 12827, 2021
- [18] V. Francia, D. Montizaan, and A. Salvati, “Interactions at the cell membrane and pathways of internalization of nano-sized materials for nanomedicine,” *Beilstein, Journal of Nanotechnology*, vol. 11, no. 1, pp. 338–353, Feb. 2020, doi: 10.3762/bjnano.11.25.
- [19] D. Gong L, Zhang Y, Liu C, Zhang M, Han S. Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy. *Int J Nanomedicine*. 2021;16:1083–102.
- [20] Graham K, Unger E. Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2018 [citado el 28 de octubre de 2022]; 13:6049–58. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s140462>

- [21] Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020
- [22] ALVIS, NELSON, & VALENZUELA, MARÍA TERESA. (2010). Los QALYs y DALYs como indicadores sintéticos de salud. *Revista médica de Chile*, 138(Supl. 2), 83-87
- [23] Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*. 2019 Dec;9(4):217-222. doi: 10.2991/jegh.k.191008.001. PMID: 31854162; PMCID: PMC7310786.
- [24] Martin OA, Martin RF. Cancer radiotherapy: understanding the price of tumor eradication. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:261. doi: 10.3389/fcell.2020.00261
- [25] Ngwa W, Boateng F, Kumar R, Irvine DJ, Formenti S, Ngoma T, Herskind C, Veldwijk MR, Hildenbrand GL, Hausmann M, et al. Smart radiation therapy biomaterials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017;97:624–37
- [26] Adams GE. Chemical radiosensitization of hypoxic cells. *Br Med Bull*. 1973;29(1):48–53. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a070956
- [27] S. Zhu, Q. Meng, L. Wang, J. Zhang, Y. Song, H. Jin, K. Zhang, H. Sun, H. Wang, B. Yang Highly photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging. *Angew.Chem. Int. Ed.*, 52 (14) (2013), pp. 3953-3957
- [28] Kwatra, A. Venugopal, S. Anant, "Nanoparticles in radiation therapy: A summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer", *Transl. Cancer Res*. 2, 330–342, 2013, doi: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.06>
- [29] M. Kumari, et al. "Toxicity study of cerium oxide nanoparticles in human neuroblastoma cells". *International journal of toxicology*, 2014, vol. 33, no 2, p. 86-97.
- [30] Senthilraja, P., and K. Kathiresan. "In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF-7 cell lines study of Marine Yeast." *Journal of applied pharmaceutical science* Vol 5. no 3 pp. 080-084, 2015.
- [31] Y. Shi et al. Facile synthesis of gadolinium (III) chelates functionalized carbon quantum dots for fluorescence and magnetic resonance dual-modal bioimaging. 2021
- [32] Bonilla N, "Evaluación de las características de un hidrogel electroresponsivo basado en dextran y anilina como sistema de liberación controlada de puntos de carbono funcionalizados con curcumina", Universidad del Rosario, 2022.
- [33] Junjun Liu, Rui Li, and Bai Yang. Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications. *ACS Central Science* 2020 6 (12), 2179-2195 DOI: 10.1021/acscentsci.0c01306
- [34] M. Lancheros. "Evaluación del efecto citotóxico de puntos de carbono en células 3T3-I1 y VERO". Universidad del Rosario, 2021.
- [35] J. M. Posimo et al., "Viability assays for cells in culture", *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2, no. 83, pp. 1–14, 2014, doi 10.3791/50645
- [36] G. Fotakis, and J. Timbrell. "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride." *Toxicology letters* Vol 160 no 2 pp. 171-177, 2006.
- [37] J.-H. Liu et al., "Cytotoxicity of Fluorescent Carbon Nanoparticles," *Nano LIFE*, vol. 01, no. 01n02, Mar. 2010, doi: 10.1142/S1793984410000158.
- [38] A. Lupu, and T. Popescu. "The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO2 nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays." *Toxicology in Vitro* Vol 27 no.5 pp. 1445-1450, 2013.
- [39] C. Labelle, C., A. Marinier, and S. Lemieux. "Enhancing the Drug Discovery Process: Bayesian Inference for the Analysis and Comparison of Dose–Response Experiments." *Bioinformatics (Oxford, England)*, Vol 35 no. 14 pp. 464–473, 2019.
- [40] F. Simeone, A. Costa, "Quantifying uncertainty in dose–response screenings of nanoparticles: a Bayesian data analysis". *Nanotoxicology*, p. 1-17, 2022

- [42] A. Surin, R. Sharipov, L. Krasil, D. Boyarkin, O. Lisina, L. Gorbacheva, A. Avetisyan, V. Pinelis, "Disruption of functional activity of mitochondria during MTT assay of viability of cultured neurons". *Biochemistry*, Vol 82, pp. 737–749, 2017.
- [43] Khan, S.A., Khan, S.B., Khan, L.U., Farooq, A., Akhtar, K., Asiri, A.M. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization*. 2018. Sharma, S. (eds) *Handbook of Materials Characterization*. Springer, Cham. https://doi-org.ez.urosario.edu.co/10.1007/978-3-319-92955-2_9

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 2. Base de datos G200

R*	Po- so	C-	C+	PC_5	PC_50	PC_15 0	PC_25 0	PCGd_ 5	PCGd_ 50	PCGd_ 150	PCGd_ 250
1	A	87,4464 03	6,1934 2544	89,232 9681	98,022 868	100,59 5522	108,17 0557	107,81 3244	111,31 4912	30,776 5603	5,0500 2382
1	B	116,388 757	3,5493 0919	86,946 1648	103,38 2563	94,949 9762	74,654 5974	97,236 7794	82,944 2592	49,213 9114	4,9070 9862
1	C	96,1648 404	5,0500 2382	80,585 9933	92,448 7851	86,660 3144	69,938 0657	75,011 9104	110,60 0286	23,987 6131	3,7636 97
2	A	103,515 264	8,5106 383	117,39 1304	131,45 2359	120,25 9019	103,70 0278	135,80 0185	121,55 4117	38,020 3515	7,1230 3423
2	B	112,210 916	5,9204 4403	130,80 481	89,916 7438	95,837 1878	91,859 3895	95,929 6947	107,67 8076	34,967 6226	7,4005 5504
2	C	84,2738 205	6,0129 5097	98,704 9029	107,77 0583	129,60 222	80,943 5708	93,987 049	110,54 5791	27,567 0675	9,6207 2155
3	A	94,9915 398	15,397 6311	104,33 1641	100,37 225	94,991 5398	80,575 2961	98,037 225	103,92 555	45,651 4382	11,336 7174
3	B	97,6311 337	16,108 291	99,864 6362	90,727 5804	100,47 3773	89,407 7834	94,382 4027	102,80 8799	53,874 7885	6,1590 5245
3	C	107,377 327	11,945 8545	113,16 4129	103,72 2504	94,585 4484	96,615 9052	109,50 9306	97,428 088	46,565 1438	7,4788 4941
4	A	90,2332 362	0,8185 6919	82,529 7152	90,468 715	83,740 749	60,461 987	75,936 3086	56,223 3685	11,482 3952	3,1060 776
4	B	107,625 028	1,4240 8612	68,468 2664		66,618 0758	56,055 1693	77,887 4187	78,593 8551	16,023 7721	2,5678 4032
4	C	102,141 736	0,5158 1072	73,648 8002	83,236 1516	65,877 9996	45,795 0213	66,887 1944	74,489 7959	17,302 0857	2,9715 1828
5	A	100,169 722	1,6972 1656	90,291 9212	95,790 9029	85,454 854	69,467 074	90,546 5037	83,214 5282	16,870 3327	3,6829 5995
5	B	106,534 284	0,9843 8561	89,680 9233	88,306 1779	86,422 2675	78,377 461	109,43 6524	91,310 2512	18,295 9946	2,7664 63
5	C	93,2959 946	1,4426 3408	91,513 9172	97,725 7298	80,261 3714	75,984 3856	94,721 6565	88,408 0109	11,371 351	3,7847 9294
6	A	97,1005 223	1,1619 2304	83,605 1594	85,396 0132	96,109 1568	59,908 3253	79,383 861	72,572 2204	29,367 8712	2,4730 8389
6	B	99,8507 622	0,7781 6864	101,54 5677	85,907 6857	100,36 2435	53,896 1731	79,160 0043	51,209 8923	37,874 427	2,2172 4763
6	C	103,048 715	0,5543 1191	106,24 6669	65,600 6822	60,675 8341	54,759 6205	69,853 9601	57,317 9832	16,959 8124	2,7608 9969

*R = Réplica

Anexo 2

Tabla 3. Base de datos VERO

R*	Po- so	C-	C+	PC_5	PC_50	PC_15 0	PC_25 0	PCGd_ 5	PCGd_ 50	PCGd_ 150	PCGd_ 250
1	A	109,983 221	4,4043 6242	79,530 2013	90,352 349	97,525 1678	45,679 5302	77,768 4564	78,523 4899	19,882 5503	11,325 5034
1	B	100,796 98	5,2852 349	65,562 0805	85,570 4698	82,424 4966	36,115 7718	86,577 1812	88,464 7651	35,989 9329	12,332 2148
1	C	89,2197 987	3,2718 1208	96,895 9732	99,916 1074	93,624 1611	41,023 4899	95,637 5839	91,484 8993	27,810 4027	9,1862 4161
2	A	93,0152 484	0,4918 8392	50,614 8549	57,501 2297	50,073 7826	104,03 3448	49,139 2031	71,864 24	14,608 9523	2,8037 3832
2	B	100,147 565	0,5410 7231	55,435 3173	51,696 9995	55,976 3896	138,41 6134	49,483 5219	50,860 7969	18,691 5888	2,7545 4993
2	C	106,837 186	0,5902 607	59,813 0841	53,369 4048	54,795 8682	97,245 4501	71,569 1097	64,485 9813	17,314 3138	3,0004 9188
3	A	96,3873 5	2,1698 9843	44,759 9261	44,725 3001	39,704 5245	99,607 5716	38,769 6214	45,521 699	44,413 6657	94,690 6741
3	B	92,8208 68	2,1006 4635	50,369 3444	52,585 4109	46,421 976	97,218 3749	40,639 4275	38,596 4912	46,387 35	85,064 6353
3	C	110,791 782	1,6505 0785	54,559 0951	44,413 6657	40,397 0452	88,388 735	42,197 5993	36,103 4164	44,690 6741	75,438 5965

*R = Réplica

ANEXO 3

Análisis de datos G200

Análisis de varianzas entre réplicas (ANOVA)

Control Negativo

ANOVA - C-

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	418.583	2	209.292	4.026	0.040
Residuals	779.718	15	51.981		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - C-

Poso	Mean	SD	N
1	95.576	6.024	6
2	106.707	7.131	6
3	97.717	8.295	6

Control Positivo

ANOVA - C+

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	5.770	2	2.885	0.100	0.906
Residuals	433.888	15	28.926		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - C+

Poso	Mean	SD	N
1	5.630	5.703	6
2	4.794	5.879	6
3	4.254	4.438	6

PC_5

ANOVA - PC_5

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	16.208	2	8.104	0.029	0.972
Residuals	4204.426	15	280.295		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PC_5

Poso	Mean	SD	N
1	94.564	13.624	6
2	96.218	20.672	6
3	93.977	15.097	6

PC_50

PC: Gd3+_5

ANOVA - PCGd_5

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	504.226	2	252.113	0.829	0.456
Residuals	4563.176	15	304.212		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PCGd_5

Poso	Mean	SD	N
1	97.920	21.973	6
2	92.339	11.966	6
3	84.995	16.931	6

ANOVA - PC_50

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	283.600	2	141.800	0.737	0.496
Residuals	2692.894	14	192.350		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PC_50

Poso	Mean	SD	N
1	100.251	16.216	6
2	91.648	6.813	5
3	91.751	15.443	6

PC_150

ANOVA - PC_150

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	338.390	2	169.195	0.534	0.597
Residuals	4753.238	15	316.883		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PC_150

Poso	Mean	SD	N
1	96.858	13.174	6
2	90.777	12.896	6
3	86.277	24.714	6

PC_250

ANOVA - PC_250

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	291.545	2	145.773	0.418	0.666
Residuals	5232.635	15	348.842		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PC_250

Poso	Mean	SD	N
1	80.381	21.218	6
2	74.042	16.138	6
3	70.673	18.327	6

PC: Gd3+_50

ANOVA - PCGd_50

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	103.435	2	51.717	0.105	0.901
Residuals	7389.129	15	492.609		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PCGd_50

Poso	Mean	SD	N
1	91.467	24.986	6
2	85.758	20.272	6
3	89.798	21.036	6

PC: Gd3+_150

ANOVA - PCGd_150

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	371.088	2	185.544	0.995	0.393
Residuals	2796.841	15	186.456		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PCGd_150

Poso	Mean	SD	N
1	28.695	12.770	6
2	35.042	15.528	6
3	23.959	12.456	6

PC: Gd3+_250

ANOVA - PCGd_250

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	3.909	2	1.954	0.249	0.783
Residuals	117.815	15	7.854		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PCGd_250

Poso	Mean	SD	N
1	5.462	3.319	6
2	4.336	2.150	6
3	5.063	2.814	6

Pruebas de normalidad

Descriptive Statistics

	C-	C+	PC_5	PC_50	PC_150	PC_250	PCGd_5	PCGd_50	PCGd_150	PCGd_250
Valid	18	18	18	17	18	18	18	18	18	18
Missing	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mean	100.000	4.893	94.920	94.720	91.304	75.032	91.751	89.008	29.232	4.954
Std. Deviation	8.396	5.085	15.757	13.639	17.306	18.026	17.265	20.994	13.651	2.676
Shapiro-Wilk	0.992	0.808	0.977	0.920	0.942	0.968	0.933	0.948	0.929	0.867
P-value of Shapiro-Wilk	1.000	0.002	0.909	0.146	0.315	0.756	0.223	0.400	0.183	0.016
Minimum	84.274	0.516	68.468	65.601	60.676	45.795	66.887	51.210	11.371	2.217
Maximum	116.389	16.108	130.805	131.452	129.602	108.171	135.800	121.554	53.875	11.337

Análisis con 6 réplicas

T Student y cohen's d (control negativo vs PC)

Paired Samples T-Test

Measure 1	Measure 2	t	df	p	Mean Difference	SE Difference	Cohen's d
C-	PC_5	1.324	17	0.203	5.080	3.837	0.312
C-	PC_50	1.218	16	0.241	4.831	3.967	0.295
C-	PC_150	1.726	17	0.102	8.696	5.037	0.407
C-	PC_250	5.207	17	< .001	24.968	4.795	1.227

Note. Student's t-test.

T student y cohen's d (control negativo vs PCGd)

Paired Samples T-Test

Measure 1	Measure 2	t	df	p	Mean Difference	SE Difference	Cohen's d
C-	PCGd_5	1.910	17	0.073	8.249	4.319	0.450
C-	PCGd_50	1.991	17	0.063	10.992	5.522	0.469
C-	PCGd_150	21.316	17	< .001	70.768	3.320	5.024
C-	PCGd_250	43.825	17	< .001	95.046	2.169	10.330

Note. Student's t-test.

Descriptives

Descriptives

	N	Mean	SD	SE
C-	18	100.000	8.396	1.979
PCGd_5	18	91.751	17.265	4.069
PCGd_50	18	89.008	20.994	4.948
PCGd_150	18	29.232	13.651	3.218
PCGd_250	18	4.954	2.676	0.631

Análisis con 3 réplicas

T student y cohen's d

Paired Samples T-Test

Measure 1	Measure 2	t	df	p	Mean Difference	SE Difference	Cohen's d
C-	PC_5	-0.451	8	0.664	-2.336	5.185	-0.150
C-	PC_50	-0.360	8	0.728	-1.980	5.501	-0.120
C-	PC_150	-0.288	8	0.781	-1.995	6.934	-0.096
C-	PC_250	1.975	8	0.084	11.571	5.858	0.658

Note. Student's t-test.

Descriptives

Descriptives

	N	Mean	SD	SE
C-	9	100.000	10.810	3.603
PC_5	9	102.336	16.044	5.348
PC_50	9	101.960	12.690	4.230
PC_150	9	101.995	13.814	4.605
PC_250	9	88.429	13.000	4.333

Análisis con 4 réplicas

T student y cohen's d

Paired Samples T-Test

Measure 1	Measure 2	t	df	p	Mean Difference	SE Difference	Cohen's d
C-	PC_5	0.808	11	0.436	4.527	5.603	0.233
C-	PC_50	0.016	10	0.988	0.078	4.835	0.005
C-	PC_150	0.802	11	0.440	5.484	6.840	0.231
C-	PC_250	3.115	11	0.010	20.152	6.469	0.899

Note. Student's t-test.

Descriptives

Descriptives

	N	Mean	SD	SE
C-	12	100.000	9.968	2.877
PC_5	12	95.473	18.724	5.405
PC_50	11	99.229	12.996	3.918
PC_150	12	94.516	18.450	5.326
PC_250	12	79.848	19.345	5.584

Análisis con 5 réplicas T student y cohen's d

Paired Samples T-Test

Measure 1	Measure 2	t	df	p	Mean Difference	SE Difference	Cohen's d
C-	PC_5	1.218	14	0.243	5.523	4.534	0.315
C-	PC_50	0.340	13	0.740	1.359	4.003	0.091
C-	PC_150	1.366	14	0.194	7.578	5.549	0.353
C-	PC_250	4.073	14	0.001	21.200	5.205	1.052

Note: Student's t-test.

Descriptives

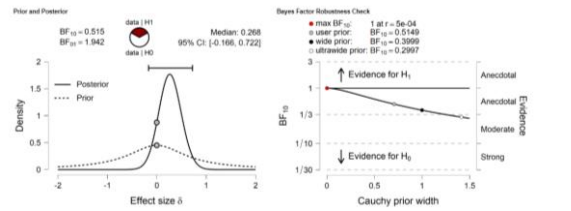
Descriptives

	N	Mean	SD	SE
C-	15	100.000	9.183	2.371
PC_5	15	94.477	16.728	4.319
PC_50	14	98.096	11.781	3.149
PC_150	15	92.422	16.966	4.381
PC_250	15	78.800	17.371	4.485

Resultados Bayesianos Control – vs pc_5

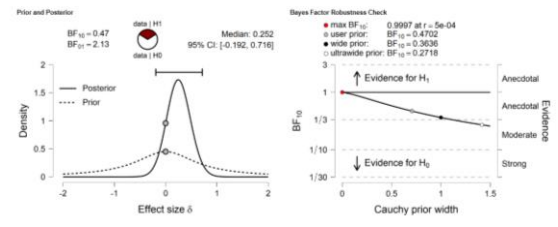
Inferential Plots

C- - PC_5



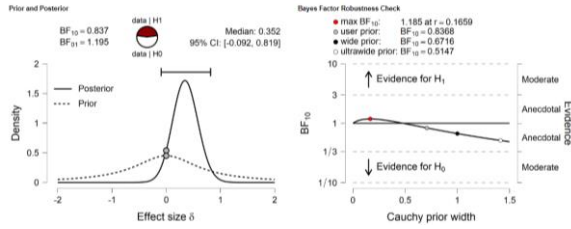
Control – vs pc_50

C- - PC_50



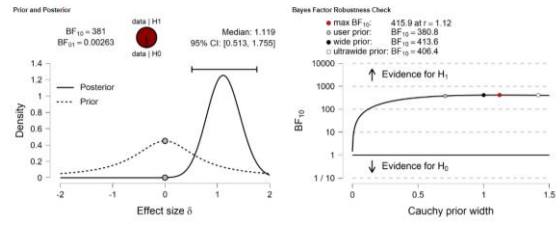
Control – vs pc_150

C- - PC_150



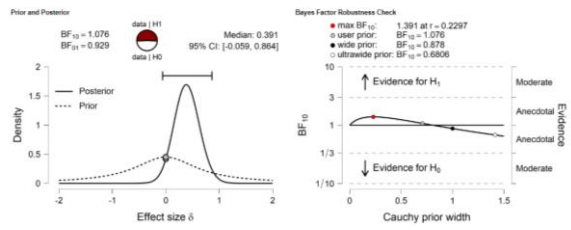
Control – vs pc_250

C- - PC_250



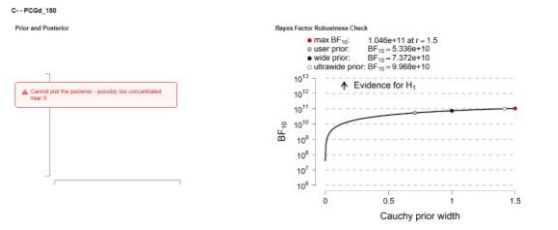
Control – vs PCGd_50

C- - PCGd_5



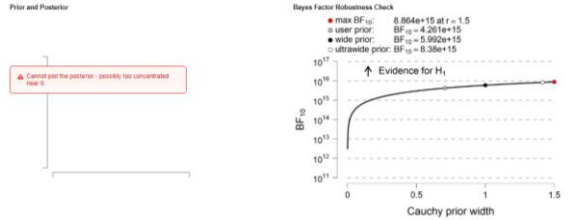
Control – vs PCGd_150

Inferential Plots



Control – vs PCGd_250

C- - PCGd_250



ANEXO 4

Análisis de datos VERO

Análisis de varianzas entre réplicas (ANOVA) Control Negativo

ANOVA - C-

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	28.718	2	14.359	0.186	0.835
Residuals	464.404	6	77.401		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - C-

Poso	Mean	SD	N
A	99.795	8.983	3
B	97.922	4.429	3
C	102.283	11.484	3

PC_50

ANOVA - PC_50

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	10.579	2	5.290	0.009	0.991
Residuals	3629.262	6	604.877		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PC_50

Poso	Mean	SD	N
A	64.193	23.538	3
B	63.284	19.306	3
C	65.900	29.797	3

PC_250

ANOVA - PC_250

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	338.894	2	169.447	0.110	0.898
Residuals	9237.322	6	1539.554		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PC_250

Poso	Mean	SD	N
A	83.107	32.488	3
B	90.583	51.472	3
C	75.553	30.229	3

PC: Gd3+_5

ANOVA - PCGd_5

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	344.791	2	172.395	0.301	0.751
Residuals	3436.772	6	572.795		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PCGd_5

Poso	Mean	SD	N
A	55.226	20.199	3
B	58.900	24.374	3
C	69.801	26.764	3

Control Positivo

ANOVA - C+

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	0.998	2	0.499	0.130	0.881
Residuals	23.047	6	3.841		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - C+

Poso	Mean	SD	N
A	2.355	1.963	3
B	2.642	2.418	3
C	1.838	1.351	3

PC_150

ANOVA - PC_150

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	2.711	2	1.355	0.002	0.998
Residuals	4112.480	6	685.413		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PC_150

Poso	Mean	SD	N
A	62.434	30.829	3
B	61.608	18.650	3
C	62.939	27.532	3

PC: Gd3+_50

ANOVA - PCGd_50

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	59.838	2	29.919	0.051	0.950
Residuals	3493.443	6	582.241		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PCGd_50

Poso	Mean	SD	N
A	65.303	17.452	3
B	59.307	25.985	3
C	64.025	27.694	3

PC: Gd3+_150

ANOVA - PCGd_150

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	81.878	2	40.939	0.192	0.830
Residuals	1278.959	6	213.160		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PCGd_150

Poso	Mean	SD	N
A	26.302	15.905	3
B	33.690	13.990	3
C	29.938	13.812	3

PC: Gd3+_250

ANOVA - PCGd_250

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Poso	75.695	2	37.848	0.018	0.982
Residuals	12432.395	6	2072.066		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives

Descriptives - PCGd_250

Poso	Mean	SD	N
A	36.273	50.770	3
B	33.384	45.012	3
C	29.208	40.156	3

Pruebas de normalidad

Descriptive Statistics

	C-	C+	PC_5	PC_50	PC_150	PC_250	PCGd_5	PCGd_50	PCGd_150	PCGd_250
Valid	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	100.000	2.278	61.949	64.459	62.327	83.081	61.309	62.878	29.977	32.955
Std. Deviation	7.851	1.734	16.595	21.330	22.680	34.598	21.742	21.075	13.042	39.541
Shapiro-Wilk	0.931	0.901	0.863	0.820	0.846	0.887	0.876	0.924	0.860	0.728
P-value of Shapiro-Wilk	0.488	0.260	0.104	0.035	0.067	0.187	0.142	0.429	0.096	0.003
Minimum	89.220	0.492	44.760	44.414	39.705	36.116	38.770	36.103	14.609	2.755
Maximum	110.792	5.285	96.896	99.916	97.525	138.416	95.638	91.485	46.387	94.691

T Student y cohen d (control negativo vs PC)

Paired Samples T-Test

Paired Samples T-Test

Measure 1	Measure 2	t	df	p	Mean Difference	SE Difference	Cohen's d
C-	PC_5	6.064	8	< .001	38.051	6.275	2.021
C-	PC_50	4.483	8	0.002	35.541	7.927	1.494
C-	PC_150	4.732	8	0.001	37.673	7.961	1.577
C-	PC_250	1.416	8	0.194	16.919	11.946	0.472

Note. Student's t-test

Paired Samples T-Test

Measure 1	Measure 2	t	df	p	Mean Difference	SE Difference	Cohen's d
C-	PCGd_5	5.011	8	0.001	38.691	7.721	1.670
C-	PCGd_50	4.685	8	0.002	37.122	7.924	1.562
C-	PCGd_150	13.342	8	< .001	70.023	5.249	4.447
C-	PCGd_250	4.946	8	0.001	67.045	13.554	1.649

Note. Student's t-test

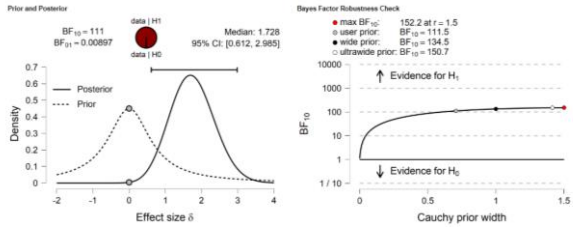
T student y cohens d (control negativo vs PCGd)

Bayesianos

Control - vs pc_5

Inferential Plots

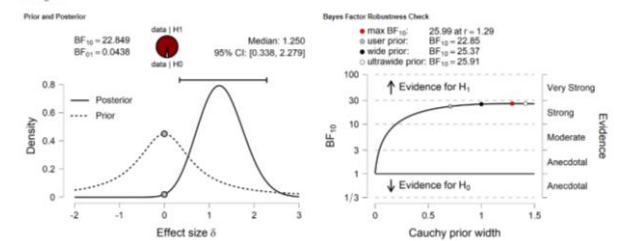
C- vs PC_5



Control - vs pc_50

Inferential Plots

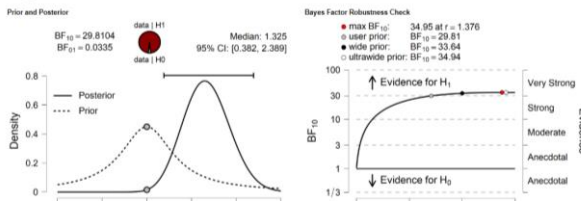
C- vs PC_50



Control - vs pc_150

Inferential Plots

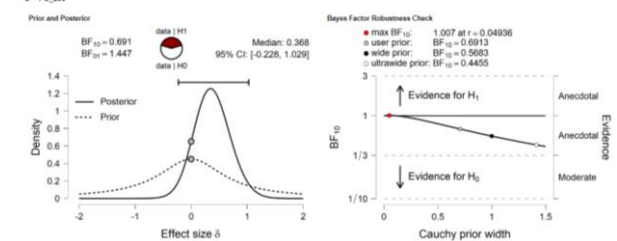
C- vs PC_150



Control - vs pc_250

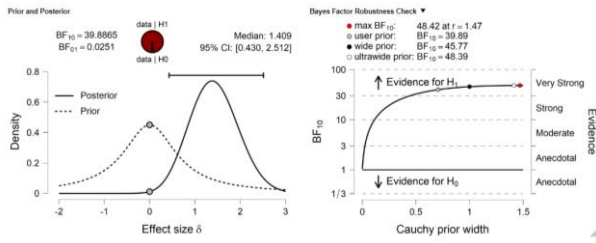
Inferential Plots

C- vs PC_250



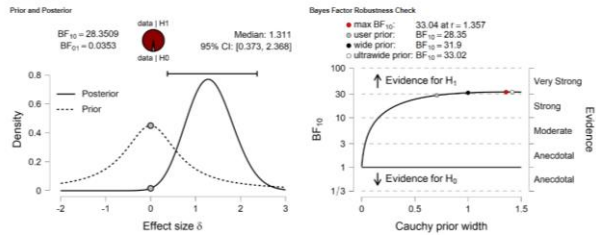
Control – vs PCGd_5

Inferential Plots
C - PCGd_5



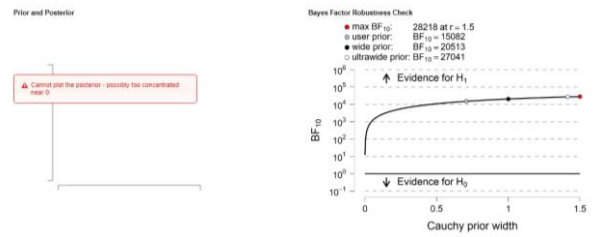
Control – vs PCGd_50

Inferential Plots
C - PCGd_50



Control – vs PCGd_150

Inferential Plots
C - PCGd_150



Control – vs PCGd_250

Inferential Plots
C - PCGd_250

