




^{99m}Tc-AgNPs-ICG: nanopartícula para imagen híbrida

^{99m}Tc-AgNPs-ICG: nanopartícula para imagem híbrida.

^{99m}Tc-AgNPs-ICG: nanoparticle for hybrid image.

 <https://doi.org/10.35954/SM2024.43.1.6.e303>


Stephanie Simois ^a  <https://orcid.org/0000-0003-0545-2180>


Agostina Cammarata ^b  <https://orcid.org/0000-0003-2828-5194>

Romina Glisoni ^c  <https://orcid.org/0000-0002-7845-1800>

Mirel Cabrera ^d  <https://orcid.org/0000-0002-5225-1106>

Marcos Tassano ^e  <https://orcid.org/0000-0001-6685-4656>

Juan Pablo Gambini ^f  <https://orcid.org/0000-0001-5368-3464>

Ximena Aida Camacho Damata ^g  <https://orcid.org/0000-0002-0755-3834>

Pablo Cabral ^h  <https://orcid.org/0000-0001-7344-2027>

(a,d,e,g,h) Universidad de la República, Facultad de Ciencias. Departamento de Radiofarmacia. Centro de Investigaciones Nucleares. Montevideo, Uruguay.

(b,c) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Tecnología Farmacéutica, Instituto de Nanobiotecnología NANOBIOTEC (UBA-CONICET). Buenos Aires, Argentina.

(f) Universidad de la República, Facultad de Medicina. Hospital de Clínicas. Centro de Medicina Nuclear e Imagenología Molecular. Montevideo, Uruguay.

Cómo citar este artículo / Citation this article / Como citar este artigo

Simois S, Cammarata A, Glisoni R, Cabrera M, Tassano M, Gambini JP, *et al.* ^{99m}Tc-AgNPs-ICG: nanopartícula para imagen híbrida. Salud Mil [Internet]. 20 de febrero de 2024 [citado DD de MM de AAAA];43(1):e303. Disponible en: <https://revistasaludmilitar.uy/ojs/index.php/Rsm/article/view/421> DOI: 10.35954/SM2024.43.1.5.e303.

RESUMEN

Introducción: actualmente la nanotecnología ha cambiado radicalmente el diagnóstico de muchas patologías humanas. El objetivo de este trabajo es obtener nanopartículas de plata para imagen híbrida (^{99m}Tc-AgNPs-ICG) que tengan potenciales aplicaciones clínicas en imagen.

Materiales y métodos: se mezclaron 2 ml de ácido ascórbico (1.7×10^{-4} M), 5 mCi de ^{99m}TcO₄⁻, 2 ml de ácido cítrico (8.0×10^{-4} M) y 0.5 ml de nitrato de plata (2.5×10^{-3} M). El pH de la solución fue 5, y se agitó durante 20 minutos a 37° C. A continuación, se añadieron 2 µl de verde de indocianina (1.3×10^{-3} M) (^{99m}Tc-AgNPs-ICG). Las propiedades fisicoquímicas de la solución se caracterizaron mediante UV ($\lambda_1 = 420$ nm, $\lambda_2 = 254$ nm) y detector gamma. Se evaluaron la imagen de fluorescencia, el tamaño de las partículas y el espectro IR.

Resultados: se obtuvieron nanopartículas de plata en solución acuosa a un pH de 5. Su pH, color y espectro fueron estables durante siete días. Además, el pico principal caracterizado por HPLC, UV y detector Gamma tenía tiempos de retención similares. Su espectro UV mostró una banda de absorción de 420 nm, que corresponde a la banda de absorción plasmónica de estas nanopartículas. El tamaño de las partículas era de $46 \text{ nm} \pm 1,5 \text{ nm}$. El espectro IR mostró bandas de absorción en 3193, 2624, 1596 y 1212 cm⁻¹.

Recibido para evaluación: noviembre 2023.

Aceptado para publicación: febrero 2024.

Correspondencia: Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Mataojo 2055, C.P. 11400, Montevideo, Uruguay. Tel: (+5982) 5250901/108; fax: (+5982) 5250895.

E-mail de contacto: pabloc7@gmail.com

Conclusiones: describimos por primera vez en la literatura la síntesis de nanopartículas de plata híbridas (radioactivas y fluorescentes). Se caracterizaron sus propiedades fisicoquímicas, siendo estables y su etiquetado fue reproducible teniendo potenciales aplicaciones biomédicas.

PALABRAS CLAVE: Compuestos de Plata; Lidofenina de Tecnecio Tc 99m; Nanopartículas del Metal; Pertecnetato de Sodio Tc 99m; Verde de Indocianina.

ABSTRACT

Introduction: Currently nanotechnology has radically changed the diagnosis of many human pathologies. The aim of this work is to obtain silver nanoparticles for hybrid imaging (^{99m}Tc-AgNPs-ICG) having potential clinical imaging applications.

Materials and methods: We mixed 2 ml of ascorbic acid (1.7×10^{-4} M), 5 mCi of ^{99m}TcO₄⁻; 2 ml of citric acid (8.0×10^{-4} M) and 0.5 ml of silver nitrate (2.5×10^{-3} M). Solution pH was 5, and it was shaken for 20 minutes at 37° C. Afterwards, 2 μL of Indocyanine Green (1.3×10^{-3} M) was added (^{99m}Tc-AgNPs-ICG). Physicochemical properties of the solution were characterized by UV ($\lambda_1 = 420$ nm, $\lambda_2 = 254$ nm) and gamma detector. Fluorescence image, particle size and IR spectrum were evaluated.

Results: Silver nanoparticles were obtained in aqueous solution a pH of 5. Their pH, color and spectrum were stable for seven days. Furthermore, the principal peak characterized by HPLC, UV and Gamma detector had similar retention times. Its UV spectrum showed an absorption band of 420 nm, which corresponds to the plasmon absorption band of these nanoparticles. The particle size was $46 \text{ nm} \pm 1.5 \text{ nm}$. The IR spectrum showed absorption bands in 3193, 2624, 1596 y 1212 cm⁻¹.

Conclusions: We describe for the first time in literature the synthesis of hybrid (radioactive and fluorescent) silver nanoparticles. Their physicochemical properties were characterized, being stable and their labelling was reproducible having potential biomedical applications.

KEYWORDS: Silver Compounds; ^{99m}Tc-HID; Sodium Pertechetate Tc 99m; Metal Nanoparticles; Indocyanine Green.

RESUMO

Introdução: Atualmente, a nanotecnologia mudou radicalmente o diagnóstico de muitas patologias humanas. O objetivo deste trabalho é obter nanopartículas de prata para imagens híbridas (^{99m}Tc-AgNPs-ICG) com possíveis aplicações de imagens clínicas.

Materiais e métodos: Misturamos 2 ml de ácido ascórbico (1.7×10^{-4} M), 5 mCi de ^{99m}TcO₄⁻; 2 ml de ácido cítrico (8.0×10^{-4} M) e 0.5 ml de nitrato de prata (2.5×10^{-3} M). O pH da solução era 5 e ela foi agitada por 20 minutos a 37° C. Em seguida, foram adicionados 2 μL de indocianina verde ($1,3 \times 10^{-3}$ M) (^{99m}Tc-AgNPs-ICG). As propriedades físico-químicas da solução foram caracterizadas por UV ($\lambda_1 = 420$ nm, $\lambda_2 = 254$ nm) e detector gama. A imagem de fluorescência, o tamanho das partículas e o espectro de infravermelho foram avaliados.

Resultados: As nanopartículas de prata foram obtidas em solução aquosa com pH de 5. Seu pH, cor e espectro permaneceram estáveis por sete dias. Além disso, o pico principal caracterizado por HPLC, UV e detector gama teve tempos de retenção semelhantes. Seu espectro de UV mostrou uma banda



de absorção de 420 nm, que corresponde à banda de absorção plasmônica dessas nanopartículas. O tamanho da partícula foi de $46 \text{ nm} \pm 1,5 \text{ nm}$. O espectro de IV mostrou bandas de absorção em 3193, 2624, 1596 e 1212 cm^{-1} .

Conclusões: Descrevemos pela primeira vez na literatura a síntese de nanopartículas de prata híbridas (radioativas e fluorescentes). Suas propriedades físico-químicas foram caracterizadas, sendo estáveis e sua rotulagem foi reprodutível, com possíveis aplicações biomédicas.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos de Prata; Lidofenina-99mTc; Nanopartículas Metálicas; Pertecnetato Tc 99m de Sódio; Verde de Indocianina.

INTRODUCCIÓN

La plata, representada por el símbolo Ag, se utiliza desde hace muchos años como metal precioso. Este metal se caracteriza tanto por su color brillante como por algunas propiedades importantes, como la ductilidad y la maleabilidad. Dado que la plata procede del bloque d de la tabla periódica, es un metal de transición (grupo 11 y periodo 5). Su masa atómica corresponde a 107,8682, su densidad es de $10,49 \text{ g/cm}^3$, su punto de fusión es de 962° C , y finalmente 2162° C corresponde a su punto de ebullición. Casi todos los compuestos químicos de la plata tienen un número de oxidación +1. Además, las propiedades antibacterianas de la plata han sido ampliamente estudiadas porque la toxicidad en las células humanas es considerablemente menor que para las bacterias (1,2).

La nanotecnología tiene muchas definiciones y aplicaciones. Sin embargo, todas las definiciones destacan el diseño y desarrollo de materiales nanoestructurados altamente ordenados de abajo arriba que ofrecen respuestas específicas cuando se exponen a determinados estímulos (3,4).

En el contexto industrial actual, las nanopartículas (NP) metálicas han adquirido una gran importancia y han encontrado diversas aplicaciones en sectores como la electrónica, la biología y la medicina (5).

Este protagonismo paulatino se atribuye a la creciente importancia de las entidades químicas a nanoescala en las últimas décadas, impulsada por sus perspectivas polifacéticas y pioneras.

El potencial inherente a las nanopartículas metálicas propicia manipular con precisión parámetros

como la forma, el tamaño, el color y las características superficiales, lo que permite a los investigadores controlar sus propiedades.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) se han estudiado especialmente para utilizarlas en aplicaciones biomédicas, por ejemplo, han demostrado tener propiedades antibacterianas (6-8).

Además, existen numerosos métodos químicos que describen la síntesis y caracterización de las nanopartículas. Siempre que se utilicen diferentes agentes reductores y estabilizadores, las AgNPs se vuelven solubles en solución acuosa mostrando potentes propiedades ópticas y biomédicas (9,10).

El cáncer representa un reto sanitario mundial, derivado de una compleja interacción de factores ambientales y mutaciones genéticas.

Estas mutaciones desencadenan una cascada de acontecimientos moleculares a nivel celular que, en última instancia, culminan en la formación de tumores. La exposición persistente a bajos niveles de estrés oxidativo se ha identificado como un posible factor que contribuye al inicio del cáncer al evadir la apoptosis (11).

Numerosas investigaciones han demostrado la localización intracelular de las AgNPs en el espacio perinuclear del citoplasma y en compartimentos endolisosomales cuando entran en las células por endocitosis (12).

Las AgNPs interrumpen la respiración celular y generan especies reactivas de oxígeno (ROS). Este impacto perjudicial sobre las células provoca estrés oxidativo, daños en el ADN, inducción de apoptosis y deterioro mitocondrial en las células cancerosas (13-16).

El concepto de teranóstica, que combina diagnóstico y terapia, encuentra aplicación en las AgNP biosintetizadas debido a su doble funcionalidad. Estas AgNPs exhiben propiedades anticancerígenas y se emplean en la administración selectiva de fármacos y en vehículos para bioimagen.

En el campo de la imagen médica, las técnicas de imagen nuclear se perfilan como herramientas indispensables, entre las que destacan la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía computarizada por emisión del fotón único (SPECT). Estas técnicas presentan una capacidad excepcional para proporcionar una visión cuantitativa de los fenómenos biológicos *in vivo*. Sin embargo, la utilidad clínica de estos métodos se ve atenuada por su limitación de una resolución espacial relativamente baja (17,18).

Por el contrario, las imágenes fluorescentes constituyen una alternativa convincente con una resolución espacial notablemente mejorada.

Más aún, la indocianina verde (ICG), cuyos atributos de respuesta a la luz aprovechan la precisión de la imagen fluorescente para la delineación intraoperatoria en tiempo real, resuena como un complemento adecuado a las modalidades de imagen nuclear. El objetivo de este trabajo es obtener nanopartículas de plata para la obtención de imágenes híbridas (radiactivas / fluorescentes) (^{99m}Tc-AgNPs-ICG), con potencial agente teranóstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados fueron nitrato de plata (99.9%, Sigma), ácido ascórbico (Sigma), ácido cítrico (May & Baker LTD Dagenham Inglaterra), hidróxido de sodio (Anedra), verde de indocianina (ICG) (Hub Pharmaceuticals.), Generador ⁹⁹Mo/^{99m}Tc (Tecnuclear).

1. Síntesis de nanopartículas de plata fluorescentes (AgNPs-ICG)

Se mezclaron 20 ml de ácido ascórbico (1.7×10^4 M) con 20 ml de ácido cítrico (8.0×10^4 M) y 5 ml de la solución de nitrato de plata (2.5×10^{-3} M), agitando constantemente a 90 rpm y 37° C.

El pH de la solución se modificó a 6 utilizando una solución de hidróxido de sodio 0,1 M, y se agitó durante 20 minutos a una temperatura controlada de 37° C. A continuación, se añadieron 20 µl de ICG (1.3×10^{-3} M) (AgNPs-ICG). Las nanopartículas fueron evaluadas mediante cromatografía de exclusión molecular por tamaño, utilizando PD-10 Sephadex G25 (Cytiva), fase móvil 0.9% NaCl, tomando fracciones de 1 mL.

Posteriormente, se realizó un análisis UV-visible abarcando el rango espectral de 200 a 700 nm para discernir desplazamientos espectrales y cambios en la tonalidad de la suspensión durante un periodo de 7 días.

2. Marcaje de AgNPs-ICG con ^{99m}Tc (^{99m}Tc-AgNPs-ICG)

El proceso de síntesis fue iniciado con la combinación de 2 ml de ácido ascórbico (1.7×10^{-4} M) y 5 mCi de ^{99m}TcO₄⁻. Esta mezcla se integró con 2 ml de ácido cítrico (8.0×10^{-4} M) y a continuación se añadieron 0,5 ml de una solución de nitrato de plata (2.5×10^{-3} M), asegurando una agitación continua durante todo el proceso. Se ajustó el pH a 6 introduciendo una solución de hidróxido de sodio 0.1 M, seguida de agitación vigorosa durante 20 minutos a una temperatura controlada de 37° C.

Posteriormente, se introdujeron 2 µl de ICG (1.3×10^{-3} M), lo que culminó en la formación del compuesto designado, denominado ^{99m}Tc-AgNPs-ICG.

3. Análisis por HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento)

La suspensión de nanopartículas fue analizada mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión por tamaño (SE-HPLC), que se realizó empleando una columna TSKgel G300SW XL de 7,8 mm x 30 cm (Tosoh Bioscience, LLC, Japón), eluida con agua bidestilada, a un flujo de 1 mL/min; con un equipo Agilent de la serie 1200, con detectores de centelleo NaI(Tl) de detección por matriz de diodos, volumen de inyección de muestra de 25 µL y detector UV λ₁ = 420 nm, λ₂ = 254 nm. El método isocrático empleado fue de 20 minutos.

4. Imágenes de fluorescencia

Un ml de suspensión de AgNPs-ICG fue añadido a un tubo Eppendorf y se determinó su fluorescencia en un equipo *in vivo* MS FX PRO (BRUKER Corporation). El análisis de la captura de la señal óptica se realizó empleando el software Bruker MI. Los filtros de fluorescencia fueron los siguientes: ICG excitación = 760-785 nm y emisión = 820-840 nm.

Se determinó la intensidad de fluorescencia para cada una de las sondas y se comunicó como intensidad media de fluorescencia (IMF).

5. Tamaño de las partículas y espectro IR

El tamaño de la suspensión de AgNPs-ICG se determinó en un equipo Zetasizer (DLS, Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments).

Una suspensión de AgNPs-ICG se concentró en vapor de nitrógeno, y una muestra de la misma se incluyó en el portamuestras de un equipo IR Agilent con módulo ATR (infrarrojo por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada).

RESULTADOS

Las nanopartículas de plata, denominadas AgNPs-ICG, se sintetizaron en un medio acuoso, empleando una temperatura controlada de 37° C con agitación continua a 90 rpm.

El pH de la solución se calibró a 6, sentando las bases para los análisis posteriores. Se realizó una evaluación espectroscópica UV-visible dentro del rango de longitudes de onda de 200 a 700 nm, revelando un pico de absorción a 408 nm, congruente con el espectro de absorción plasmónica característica de estas nanopartículas (19).

Estos parámetros, junto con los atributos visuales de la suspensión, se sometieron a estudio durante 7 días, afirmándose su estabilidad sin alteraciones perceptibles (figura 1).

Para determinar la composición y las características de las AgNPs-ICG, empleamos cromatografía de exclusión molecular mediante el empleo de una columna PD10. Los perfiles de este análisis se muestran en la figura 2.

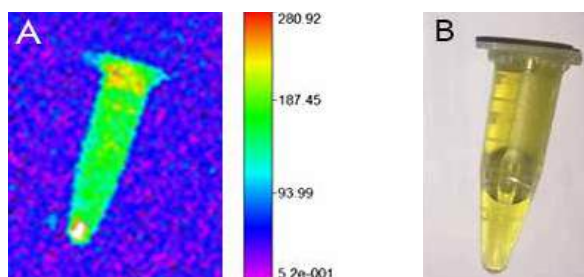


Figura 1A. Imagen fluorescente de AgNPs-ICG.

Figura 1B. Imagen visible de AgNPs-ICG.

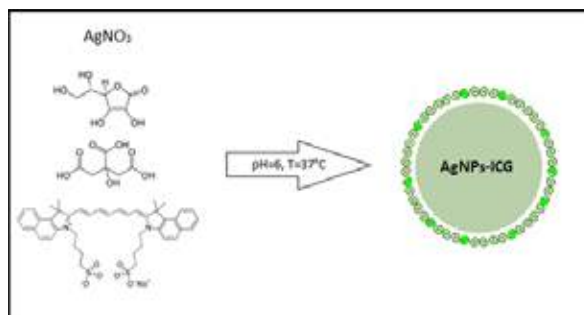


Figura 1C. Esquema de la obtención de AgNPs-ICG.

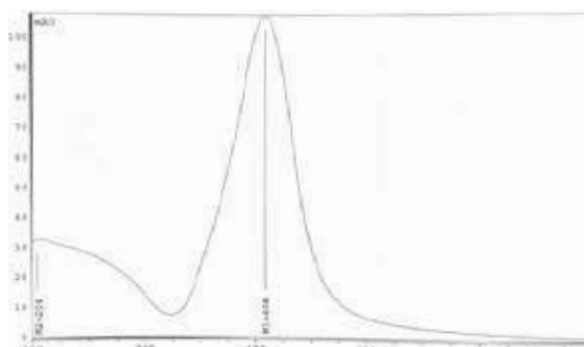


Figura 1D. Espectro UV visible de AgNPs-ICG.

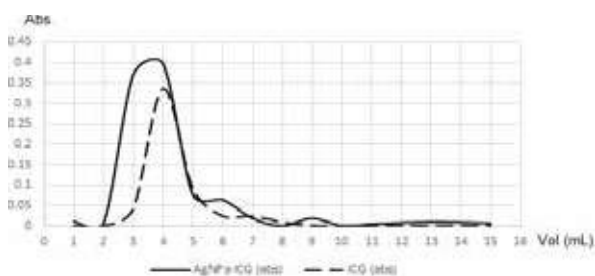


Figura 2. Cromatografía de exclusión molecular (PD-10).

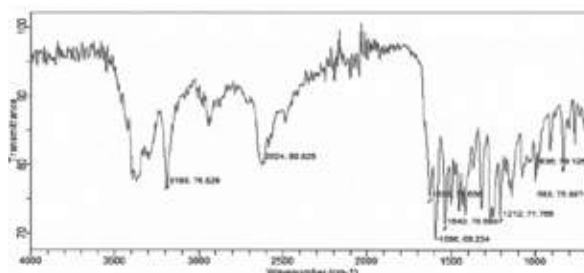


Figura 3. Espectro IR de AgNPs-ICG.

Curiosamente, los perfiles revelan claramente que las nanopartículas cargadas con verde de indocianina se eluyen a un ritmo acelerado, y su perfil de elución difiere claramente del del ICG libre.

Las nanopartículas fueron estudiadas mediante espectrometría infrarroja, revelando bandas espectrales distintivas en 3193, 2624, 1596 y 1212 cm⁻¹ (figura 3).

Para dilucidar sus atributos dimensionales, se evaluó el tamaño de partícula de la suspensión de AgNPs-ICG empleando un equipo de dispersión de luz láser y se observó una distribución monomodo. Esta distribución presentó un diámetro hidrodinámico de 46,8 ± 1,7 nm, indicativo de un tamaño de partícula bien definido y estrechamente regulado, acompañado de un valor de PDI de 0,317 ± 0,041 (figura 4).

El proceso de marcaje con ^{99m}Tc fue realizado exitosamente, ya que las nanopartículas AgNPs-ICG se cargaron eficazmente con ^{99m}Tc, dando lugar a la formación de ^{99m}Tc-AgNPs-ICG (figura 5).

La evaluación radioquímica de las nanopartículas ^{99m}Tc-AgNPs-ICG mediante HPLC reveló una notable concordancia entre los cromatogramas UV y gamma, subrayada por una confluencia de tiempos de retención en el pico. Este pico principal reveló una banda de absorción distintiva a 420 nm dentro de su espectro (figura 6A).

Diferenciándose del pertecnetato, que mostró un tiempo de retención de 11.6 minutos, el pico principal de las nanopartículas ^{99m}Tc-AgNPs-ICG demostró un tiempo de retención distinto de 7.2 minutos. Esta divergencia en los tiempos de retención sirve como un robusto indicador, demostrando una pureza radioquímica cercana al 100% (figura 6B).

DISCUSIÓN

Las diferentes aplicaciones de las nanopartículas metálicas, en particular las de plata, se vienen estudiando desde las últimas décadas.

En especial, el desarrollo de agentes híbridos radiactivos-fluorescentes es de gran importancia biomédica; pueden utilizarse para el diagnóstico

y guiar la terapia en quirófano mediante la obtención de imágenes moleculares *in vivo* (20).

Las NPs de Ag han surgido como prometedores radiosensibilizadores basados en nanomateriales, mejorando la erradicación de células de glioma inducida por radiación, como demostraron Liu *et al.* en 2013 (21).

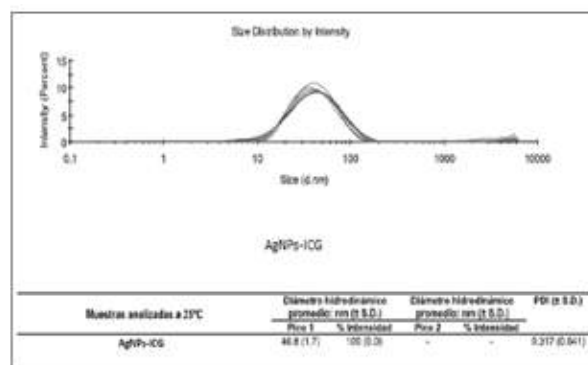


Figura 4. Tamaño de las partículas y espectro IR de AgNPs-ICG.

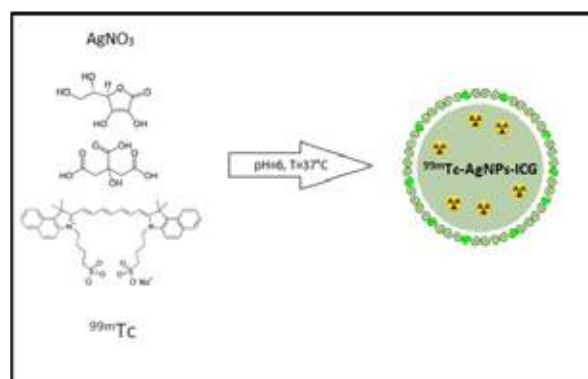


Figura 5. Esquema de la maracción de las nanopartículas de plata híbridas (^{99m}Tc-AgNPs-ICG).

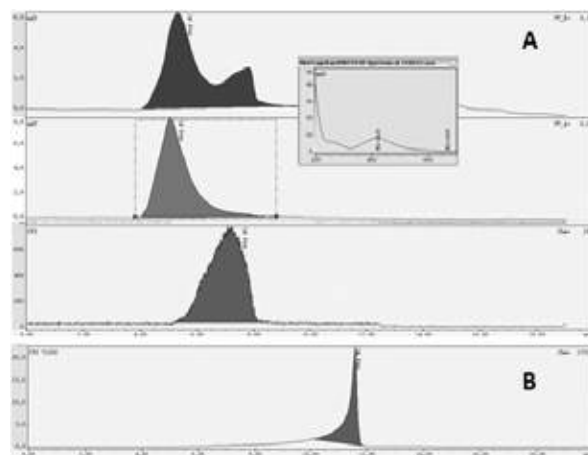


Figura 6A. Perfil de HPLC: ^{99m}Tc-AgNPs-ICG
Figura 6B. Perfil de HPLC: Pertecnetato.



El tratamiento de células cancerosas con NPs de Ag muestra una citotoxicidad dependiente de la dosis. Las NPs de menor tamaño, como las de 20 nm y 50 nm, muestran una mayor citotoxicidad a dosis de radiación relativamente más bajas.

En células de glioma hipóxicas, el tratamiento con NPs de Ag en combinación con radioterapia aumenta significativamente los efectos antigliomatosos, lo que se traduce en una mayor eficacia de la radiación. Este efecto puede atribuirse a una mayor actividad de apoptosis y a una fuerte inducción de autofagia (22).

Un estudio reciente se ha mostrado prometedor al utilizar NPs de Ag modificadas recubiertas con albúmina sérica bovina (BSA) y conjugadas con verapamilo (VRP).

Estas NPs de Ag modificadas han demostrado una acumulación efectiva en células tumorales, representando ser potenciales nano radiosensibilizadores de alta eficiencia para la radioterapia de gliomas (23).

En el presente estudio, hemos sintetizado y caracterizado nanopartículas fluorescentes, denotadas como AgNPs-ICG como potencial agente terapéutico. El marcado fluorescente se utiliza habitualmente para controlar la biodistribución de nanomedicinas. Sin embargo, una interpretación significativa de los resultados es requerida para que el marcado fluorescente permanezca adherida a la nanomedicina. En este trabajo, exploramos la estabilidad de las AgNPs-ICG, para ello evaluamos su tamaño y distribución.

Se observó que estas nanopartículas presentaban una distribución monomodo uniforme, indicativa de un proceso de síntesis muy controlado. Esta uniformidad en la distribución del tamaño es vital para sus aplicaciones previstas, especialmente en el contexto del uso *in vivo*, donde la uniformidad puede ser crucial para garantizar un comportamiento e interacciones coherentes dentro de los sistemas biológicos. Además, fue realizado un análisis del diámetro hidrodinámico de las AgNPs-ICG, revelando un diámetro medio de 46.8 ± 1.7 nm.

Este rango de tamaño específico es un logro notable, ya que se ajusta bien a la dimensión óptima deseable para aplicaciones biomédicas. Tales dimensiones se han asociado con una mayor capta-

ción celular, tiempos de circulación prolongados y un potencial minimizado de eliminación por el sistema reticuloendotelial, destacando así la idoneidad de las nanopartículas para su uso *in vivo* (24).

El análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) muestra diferentes tramos de enlace con diferentes picos; 2624-C-H; O-H, 1638-C=C, y 1212-C=O.

Los picos cercanos a 3420 cm^{-1} y 2950 cm^{-1} se asignan al estiramiento OH y al estiramiento C-H aldehídico, respectivamente. El pico cercano a 833 cm^{-1} se asignó a C=CH₂. Los espectros FTIR de las nanopartículas de plata mostraron picos prominentes a 2950 y 1638 cm^{-1} . La banda 1370 se desarrolló para el estiramiento C-C. (25).

Estas observaciones apoyan colectivamente la presencia de nanopartículas de plata y su interacción con ligandos orgánicos. Es probable que estos ligandos se unan a la plata (Ag) a través de enlaces superficiales formados entre los átomos más electronegativos y los orbitales d de Ag.

Esta interacción permite la estabilización acuosa de las nanopartículas, lo que les confiere atributos biocompatibles (26).

Además, nuestra investigación se extendió a una evaluación de la estabilidad de las nanopartículas durante un periodo de 7 días, en el que las nanopartículas exhibieron un perfil de estabilidad notable, mostrando alteraciones insignificantes en sus propiedades centrales.

Además de su función primaria como colorante, el ICG posee la capacidad de convertir la luz en calor y generar radicales libres cuando se activa con la luz (27).

Estas propiedades únicas hacen del ICG un candidato prometedor para servir como fotosensibilizador eficaz en el contexto de la terapia fototérmica (PTT) para el tratamiento del cáncer.

Cabe señalar que los efectos citotóxicos de las AgNPs se observan principalmente a altas concentraciones, a menudo en el rango de varios cientos de concentraciones micromolares (28).

Para aumentar su potencial en el tratamiento del cáncer, un método eficaz consiste en cargar fármacos anticancerígenos o fotosensibilizadores

como el ICG en las AgNP. Además, las AgNPs son excelentes nanotransportadores, especialmente para compuestos sensibles al calor y solubles en agua, como el ICG.

Esta ventaja se deriva del proceso de síntesis de las AgNPs, que no requiere el uso de disolventes orgánicos ni calentamiento, lo que las hace muy favorable para estas aplicaciones (29).

Profundizando en nuestro estudio, exploramos el marcado dual de las nanopartículas, concretamente ^{99m}Tc-AgNPs-ICG.

Esta estrategia de marcado dual, que incorpora tanto elementos radiactivos como fluorescentes, encierra un inmenso potencial para diversas aplicaciones que van desde la obtención simultánea de imágenes hasta las intervenciones terapéuticas dirigidas.

El análisis por HPLC reveló que las nanopartículas con doble marcado presentaban un perfil estable. La presencia de detectores UV y GAMMA permitió una evaluación exhaustiva de la integridad de las nanopartículas, garantizando que tanto sus componentes fluorescentes como radiactivos se mantuvieran bien conservados a lo largo del estudio.

El análisis del espectro UV reveló un pico distintivo de resonancia plasmónica superficial que abarcaba el rango de longitudes de onda de 400 a 450 nm, una característica distintiva que significa el éxito de la síntesis de nanopartículas de plata (30).

Utilizamos HPLC con detección GAMMA para explorar más a fondo. El cromatograma resultante reveló un pico único, que indicaba las nanopartículas marcadas (^{99m}Tc-AgNPs-ICG).

Este pico distintivo difería significativamente del cromatograma del pertecnetato libre, confirmando la presencia específica de las nanopartículas marcadas.

Esta diferenciación pone de manifiesto el éxito de la integración del marcado radiactivo (^{99m}Tc) en la estructura AgNPs-ICG. El desarrollo de nanopartículas de plata híbridas (fluorescentes-radioactivas) podría abrir el camino a nuevos agentes diagnósticos y terapéuticos. Nuestro estudio describe por primera vez el desarrollo de nanopartículas híbridas de plata (radiactivas y fluorescentes). Fueron caracterizadas sus propiedades físico-

químicas, mostrando ser estables y su marcado fue reproducible, lo que les confiere potenciales aplicaciones biomédicas.

CONCLUSIONES

Sintetizamos con éxito nanopartículas de plata (AgNPs) para el desarrollo de un agente de imagen híbrido, ^{99m}Tc-AgNPs-ICG, como un potencial agente teranóstico.

Caracterizamos las nanopartículas AgNPs-ICG mediante diversas técnicas, entre ellas la espectrometría infrarroja y dispersión de luz láser, que revelaron un tamaño de partícula bien definido y estrechamente regulado, con un diámetro hidrodinámico de 46.8 ± 1.7 nm y un valor del índice de polidispersidad (PDI) bajo de 0.317 ± 0.041 . La posterior carga de ^{99m}Tc en las nanopartículas de AgNPs-ICG fue exitosa, dando lugar a la formación de ^{99m}Tc-AgNPs-ICG con una pureza radioquímica cercana al 100%.

El desarrollo de ^{99m}Tc-AgNPs-ICG abre interesantes vías para mejorar el diagnóstico, el tratamiento y la investigación del cáncer, junto con potenciales aplicaciones en diversos campos médicos, entre ellos: cirugía guiada por imágenes, diagnóstico y tratamiento del cáncer, medicina personalizada y monitorización de la respuesta al tratamiento. Para aprovechar todo el potencial de este innovador agente teranóstico serán vitales nuevas investigaciones y estudios clínicos.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores no reportan ningún conflicto de interés. El estudio se realizó con recursos propios de los autores y/o la institución a la que representan.

REFERENCIAS

- (1) Burduşel AC, Gherasim O, Grumezescu AM, Mogoantă L, Fica A, *et al.* Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials* (Basel) 2018 Sep; 8(9):681. DOI: 10.3390/nano8090681.
- (2) Clement JL, Jarrett PS. Antibacterial Silver. *Met Based Drugs* 1994; 1(5-6):467-482. DOI: 10.1155/MBD.1994.467.



- (3) Saji VS, Choe HC, Young KWK. Nanotechnology in biomedical applications—a review. *Int J Nano Biomater* 2010; 3:119-139. DOI: 10.1504/IJNB.M.2010.037801.
- (4) Heiligtag FJ, Niederberger M. The fascinating world of nanoparticle research. *Mater Today* 2013; 16:262-271. DOI: 10.1016/j.mattod.2013.07.004.
- (5) Syafiuddin A, Salmiati Salim MR, Kueh ABH, Hadibarata T, Nur H. A Review of silver nanoparticles: Research trends, global consumption, synthesis, properties, and future Challenges. *J Clin Chem Soc* 2017; 64:732-756. DOI: 10.1002/jccs.201700067.
- (6) Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 2016 Sep 13; 17(9):piiE1534. DOI: 10.3390/ijms17091534.
- (7) Rao CNR, Müller A, Cheetham AK. Nanomaterials – An Introduction. Cap. 1, p.1-11. <https://doi.org/10.1002/352760247X.ch1>. Sastry M. Moving Nanoparticles Around: Phase-Transfer Processes in Nanomaterials Synthesis. Cap. 3, p.31-50. <https://doi.org/10.1002/352760247X.ch3>. In: Rao CNR, Müller A, Cheetham AK (Eds.). *The Chemistry of Nanomaterials. Synthesis, Properties and Applications* Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- (8) Ouay BL, Stellacci F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today* 2015; 10:339-354. DOI: 10.1016/j.nantod.2015.04.002.
- (9) Mie G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik* 1908; 330(3):377-445. DOI: 10.1002/andp.19083300302.
- (10) Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci* 2016; 17:1534. DOI: 10.3390/ijms17091534.
- (11) Ghosh R, Girigoswami K. NADH dehydrogenase subunits are overexpressed in cells exposed repeatedly to H₂O₂. *Mutat Res* 2008; 638(1-2):210-215. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2007.08.008
- (12) Asharani PV, Hande MP, Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol* 2009; 10:65. Published 2009 Sep 17. DOI: 10.1186/1471-2121-10-65.
- (13) Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells [published correction appears in *Toxicol Lett* 2008 Mar 10; 185(2):142]. *Toxicol Lett* 2008; 179(3):130-139. DOI: 10.1016/j.toxlet.2008.04.015.
- (14) Sanpui P, Chattopadhyay A, Ghosh SS. Induction of apoptosis in cancer cells at low silver nanoparticle concentrations using chitosan nanocarrier. *ACS Appl Mater Interfaces* 2011; 3(2):218-228. DOI: 10.1021/am100840c.
- (15) Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, *et al.* DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233(3):404-410. DOI: 10.1016/j.taap.2008.09.015.
- (16) Sukirtha R, Priyanka KM, Antony JJ, Kamalakkannan S, Thangam R, Gunasekaran P, *et al.* Cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. *Process Biochem* 2012; 47:273-279. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.11.003.
- (17) Chen D, Dougherty CA, Yang D, Wu H, Hong H. Radioactive Nanomaterials for Multimodality Imaging. *Tomography* 2016 Mar; 2(1):3-16. DOI: 10.18383/j.tom.2016.00121.
- (18) Gambini JP, Silvera E, Musetti M, Quinn T, Zhong Yang G, Matalonga S, *et al.* ^{99m}Tc nanocolloid indocyanine green: An hybrid tracer for breast sentinel node procedures. *J Nucl Med* 2019 May 1; (60)supplement 1:1231.

(19) Ider M, Abderrafi K, Eddahbi A, Ouaskit S, Kassiba A. Silver Metallic Nanoparticles with Surface Plasmon Resonance: Synthesis and Characterizations.

J Clust Sci 2017; 28:1051-1069.

DOI: 10.1007/s10876-016-1080-1.

(20) Herrmann K, Nieweg OE, Povoski SP (Eds.). Radioguided surgery. Current Applications and Innovative Directions in Clinical Practice. Switzerland: Springer International, 2016.

(21) Liu P, Huang Z, Chen Z, Xu R, Wu H, Zang F, *et al.* Silver nanoparticles: a novel radiation sensitizer for glioma?

Nanoscale 2013; 5(23):11829-11836.

DOI: 10.1039/c3nr01351k.

(22) Liu Z, Tan H, Zhang X, Zhou Z, Hu X, Zhang H, *et al.* Enhancement of radiotherapy efficacy by silver nanoparticles in hypoxic glioma cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(sup3):S922-S930.

DOI: 10.1080/21691401.2018.1518912.

(23) Zhao J, Li D, Ma J, Yang H, Chen W, Cao Y, *et al.* Increasing the accumulation of aptamer AS1411 and verapamil conjugated silver nanoparticles in tumor cells to enhance the radiosensitivity of glioma. *Nanotechnology* 2021; 32(14):145102. DOI: 10.1088/1361-6528/abd20a.

(24) Lee SH, Jun BH. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine.

Int J Mol Sci 2019 Feb 17; 20(4):865.

DOI: 10.3390/ijms20040865.

(25) Marimuthu S, Rahuman AA, Rajakumar G, Santhoshkumar T, Kirthi AV, Jayaseelan C, *et al.*

Evaluation of green synthesized silver nanoparticles against parasites.

Parasitology Research 2011; 108(6):1541-1549.

DOI: 10.1007/s00436-010-2212-4.

(26) Frost MS, Dempsey MJ, Whitehead DE. The response of citrate functionalised gold and silver nanoparticles to the addition of heavy metal ions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2017 Apr 5; 518:15-24.

DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.12.036.

(27) Sheng Z, Hu D, Xue M, He M, Gong P, Cai L. Indocyanine Green Nanoparticles for Theranostic Applications. *Nano-Micro Lett* 2013; 5:145-150. DOI: 10.1007/BF03353743.

(28) Ding J, Chen G, Chen G, Guo M. One-Pot Synthesis of Epirubicin-Capped Silver Nanoparticles and Their Anticancer Activity against Hep G2 Cells. *Pharmaceutics* 2019 Mar 15; 11(3):123. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030123.

(29) De Matteis V, Cascione M, Toma CC, Leporatti S. Silver Nanoparticles: Synthetic Routes, In Vitro Toxicity and Theranostic Applications for Cancer Disease.

Nanomaterials (Basel) 2018 May 10; 8(5):319.

DOI: 10.3390/nano8050319.

(30) Gonzalez AL, Noguezn C, Beranek J, Barnard AS. Size, Shape, Stability, and Color of Plasmonic Silver Nanoparticles.

J Phys Chem C 2014; 118:9128-9136.

DOI: 10.1021/jp5018168.

CONTRIBUCIONES AL MANUSCRITO:

- (a) Concepción; diseño; adquisición de datos; análisis de datos; interpretación y discusión de resultados; redacción y revisión crítica.
- (b) Diseño; Adquisición de datos.
- (c) Diseño; Adquisición de datos.
- (d) Análisis de datos; interpretación y discusión de resultados; redacción y revisión crítica.
- (e) Análisis de datos; interpretación y discusión de resultados; redacción y revisión crítica.
- (f) Diseño; análisis de datos; interpretación y discusión de resultados; redacción y revisión crítica.
- (g) Análisis de datos; interpretación y discusión de resultados; redacción y revisión crítica y aprobación de la versión final.
- (h) Concepción; diseño; análisis de datos; interpretación y discusión de resultados; redacción y revisión crítica.

NOTA: este artículo fue aprobado por el Comité Editorial.