



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

**Nanopartículas de oro recubiertas con ácido fólico y
su interacción con células cancerosas**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALEJANDRA RANGEL MENDOZA

Director de Tesis:

Dra. Myrna Sabanero López

Co-directores:

Dr. Juan Luis Pichardo Molina

M. en C. Lérica Liss Flores Villavicencio

GUANAJUATO, GTO

ENERO DE 2018

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología, de la División de Ciencias Naturales y Exactas, sede Noria Alta, Campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato, en colaboración con el Centro de Investigaciones en Óptica, A.C. León, Gto., bajo la dirección de la Dra. Myrna Sabanero López, Dr. Juan Luis Pichardo Molina y M. en C. Lérica Liss Flores Villavicencio, y con el apoyo del Dr. Pablo Cardoso Ávila (Centro de Investigaciones en Óptica, A.C.) y Dr. José Pedro Castruita Domínguez (Departamento de Ecología CUCBA, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco).

COMITÉ DE SINODALES ASIGNADOS

PRESIDENTE

Dra. Teresa Imelda Saucedo Medina

SECRETARIO

Dra. Edith Ruth Martínez Alcaraz

VOCAL

Dr. Luis Manuel Orozco Castellanos

SINODAL SUPLENTE

Q.F.B Alfonso Trujillo Valdivia

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a Dios por todo lo generoso que ha sido conmigo, por todas las cosas maravillosas que me ha dado y por permitirme alcanzar esta meta.

Especialmente quiero agradecer a mis padres, **Omar y Soco**, por ser ustedes el pilar donde me sostengo, porque siempre han confiado en mí y me han impulsado a salir adelante. Gracias por ser los mejores padres que la vida me pudo dar, porque gracias a su amor y apoyo he logrado cumplir esta meta. No me alcanzan las palabras para expresarles mi profundo agradecimiento y lo orgullosa que me siento de que sean mis padres. Gracias por todo el esfuerzo que hicieron para convertirme en una profesionalista, este logro también les pertenece. Los quiero mucho.

A mi hermana **Ana Karen**, por estar a mi lado en cada momento de mi vida, por tu apoyo en momentos difíciles y por enseñarme a confiar en mí. Me has motivado a superar mis temores y a seguir adelante. Siempre serás mi compañera de vida y espero nunca dudes de lo mucho que te quiero.

A mi tía **Yola**, por ser una amiga y otra hermana para mí, por todo el apoyo y cariño que me has dado. Agradezco tus consejos que me han motivado a seguir adelante en el camino, aunque en ocasiones parezca difícil. Por la paciencia que me has tenido y por la confianza que me has brindado. Te quiero mucho.

A la Dra. **Myrna Sabanero**, por la confianza que depositó en mí al abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo de trabajo. A la M. en C. **Lérida Liss Flores** y al Dr. **Juan Luis Pichardo**, por la confianza que me han ofrecido y permitirme desarrollar este proyecto. Gracias al Dr. **Pablo Cardoso** y al Dr. Pichardo por todo el apoyo y la confianza que me brindaron al permitirme hacer uso de las nanopartículas de oro, por sus observaciones y enseñanzas. Especialmente agradezco a la maestra Liss por todo el apoyo y paciencia que me ha tenido durante este tiempo, por todo lo que me ha enseñado, así como sus consejos, la estimo.

Agradezco al Dr. **Pedro Castruita** por el apoyo brindando durante el análisis electroforético del RNA y RT-PCR de la Hsp-70, por el tiempo que me brindó al compartirme sus conocimientos.

Agradezco a la Q.F.B. **Ma. Lourdes Palma Tirado**, responsable de la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología de la UNAM, por el apoyo brindado en la obtención de las imágenes por microscopía de transmisión para el análisis ultraestructural de las células expuestas a las NpsAu-AF.

A la Dra. **Edith**, por ser un ejemplo a seguir para mí. Gracias por las oportunidades y la confianza que me ha brindado. Es una persona digna de mi admiración y respeto, al ser una gran maestra y guía durante mi educación universitaria. Agradezco su paciencia, sus enseñanzas y sus consejos. Gracias por creer en mí y por permitirme crecer personal y profesionalmente. La estimo mucho.

Quiero agradecer a mis abuelitos que ya no están físicamente conmigo, pero los llevo presentes en mi corazón: a mi papá **Gil**, mamá **Gollita**, mamá **Toñis** y mi papá **Chuta**, gracias por el cariño que me dieron y porque gracias a ustedes tengo a los mejores padres. Papá Chuta, sé que donde te encuentres, debes estar muy orgulloso de mí, gracias por todo el cariño que me diste y por hacerme sentir una nieta muy querida, te llevo en mi corazón siempre.

A **Lalo**, por ser mi compañero y amigo. Gracias por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, por todo el apoyo que me has brindado siempre, por tus consejos y tu cariño. Siempre tuviste las palabras correctas que me motivaban a seguir adelante y has confiado en que puedo lograr las cosas, incluso cuando yo no lo creía. Agradezco tu paciencia en los días en los que estaba estresada y siempre me sacabas una sonrisa, has sido un gran apoyo para mí. Te quiero mucho.

A mis familiares, tíos y primos, gracias por su apoyo y por estar presentes en los momentos más importantes de mi vida. Agradezco sus consejos y palabras de apoyo que me han motivado a seguir adelante.

A **Santiago**, por ser el mejor amigo que me dio la Universidad. Gracias por estar conmigo a lo largo de toda la carrera, por todas las sonrisas que me sacabas con tus ocurrencias, por tus consejos en momentos difíciles y por nunca dejarme caer. Gracias por nunca dejarme sola, incluso cuando eso significara cambiar tus horarios, hubiera sido muy difícil este camino si no hubiera tenido tu compañía. Te quiero mucho.

A **Jesús**, por ser de los mejores amigos que tuve en la Universidad, por todos los momentos que compartimos juntos, por estar en las buenas y en las malas, por tolerar los días difíciles y por siempre escucharme. Agradezco todo el apoyo que me has dado. Te quiero mucho.

A mis amigos desde la secundaria: **Abi, Moy y Elías**, gracias por su amistad y apoyo a lo largo de todos estos años. Porque a pesar de las circunstancias seguimos siendo tan amigos como siempre. Abi gracias por ser la mejor de las amigas, por tu paciencia, consejos y apoyo. Los quiero mucho.

A **Paty y Cris** por ser las amigas más lindas que me pudo tocar, por siempre estar en los momentos importantes, por su apoyo y sus consejos. Porque a pesar de la distancia y el tiempo siguen estando ahí para mí. Las quiero mucho.

A mis amigos de la Universidad: **Chigüindo, May, Adri, César, Agustín, José Luis, Elena, Leslie, Lily, Monse, Sam, Damaris, Alexia y Diego** por enseñarme que la Universidad no sólo se trata de estudiar, sino también de compartir buenos momentos con los amigos. Mis mejores años de Universidad se los debo a ustedes, gracias por todas las risas, pláticas y por brindarme su casa. Los quiero y extraño mucho.

A mis amigos del laboratorio **Lucy y Moy** por compartir su conocimiento conmigo, por su paciencia y enseñarme sus técnicas. Mi tiempo en el laboratorio fue más ameno con sus pláticas y consejos. Ustedes me motivaron a seguir estudiando y preparándome.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN.....	v
CAPÍTULO 1	1
ANTECEDENTES	1
1.1 Cáncer	1
1.1.1 Detección.....	1
1.2 Uso de la nanotecnología.....	2
1.2.1 Nanotecnología	2
1.2.2 Nanopartículas de oro.....	3
1.2.2.1 Propiedades ópticas	3
1.3 Terapia alternativa	4
1.3.1 Receptor de folato.....	4
1.4 Proteínas de choque térmico.....	5
1.4.1 HSP 70	6
1.5 JUSTIFICACIÓN	7
1.6 HIPÓTESIS.....	8
1.7 OBJETIVO GENERAL	9
1.7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
CAPÍTULO 2	10
MATERIAL Y MÉTODOS	10
2.1 Cultivo celular.....	10
2.2 Nanopartículas de oro acopladas a ácido fólico.....	10
2.2.1 Caracterización de NPs funcionalizadas	12
2.3 Exposición de las células HeLa a las NPsAu-AF.....	12
2.4 Determinación de la actividad metabólica	12
2.5 Ensayo de viabilidad por el método de exclusión de Azul de Tripano.....	13

2.6	Análisis del citoesqueleto y núcleo	13
2.7	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	13
2.8	SDS-PAGE	14
2.9	Determinación de la Hsp70	14
2.10	Extracción del RNA	15
2.11	RT-PCR de la Hsp70.....	15
2.12	Análisis estadístico.....	17
CAPÍTULO 3		18
RESULTADOS		18
3.1	Cultivo celular.....	18
3.2	Actividad metabólica mitocondrial de las células HeLa expuestas a las NPsAu-AF.....	18
3.3	Análisis morfológico y determinación de la viabilidad celular de las células HeLa expuestas a las NPsAu-AF	20
3.4	Análisis estructural de organelos.....	22
3.5	Análisis ultraestructural de las células HeLa expuestas a NPsAu-AF	23
3.6	Análisis del perfil total de proteínas	25
3.7	Inmunodetección de la proteína Hsp70 en las células HeLa expuestas a las NPsAu-AF 26	
3.8	Expresión del gen que codifica para la proteína Hsp70 en células HeLa expuestas a NPsAu-AF.....	28
CAPÍTULO 4		30
DISCUSIÓN.....		30
CAPÍTULO 5		34
CONCLUSIÓN.....		34
REFERENCIAS.....		35
ANEXOS		38
ANEXO I		38
ANEXO II.....		42
ANEXO III		43
APÉNDICE.....		49
APÉNDICE A.....		49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático de la síntesis de NPsAu.....	11
Figura 2. Línea celular HeLa (ATCC® CCL2™).....	18
Figura 3. Actividad metabólica mitocondrial de las células HeLa expuestas 24h a las NPsAu-CYS-BSA-AF.....	19
Figura 4. Actividad metabólica mitocondrial de las células HeLa expuestas 24h a las NPsAu-4ATP-BSA-AF.....	20
Figura 5. Análisis morfológico y viabilidad de las células HeLa expuestas a las NPsAu-AF.....	21
Figura 6. Análisis del citoesqueleto y núcleo de células expuestas a NPsAu-AF..	23
Figura 7. Análisis ultraestructural de las células HeLa expuestas a NPsAu-AF	24
Figura 8. Perfil de proteínas totales de células HeLa expuestas a NPsAu-AF	25
Figura 9. Inmunodetección de la Hsp 70 de células HeLa expuestas a NPsAu-AF.	27
Figura 10. Análisis electroforético del RNA aislado de células HeLa en diferentes condiciones.....	28
Figura 11. Expresión del gen que codifica para la proteína Hsp 70 de células HeLa expuestas a diferentes condiciones.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mix A: componentes de la mezcla de reacción.....	15
Tabla 2. Mix B: componentes de la mezcla de reacción.....	16
Tabla 3. Componentes de la amplificación.....	16
Tabla 4. Condiciones de amplificación.	17

ABREVIATURAS

4-ATP	4-aminotiofenol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Ácido fólico
Ag	Plata
ATCC	American Type Culture Collection
Au	Oro
AuNPs	Nanopartículas de oro
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grado Celsius
cDNA	Complementary DNA
Cu	Cobre
Col.	Colaboradores
CYS	Cisteamina
DAPI	4',6-Diamidina-2'- dihidrocloruro de fenilindol
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium
Fig.	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FR	Receptor de folato
GM	Ácido mercaptosuccínico
h	Horas
Hsp70	Proteínas de choque térmico de 70 kDa
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
M	Concentración molar
mg	Miligramos

min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
NIR	Infrarrojo cercano
nm	Nanómetros
NP(s)	Nanopartículas
NPAu-AF	Nanopartículas de oro recubiertas con ácido fólico
NPsAu-4ATP-BSA	Nanopartículas de oro-4-aminotiofenol-albumina sérica bovina
NPsAu-4ATP-BSA-AF	Nanopartículas de oro-4-aminotiofenol-albumina sérica bovina-ácido fólico
NPsAu-Cys-BSA	Nanopartículas de oro-cisteamina-albumina sérica bovina
NPsAu-Cys-BSA-AF	Nanopartículas de oro-cisteamina-albumina sérica bovina-ácido fólico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
S	Segundos
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
U	Unidades
XTT	Sal de tetrazolio
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar

RESUMEN

Las nanopartículas de metales nobles exhiben excelentes propiedades físicas y químicas, intrínsecas a su tamaño. Por otra parte, el diseño de un nanomaterial multifuncional es de primordial importancia en nanomedicina ya que esto permite incrementar su potencial aplicación. Sin embargo, surge una gran pregunta: ¿cuáles son las consecuencias que observaremos a causa de la exposición de estos nanomateriales?, ¿qué clase de daños toxicológicos causarán?; Diversos estudios ya han mostrado algunos resultados sobre los daños, aunque otros aseguran que dichos materiales son inertes, los resultados de la toxicidad de nanopartículas de oro (NPsAu) son aún escasos e incluso contradictorios a la fecha. Por tal motivo, en el presente trabajo proponemos el estudio del posible daño toxicológico de NPsAu funcionalizadas con moléculas orgánicas en células HeLa. Las células HeLa (2×10^5 células/mL) fueron crecidas en medio DMEM a 37°C / 5% CO_2 y expuestas a NPsAu-AF por 24h, en dilución seriada (350-0.17 μM). Se determinó la actividad metabólica por el ensayo de XTT, viabilidad celular (Método de la exclusión del colorante Azul de Tripano) evaluando los organelos tales como el citoesqueleto y núcleo (Faloidina-FITC y DAPI), así mismo se determinó la expresión de la proteína y el gen de la Hsp70 por Western blot y RT-PCR respectivamente. Los resultados indican que células HeLa expuestas a NPsAu-AF no muestran una diferencia significativa en la viabilidad celular con respecto a las células no expuestas, además, las células expuestas no presentan cambios morfológicos aparentes ni tampoco perdieron la capacidad de adhesión. El análisis de los microfilamentos y el núcleo indicó la integridad de los organelos. La detección de la proteína y la expresión del gen de la Hsp70 no revelaron la presencia de estrés celular ni daño genotóxico. La exposición de las células HeLa a las NPsAu-AF no inducen un efecto citotóxico, razón por la cual consideramos que estas nanopartículas pueden ser una herramienta potencial en diversas aplicaciones biomédicas.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Cáncer

El cáncer es la proliferación de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina «metástasis». La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer (OMS, 2017).

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 se presentaron 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer (OMS, 2017). En México en 2013, 13.6 % del total de defunciones (población mayor de 20 años) se debieron a algún tumor, de las cuales 93.6% correspondieron a tumores malignos. Por sexo, del total de defunciones por cáncer, 48.8% ocurren en varones y 51.2% en mujeres (INEGI, 2016). Los tipos de cáncer diagnosticado con más frecuencia en el hombre fueron de pulmón, próstata, estómago, hígado, colon y recto; mientras que en la mujer fueron los de mama, cuello uterino, estómago, pulmón, colon y recto (OMS, 2015). Se prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 13.1 millones en 2030 (Secretaría de Salud. Servicios de Salud del Estado de Puebla, 2016).

1.1.1 Detección

La mortalidad por cáncer se puede reducir si los casos se detectan y tratan en etapas tempranas (OMS, 2017). Las actividades de detección temprana tienen dos componentes: el diagnóstico temprano y el cribado. El objetivo es descubrir a los pacientes que presentan una lesión precancerosa y así poder diagnosticarlos y proporcionar el tratamiento oportuno. Los programas de cribado son especialmente

eficaces en relación a los tipos de cáncer frecuentes, para los cuales existe una prueba de detección eficaz, asequible, aceptable y accesible a la mayoría de la población en riesgo (OMS, 2015).

1.2 Uso de la nanotecnología

1.2.1 Nanotecnología

El prefijo "nano" se deriva de la palabra griega "nanos" que significa "enano". La nanotecnología es la ciencia de la manipulación y aplicación de materiales que tienen al menos una dimensión inferior a 100 nanómetros (nm) de longitud (nanopartículas, grafeno, fullerenos, nanotubos de carbono, etc). El interés por estos materiales surge principalmente porque exhiben propiedades únicas (súper magnetismo, catalíticas, ópticas, eléctricas y mecánicas) que el mismo material no exhibe en su forma macroscópica (material de bulto). Las aplicaciones de estos materiales se pueden observar incluso en productos de consumo diario, pero principalmente en el área científica, siendo este el caso del campo biomédico experimental, en donde dichos materiales son utilizados como: agentes de liberación de fármacos, biosensores, agentes de contraste en imagenología, etc. Los nanomateriales para la formación de imágenes y la administración de fármacos a menudo se recubren con biomoléculas tales como ADN, proteínas y anticuerpos monoclonales con la finalidad de que puedan ser dirigidos de manera específica, ya sea para nuevos tratamientos o en la detección de enfermedades. Por otra parte, debido al tamaño extremadamente pequeño de los nanomateriales, su razón área de superficie a volumen es extremadamente alta, lo que los hace altamente reactivos. La alta reactividad que poseen es una propiedad muy interesante para procesos de catálisis, sin embargo se tiene la preocupación de que cuando estos se administren a organismos vivos, sus posibles efectos tóxicos se puedan hacer presentes, causando diversas patologías (Arora y col., 2012). Sin embargo, y a pesar de los estudios ya reportados sobre el tema, aún no se conocen con precisión los posibles daños a corto y largo plazo de estos materiales, esto sin considerar que el desarrollo y nuevas aplicaciones surgen día a día.

1.2.2 Nanopartículas de oro

Nanopartículas de metales nobles como el oro (NPsAu), exhiben excelentes propiedades físicas y químicas, intrínsecas a su tamaño nanométrico. Las NPsAu son producidas en distintos tamaños y formas, pueden ser funcionalizadas con un amplio tipo de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.). Todo esto, proporciona que las NPsAu despierten un gran interés en diversos campos científicos, pero especialmente en los sectores biomédico y alimentario, donde se ha descrito su utilización en el tratamiento contra el cáncer o como parte integrante de envases resistentes a la abrasión, con propiedades antimicrobianas (Mateo y col., 2013).

Las NPsAu están dentro de las más estudiadas debido a su gran estabilidad, aparente baja toxicidad y alta eficiencia de conversión de radiación (Vis-IR) en calor, combinado con la multitud de métodos de síntesis que generan una amplia variedad de formas y tamaños. Así mismo, se pueden funcionalizar con moléculas mediante su unión a través de distintas moléculas que permiten tener grupos funcionales libres para su posible interacción con otras moléculas o biomoléculas abriendo la posibilidad de múltiples aplicaciones, desde el diagnóstico, terapia génica, el transporte de fármacos, inmunoterapia, terapia fototérmica y termo-radioterapia (Pérez, 2016; Ravichandra y col., 2017)

Actualmente, las nanopartículas de oro destacan especialmente por sus propiedades fototerapéuticas. Por ello, en los últimos años se han realizado notables esfuerzos en la investigación y en la aplicación de las NPsAu para la detección temprana, el diagnóstico y tratamiento del cáncer (Mateo y col., 2013).

1.2.2.1 Propiedades ópticas

Las nanopartículas metálicas (Au, Ag, Cu, Pd) exhiben singulares propiedades ópticas a causa de sus plasmones de superficie localizados (PSL). Se conocen como plasmones de superficie localizados al movimiento colectivo y armónico que sufren los electrones de superficie cuando el campo eléctrico de la luz incidente interacciona con estos. Para que este fenómeno ocurra, la partícula tiene que ser mucho menor que la longitud de onda de la luz incidente (Cruz y col., 2012).

Las NPs de metales nobles como el oro, la plata y el cobre, presentan bandas de absorción debido a su PSL, en un rango de longitudes de onda que van desde el visible hasta al infrarrojo cercano (NIR). Por otro lado, las NPsAu de tamaños menores a 40 nm son altamente eficientes en la conversión de luz en calor a través de procesos de desexcitación no radiactiva. Razón por la cual, este tipo de materiales puede ser útil en el uso de nuevas terapias, así como en la liberación de fármacos u otros agentes terapéuticos que permitan la destrucción de células tumorales (Pérez, 2016).

1.3 Terapia alternativa

Las modalidades convencionales del tratamiento del cáncer tienen varias limitaciones, una de ellas es su baja eficacia, una toxicidad adversa grave, así como la resistencia a los fármacos. La nanotecnología es un campo interdisciplinario prometedor en el desarrollo de nuevos y posibles métodos de diagnóstico y tratamiento a diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer. Debido a las propiedades ópticas, magnéticas y estructurales de las NPs, se ha propuesto su uso en el desarrollo de tratamientos no convencionales contra el cáncer. Éstas presentan una variedad de formulaciones para diversas aplicaciones, teniendo ventajas sobre otras moléculas de fármacos en estudios *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, algunos reportes muestran que las NPs mejoran la administración de fármacos anticancerígenos que son hidrofóbicos o inestables y aumentan su tiempo de vida media. La síntesis de NPs ofrece la posibilidad de manipular sus propiedades físicas y químicas, para lograr el objetivo de diseñarlas de forma que proporcionen una interacción biológica altamente específica (Roblero y col., 2015).

1.3.1 Receptor de folato

En la actualidad se han descubierto moléculas sobreexpresadas en las células cancerosas, las cuales participan en las vías moleculares cruciales para el crecimiento tumoral, el mantenimiento y la metástasis. Estas moléculas son utilizadas para el diseño de un tratamiento específico, por ejemplo: el receptor de folato (RF) que es sobreexpresado en la superficie de células de tumores sólidos, incluyendo el de ovario, riñón, pulmón, cerebro, endometrial, colorectal, páncreas, gástrico, próstata, testicular,

vejiga, cabeza y cuello (Assaraf y col., 2014). En este sentido, la bioconjugación de ácido fólico con nanopartículas (NPAu-AF) es un enfoque que puede ser útil en el tratamiento específico de los tejidos que sobreexpresan el RF (Ngernyuang y col., 2015).

Por ejemplo, Rathinaraj y col. (2015) proponen el uso de NpsAu recubiertas con ácido fólico y su interacción con células orales de cáncer escamoso (KB). También se ha reportado el uso de las nanopartículas de oro recubiertas de ácido mercaptosuccínico y bioconjugadas con ácido fólico para su interacción con receptores de folato sobreexpresado en las membranas de células KB y a la vez facilitar el tránsito de éstas a través de la membrana celular (Rathinaraj y col., 2015). Otros estudios, están dirigidos a la aplicación de nanoacumulaciones de oro con recubrimiento de sílice conjugadas a ácido fólico para tomografía computarizada de fluorescencia específica y de rayos X para el estudio de células de cáncer gástrico *in vivo* (Zhou y col., 2013).

Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo sobre su posible uso en terapia fototérmica. Por lo que, en este estudio, se determinará la interacción de nanopartículas de oro recubiertas con ácido fólico y su interacción con células de cáncer cérvico uterino.

1.4 Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico o *heat shock proteins* (HSP) son una familia de proteínas que se producen en grandes cantidades por la mayoría de las células como respuesta al estrés mecánico, a la estimulación con citocinas o a las altas temperaturas, como mecanismo de protección frente a estas condiciones adversas. Las HSP se clasifican según su peso molecular (p. ej., HSP70 por su peso de 70 kDa). En el ámbito intracelular, las HSP actúan como chaperonas, facilitando el ensamblaje correcto de las proteínas, así como la translocación de oligómeros, pero también favorecen la eliminación de las proteínas que están dañadas de forma irreversible (Madrigal y col., 2009).

1.4.1 HSP 70

Las HSP de 70 kDa (HSP 70) son de las más importantes, porque con mayor frecuencia son inducidas en células estresadas. Las HSP han sido el foco de investigaciones debido a que la secuencia de aminoácidos de HSP 70 está muy conservada en especies ampliamente divergentes; por lo tanto, se cree que representan una característica fundamental de la capacidad de una célula para hacer frente a condiciones desfavorables (Berberian y col., 1990).

1.5 JUSTIFICACIÓN

Las nanopartículas de oro tienen propiedades ópticas especiales, debido a su plasmón de resonancia; por tal motivo han sido ampliamente usadas en la ciencia y la tecnología. Por otra parte, la sobreexpresión de los receptores de folato en las células cancerosas y por ende su alto requerimiento de folato, son características que hacen de esta molécula un blanco terapéutico. La combinación de las características bioquímicas del folato y las propiedades fototérmicas de las nanopartículas de oro, son una fuente potencial y novedosa en el desarrollo de estrategias dirigidas, basadas en nanopartículas de oro conjugadas con ácido fólico (NPAu-AF). Pero, se sabe que algunos nanomateriales son causantes de efectos citotóxicos y es de suma importancia estudiarlos antes de realizar aplicación alguna.

En el presente trabajo, proponemos el estudio *in vitro* de la interacción de NPs-Au-AF en cultivos de células HeLa, con la finalidad de evaluar y determinar los posibles efectos citotóxicos. Estableceremos de ser posible los parámetros de seguridad para su uso al menos a nivel de pruebas *in vitro*.

1.6 HIPÓTESIS

Al modificar la química de la superficie de NPs-Au usando moléculas orgánicas (cisteamina, 4-aminotiofenol, albúmina sérica) y bioconjugarlas con ácido fólico, nuestra hipótesis es que se pueden reducir los efectos citotóxicos que producen las NPs antes de haber sido modificadas.

1.7 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la toxicidad de AuNPs funcionalizadas con moléculas orgánicas y bioconjugadas con ácido fólico en células de cáncer cérvico uterino.

1.7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la viabilidad celular y actividad metabólica de células HeLa expuestas a NPsAu-AF
2. Analizar la ultraestructura y los organelos de células HeLa expuestas a NPsAu-AF
3. Examinar la expresión de la Hsp 70 en células HeLa expuestas a NPsAu-AF

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Cultivo celular

La línea celular HeLa (ATCC® CCL2™) de adenocarcinoma de cérvix fue crecida en medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium, Gibco), suplementado con 10% suero fetal bovino (Gibco), en una atmósfera de CO₂ al 5%, a una temperatura de 37°C de 48 a 72 h (Freshney, 2000). La línea celular fue manipulada con los requerimientos de nivel de bioseguridad tipo 2 a la cual corresponde.

2.2 Nanopartículas de oro acopladas a ácido fólico

Las nanopartículas de oro acopladas con ácido fólico fueron sintetizadas en el laboratorio del Dr. Juan Luis Pichardo Molina (Centro de Investigaciones en Óptica A.C.). Para ello, las NPsAu se sintetizaron y funcionalizaron (Fig. 1) usando diferentes moléculas orgánicas tales como cisteamina, 4-aminotiofenol y albúmina sérica (Cardoso y col., 2017). Para algunos ensayos, se utilizaron las NPsAu sin funcionalizar con AF y se designaron en la siguiente forma:

- NPsAu-Cys-BSA: nanopartículas de oro-cisteamina-albúmina sérica bovina
- NPsAu-4ATP-BSA: nanopartículas de oro-4-aminotiofenol-albúmina sérica bovina

Del mismo lote de síntesis y funcionalización, se recubrieron adicionalmente con ácido fólico, las cuales también fueron empleadas en el presente estudio (NPsAu-AF), designadas como:

- NPsAu-Cys-BSA-AF: nanopartículas de oro-cisteamina-albúmina sérica bovina-ácido fólico
- NPsAu-4ATP-BSA-AF: nanopartículas de oro-4 aminotiofenol-albúmina sérica bovina-ácido fólico

En el apéndice A se dan los detalles completos del proceso de síntesis y funcionalización de las NPs.

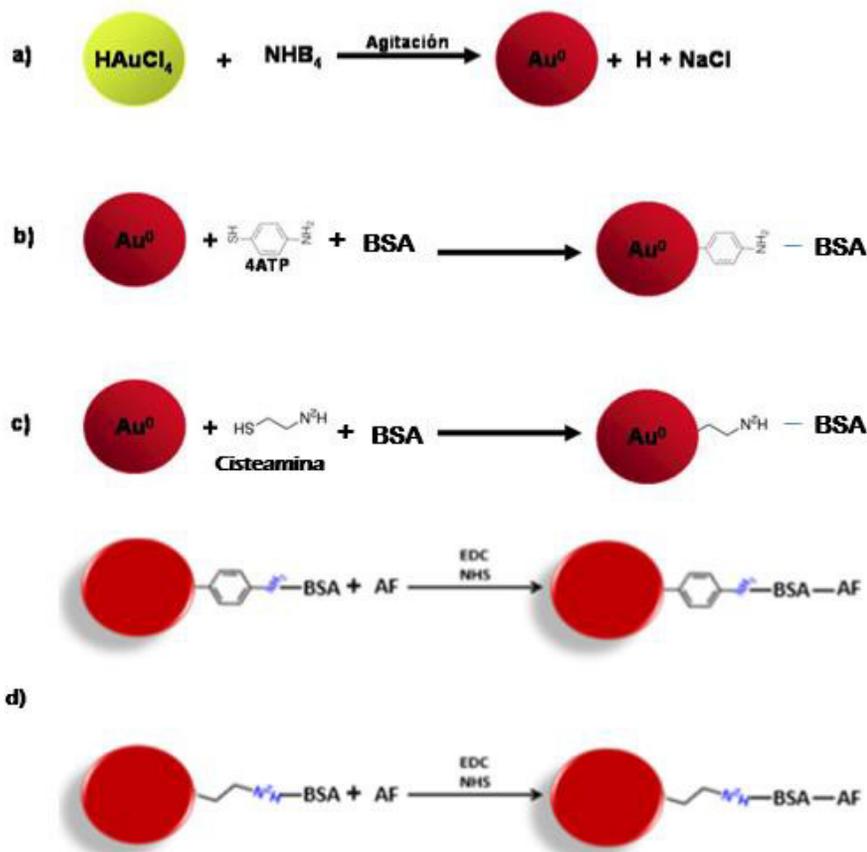


Figura 1. Diagrama esquemático de la síntesis de NpsAu: a) El NaBH_4 reduce la sal metálica y permite la formación de NPs a través del proceso de nucleación y crecimiento, b) muestra la adición de 4-aminothiophenol que permite funcionalizar las nanopartículas dejando expuesto al grupo amino que permitirá la funcionalización, c) muestra la adición de cisteamina para funcionalizar las nanopartículas dejando expuesto al grupo amino que permite la funcionalización de la superficie de NPs, de manera similar se realizó la funcionalización con BSA, d) Funcionalización de NPsAu-BSA con ácido fólico: muestra la adición de solución de AF-NHS-EDC a las NPsAu-BSA posteriormente lavada mediante diálisis.

2.2.1 Caracterización de NPs funcionalizadas

La funcionalización de las NPs se caracterizó por Espectroscopía Raman, Electroforesis, mientras que la morfología y tamaño se determinó mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés).

2.3 Exposición de las células HeLa a las NPsAu-AF

Las células HeLa (2×10^5 células/mL) fueron expuestas a diferentes concentraciones de NPsAu-AF por 24h a 37°C/ 5% CO₂, para ello se realizó una dilución seriada, iniciando con una concentración de 350 µM de Au. Posteriormente, se realizó el ensayo de XTT. Como control positivo de daño celular, se utilizaron células HeLa expuestas a 50µM H₂O₂ durante 30 minutos.

2.4 Determinación de la actividad metabólica

La actividad metabólica se realizó por el método XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-h-tetrazolio-5-carboxanilida), el cual se basa en la reducción de la sal a cristales de formazan solubles en agua, proceso bioquímico realizado por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables (Mohammed y col., 2006). La solución de XTT (Sigma) se preparó a una concentración de 0.25 mg/mL en Menadiona (Sigma) al 0.1 mM. Esta solución se añadió a las células y se incubó por 90 min a 37°C en oscuridad. El sobrenadante fue recuperado y se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro para microplacas Epoch™ BioTek. Los datos fueron normalizados con las células control para determinar el porcentaje de actividad metabólica.

2.5 Ensayo de viabilidad por el método de exclusión de Azul de Tripano

El Azul de Tripano es utilizado para discriminar entre células viables (no teñidas) y no viables (teñidas de azul). Para ello, se adicionó a las células expuestas a NpsAu-AF (21.87 μ M) una solución de Azul de Tripano al 0.4% (dilución 1:10) y se incubó por 3min. Después, se realizó la cuantificación de las células viables en cámara de Neubauer, usando un microscopio invertido (Primo Vert Carl Zeiss). El porcentaje de las células viables fue normalizado con respecto a las células no expuestas a las NPsAu-AF.

2.6 Análisis del citoesqueleto y núcleo

Para el análisis de los microfilamentos, las células expuestas a NpsAu-AF (21.87 μ M) por 24h, fueron fijadas con 4% p-formaldehído y 0.05 % Glutaraldehído por 20 min. Después, fueron permeabilizadas con 0.5% de Triton X-100 en amortiguador de microfilamentos (Tris-HCl 10mM, 5mM KCl, 1mM MgCl₂), posteriormente se incubaron con Faloidina-FITC (Sigma Aldrich). Las preparaciones fueron montadas con Vecta Shield-DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories, USA), el DAPI se une a regiones ricas de A-T en el DNA. Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Leica, DMLS) con una cámara AxioCam ICc1 (Carl Zeiss) usando el filtro B (450-490nm).

2.7 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Para el análisis por TEM, las células expuestas a NPsAu-AF (21.87 μ M) por 24 h, fueron preparadas usando el siguiente procedimiento: las células fueron fijadas con una solución de 0.5 % de Glutaraldehído (Electron Microscopy Sciences) y 4 % de Paraformaldehído (Polyscience), en amortiguador de cacodilato 100 mM, pH 7.4 / 20 min. Después, se realizó una posfijación con 1 % OsO₄ por 1 h. Las muestras se lavaron con 100 mM de cacodilato, se deshidrataron con etanol (30-100 %) y se embebieron en resina Epon (Electron Microscopy Sciences). Secciones ultradelgadas

fueron obtenidas usando un Ultramicrotomo (RMC, MT-x), se tiñeron con acetato de uranilo, las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1010).

2.8 SDS-PAGE

Para la obtención de las proteínas totales de las células HeLa con/sin exposición a las NPsAu (21.87 μ M) por 24 h, se realizó un homogenado total en SDS al 2 % en amortiguador de fosfatos a pH 7.0 más una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini-Roche), después se realizó la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), usando la técnica descrita por Laemmli (1970). La cuantificación de las proteínas fue realizada por el método de Lowry (1951). Un gel fue teñido con Azul de Coomassie para la visualización de las proteínas, la adquisición de la imagen se realizó en un equipo ChemiDoc MP System-BIORAD utilizando el software Image Lab™ software (BIORAD). Por otra parte, otro gel se transfirió a membrana de nitrocelulosa para posteriormente realizar una inmunodetección de la Hsp70, como a continuación se describe.

2.9 Determinación de la Hsp70

La membrana de nitrocelulosa fue teñida con rojo de Ponceau, para visualizar las proteínas. Después, se incubó con un anticuerpo contra la Hsp70 (Santa Cruz) a una dilución 1:200/2 h y un anticuerpo secundario chivo anti-conejo acoplado a peroxidasa (Sigma) a una dilución 1:2000/1 h. El revelado se realizó por quimioluminiscencia (kit de quimioluminiscencia BIORAD). Las imágenes fueron obtenidas usando un equipo de adquisición de imagen (ChemiDoc MP System- BIORAD) utilizando el software Image Lab™ software (BIORAD).

2.10 Extracción del RNA

La extracción del RNA de las células expuestas a NpsAu-AF (21.87 μ M) por 24 h, se realizó con el kit “AxiPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep” (AXIGEN Biosciences). El RNA se analizó en un gel de agarosa al 0.8 % con Gel Red™ (BIOTUM). Se utilizó el marcador de peso HyperLadder™ 1kb (BIOLINE). Las bandas se visualizaron en un sistema ChemiDoc MP (luz UV a 260-280 nm, BIORAD) y la adquisición de las imágenes con el software Image Lab™ (BIORAD).

2.11 RT-PCR de la Hsp70

Para determinar la expresión del gen que codifica para la proteína Hsp70, se realizó la RT-PCR. Primero se preparó el mix A (Tabla 1) para sintetizar cDNA utilizando el Kit SuperScript III First Strand (Invitrogen®):

Tabla 1. Mix A: componentes de la mezcla de reacción

Componente	Volumen en μ L
RNA	Volumen necesario para tener 200ng
Oligo Dt	1
dNTPmix (10 mM)	1
H ₂ O	Ajustar a 10 μ L

Después, se incubó el mix A a 65°C durante 5 min e inmediatamente se colocó en hielo durante 1 min. Por otra parte, para la síntesis de cDNA se preparó el siguiente mix (B) (Tabla 2):

Tabla 2. Mix B: componentes de la mezcla de reacción

Componentes	Volumen en μL
Buffer RT 10X	2
MgCl ₂ (25mM)	4
DTT (0.1 M)	2
RNAsa Out (40 U/ μL)	1
SuperScript III RT (200 U/ μL)	1

Se añadió 50 μL de este mix B, para sintetizar el cDNA al mix A. Se mezcló gentilmente y enseguida se incubó a 50°C/50 min. La reacción se detuvo incubando a 85°C/5 min e inmediatamente se colocó en hielo por 1 min. Se añadió 1 μL de RNAsa H y se incubó a 37°C /20 min.

La amplificación mediante PCR (Tabla 3 y 4), se realizó utilizando el Kit Master Mix (Bioline®) y como templado el cDNA sintetizado, como control de carga se utilizó la expresión del gen de actina (Oligo directo: ATGGTGGGCATGGGTCAGAAG y reverso CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG).

Tabla 3. Componentes de la amplificación

Componente	Volumen en μL
Cdna	1
Oligo directo Hsp70 CCACCTACTCCGACAACCAACC	1
Oligo reverso Hsp70 CTCCAGCTCCTTCCTTGTGC	1
Master Mix (2X)	12.5
H ₂ O	9.5

Tabla 4. Condiciones de amplificación

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Desnaturalización Inicial	94 °C	3 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 s	
Alineamiento	57 °C	1 min	25
Extensión	72 °C	1 min	

2.12 Análisis estadístico

Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno con una $n=3$ y los resultados paramétricos (ANOVA, $*p \leq 0.05$) se reportaron para la actividad metabólica como la media \pm la desviación estándar (SD). Además, se realizó un análisis de medias por el Método de Dunnett y Tukey (Minitab 18).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Cultivo celular

Las células HeLa de adenocarcinoma de cérvix ó cáncer cérvico uterino, fueron seleccionadas como modelo para este estudio, esta línea celular tiene morfología epitelial, con un fenotipo adherente que permite la formación de monocapas (Fig. 2).

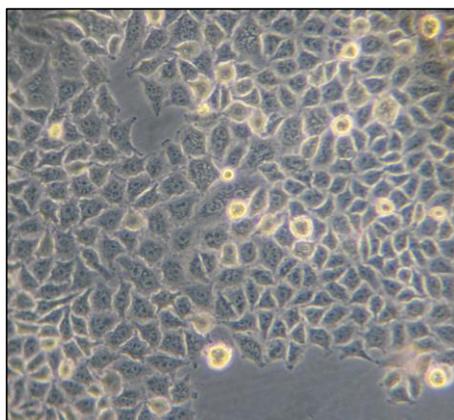


Figura 2. Línea celular HeLa (ATCC® CCL2™)

3.2 Actividad metabólica mitocondrial de las células HeLa expuestas a las NPsAu-AF

Se analizó la actividad metabólica mitocondrial de las células HeLa expuestas a las NPsAu-AF (Figura 4), mientras que las células no expuestas fueron utilizadas como control negativo y la actividad metabólica fue tomada como el 100 % (0.85 Abs). Por otra parte, las células tratadas por 30 min con 50 μM de H_2O_2 para la inducción de estrés oxidativo, fueron utilizadas como control positivo con una actividad metabólica del 18.5 % (0.15 Abs) significativamente diferente con respecto al control negativo y las diferentes concentraciones de NPsAu-AF. Los resultados de la exposición de células

HeLa a NPsAu-AF, se les realizó un análisis estadístico de ANOVA (* $p \leq 0.05$), encontrando diferencias significativas. Después, se realizaron pruebas post hoc, por el método de Dunnett y Tukey para determinar la diferencia entre las medias. Al realizar una prueba de medias por el método de Dunnett (control vs cada uno de los tratamientos), se observó que la concentración de 10.93, 21.87 y 350 μM de NPsAu-CYS-BSA-AF muestran diferencias significativas con respecto al control negativo (Anexo III). En contraste, las células expuestas a NPsAu-4ATP-BSA-AF no muestran diferencias significativas entre el control negativo y los tratamientos (Anexo III). En el análisis de medias de las concentraciones (Método de Tukey), se observaron diferencias significativas entre algunas concentraciones (Fig. 3 y 4).

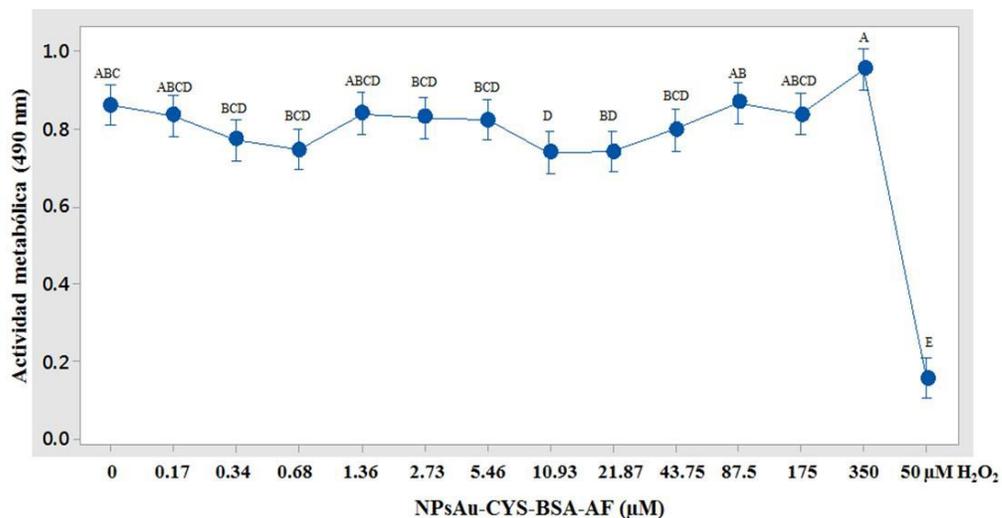


Figura 3. Actividad metabólica mitocondrial de las células HeLa expuestas 24 h a las NPsAu-CYS-BSA-AF. Células HeLa no expuestas a NPAu-CYS-BSA-AF fueron utilizadas como control negativo, un tratamiento con 50 μM de H_2O_2 durante 30 min fue utilizado como control positivo. Los valores representan la media \pm desviación estándar, Método de Tukey ($n=9$), * $p \geq 0.05$. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (95% IC para la media).

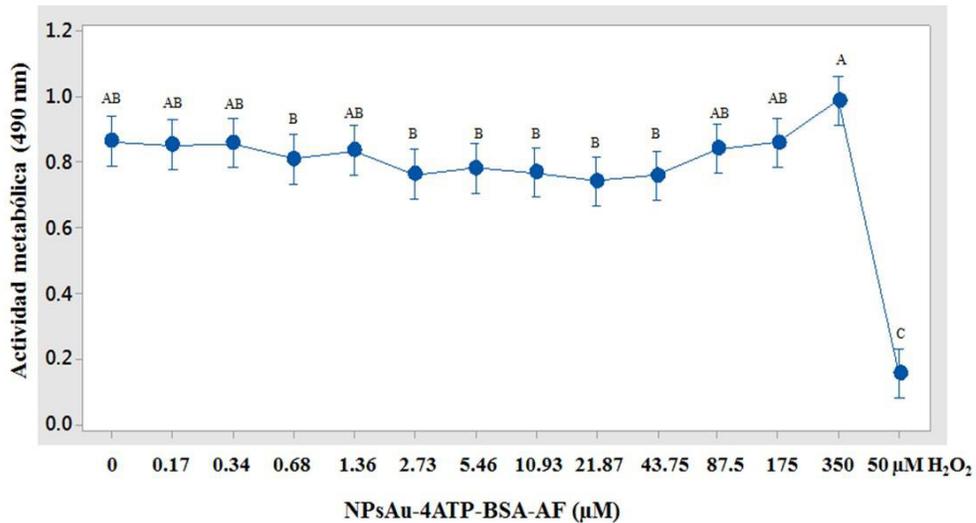


Figura 4. Actividad metabólica mitocondrial de las células HeLa expuestas 24 h a las NPsAu-4ATP-BSA-AF. Células HeLa no expuestas a NPAu-4ATP-BSA-AF fueron utilizadas como control negativo, un tratamiento con 50 μM de H₂O₂ durante 30 min fue utilizado como control positivo. Los valores representan la media ± desviación estándar, Método de Tukey (n=9), *p ≥ 0.05. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (95% IC para la media).

3.3 Análisis morfológico y determinación de la viabilidad celular de las células HeLa expuestas a las NPsAu-AF

Las células HeLa expuestas 24 h a 21.87 μM NPsAu-AF fueron observadas por microscopía de campo claro para determinar alteraciones celulares. Las células HeLa, no presentan cambios morfológicos ni pierden la capacidad de adhesión a la placa de poliestireno manteniéndose la monocapa celular (Fig. 5b y c), características similares al control (Fig. 5a). En contraste, las células tratadas con 50 μM de H₂O₂ pierden la morfología epitelial, las células se observan de forma redondeada, algunas mantienen la capacidad de adhesión (Fig. 5d), como consecuencia, la monocapa celular se pierde

y se observan espacios entre las células (Fig. 5d, asterisco). El ensayo de la exclusión del colorante Azul de Tripano (Fig. 5), indico la integridad en la permeabilidad de la membrana celular y la viabilidad de las células expuestas a las NPsAu-Cys-BSA-AF con un 100 % de viabilidad; en las células tratadas con NPsAu-4ATP-BSA-AF la viabilidad celular fue del 99.9 % y se observaron escasas células no viables (Fig. 5b). Sin embargo, en las células tratadas con 50 μM de H_2O_2 , la viabilidad celular es reducida al 20 %, las células no viables muestran una coloración azul (Fig. 5d flecha).

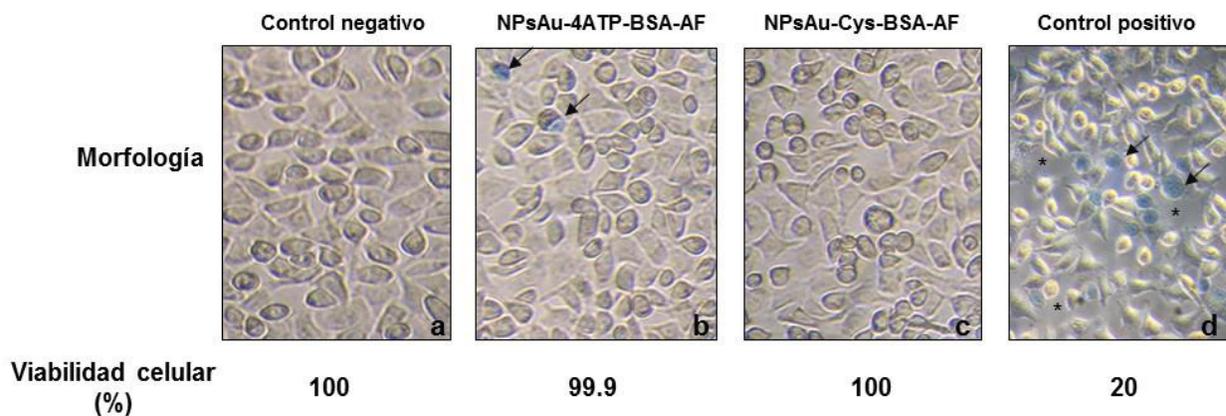


Figura 5. Análisis morfológico y viabilidad de las células HeLa expuesta a NPsAu-AF. Células HeLa en cultivo con medio DMEM suplementado con 10 % SFB con y sin NPsAu-AF. Morfología y determinación de la viabilidad celular (%) por el ensayo de la exclusión del colorante Azul de Tripano. a) Control negativo: Células HeLa no expuestas a NPAu-AF, b) Células HeLa expuestas a NPsAu-4ATP-BSA-AF, c) Células HeLa expuestas a NPsAu-Cys-BSA-AF (21.87 μM) y d) Control positivo: células tratadas con 50 μM de H_2O_2 . Las células no viables son teñidas de azul (flecha), espacios sin células (señaladas por *).

3.4 Análisis estructural de organelos

La interacción de las células HeLa con NpsAu-AF, mostró que la exposición no altera la estructura de los organelos (Fig. 6). La estructura de los microfilamentos de las células expuestas a las NPsAu-4ATP-BSA-AF y NPsAu-Cys-BSA-AF (Fig. 6b y 6c respectivamente) es similar a la muestra del control negativo (Fig. 6a), con finas fibras de actina citosólicas y en las uniones celulares (Fig. 6a, flecha y asterisco respectivamente). El análisis del núcleo mostró el empaquetamiento homogéneo de la heterocromatina, indicando ausencia de fragmentación nuclear (Fig. 6b' y c'), resultado similar al observado en los controles (Fig. 6a'). En cambio, el control positivo exhibe daño celular ($50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$), se observa claramente pérdida de las uniones celulares y la estructura de los microfilamentos (Fig. 6d, asterisco y cabeza de flecha respectivamente), como consecuencia la pérdida de la morfología, además, se observa menos fluorescencia por la disminución del marcaje de la faloidina-FITC, la cual se une con alta selectividad a la F-actina, reflejándose en una baja fluorescencia (Fig. 6d'). Sin embargo, los núcleos no muestran un daño evidente (Fig. 6d').

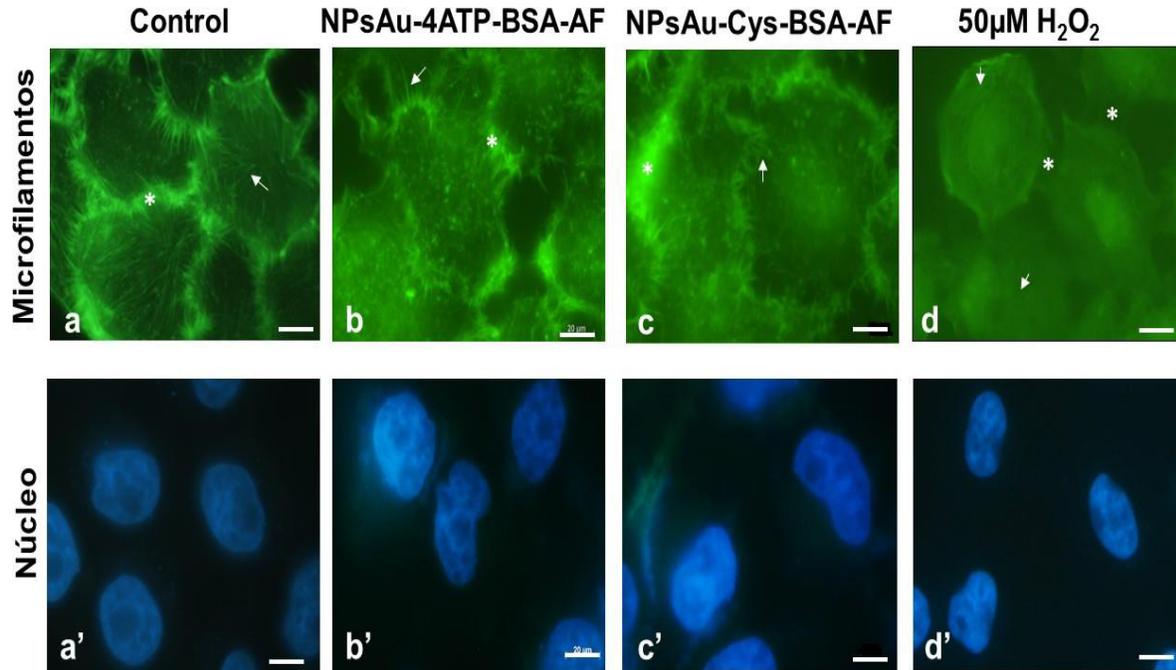


Figura 6. Análisis del citoesqueleto y núcleo de células expuestas a NPsAu-AF. Los microfilamentos fueron teñidos con Faloidina-FITC y el núcleo con DAPI. Células expuestas a 50 μM H_2O_2 fueron utilizadas como control de daño celular a citoesqueleto. Las células fueron expuestas a: b) NPsAu-4ATP-BSA-AF y c) NPsAu-Cys-BSA-AF por 24 h a una concentración de 21.87 μM . Uniones celulares (asteriscos), microfilamentos (flecha), pérdida de microfilamentos (cabeza de flecha). La barra de escala es equivalente a 20 μm .

3.5 Análisis ultraestructural de las células HeLa expuestas a NPsAu-AF

Para determinar si existía un daño a nivel de la ultraestructura de las células expuestas a las NpsAu-AF se realizó un análisis por TEM. Las micrografías revelan que al analizar varias células, no existe una alteración ultraestructural (Fig. 7 panel A). Por ejemplo, la membrana plasmática (MP) y nuclear se muestran íntegras, los núcleos (Nu) no muestran fragmentación nuclear, no obstante, se observaron algunas vacuolas en el citoplasma de las células expuestas a NPsAu-4ATP-BSA-AF, por ejemplo la Fig. 7 b y b' las fechas en rojos muestran las posiciones de algunas vacuolas que observamos. Además, se observó la presencia de NPsAu-4ATP-BSA-AF (20 nm), en el panel B de

la figura 7 se muestra una ampliación que permite ver en más detalle la presencia de las NPs.

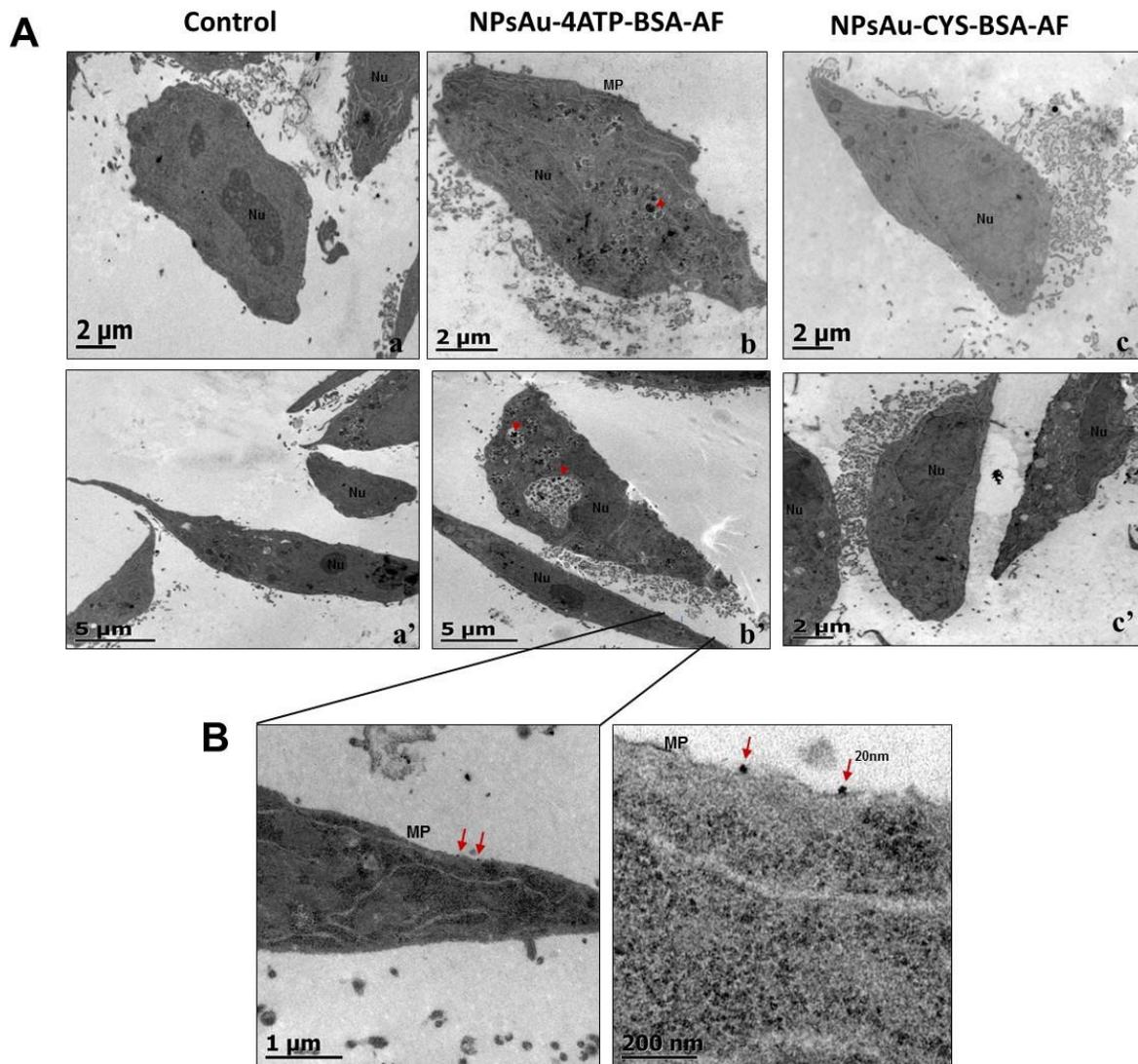


Figura 7. Análisis ultraestructural de las células HeLa expuestas a NPsAu-AF. Panel A. Micrografías de células HeLa. a) Control: Células HeLa no expuestas a NPAu-AF; b) y c) Células expuestas a 21.87 μM de NPsAu-4ATP-BSA-AF y NPsAu-Cys-BSA-AF respectivamente por 24 h. Nu: núcleo, MP: Membrana plasmática. Panel B. Ampliación de una porción de la célula HeLa y la visualización de las NPsAu-4ATP-BSA-AF de 20 nm (flechas en rojo), sobre la superficie de la membrana plasmática (MP).

3.6 Análisis del perfil total de proteínas

El análisis del perfil de proteínas indica que no existe una alteración en el patrón de proteínas totales (Fig. 8) de las células expuestas a NPsAu-AF. Sin embargo, en el control positivo existe una disminución en el patrón de proteínas totales (Fig. 8 carril 6), por el daño celular producido en las proteínas por las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), específicamente por la oxidación de aminoácidos, entrecruzamientos de cadenas peptídicas y formación de grupos carbonilos.

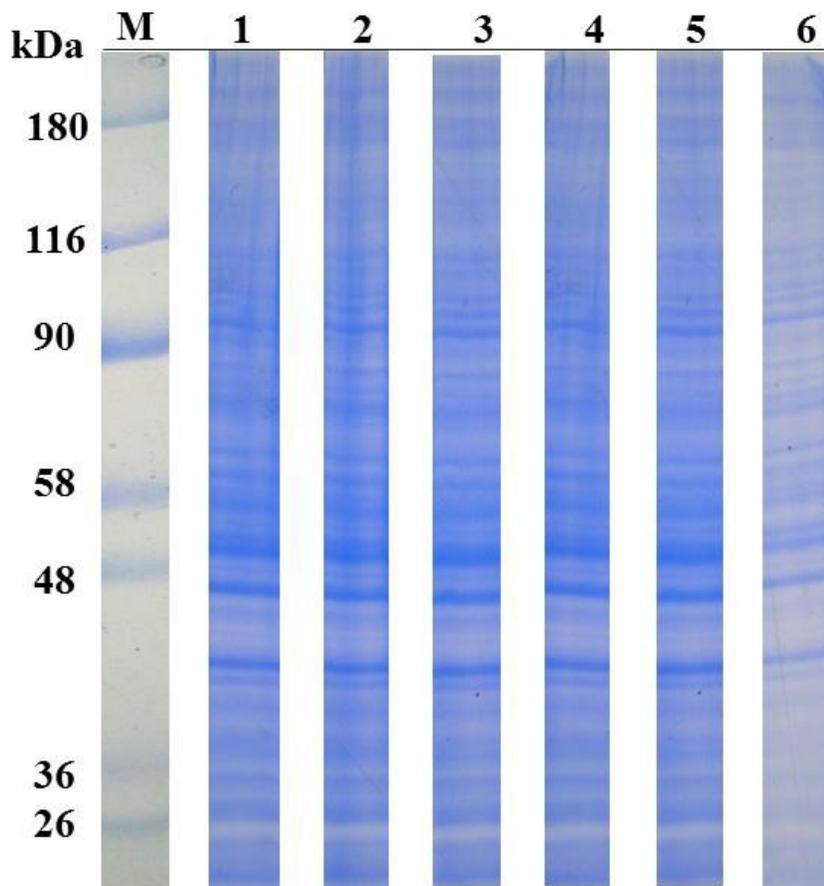


Figura 8. Perfil de proteínas totales de células HeLa expuestas a NPsAu-AF. Carril: M. Marcadores de peso molecular, 1. Control. Células no expuestas a NPsAu-AF; Células expuestas a NPsAu-AF (21.87 μ M): 2. NPsAu-Cys-BSA-AF, 3. NPsAu-4ATP-BSA-AF, 4. NPsAu-Cys-BSA, 5. NPsAu-4ATP-BSA, 6. 50 μ M H₂O₂.

3.7 Inmunodetección de la proteína Hsp70 en las células HeLa expuestas a las NPsAu-AF

La detección de la proteína Hsp70, proteína involucrada en procesos de estrés celular, reveló que no existe un estrés en las células expuestas a NPsAu-AF (Fig.9 carril 2 y 3), comparado con células HeLa que fueron expuestas a un estrés oxidativo con 50 μ M H₂O₂ (Fig. 9 carril 6). La inducción de la Hsp70 debido al estrés oxidativo por H₂O₂ fue observada por la intensidad en la banda de 70 kDa en comparación con la muestra control (Fig. 9 carril 1) y las células expuestas a NPsAu-Cys-BSA-AF y NPsAu-4ATP-BSA-AF (Fig. 9 carril 2 y 3 respectivamente). Además, para este ensayo se expusieron células HeLa a NPsAu-Cys-BSA y NPsAu-4ATP-BSA (Fig. 9 carril 4 y 5), observando un incremento de la Hsp70 de las células expuestas a NPsAu-4ATP-BSA. De acuerdo con el análisis de la cantidad relativa de la Hsp70 (Fig. 9B) con respecto al control negativo, es evidente que sólo el control positivo (6.93) induce un incremento significativo de la Hsp70 (Fig. 9B). Los resultados indican, que la exposición de las células HeLa a las NPsAu independientemente de la funcionalización y bioconjugación, no induce la expresión de la proteína Hsp70.

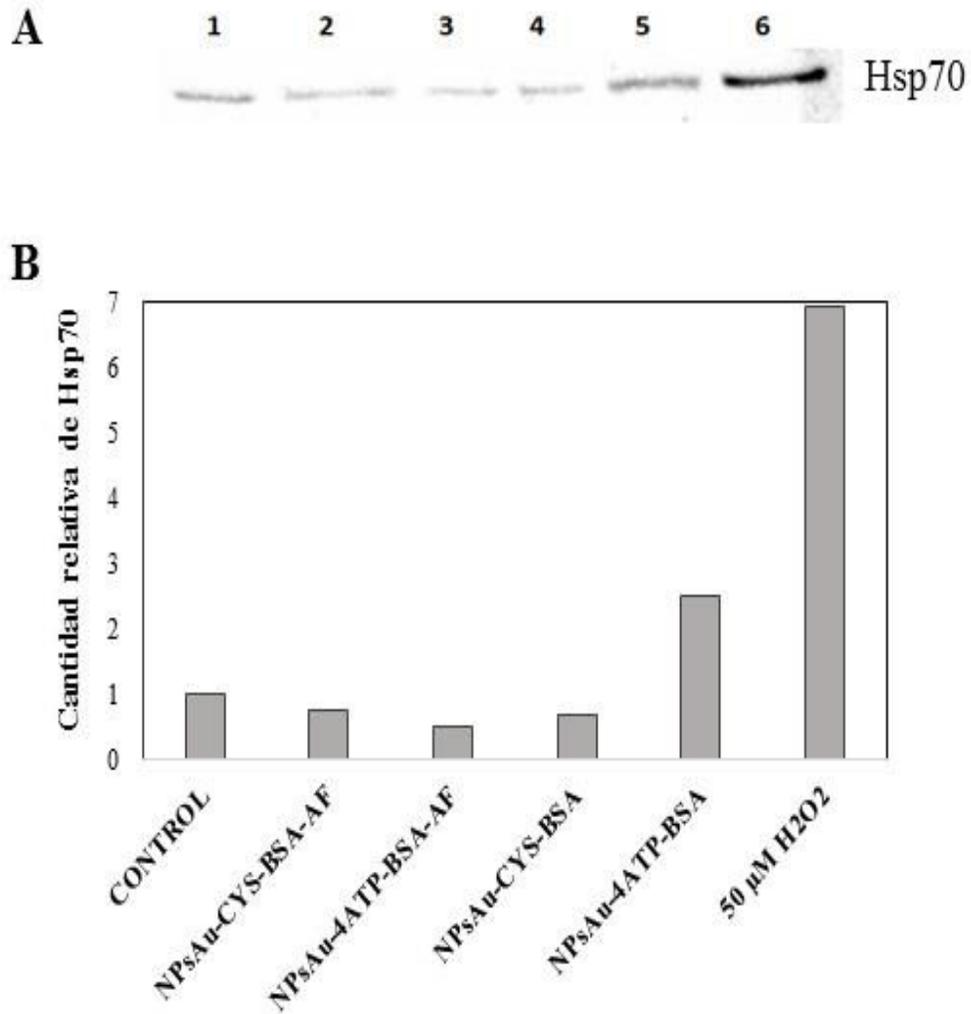


Figura 9. Inmunodetección de la Hsp 70 de células HeLa expuestas a NPsAu-AF. Panel A. 1. Control negativo (células no expuestas a NPsAu), 2. NPsAu-Cys-BSA-AF, 3. NPsAu-4ATP-BSA-AF, 4. NPsAu-Cys-BSA, 5. NPsAu-4ATP-BSA, 6. Control positivo (células expuestas a 50 μ M H₂O₂). Panel B. Análisis de la cantidad relativa de la Hsp70 con respecto al control negativo (valor = 1).

3.8 Expresión del gen que codifica para la proteína Hsp70 en células HeLa expuestas a NPsAu-AF

El análisis electroforético del ácido ribonucleico (RNA) de las células HeLa expuestas a NPsAu, indicó que no había degradación del material genético por efecto de la exposición a las NPsAu independientemente de la funcionalización (Fig. 10), ya que en el patrón de las bandas del RNA ribosomal no se observó un barrido.

Por otra parte, el ensayo de RT-PCR (Figura 11) reveló que la exposición de las células HeLa a las NPsAu-AF, no inducen la expresión del gen que codifica para la proteína Hsp70 (400 pb), debido a que las bandas de las células expuestas a NPsAu (Fig. 11, carriles 3, 4, 5 y 6) presentaron similar intensidad respecto a la banda de la muestra control (Fig. 11 carril 2). Además, se analizó la expresión del gen que codifica para la proteína de actina (450 pb), como control del ensayo de RT-PCR (Fig. 11).

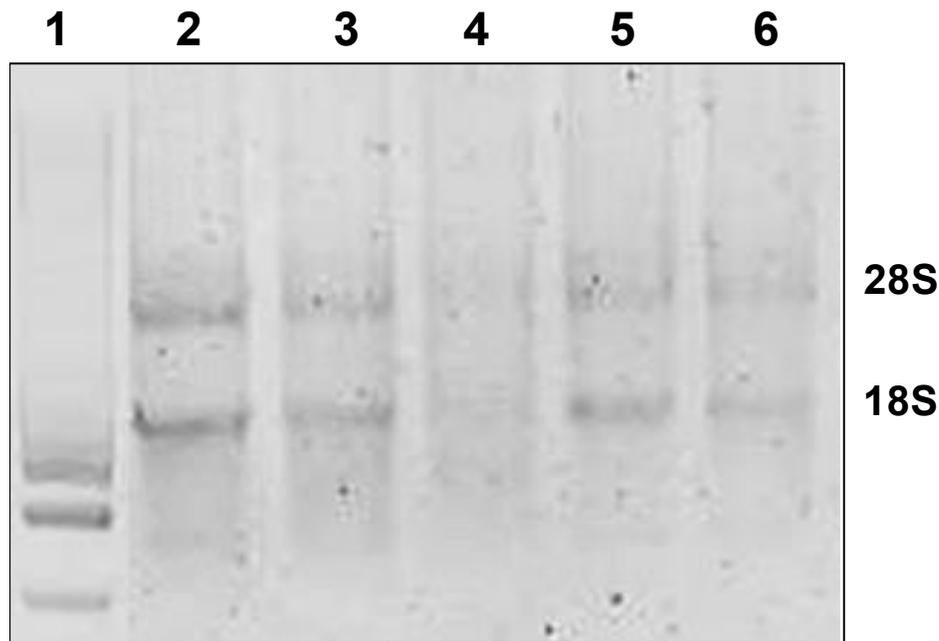


Figura 10. Análisis electroforético del RNA aislado de células HeLa en diferentes condiciones. Carril: Carril: 1) Marcador de tamaño molecular (HyperLadder™ 1Kb Bioline), 2) Control: células sin exponer a las NPsAu, 3) NPsAu-4ATP-BSA, 4) NPsAu-4ATP-BSA-AF, 5) NPsAu-Cys-BSA, 6) NPsAu-Cys-BSA-AF. La exposición se realizó por 24 h/37°C.

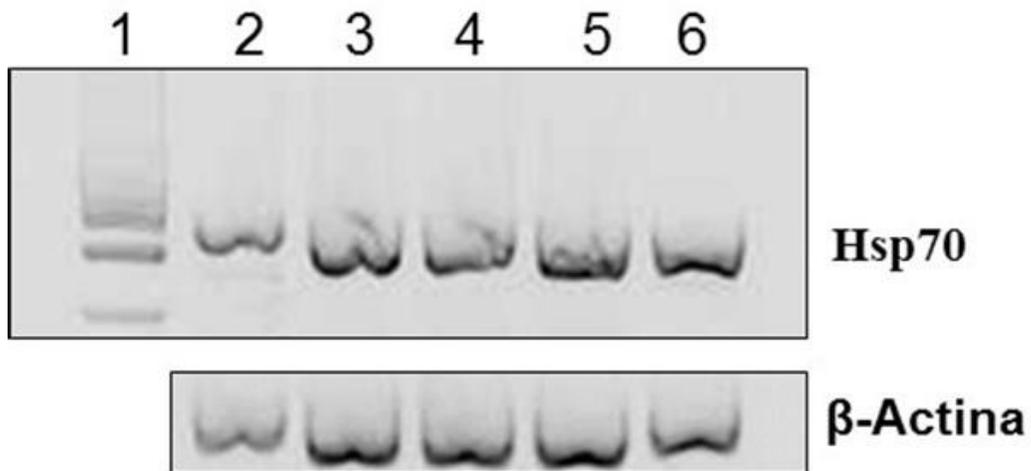


Figura 11. Expresión del gen que codifica para la proteína Hsp 70 de células HeLa expuestas a diferentes condiciones. Carril: 1) Marcador de tamaño molecular (HyperLadder™ 1Kb Bioline), 2) Control: células sin exponer a las NPsAu, 3) NPsAu-4ATP-BSA, 4) NPsAu-4ATP-BSA-AF, 5) NPsAu-Cys-BSA, 6) NPsAu-Cys-BSA-AF. La exposición se realizó por 24 h/37°C.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Las nanopartículas de oro (NPsAu) destacan especialmente por sus propiedades catalíticas, ópticas, mecánicas, eléctricas y magnéticas. Por ello, en los últimos años se ha incrementado su uso en aplicaciones industriales y biomédicas (Mateo y col., 2013). Por otra parte, el diseño de un nanomaterial multifuncional es primordial en la nanomedicina para promover una aplicación versátil y eficiente (Golshan y col., 2017).

Debido a la evidente exposición de los organismos biológicos a los nanomateriales, surge una nueva rama de la toxicología, la Nanotoxicología, la cual estudia los protocolos de prueba y la evaluación de riesgos en humanos y ambientales (Arora y col., 2012). En este sentido, los estudios disponibles sobre la toxicidad de las NPsAu aún son limitados en comparación con la nuevas aplicaciones que día a día surge, y en muchos de estos muestran resultados contradictorios (Mateo y col., 2013). Por este motivo, resulta necesario el desarrollo de un mayor número de estudios sobre sus efectos citotóxicos, con el fin de establecer condiciones seguras para su uso en los diferentes campos de aplicación.

Por otra parte, el receptor de folato alfa se sobreexpresa diferencialmente en diferentes tipos y etapas del cáncer, por ejemplo; en un tumor primario está sobreexpresado del 15-20%, pero en situación de recaída tumoral, está en más del 90 %. En tejidos u órganos sanos, la expresión es muy limitada (Parker y col., 2005, Zwicke y col. 2012). El AF (441 Da) es una molécula estable en diferentes condiciones de pH y temperatura, no inmunógeno y con la capacidad de unirse al receptor de folato alfa independientemente de la conjugación del AF con marcadores o fármacos (Luong y col., 2017).

Desde esta perspectiva, en este proyecto se analizó la interacción de las células HeLa con NPsAu funcionalizadas con moléculas orgánicas y bioconjugadas con ácido fólico (AF). En estudios previos del grupo de trabajo, se demostró que la funcionalización de las NPsAu con 4ATP, BSA o Cys, son fácilmente dispersadas en medios acuosos y presentan una baja agregación, además, no se observó un efecto citotóxico en las células HeLa (Cardoso y col., 2017).

Sin embargo, es importante resaltar que la adición de las diferentes moléculas a las NPsAu cambia sus propiedades ópticas y estructurales, características que deben ser tomadas en cuenta para las aplicaciones ópticas o fototérmicas de las NPsAu funcionalizadas.

En este estudio, la funcionalización de las NPsAu con el AF no alteró la actividad metabólica independientemente de la concentración, mostrando una buena compatibilidad. Reportes similares en células de carcinoma epitelial KB (cáncer de cuello-cabeza) expuestas a NPsAu-AF no tienen un efecto citotóxico significativo en las células KB. Además, los efectos combinados de radioterapia (irradiación con rayos X) y terapia fototérmica (luz láser) en las células KB expuestas previamente 6 h con las NPsAu-AF a concentraciones de 20 – 40 μ M, se observó una disminución de la viabilidad celular hasta un 54 %, una reducción de la viabilidad mayor que la obtenida con NPsAu-AF + Radioterapia ó NPsAu-AF + Terapia fototérmica. Por otra parte, se observó una mayor inducción de la apoptosis en células KB expuestas a las NPsAu-AF + Terapia fototérmica (Neshastehriz y col., 2017). Estos resultados confirman que F-AuNPs en combinación con Radioterapia + Terapia fototérmica, pueden aumentar significativamente los efectos terapéuticos proporcionando la pauta para una foto-termo-radioterapia del cáncer utilizando nanoconjugados de oro con AF.

Por otra parte, en células HeLa expuestas por 24 h a NPsAu-AF no presentan efecto citotóxico, pero se aumenta significativamente la muerte celular por la inducción del efecto de la dosis de radiación producido por rayos X (Khoshgard y col., 2014).

En contraste, en células humanas de adenocarcinoma colorrectal (HT29) expuestas a NPsAu (31.99 nm) sin funcionalización, disminuye la actividad metabólica a un 60 %, la tinción con azul de tripano indica que no existe un efecto en la integridad de la membrana celular (Schneider y col., 2017). En nuestro ensayo, las células HeLa expuestas a NPsAu-4ATP-BSA-AF y NPsAu-Cys-BSA-AF muestran un 99.9 y 100 % de viabilidad celular, indicando la integridad en la permeabilidad de la membrana celular. Además, las células HeLa no presentan cambios morfológicos ni pierden la capacidad de adhesión al sustrato.

En la actualidad, existen una variedad de estudios *in vitro* e *in vivo* sin efectos citotóxicos de NPsAu en modelos celulares como K562 (leucemia), SK-BR3 (cáncer de mama), PC-3 (próstata), V79 (fibroblastos de pulmón), entre otras; sin y con una variedad de moléculas que modifican la superficie de las NPsAu, con propuestas para su uso como nanoacarreadores, liberación de antineoplásicos como la doxorubicina y el efecto térmico provisto por NPsAu, así como la especificidad por el AF (Chauhan y col., 2017; Golshan y col., 2017; Tsai y col., 2013). A su vez, estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran el efecto citotóxico de las NPsAu desde efectos genotóxicos, inducción de la apoptosis, procesos de inflamación, estrés oxidativo y daño celular (Tsai y col., 2013, Wahab y col., 2014). En este sentido, la detección de la proteína y la expresión del gen de la Hsp70, proteína involucrada en procesos de estrés, reveló que no existe un estrés celular ni daño genotóxico en las células HeLa expuestas a las NPsAu-AF.

Otro factor importante que se consideró para la evaluación de la citotoxicidad de las NPsAu-AF es el citoesqueleto. El citoesqueleto está compuesto principalmente por filamentos de proteínas denominados motores moleculares (microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios), que forman una red tridimensional y son importantes en la regulación de la estructura y función de las células. La modificación o destrucción de estos motores moleculares provoca importantes cambios fisiológicos, funcionales y morfológicos de las células, e incluso la muerte celular (Cardoso y col., 2017). Sin embargo, la exposición de las células HeLa a las NPsAu-AF, no altera la estructura del citoesqueleto y el núcleo. En células de osteoblastos (MG-63) la distribución de los microfilamentos y la morfología del núcleo son similares a las MG-63

no expuestas a NPsAu. Además, micrografías de TEM indican que existen agregados de NPsAu en vesículas citoplásmicas (endosomas tardíos) dependientes de la concentración de NPsAu (Tsai y col., 2013). En las micrografías de las células HeLa expuestas a las NPsAu-4ATP-BSA-AF, también se observan vacuolas citoplásmicas sugiriendo la formación de agregados de nanopartículas (Fig. 7b y b'), la membrana celular se encuentra íntegra correlacionando los resultados con los ensayos de la permeabilidad de la membrana. Se ha sugerido que la incorporación de las NPsAu se realiza mediante un proceso de endocitosis no específico permaneciendo las NPsAu en el endosoma durante un tiempo prolongado (Schneider y col., 2017; Tsai y col., 2013). En el caso de las NPsAu-AF, son incorporadas a la célula mediante un proceso receptor-ligando, es decir, AF – Receptor de folatos alfa, por un proceso de endocitosis específico (Luong y col., 2017). Sin embargo, es necesario realizar más estudios de la acumulación de las NPsAu-AF en las células HeLa.

Es fundamental establecer la seguridad en el uso de las nanopartículas de oro antes de ser aplicadas en experimentos *in vivo*, por lo cual la realización de estos ensayos es de vital importancia. El principal aporte de este estudio fue establecer que nanopartículas funcionalizadas con tres tipos de moléculas orgánicas y bioconjugadas con ácido fólico, no inducen un efecto citotóxico en células HeLa que sobreexpresan los receptores de folato. De esta manera el uso de nanopartículas de oro acopladas a ácido fólico es una potencial herramienta para diversas aplicaciones biológicas. Uno de los aspectos importantes en este nanoconjugado “NPsAu-AF”, son las oscilaciones de la superficie del plasmón de resonancia de las NPsAu, las propiedades físicas de las NPsAu le permiten absorber la energía del láser en una longitud visible o bien en el cercano infrarrojo y convertir la energía absorbida en calor, resultando como una perspectiva la implementación de una terapia fototérmica. Al mismo tiempo, la especificidad bioquímica de la interacción receptor – ligando por el ácido fólico, para lograr una terapia dirigida.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIÓN

En este trabajo se propuso el estudio de la interacción de nanopartículas de oro funcionalizadas con diferentes moléculas orgánicas (4-ATP, cisteamina y BSA), con la finalidad de estudiar los posibles daños toxicológicos que estas pudieran causar en cultivos *in vitro* de la línea celular HeLa.

Los resultados obtenidos propician evidencia para concluir que la exposición de las células HeLa a las NPsAu-AF no induce un efecto citotóxico en experimentos *in vitro*; mostrando prueba clara sobre la baja toxicidad de las NPsAu. De acuerdo a nuestro estudio, se puede concluir que las moléculas orgánicas ayudan a reducir significativamente el efecto citotóxico de este tipo de nanomateriales, respecto a estudios anteriores con nanopartículas que no estaban funcionalizadas con éstas moléculas. Por lo que el uso de las NpsAu-AF en células que sobreexpresan el receptor de folato es una potencial herramienta para diversas aplicaciones biológicas, tales como terapia fototérmica, aplicación de fármacos, etc. Sin embargo, para asegurar su uso en aplicaciones biológicas, se sugiere el análisis de la exposición de organismos superiores a las NpsAu-AF.

REFERENCIAS

Arora S., Rajwade J. M., Paknikar K. M. (2012). Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 258: 151-165

Assaraf Y. G., Leamon C.P., Reddy J.A. (2014). The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment. *Drug Resistance Updates*. 17: 89-95

Berberian P. A., Myers W., Tytell M., Challa V., Bond M. G. (1990) Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. *Am J Pathol* 136: 71-80

Cardoso Avila P.E., Rangel Mendoza A., Pichardo Molina J.L., Flores Villavicencio L.L., Castruita Dominguez J.P., Chilakapati M.K., Sabanero M. (2017) Biological response of HeLa cells to gold nanoparticles coated with organic molecules. *Toxicology in Vitro* 42:114-122

Chauhan G., Chopra V., Tyagi A., Rath G., Sharma R.K., Goyal A.K. (2017) "Gold nanoparticles composite-folic acid conjugated graphene oxide nanohybrids" for targeted chemo-thermal cancer ablation: In vitro screening and in vivo studies. *Eur J. of Pharmaceutical Sciences*. 96: 351–361

Cruz D.A., Rodríguez M.C., López J.M., Herrera V.M., Orive A.G., Creus A.H. (2012) Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda. *Av. cien. ing.:* 3: 67-78

Golshan M., Salami-Kalajahi M., Mirshekarpour M., Roghani-Mamaqani H., Mohammadi M. (2017) Synthesis and characterization of poly(propylene imine)-dendrimer-grafted gold nanoparticles as nanocarriers of doxorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 155: 257–265

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2016) Estadísticas a propósito del... día mundial contra el cáncer (4 de febrero) Aguascalientes, Ags. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf

Khoshgard K., Hashemi B., Arbabi A., Rasaei M.J., Soleimani M. (2014) Radiosensitization effect of folate-conjugated gold nanoparticles on HeLa cancer

cells under orthovoltage superficial radiotherapy techniques. *Physics in Medicine and Biology* 59: 2249–2263

Luong D., Kesharwani P., Alsaab H.O., Sau S., Padhye S., Sarkar F.H., Iyer A.K. (2017) Folic acid conjugated polymeric micelles loaded with a curcumindifluorinated analog for targeting cervical and ovarian cancers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 157: 490–502

Madrigal J., López O., Blanco L., Muñoz B., Ramos P., Van Oostrom M., Meilhac O., Michel J.B., Egido J., Martín J.L. (2009) Heat Shock Proteins as Potential Therapeutic Targets in Atherosclerosis. *Clin Invest Arterioscl.* 21:163-72. DOI: 10.1016/S0214-9168(09)72041-8

Mateo D., Morales P., Ávalos A., Haza A.I. (2013) Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro. *Gold nanoparticles: Applications and in vitro cytotoxicity.* *Acta Toxicol. Argent.* 21: 102-109

Neshastehriz A., Tabei M., Maleki S., Eynali S., Shakeri-Zadeh A. (2017) Photothermal therapy using folate conjugated gold nanoparticles enhances the effects of 6 MV X-ray on mouth epidermal carcinoma cells. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology.* 172: 52–60

Ngernyuang N., Seubwai W., Daduang S., Boonsiri P., Limpai boon T., Daduang J. (2015) Targeted delivery of 5-fluorouracil to cholangiocarcinoma cells using folic acid as a targeting agent. *Materials Science and Engineering C.* 60: 411-415.

Organización Mundial de la Salud. (2017) Cáncer Nota descriptiva Febrero de 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Parker N., Turk M.J., Westrick E., Lewis J.D., Low P.S., Leamon C.P. (2005) Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal. Biochem.* 338:284-293

Pérez M. (2016) Estudio del mecanismo molecular de apoptosis y de la seguridad de la terapia fototérmica aplicada al tratamiento del cáncer utilizando nanoprismas de oro funcionalizados. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. 195 pág. (1, 40, 41, 43, 50, 51)

Rathinaraj P., Lee K., Park S.Y., Kang I.K. (2015) Targeted images of KB cells using folate-conjugated gold nanoparticles. *Nanoscale Research Letters.* 10: 5

Ravichandrana M., Ozab G., Velumania S., Tapia Ramírez J., Verad A., Leijad L. (2017) Design and evaluation of surface functionalized superparamagneto-plasmonic nanoparticles for cancer therapeutics. *Int. J. of Pharmaceutics* 524: 16–29

Roblero G.V., Ramón E. (2015) Uso de nanopartículas (NP) en la terapia fotodinámica (photodynamic therapy [PDT]) contra el cáncer. *Gac Med Mex.* 151: 85-86

Secretaría de Salud. Servicios de salud del estado de Puebla. (2016) Qué es el cáncer. 08 Agosto 2016. <http://www.ss.pue.gob.mx/index.php/articulos-puebla-sana/item/47-aprende-sobre-el-cancer>

Schneider T., Westermann M., Gleit M. (2017) In vitro uptake and toxicity studies of metal nanoparticles and metal oxide nanoparticles in human HT29 cells. *Nanotoxicology Arch Toxicol.* DOI 10.1007/s00204-017-1976-z

Tsai S.W., Liaw J.W., Kao Y.C., Huang M.Y., Lee C.Y., Rau L.R., Huang C.Y., Wei K.C., Ye T.C. (2013) Internalized Gold Nanoparticles Do Not Affect the Osteogenesis and Apoptosis of MG63 Osteoblast-Like Cells: A Quantitative, In Vitro Study. *PLOS ONE* 8: e76545

Wahab R., Dwivedi S., Khan F., Mishra Y.K., Hwang I.H., Shin H.S., Musarrat J., Al-Khedhairy A.A. (2014) Statistical analysis of gold nanoparticle-induced oxidative stress and apoptosis in myoblast (C2C12) cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 123: 664–672

Zhou Z, Zhang C, Qian Q, Ma J, Huang P, Zhang X, Pan L, Gao G, Fu H, Fu S, Song H, Zhi X, Ni J, Cui D. (2013) Folic acid-conjugated silica capped gold nanoclusters for targeted fluorescence/X-ray computed tomography imaging. *Journal of Nanobiotechnology* 11:17

Zwicke G.L., Mansoori G.A., Jeffery C.J. (2012) Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Rev,* 3 doi.org/10.3402/nano.v3i0.18496

ANEXOS

ANEXO I

Participación en Congresos Nacionales e Internacionales

XIII encuentro
Participación de la
Mujer
en la
Ciencia

17-19 AGOSTO 2016 León, Guanajuato

CIO
CENTRO DE INVESTIGACIONES
EN ÓPTICA, A.C.

Otrorga el presente
Reconocimiento
por su valiosa participación a:

Rangel Mendoza Alejandra, Pichardo Molina Juan Luis, Flores Villavicencio Lérica L., Cardoso Ávila Pablo y Sabanero López Myrna

Por el trabajo:
**NANOPARTÍCULAS DE ORO RECUBIERTAS CON ÁCIDO FÓLICO Y SU INTERACCIÓN
CON CÉLULAS CANCEROSAS**

Cristina E. Solano Sosa
Cristina E. Solano Sosa
Representante del Comité Organizador

E. Delfino
Dr. Elder de la Rosa Cruz
Director General del CIO

Hilda Bruso



Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

a

Alejandra Rangel Mendoza

con el proyecto

Nanopartículas de oro recubiertas con ácido fólico y su interacción con células cancerosas

Presentado en el
4^{er} Encuentro de Jóvenes Investigadores

Alentamiento
"La verdad os hará libres"
Guanajuato, Gto. del 21 y 22 de septiembre de 2016

Dr. José Luis Lucio Martínez
Secretario Académico

Dr. Luis Felipe Guerrero Agripino
Rector General

Dr. Mauro Napsuciale Mendivil
Director de Apoyo a la Investigación y al Posgrado



UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO **XVII** Reunión Internacional
de Ciencias Médicas

La Universidad de Guanajuato Campus León a través
del Departamento de Ciencias Médicas

otorga la presente

Constancia

Rangel Mendoza Alejandra

Cardoso Ávila Pablo, Flores Villavicencio Lérica Liss, Sabanero López Myrna, Castruita Domínguez J.
Pedro, Pichardo Molina Juan Luis.

Por la presentación del **trabajo libre en cartel** titulado

**ANÁLISIS CELULAR Y BIOQUÍMICO DE CELULAS HELA EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE
ORO FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO FÓLICO**

26, 27 y 28 de abril de 2017 en León, Guanajuato.
“La Verdad Os Hará Libres”

Dr. Tonatihu García Campos
Director de División de
Ciencias de la Salud

Dra. Ma. Eugenia Garay Sevilla
Presidenta del Comité Organizador
Departamento de Ciencias Médicas

Dr. Maciste Habacuc Macías Cervantes
Director del Departamento
de Ciencias Médicas

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



La Universidad de Guanajuato
otorga la presente

CONSTANCIA

Alejandra Rangel Mendoza, Lérica Liss Flores Villavicencio, Pablo Cardoso Ávila, Pedro Castruita Domínguez, Juan Luis Pichardo Molina, Myrna Sabanero López, Julio César Villagómez Castro

por la presentación del trabajo

ANÁLISIS DE LA EXPOSICIÓN DE CÉLULAS HELA A NANOPARTÍCULAS DE ORO RECUBIERTAS CON
ÁCIDO FÓLICO
en el

4to Encuentro Anual de Estudiantes: Innovación e Investigación en la DCNE, que fue desarrollado los días 11 y 12 de octubre dentro del marco de la Segunda Semana de Innovación, Emprendimiento e Investigación de la División de Ciencias Naturales y Exactas

Guanajuato, Gto. 14 de octubre de 2017

Dr. Fernando Israel Gómez Castro
Coordinador General de la Segunda
Semana de Innovación, Emprendimiento
e Investigación en la DCNE

Dr. Agustín Ramón Uribe Ramírez
Director de la División de Ciencias
Naturales y Exactas

Dr. Gustavo Cruz Jiménez
Presidente del Comité Organizador
del 4º Encuentro Anual de
Estudiantes

ANEXO II

Publicación de resumen en extenso en memorias indexadas

- **NANOPARTÍCULAS DE ORO RECUBIERTAS CON ÁCIDO FÓLICO Y SU INTERACCIÓN CON CÉLULAS CANCEROSAS.**

Alejandra Rangel Mendoza, Pablo Cardoso Ávila, Lérida Liss Flores Villavicencio, Myrna Sabanero López, Juan Luis Pichardo Molina.

Memoria Jóvenes Investigadores 2017. 3(1): 174-177. ISSN 2395-9797

- **NANOPARTÍCULAS DE ORO RECUBIERTAS CON ÁCIDO FÓLICO Y SU INTERACCIÓN CON CÉLULAS CANCEROSAS**

Alejandra Rangel Mendoza, Juan Luis Pichardo Molina, Lérida L. Flores Villavicencio, Pablo Cardoso Ávila, Myrna Sabanero López.

Memoria XVIII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia 2016. 2. Biología y Química: 1076 – 1080. ISSN 2448-5063

Publicación del artículo científico en una revista internacional

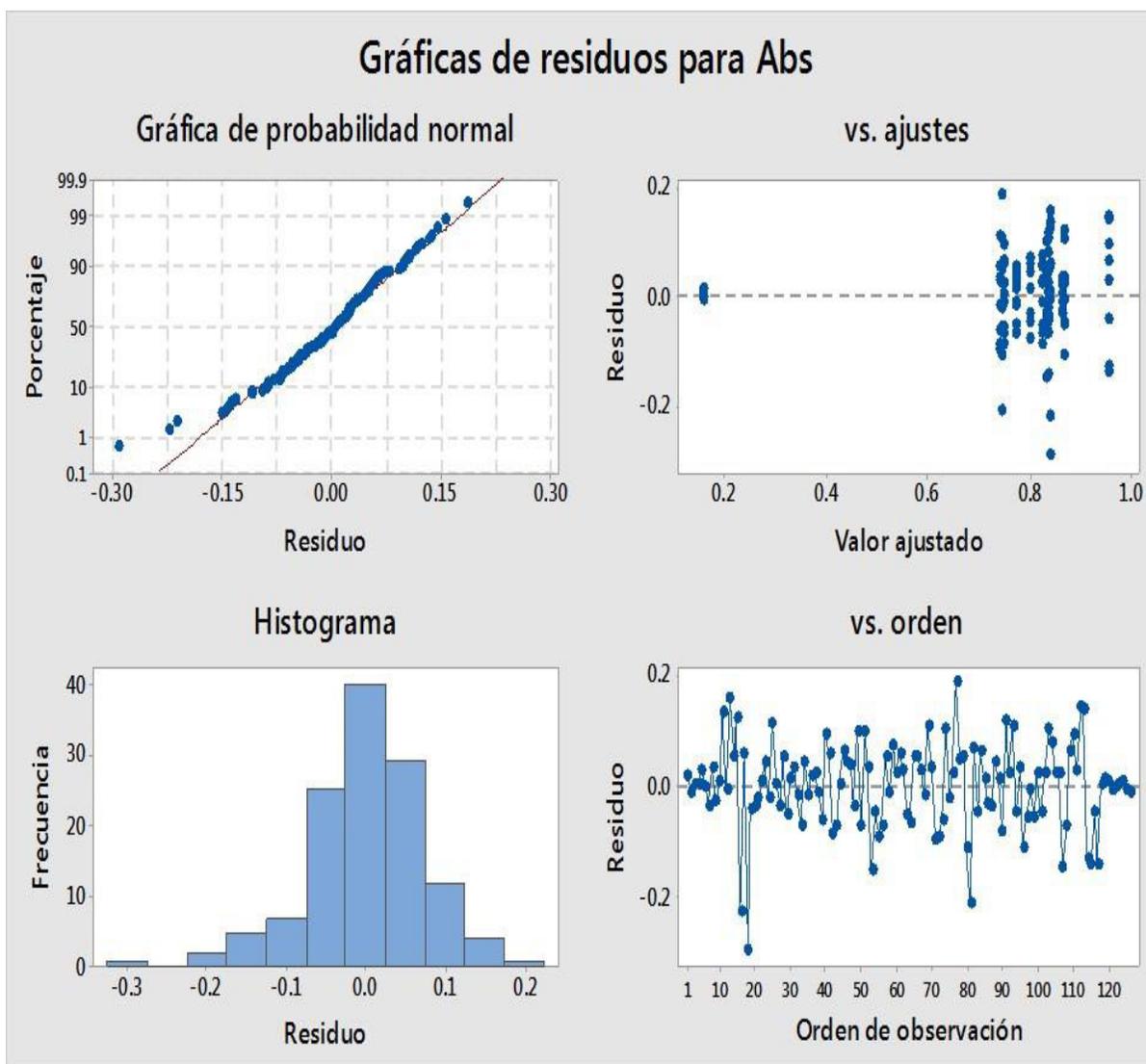
Cardoso Ávila P.E., Rangel Mendoza A., Pichardo Molina J.L., Flores Villavicencio L.L., Castruita Domínguez J.P., Chilakapati M.K., Sabanero López M. (2017) Biological response of HeLa cells to gold nanoparticles coated with organic molecules. *Toxicology in Vitro*, 42: 114-122

ANEXO III

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

❖ Células HeLa expuestas a NPsAu-CYS-BSA-AF

ANOVA de un solo factor
Actividad metabólica (Abs 490 nm) vs Concentración de NPsAu- CYS -
BSA-AF



Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	13	4.0725	84.71%	4.0725	0.313268	47.74	0.000
Error	112	0.7349	15.29%	0.7349	0.006562		
Total	125	4.8074	100.00%				

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 91%

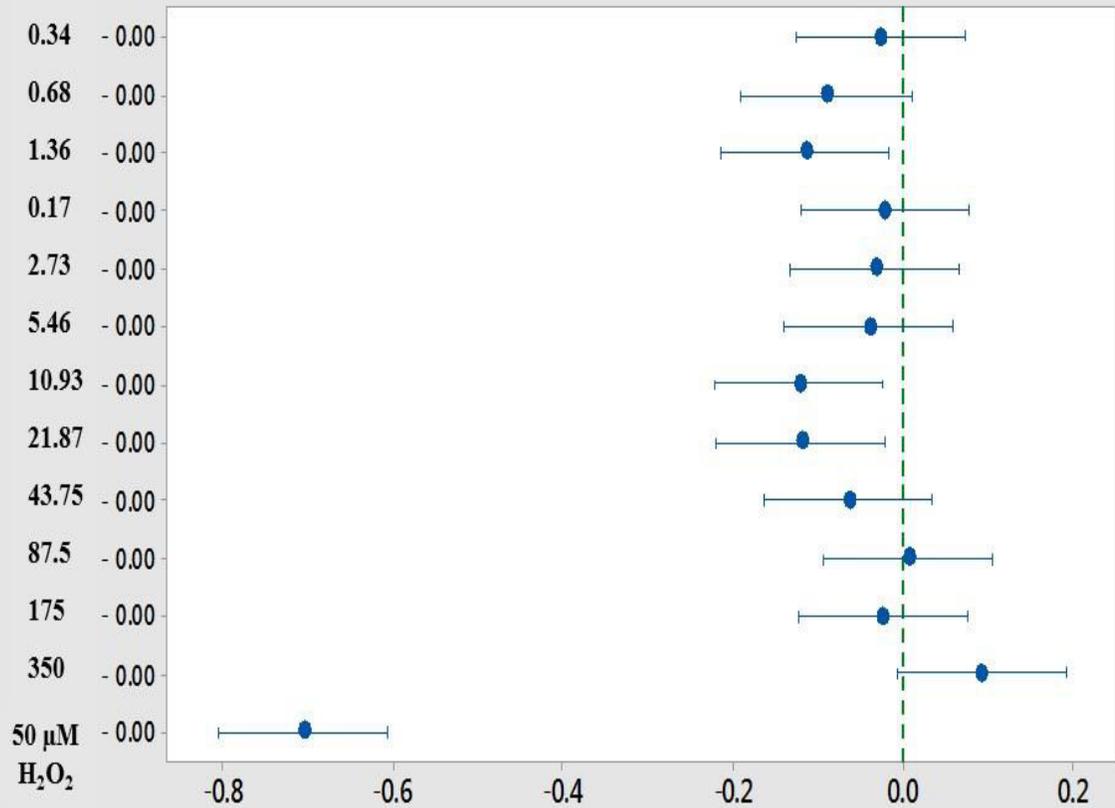
NPsAu-CYS-BSA-AF (μM)	N	Media	Agrupación
350	9	0.9558	A
87.5	9	0.8696	A B
0	9	0.86389	A B C
0.17	9	0.8420	A B C D
175	9	0.8390	A B C D
0.34	9	0.8364	A B C D
2.73	9	0.8313	B C D
5.46	9	0.8239	B C D
43.75	9	0.7993	B C D
0.68	9	0.7733	B C D
1.36	9	0.7480	B C D
21.87	9	0.7439	C D
10.93	9	0.7410	D
50 μM H_2O_2	9	0.15722	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs simultáneos de 91% de Dunnett

NPsAu-CYS-BSA-AF (μM)

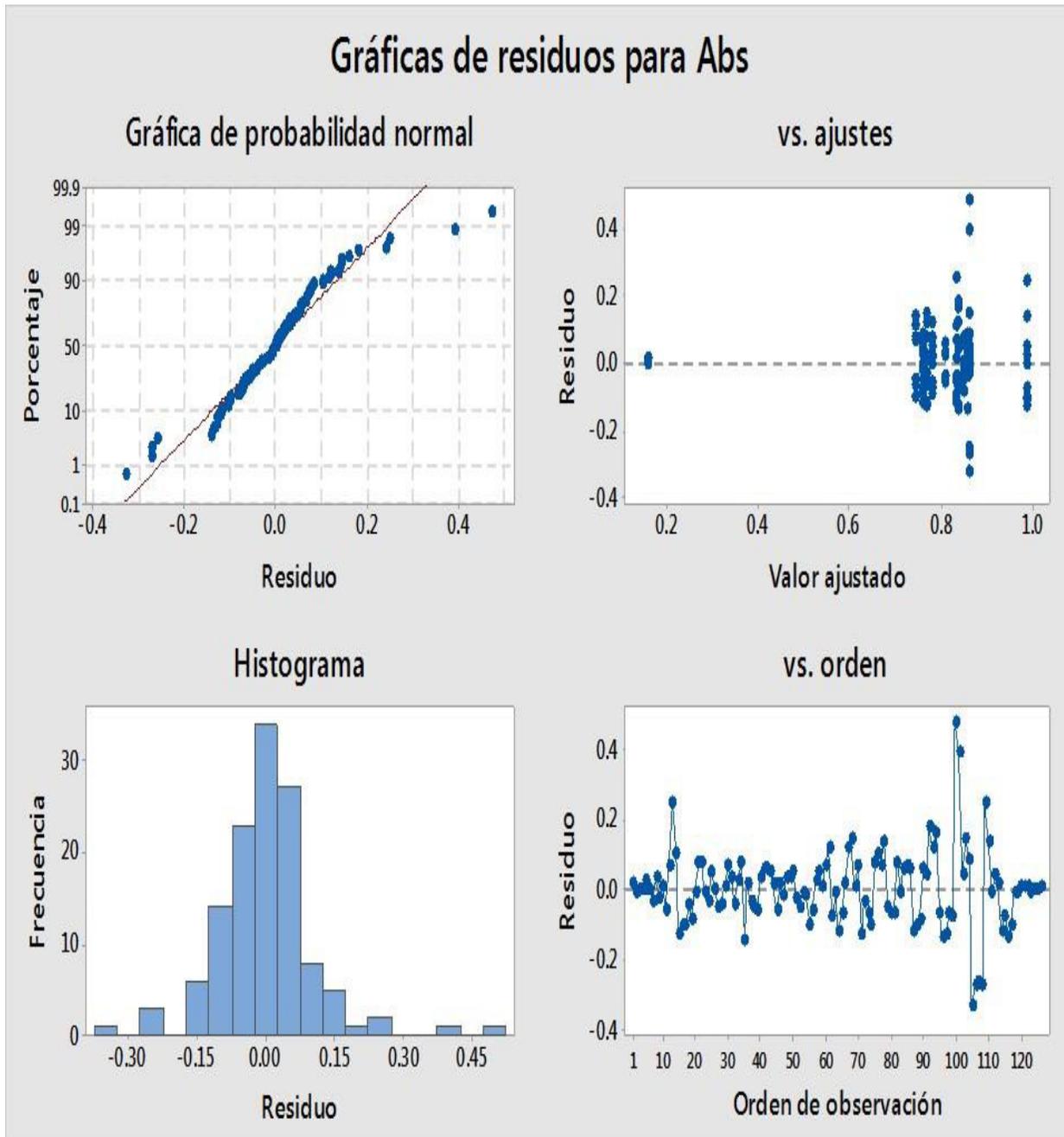
Media de nivel - Media de control para Abs



Si un intervalo no contiene cero, las media correspondiente es significativamente diferente de la media de control.

❖ Células HeLa expuestas a NPsAu-4ATP-BSA-AF

ANOVA de un solo factor
Actividad metabólica (Abs 490 nm) vs Concentración de NPsAu- 4ATP -
BSA-AF



Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	13	4.189	74.42%	4.189	0.32227	25.07	0.000
Error	112	1.440	25.58%	1.440	0.01286		
Total	125	5.629	100.00%				

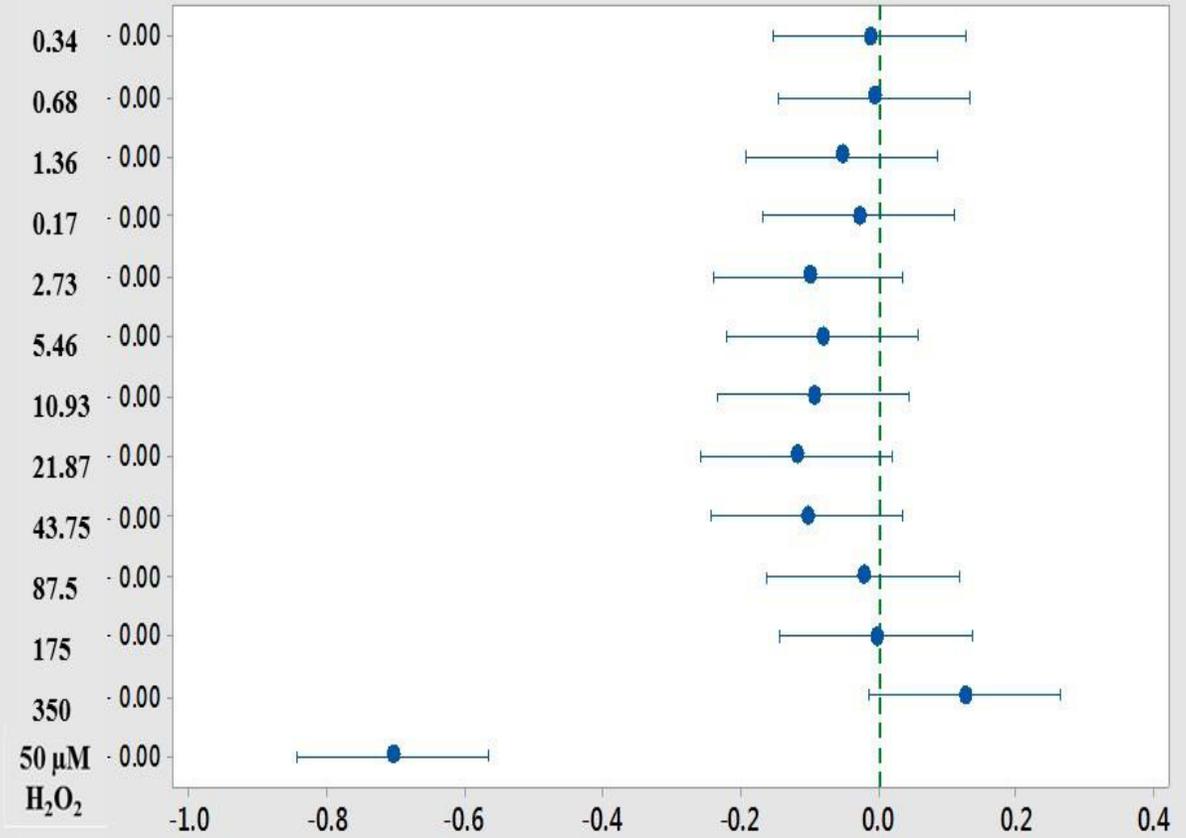
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 91%

NPsAu-4ATP-BSA-AF (μM)	N	Media	Agrupación
350	9	0.9884	A
0	9	0.86389	A B
175	9	0.861	A B
0.68	9	0.8568	A B
0.34	9	0.8512	A B
87.5	9	0.8402	A B
0.17	9	0.8348	A B
1.36	9	0.8094	B
5.46	9	0.7809	B
10.93	9	0.7684	B
2.73	9	0.7616	B
43.75	9	0.7590	B
21.87	9	0.7429	B
50 $\mu\text{MH}_2\text{O}_2$	9	0.15722	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs simultáneos de 91% de Dunnett

NPsAu-4ATP-BSA-AF (μM) Media de nivel - Media de control para Abs



Si un intervalo no contiene cero, las media correspondiente es significativamente diferente de la media de control.

APÉNDICE

APÉNDICE A

Síntesis y funcionalización de nanopartículas de oro

Reactivos químicos

Ácido cloraúrico (HAuCl_4), borohidruro de Sodio, 4-aminotiofenol (4ATP), cisteamina, ácido fólico, N-Hidroxisuccinimida (NHS), N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato (EDC) y albúmina de suero bovino fueron compradas en Sigma Aldrich. Se usó agua ultra-pura proveniente de un Sistema Milli-Q para todos los procedimientos (Millipore America, resistividad $>18 \text{ M}\Omega\text{cm}$). Todos los recipientes de vidrio fueron lavados con agua regia y enjuagada con agua Milli-Q.

Síntesis de nanopartículas de oro y funcionalización

Nanopartículas de oro: la síntesis de nanopartículas de oro se realizó añadiendo 2.5 mL de borohidruro de sodio a 0.1 M enfriado en un baño de hielo a 100 mL de HAuCl_4 , todo bajo agitación magnética vigorosa. Al añadir el borohidruro la solución toma un color rojo brillante indicando la formación de nanopartículas de oro (NPsAu). La solución fue dejada en reposo durante un día antes de proceder a usar.

Funcionalización de NPs de oro con cisteamina y BSA: 10 μL de cisteamina 5.9 mM y 20010 μL de BSA al 10% M/V fueron mezclados con 20 mL de NPsAu. El coloide se dejó reaccionar a 4°C durante dos días. Para remover los residuos de la síntesis y la cisteamina no ligada a las NPs, el coloide fue lavado mediante diálisis (12-14 kD, Spectra/Por 4 dialysis membrane, SpectrumLabs). La solución de NPsAu-cisteamina-

BSA fue lavada en agua milli-Q bajo agitación vigorosa durante 48 horas cambiando el agua cada 8 horas.

Funcionalización de NPsAu-Cisteamina-BSA con ácido fólico: 4.5 mg de ácido fólico, 9.5 mg de EDC y 2 mg de NHS fueron disueltos en 10 mL de buffer PBS. La solución fue sonicada durante 15 min y se almacena a 4°C durante 12 horas antes de usarse. Posteriormente 50 µL de esta solución fueron añadidos a 10 mL de la solución de NPsAu-cisteamina-BSA y se dejó reaccionar durante 24 horas a 4°C. Finalmente la solución fue lavada mediante diálisis para remover el AF no ligado y los entrecruzantes NHS y EDC que se encuentran libres.

Funcionalización de NPsAu con 4ATP y BSA: de la misma forma en que se funcionalizaron las NPsAu con cisteamina, 10 µL de 4ATP 5.9 mM y 200 µL de BSA al 10% M/V fueron mezclados con 20 mL de NPsAu y se dejaron reaccionar durante dos días a 4°C. Las NPsAu-4ATP-BSA fueron lavadas mediante diálisis como se explicó anteriormente.

Funcionalización de GNPs-4ATP-BSA con ácido fólico: 50 µL de la solución de AF-NHS-EDC fueron agregados a 10 mL de la solución de NPsAu-4ATP-BSA previamente dializada y se dejó reaccionar durante 24 horas para posteriormente ser lavada mediante diálisis como se explicó anteriormente.

Ajuste de la concentración de oro: todas las soluciones de oro fueron ajustadas a 1 OD en su pico de máxima absorción usando un espectrómetro portátil; a esta absorbancia todas las muestras tiene una concentración de oro de 0.35 mM.