



INSTITUTO POTOSINO
DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES

**AuNPs FUNCIONALIZADAS CON β -CICLODEXTRINA,
NH₂-PEG-SH Y ÁCIDO FÓLICO COMO POTENCIALES
SISTEMAS DE TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER**

Tesis que presenta

QFB Armando González Sánchez

Para obtener el grado de

Maestro en Nanociencias y Materiales

Co-directores de la Tesis:

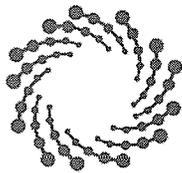
Dr. José Luis Rodríguez López

División de Materiales Avanzados, IPICYT

Dra. Claudia Escudero Lourdes

Facultad de Ciencias Químicas, UASLP

San Luis Potosí, S.L.P., 10 de Agosto de 2018



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“AuNPs Funcionalizadas con β -Ciclodextrina, NH₂-PEG-SH y Ácido Fólico como Potenciales Sistemas de Tratamiento Contra el Cáncer”*** presentada para obtener el Grado de Maestro en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **Armando González Sánchez** y aprobada el **diez de agosto de dos mil dieciocho** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. José Luis Rodríguez López
Codirector de la tesis

Dra. Claudia Escudero Lourdes
Codirectora de la tesis

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial

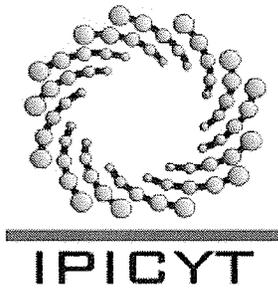
Dr. Miguel Avalos Borja
Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el *Laboratorio de Materiales Nanoestructurados: Síntesis y Propiedades* de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., y en el *Laboratorio de Inmunotoxicología* de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí bajo la co-dirección de Dr. José Luis Rodríguez López y de la Dra. Claudia Escudero Lourdes.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. **610926**.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 040 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Nanociencias y Materiales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 10 días del mes de agosto del año 2018, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Miguel Avalos Borja	Presidente	IPICYT
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Secretario	IPICYT
Dra. Claudia Escudero Lourdes	Sinodal externo	UASLP
Dr. José Luis Rodríguez López	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES

sustentó el C.

Armando González Sánchez

sobre la Tesis intitulada:

AuNPs Funcionalizadas con β -Ciclodextrina, NH₂-PEG-SH y Ácido Fólico como Potenciales Sistemas de Tratamiento Contra el Cáncer

que se desarrolló bajo la dirección de

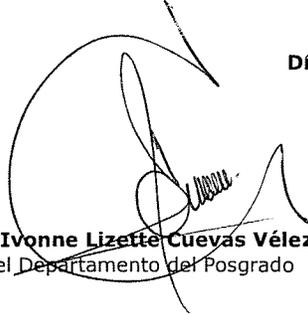
Dr. José Luis Rodríguez López
Dra. Claudia Escudero Lourdes (UASLP)

El Jurado, después de deliberar, determinó

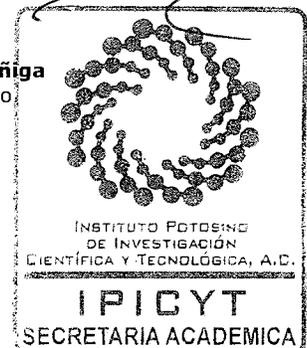
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 10 días del mes de agosto de 2018.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico



Agradecimientos

Me gustaría agradecer al Dr. José Luis Rodríguez López por la oportunidad de permitirme desarrollar el proyecto en su grupo de trabajo.

A la Dra. Claudia Escudero Lourdes por su siempre amable disposición y apoyo en cualquier tema.

Al IPICyT, por los apoyos institucionales: LINAN (M.C. Ana Iris Peña, Dra. Mariela Bravo, Dr. Héctor Gabriel Silva y Dra. Araceli Patrón Soberano), al LAMBAMA (I.Q. Ma. Del Carmen Rocha Medina), al laboratorio de análisis Instrumental de la División de Ciencias Ambientales (Dra. Dulce Partida y M.C. Guillermo Vidriales) y al laboratorio de Biopolímeros, Nanoestructuras y Bionanomateriales de la FCQ de la UASLP (Dra. Alma Gabriela Palestino Escobedo y Dr. César Fernando Azael Gómez Durán) por su apoyo y soporte técnico durante las caracterizaciones.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por la colaboración establecida con el Laboratorio de Inmunotoxicología (Dra. Elizabeth Reynaga Hernández y M.C. Ildemar Alvarado Morales).

A CONACYT por la beca **610926** proporcionada.

Y por último pero no menos importante, a mi familia y amigos, quienes siempre han creído en mí.

GRACIAS...

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Copia del acta de examen	iv
Agradecimientos	v
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiv
1. Introducción	1
1.1 Nanotecnología y Nanopartículas	1
1.1.1 Fuentes y origen de las NPs	1
1.2 Clasificación de las NPs de Origen Tecnológico	3
1.3 Nanomedicina y Aplicaciones Biomédicas de las NPs	4
1.3.1 Características fisicoquímicas de las NPs para su aplicación en medicina	5
1.3.2 Funcionalización y recubrimiento de NPs: propósitos y objetivos	7
1.4 Cáncer y su Tratamiento: Un Problema Global de Salud	10
1.4.1 La nanomedicina como alternativa revolucionaria.	10
1.4.2 AuNPs en el tratamiento del cáncer	12
1.4.3 Cáncer de próstata y su relevancia	13
1.4.4 Células madre cancerosas como blanco en la terapia anti-cáncer	13
1.5 Nanotoxicología y Normatividad Aplicable	15
2. Justificación	16
3. Objetivos	19
3.1 General	19
3.2 Específicos	19
4. Hipótesis	20
5. Materiales y Métodos	21
5.1 Síntesis de AuNSP	21
5.2 Síntesis de AuNRD	23
5.3 Síntesis de AuNST	24
5.4 Caracterización Morfológica de las AuNPs	25
5.5 Análisis de Tamaño de AuNPs	26

5.6 Funcionalización	27
5.7 Evaluación de Estabilidad y Respuesta Óptica	28
5.8 Caracterización Elemental y Química	29
5.9 Análisis y Ajuste de Concentración	31
5.10 Evaluación de Citotoxicidad <i>in-vitro</i>	32
5.10.1 Ensayo de LDH	32
5.10.2 Ensayo de MTS	34
6. Discusión de Resultados	36
6.1 Caracterización Morfológica de las AuNPs	36
6.2 Análisis de Tamaño de AuNPs	39
6.3 Evaluación de Estabilidad y Respuesta Óptica	42
6.4 Caracterización Química y Elemental	45
6.5 Evaluación de Citotoxicidad <i>in-vitro</i>	55
6.5.1 Ensayo de LDH	55
6.5.2 Ensayo de MTS	56
7. Conclusiones y Perspectivas	59
8. Referencias	62

Lista de tablas

Tabla 1. Media (X), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) obtenidos del análisis del tamaño de AuNSP, AuNRD y AuNST.	41
Tabla 2. Picos de emisión XPS identificados en los espectros de inspección así como las componentes (Comp.) de los espectros de alta resolución en los sistemas AuNSP@BCD-PEG-AF, AuNRD@BCD-PEG-AF y AuNST@BCD-PEG-AF.	50
Tabla 3. AuNST@BCD-PEG-AF ligadas a la membrana plasmática y/o internalizadas en NSCs y CSCs analizado por ICP-OES.	58

Lista de figuras

Figura 1. Potenciales aplicaciones de las NPs en tratamientos, diagnóstico e imagenología en función del diseño, adaptación y control de sus propiedades ópticas, físicas y químicas.	6
Figura 2. (A) Número de publicaciones en los últimos años en el campo de las nanopartículas para la terapia contra el cáncer. (B) Número de pruebas clínicas lanzadas (fases 1, 2, 3 y 4) para fármacos con implicaciones nanotecnológicas en la terapia contra el cáncer.	11
Figura 3. Propuesta de recubrimiento y funcionalización para los complejos sintetizados así su posterior evaluación en un modelo celular <i>in-vitro</i> de cáncer de próstata de los sistemas con características fisicoquímicas esperadas.	18
Figura 4. Diseño experimental para la exposición de los modelos celulares <i>in-vitro</i> en placas de cultivo de 96 pozos a AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF para NSCs y CSCs.	34
Figura 5. Imágenes representativas de AuNSP obtenidas por SEM y TEM.	36
Figura 6. Imágenes representativas de AuNRD obtenidas por SEM y TEM.	37
Figura 7. Imágenes representativas de AuNST obtenidas por SEM y TEM.	38
Figura 8. Histograma de distribución de tamaño de AuNSP.	39
Figura 9. Histogramas de distribución de las dimensiones de los AuNRD.	40
Figura 10. Histograma de distribución tamaño de AuNST.	41
Figura 11. Espectros UV-VIS correspondientes al sistema AuNSP.	42
Figura 12. Espectros UV-VIS correspondientes al sistema AuNRD.	43
Figura 13. Espectros UV-VIS correspondientes al sistema AuNST.	43

Figura 14. Espectros EDS de las AuNPs sintetizadas previo al proceso de funcionalización.	45
Figura 15. Espectros obtenidos por XPS en AuNSP.	46
Figura 16. Espectros obtenidos por XPS en AuNRD.	47
Figura 17. Espectros obtenidos por XPS en AuNST.	48
Figura 18. Espectros por FTIR correspondientes al sistema AuNSP@BCD-PEG-AF con sus respectivos picos característicos.	51
Figura 19. Espectros por FTIR correspondientes al sistema AuNRD@BCD-PEG-AF con sus respectivos picos característicos.	52
Figura 20. Espectros por FTIR correspondientes al sistema AuNST@BCD-PEG-AF con sus respectivos picos característicos.	53
Figura 21. Integridad de la membrana plasmática evaluada por el ensayo de LDH en un modelo <i>in-vitro</i> de cáncer de próstata tras exposición por 24 hrs a AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF.	55
Figura 22. Alteración del metabolismo celular en un modelo <i>in-vitro</i> de cáncer de próstata tras exposición por 24 hrs a AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF.	57

Abreviaturas

AF	Ácido Fólico
AuNPs	Nanopartículas de Oro
AuNRD	Nanorodillos de Oro
AuNSP	Nanoesferas de Oro
AuNST	Nanoestrellas de Oro
BCD	β -Ciclodextrina
CSCs	Células Madre Cancerosas
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
DDSs	Sistemas de Transporte y Liberación de Fármacos
EDS	Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X
FTIR	Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier
HAuCl₄	Ácido tetracloroaurico
ICP-OES	Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente
KSFM	Medio para Keratinocitos Libre de Suero
LDH	Ensayo de Liberación de Deshidrogenasa Láctica
nm	Nanómetros
NH₂-PEG-SH	Poli-etilenglicol amino tiolado
NPs	Nanopartículas
NSCs	Células Madre Normales
PBS	Buffer Salino de Fosfatos a pH 7.4
SEM	Microscopia de Barrido por Electrones
SPR	Plasmón de Resonancia Superficial
TEM	Microscopía de Transmisión por Electrones
UV-VIS	Espectroscopía de Ultravioleta y Visible
XPS	Espectroscopía de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X

Resumen

AuNPs FUNCIONALIZADAS CON β -CICLODEXTRINA, NH₂-PEG-SH Y ÁCIDO FÓLICO COMO POTENCIALES SISTEMAS DE TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER

Los nanomateriales de origen tecnológico como lo son las nanopartículas de oro (AuNPs) han sido extensamente estudiados para su aplicación en la nanomedicina, sin embargo hay muy pocos ejemplos de productos nanotecnológicos basados en oro que sean implementados en ensayos clínicos y, hasta el momento, ninguno ha sido aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de la Unión Americana (FDA por sus siglas en inglés). Para ser aplicados en el área médica, ya sea como tratamiento o en la línea diagnóstica, todos los sistemas nanoestructurados deben de ser adecuadamente caracterizados en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas utilizando el entorno biológico en el que se propone sea empleado, para determinar su potencial de funcionalidad, toxicidad y efectividad

El objetivo del presente trabajo fue sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente tres sistemas basados en nanopartículas de oro con un tamaño inferior a 100 nm y de distintas morfologías: esféricas (AuNSP), en forma de barra (AuNRD) y en forma de estrella o multiramificadas (AuNST), evaluando y seleccionando aquellos con la capacidad de ser funcionalizados con β -ciclodextrina, poli-etilenglicol amino tiolado y ácido fólico para determinar su citotoxicidad empleando un modelo *in-vitro* con dos tipos celulares de un mismo linaje: células madre normales (NSCs) y células madre cancerosas (CSCs) de la próstata humana.

Los tres sistemas de AuNPs fueron sintetizados por métodos químicos. Mediante Microscopía de Barrido y Transmisión por electrones (SEM y TEM respectivamente) se analizó la morfología buscada así como el tamaño de las NPs. El análisis por Espectroscopía de Fotoelectrones Emitidos por Rayos X (XPS) y Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) permitió determinar que el sistema AuNST fue exitosamente funcionalizado (AuNST@BCD-PEG-AF).

Por otro lado, el potencial citotóxico de AuNPs fue evaluado en NSC y CSC a través de los ensayos de Liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH) y la Reducción de Sales de Tetrazolio (MTS) al exponer las células a los sistemas AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF durante 24 horas en diferentes concentraciones. Los resultados mostraron que ambos tipos celulares no ven comprometida gravemente la integridad de su membrana plasmática además de mostrar una alteración significativa en su metabolismo.

Finalmente, las concentraciones de Au reportadas de los medios sobrenadantes indican que el sistema AuNST@BCD-PEG-AF presentó mayor asociación a las CSCs en comparación a las NSCs, lo cual permitió deducir que los sistemas en cuestión tienen afinidad para ser ligados a la membrana plasmática y/o internalizados preferentemente en células cancerosas.

Abstract

FUNCTIONALIZED AuNPs WITH β -CYCLODEXTRIN, NH₂-PEG-SH AND FOLIC ACID AS POTENTIAL CANCER TREATMENT SYSTEMS

Nanomaterials of technological origin such as gold nanoparticles have been extensively studied for applications in nanomedicine, however, there are only a few examples of gold-based nanotechnology products that are implemented in clinical trials and, so far, none of them has been approved by the USA Food and Drug Administration (FDA). Any nanomaterial intended for its application in the biomedical area should be properly characterized physicochemically in the biological environment in which its use is proposed to determine its functionality, toxicity and effectiveness.

The aim of the project was to synthesize and physicochemically characterize three systems based on gold nanoparticles with a size < 100 nm and with different morphologies: spherical-shaped (AuNSP), rod-shaped (AuNRD) and star-shaped or multi-branched (AuNST), and to evaluate and select those with the ability to be functionalized with β -cyclodextrin, polyethylene glycol amino thiolated and folic acid to determine its cytotoxicity using an *in-vitro* model with two cell types of the same line: normal (NSC) and cancerous stem cells (CSC) of the human prostate.

Such three AuNPs systems were synthesized by chemical methods. Scanning and Transmission Microscopy by Electrons (SEM and TEM respectively) were used to evaluate the desired NPs morphology and the size. Through X-ray Emitted Photoelectron Spectroscopy (XPS) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) the system based on AuNST was evaluated for a successful functionalization (AuNST@BCD-PEG-AF).

On the other hand, the cytotoxic potential of AuNPs was evaluated in NSCs and CSCs through the Lactate Dehydrogenase Release (LDH) and Tetrazolium Salts Reduction (MTS) essays by exposing the cells to the AuNST and AuNST@BCD-PEG-AF systems during 24 hours at different concentrations. Results showed that both cell types do not compromise their plasmatic membrane integrity, furthermore to present significant alterations in their cellular metabolism.

Finally, the Au concentrations reported from the supernatant media indicate that the AuNST@BCD-PEG-AF system have a greater association with the CSCs compared to the NSCs, which allowed us to deduce that the systems in question have affinity to be linked to the plasma membrane and/or internalized preferably in cancerous cells.

1. Introducción

1.1 Nanotecnología y Nanopartículas

En el año de 1959 el premio Nobel de física Richard P. Feynman ofreció la conferencia titulada *“There's Plenty of Room at the Bottom”* (*Hay mucho espacio en el fondo*), considerada por muchos el inicio de la nanotecnología puesto que Feynman planteó la posibilidad de utilizar máquinas/herramientas que fabricaran máquinas/herramientas más pequeñas que después se utilizaran para hacer máquinas/herramientas aún más pequeñas y de esta manera sucesiva llegar a niveles atómicos. Feynman llegó a la conclusión de que *“éste es un desarrollo que no puede frenarse”*, tales nanoherramientas o nanomáquinas podrían finalmente emplearse para desarrollar una amplia gama de instrumentación y fabricación con aplicaciones específicas y precisas (Freitas, 2005), esto es en palabras actuales, nanotecnología.

La nanotecnología en definición es la ciencia que estudia y busca la manipulación de la materia en la escala de una mil millonésima parte de un metro (10^{-9} m = 1 nm). Las nanopartículas (NPs) son el componente más fundamental de un nanomaterial y de acuerdo a la *American Society of Testing and Materials* (ASTM) una nanopartícula es definida como una partícula ultrafina cuyo tamaño en 2 o 3 dimensiones se encuentren en el intervalo de 1 a 100 nm (Horikoshi & Serpone, 2013).

1.1.1 Fuentes y Origen de las nanopartículas

Las NPs pueden clasificarse en dos grandes categorías de acuerdo a su origen: naturales y antropogénicas.

En la naturaleza, las NPs son abundantes ya que se producen en muchos procesos naturales como reacciones fotoquímicas, erupciones volcánicas, incendios forestales y erosión simple, así como por plantas y animales, por ejemplo, desprendimiento de piel y cabello. A pesar de que la contaminación del aire es generalmente asociada a actividades humanas como los automóviles, industrias y combustión de hidrocarburos los procesos naturales como los mencionados pueden producir cantidades tan grandes de materia

nanoparticulada que afectan profundamente la calidad del aire en todo el mundo. Se estima que los aerosoles generados por actividades humanas son sólo alrededor del 10% del total mientras que el 90% restante tiene un origen natural. Estos fenómenos a gran escala son visibles desde los satélites, y producen material particulado y aerotransportado que va desde la micro a la nanoescala (Buzea, Pacheco, & Robbie, 2007).

Respecto al origen de las NPs por actividades antropogénicas es bien conocido que durante milenios los humanos han creado nanomateriales ya que son subproductos de combustión simple, del proceso de cocción de los alimentos, y más recientemente, de manufactura química por procesos de refinación de minerales, fundición, combustión en los motores de los vehículos y de los aviones, combustión de lodo de alcantarillado pulverizado y combustión de hidrocarburos en general para la generación de energía. Mientras que las nanopartículas diseñadas o manufacturadas como tal han estado en el mercado por un tiempo relativamente más corto (décadas) y son comúnmente utilizadas en cosméticos, artículos deportivos, neumáticos, ropa resistente a las manchas, protectores solares, pasta de dientes, aditivos alimentarios, etc., estos productos y aquellas NPs aún más recientemente fabricadas deliberadamente resultado de la nanotecnología, como los nanotubos de carbono, constituyen una pequeña minoría de los nanomateriales ambientales. La cantidad de NPs manufacturadas o generadas por el hombre varía desde bien establecidas toneladas por año de producción como el carbón negro para llantas de automóvil hasta cantidades en microgramos como por ejemplo marcadores constituidos por quantum dots fluorescentes para imagenología biológica (Buzea et al., 2007).

1.2 Clasificación de los Nanomateriales de Origen Tecnológico

La clasificación de nanomateriales de origen tecnológico (producto de la nanotecnología), entre ellos las NPs, suele variar al revisar la extensa bibliografía disponible, sin embargo las clasificaciones más comúnmente reportadas son aquellas que están en función de las siguientes características (Buzea et al., 2007):

- Dimensionalidad: pueden ser nanomateriales 1, 2 o 3-dimensionales (1D, 2D o 3D) dependiendo de cuantas de sus dimensiones sean inferiores a 100 nm.
- Morfología: para éste tipo de clasificación se toman en cuenta principalmente factores como planeidad, esfericidad y relación de aspecto.
- Uniformidad y aglomeración: ésta clasificación está basada en la química y propiedades electromagnéticas de los nanomateriales los cuales pueden presentarse como aerosoles dispersos, como suspensiones/coloides o en estado aglomerado (bulto).
- Composición: La clasificación más reportada en la literatura, siendo que aún puede haber sub-clasificaciones en ésta categoría, por ejemplo, si el nanomaterial está compuesto por uno o varios constituyentes (complejos) o si o si está formado por componentes orgánicos o inorgánicos.

Las nanopartículas son comúnmente clasificadas en función de su composición, pudiendo ser orgánicas (nanopartículas virales, liposomas, polímeros, nanopartículas basadas en carbono, etc.) u inorgánicas (nanopartículas metálicas, magnéticas, nanopartículas de sílica, entre otras), dicha clasificación es especialmente útil cuando las nanopartículas están pensadas en aplicaciones biomédicas ya que la bio-compatibilidad, es decir, la capacidad de un material para desempeñarse con una respuesta apropiada del organismo anfitrión en una situación o aplicación específica (Williams, 2008) suele ser generalmente mayor en aquellas basadas en componentes orgánicos.

1.3 Nanomedicina y Aplicaciones Biomédicas de las NPs

La nanomedicina, término acuñado por Freitas en el año 2005 (Freitas, 2005), es un subproducto resultado de la convergencia entre la nanotecnología con otras disciplinas como las ciencias de los materiales, la biología celular y molecular, las ciencias farmacéuticas y la medicina (Rojas-Aguirre, Aguado-Castrejón, & González-Méndez, 2016) y cuya definición formal fue dada por *The European Science Foundation* después de una amplia deliberación: “Nanomedicina: emplea herramientas de escala nanométrica para el diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades, y por consiguiente comprender la compleja patofisiología subyacente de la enfermedad y cuyo objetivo final es mejorar la calidad de vida” (Duncan & Gaspar, 2011).

Sintetizando, la nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología en el campo de la medicina, y se ha convertido en una disciplina sumamente necesaria para desarrollar sistemas nanoestructurados que, por ejemplo, aplicados en el campo de la medicina regenerativa e ingeniería tisular puedan reparar y/o reemplazar tejidos u órganos dañados restaurando la funcionalidad celular normal de manera parcial o total, o aplicados a la liberación de fármacos y diagnóstico siendo capaces de identificar y tratar enfermedades en dianas específicas como un órgano, un tejido, un tipo celular, un microorganismo o incluso un compartimento celular u organelo (Rojas-Aguirre et al., 2016) focalizando y aumentando la actividad terapéutica o en su caso la capacidad diagnóstica, minimizando de éste modo el daño a las células y tejidos sanos del cuerpo.

Las NPs en específico han llamado fuertemente la atención para aplicaciones en medicina debido a que exhiben un comportamiento y propiedades diferentes en comparación a los materiales en bulto o macroscópicos, principalmente presentan efectos cuánticos (poseen un comportamiento discontinuo debido al confinamiento cuántico en materiales con electrones deslocalizados) y efectos de superficie (debido a la significativa fracción de átomos superficiales presentes en relación a los átomos internos). Un ejemplo de NPs que explotan sus efectos cuánticos son los quantum dots o puntos cuánticos (nanoestructuras sintetizadas con tamaños de apenas unos pocos nanómetros) ya que el comportamiento electrónico de éstos es similar a aquel que se conoce en átomos individuales o moléculas pequeñas cuyos espectros energéticos aparecen cuantizados.

Las NPs poseen una extensa área superficial, así como un alto número de partícula por unidad de masa, por ejemplo, una micropartícula de carbón de 60 μm de diámetro tiene una masa de 0.3 μg y un área superficial de 0.01 mm^2 mientras que la misma masa de carbón en forma nanoparticulada de 60 nm de diámetro tendría un área superficial de 11.3 mm^2 y consistiría de 1×10^9 nanopartículas (Buzea et al., 2007).

Las potenciales aplicaciones médicas de las NPs pueden clasificarse en tres modalidades principales tal como lo mencionan Yohan & Chithrani (Yohan & Chithrani, 2014): tratamiento (por terapia fotodinámica, terapia fototérmica, radiación o transporte y liberación génica o farmacéutica), diagnóstico (ensayos basados en NPs) e imagenología (por campo dual, resonancia magnética, fotoacústica, entre otras).

En los últimos años las NPs han sido y continúan siendo implementadas con éxito en cada fase de los procesos clínicos y la razón se debe a la forma en que sus propiedades físicas (Gou & Murphy, 2005; Horikoshi & Serpone, 2013; Melillo et al., 2002), químicas (Abbasi et al., 2014; Dawidczyk, Russell, & Searson, 2014; Kwon et al., 2013) y ópticas (Abidi et al., 2010; Cao et al., 2017; Shakeri-Zadeh, Ghasemifard, & Ali Mansoori, 2010) están siendo explotadas por los investigadores. Al conjugar tales propiedades únicas con la facilidad de síntesis (T. Huang, Meng, & Qi, 2009; Liming Zhang et al., 2014), biocompatibilidad (Kwon et al., 2013; Williams, 2008) y personalización (X. Q. Zhang et al., 2012) es claro que las NPs tienen mucho que ofrecer en la investigación clínica y, especialmente el campo de las NPs inorgánicas, ha tenido un crecimiento exponencial en las últimas dos décadas ya que ofrecen simultáneamente todas las propiedades y características mencionadas.

1.3.1 Características fisicoquímicas de las NPs para su aplicación en medicina

Cada enfermedad o padecimiento requiere de distintos procesos de diagnóstico, así como tratamientos específicos con características propias y únicas, esto es un hecho completamente conocido en la práctica médica y sigue siendo aplicable en la nanomedicina, por ello no es posible enumerar características universales que deben poseer las NPs para poder tener una aplicación determinada en el área médica.

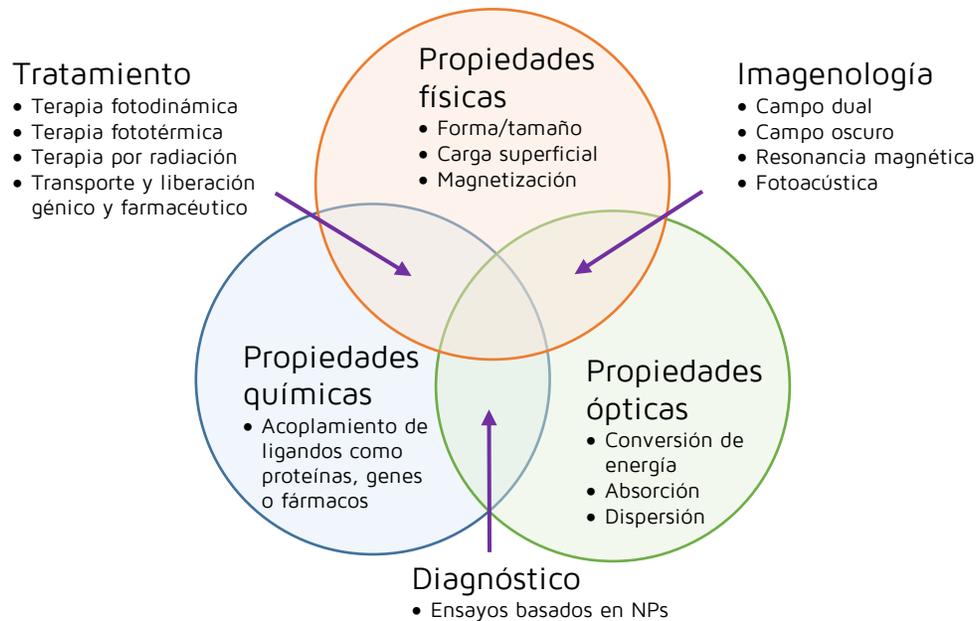


Figura 1. Potenciales aplicaciones de las NPs en tratamientos, diagnóstico e imagenología en función del diseño, adaptación y control de sus propiedades ópticas, físicas y químicas. Modificado de D. Yohan and B. D. Chithrani, "Applications of nanoparticles in nanomedicine," *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 10, no. 9, pp. 2371–2392, 2014.

Las variadas herramientas, así como los conocimientos de los cuales la nanotecnología hace uso permiten el desarrollo de más efectivas modalidades y aún más seguros sistemas de diagnóstico, terapia e imagenología. Al diseñar dichos sistemas basados en NPs para uso médico se deben tener en cuenta las propiedades y características intrínsecas del o los materiales base así como de sus complementos, como recubrimientos, ligandos o compuestos funcionales conjugados a las mismas. El éxito de cualquier sistema se basa en la estabilidad biológica de las NPs en su entorno objetivo, junto con el control de su tamaño, forma, propiedades ópticas y de superficie. La Fig. 1 resume la forma en que las propiedades físicas, químicas y ópticas de las NPs pueden ser diseñadas para una variedad de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de imagen.

Así como diferentes NPs tienen diferentes aplicaciones en función de sus propiedades y características, así también diferentes ligandos, moléculas y recubrimientos poseen diferentes propósitos y objetivos. Particularmente las NPs inorgánicas ofrecen versátiles posibilidades de modificación, una relativa facilidad de funcionalización y de recubrimiento actuando como plataformas idóneas para el ensamblaje de sistemas o

complejos multifuncionales bien definidos. Una vez sintetizadas, estas estructuras conservan una solubilidad eficiente y propiedades coloidales para uso en entornos o medios complejos (por ejemplo, sangre, tejidos, etc.). Pequeñas variaciones en la composición, el revestimiento de la superficie, la elección y combinación de ligandos funcionales puede conducir a una gran cantidad de posibilidades para el desarrollo de aplicaciones en sistemas biológicos (Doane & Burda, 2012).

1.3.2 Funcionalización y recubrimiento de NPs: propósitos y objetivos

El uso de NPs en nanomedicina requiere el control de las interacciones entre las NPs mismas, así como con el medio y las biomoléculas que forman y sustentan todo sistema biológico, tal objetivo pretende y puede ser alcanzado mediante la funcionalización y/o el recubrimiento superficial. Por ejemplo, la funcionalidad superficial de una nanopartícula puede ser controlada para proveer de un reconocimiento específico y selectivo los cuales son requeridos en aplicaciones de diagnóstico en biosensores; Otras NPs pueden ser diseñadas para transportar y liberar cargas intracelularmente para lo cual su internalización y no citotoxicidad pueden ser mejoradas al recubrir la nanopartícula base con componentes orgánicos y biocompatibles como PEG o fosfolípidos (formando liposomas), incluso, la falta de interacción puede ser considerado un importante atributo al prevenir que las NPs sean reconocidas y capturadas por el sistema inmune (Mout, Moyano, Rana, & Rotello, 2012).

A pesar de que el estudio y adaptación de las superficies de NPs continúa siendo un reto y un campo de grandes oportunidades en la nanomedicina (así como para la nanotecnología en general) se han logrado grandes avances para proveer de funcionalidad y/o simple protección y estabilidad a los sistemas a través de diferentes estrategias como intercambio de ligandos, modificación de ligandos o recubrimiento con capas adicionales por mencionar algunas y las cuales pueden realizarse *in-situ* durante la síntesis de las NPs o post-síntesis (Sperling & Parak, 2010). En la práctica diaria existe un creciente interés en aquellos procedimientos sencillos y de fácil implementación técnica y experimental que se encuentran reportados en la literatura y demuestran ser eficientes para lograr la funcionalización superficial, algunos de esos métodos son procesos simples de agitación ultrasónica o mecánica de los componentes que proveerán funcionalidad o recubrimiento a

los sistemas dentro de un medio acuoso con las nanopartículas para favorecer un enlace químico entre ellos.

Algunos de los principales agentes o compuestos para la funcionalización o recubrimiento para NPs inorgánicas que se pueden encontrar reportados son los siguientes:

- Recubrimiento con sílica (SiO₂): es uno de los métodos más ampliamente utilizados para el revestimiento de NPs inorgánicas ya que provee ventajas específicas como lo es la solubilidad en agua, fotoestabilidad, estabilidad coloidal además de presentar una baja interacción no específica con los sistemas biológicos (Erathodiyil & Ying, 2011).
- Recubrimiento con polímeros orgánicos: Entre los más utilizados se encuentran el poli-etilenglicol (PEG) y la poli-acrilamida (PAA), este tipo de recubrimiento impide la adsorción de proteínas del suero sanguíneo, aumenta el tiempo de circulación por mejora de estabilidad coloidal e incrementa la probabilidad de penetración de las NPs en tejidos tumorales basado en un direccionamiento (*targeting*) pasivo a través del efecto EPR (Kumari, Ghosh, & Biswas, 2016; Mout et al., 2012; Wongpinyochit, Uhlmann, Urquhart, & Seib, 2015; X. D. Zhang et al., 2011).
- Recubrimiento/funcionalización con moléculas macrocíclicas: esta clase de recubrimientos busca formar sistemas hospedero-huésped empleando las interacciones no covalentes entre moléculas invitadas (carga, huésped) y compuestos macrocíclicos que actúan como hospederos (*carriers*) para diversas funciones biomédicas tales como captura y localización espacial de analitos y la encapsulación de fármacos y genes. Las moléculas empleadas para dicho propósito incluyen a los éteres de corona, calixarenos, cucurbitáceas, ciclodextrinas, ciclofanos y pillarenos (Challa, Ahuja, Ali, & Khar, 2005; del Pozo, Casero, & Quintana, 2017; Rodríguez, 2007; Wu et al., 2015).
- Funcionalización con biomoléculas: en ésta categoría pueden incluirse una amplia gama de agentes como anticuerpos, péptidos, oligonucleótidos, factores de crecimiento, interleucinas, lípidos, folatos, aptámeros, moléculas CD (*Clusters of Differentiation*) así como ligandos específicos de receptores de interés, entre otros (Erathodiyil & Ying, 2011; Khosravian et al., 2016; Kim E. Sapsford, W. Russ Algar, 2013; Mout et al., 2012; Shakeri-Zadeh et al., 2010; Sperling & Parak, 2010); Uno

de los objetivos principales de funcionalizar con las biomoléculas mencionadas es lograr un targeting activo mediante el acople y reconocimiento entre un ligando y su receptor.

- Funcionalización con grupos químicos: las moléculas empleadas suelen ser ligandos pequeños que contienen grupos funcionales (COOH, NH₂, SH, OH, Br mencionando los más comunes), entre los propósitos de dicho tipo de funcionalización se encuentran el estabilizar a las NPs por repulsión electrostática, aumentar la solubilidad en un medio acuoso o, contrariamente, aumentar la lipofilidad para facilitar el tránsito a través de membranas biológicas.

1.4 El Cáncer y su Tratamiento: Un Problema Global de Salud

El cáncer una de las principales causas de muerte en todo el mundo, la Organización Mundial de la Salud atribuyó 8.8 millones de defunciones al cáncer en el año 2015, eso es aproximadamente 1 de cada 6 muertes y se prevé que el número de nuevos casos aumente en cerca del 70% en los próximos 20 años (“Cáncer, Datos y cifras,” 2018); Para cambiar éstas estadísticas que reflejan la magnitud del problema, uno de los principales retos en la terapia contra el cáncer que afronta la nanomedicina es desarrollar nuevos sistemas de tratamiento y diagnóstico capaces de brindar ventajas respecto a los ya existentes o sobre los fármacos antineoplásicos mismos (Wicki, Witzigmann, Balasubramanian, & Huwyler, 2015):

- Se requiere desarrollar sistemas multifuncionales o teranósticos que puedan brindar co-liberación de fármacos en terapias combinadas o fungir como sistemas de liberación/tratamiento o tratamiento/diagnóstico.
- Superar los problemas de solubilidad y estabilidad química de los fármacos antineoplásicos.
- Proteger a los fármacos de la biodegradación y excreción, influyendo con ello en su perfil farmacocinético.
- Mejorar la focalización y biodistribución del fármaco la cual está definida por las propiedades fisicoquímicas de éste y limita la penetración en las células tumorales.
- Los DDSs pueden ser diseñados para liberar el fármaco en respuesta a estímulos específicos, ya sean internos o externos (cambio de pH, campo magnético, radiación electromagnética, etc.).

1.4.1 La nanomedicina como alternativa revolucionaria

Resulta inmediato inferir que la nanomedicina posee un enfoque único e integral que puede ser aplicado al tratamiento contra el cáncer. El creciente interés en el campo de nanomedicina ha llevado a estudiar una gran variedad de plataformas y sistemas que pueden ser utilizados en la terapia contra el cáncer como por ejemplo liposomas, dendrímeros, nanopartículas de oro, nanopartículas de plata, nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas, quantum dots, partículas poliméricas o nanopartículas de sílica

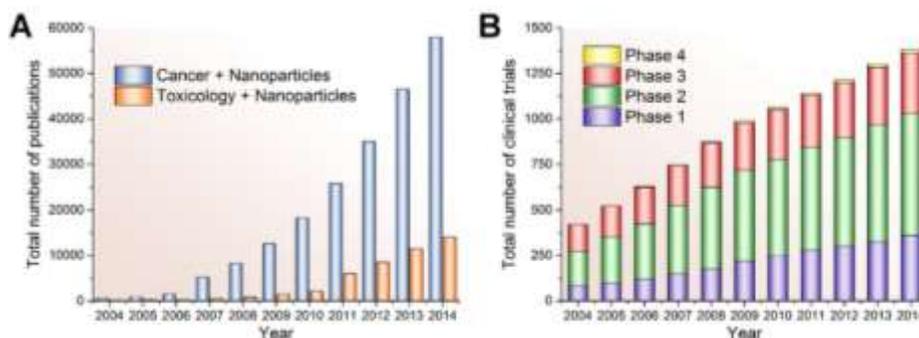


Figura 2. (A) Número de publicaciones en los últimos años en el campo de las nanopartículas para la terapia contra el cáncer. (B) Número de pruebas clínicas lanzadas (fases 1, 2, 3 y 4) para fármacos con implicaciones nanotecnológicas en la terapia contra el cáncer. Tomado de A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, J. Huwyler, Nanomedicine in cancer therapy : Challenges , opportunities , and clinical applications. *J. Control. Release*, 2015, **200**, 138.

(Bao, Mitragotri, & Tong, 2013; Kwon et al., 2013; Perumal & Vyas, 2014; Shmarakov et al., n.d.; Yang & Wang, 2013) cada uno de ellos con sus propias ventajas y limitaciones y a los cuales es posible incorporar agentes de contraste para imagenología, biomarcadores que actúen como ligandos específicos de algún receptor sobre-expresado en células tumorales o algún agente quimioterapéutico fungiendo como DDSs.

La terapia contra el cáncer requiere imperativamente de sistemas nanoestructurados que funjan como agentes de diagnóstico y/o tratamiento altamente específicos que, por ejemplo, al ser utilizados en quimioterapia focalicen la biodistribución del fármaco reduciendo la toxicidad en células sanas y elevando así el índice terapéutico, sin embargo la nanomedicina no sólo presenta potenciales y prometedoras ventajas a futuro en comparación a los tratamientos convencionales, si no que ya ha comenzado a revolucionar la terapia contra el cáncer existiendo a la fecha medicamentos en el mercado (surgidos a partir de investigaciones en este campo) aprobados por distintas agencias gubernamentales (al menos 10 medicamentos) de acuerdo a la actualización reportada por Shi y colaboradores (J. Shi, Kantoff, Wooster, & Farokhzad, 2016) mientras que muchos más se encuentran en diversas etapas clínicas y preclínicas de desarrollo según reporta Wicki y colaboradores (Wicki et al., 2015) (1 386 formulaciones hasta diciembre del 2014), además el mismo grupo de investigación señala que las publicaciones en el campo de las nanopartículas para terapia contra el cáncer ha crecido de manera exponencial en los últimos años llegando a aproximadamente 57 000 publicaciones disponibles a la misma fecha anteriormente mencionada (Fig. 2), lo cual indica que la terapia farmacológica

específica y el diagnóstico temprano de éste tipo de patología son áreas de gran relevancia en la investigación.

1.4.2 AuNPs en el tratamiento del cáncer

Entre de las NPs inorgánicas empleadas en aplicaciones médicas, la investigación empleando nanopartículas de oro (AuNPs) ha tenido un destacable progreso, particularmente en su aplicación en la terapia contra el cáncer (Yohan & Chithrani, 2014). Las AuNPs proporcionan estrategias para mejorar la el transporte, la orientación y el control en la liberación de fármacos mediante a través de su facilidad de recubrimiento o funcionalización mientras se minimizan los efectos secundarios comúnmente encontrados en los tratamientos tradicionales, además, poseen la capacidad de generación de calor al transformar la radiación electromagnética (en el intervalo del ultravioleta al infrarrojo cercano) en energía térmica, propiedad producto de su SPR y empleada para dañar las células tumorales por muerte necrótica o apoptótica en la denominada terapia fototérmica (X. Huang, Jain, El-Sayed, & El-Sayed, 2008; Kereselidze, Romero, Peralta, & Santamaria, 2012). Finalmente otra ventaja competitiva de las AuNPs es que se ha reportado que NPs de hasta 100 nm pueden ser aclaradas parcialmente por vía hepática (X. D. Zhang et al., 2011).

Existen múltiples publicaciones acerca de AuNPs y su aplicación contra el cáncer, cada una con novedades y variaciones que enriquecen la información disponible y convierte a estos sistemas en uno de los más estudiados y conocidos para ésta aplicación específica. Resulta muy interesante dilucidar las potencialidades de estos sistemas evaluando diferentes variables, desde concentraciones de precursores y coadyuvantes en el control del tamaño y morfología en los protocolos de síntesis hasta las distintas combinaciones en los recubrimientos y ligandos funcionales.

A pesar del enorme avance en el estudio de AuNPs en una amplia gama de campos de investigación, existen pocos casos de nanopartículas de oro que se investigan activamente en ensayos clínicos, y de acuerdo a Bobo y colaboradores (Bobo, Robinson, Islam, Thurecht, & Corrie, 2016) no hay nanomedicinas basadas en oro que hayan sido aprobadas por la FDA (hasta el año 2017).

1.4.3 Cáncer de próstata y su relevancia

Uno de los tipos de cáncer de mayor incidencia y mortalidad es el cáncer de próstata; globalmente y de acuerdo a los datos disponibles por parte de la *Agencia Internacional para la investigación sobre el Cáncer* (IARC por sus siglas en inglés) los cuales datan del año 2012 (GLOBOCAN 2012) señala que el cáncer de próstata se ubica el 5to lugar por el número de muertes causadas (aprox. 310 000) mientras que en incidencia se encuentra en el 2do lugar con más 1 100 000 nuevos casos registrados cada año, la misma fuente indica que en México cada año más de 9 000 hombres fallecen por cáncer de próstata y se presentan aproximadamente 22 000 nuevos casos, ubicándose como el tipo de cáncer con mayor mortalidad e incidencia para varones en el país (Ferlay et al., 2015).

Los datos mencionados dan una idea de la relevancia social de éste tipo de cáncer y por qué se han realizado investigaciones en nanomedicina empleando modelos de cáncer de próstata *in-vitro* e *in-vivo* (Lakshmanan, 2016). Entre los sistemas estudiados en éste modelo de cáncer se encuentran nanocomplejos magnéticos con doxorubicina (Li Zhang & Zhang, 2013), quantum dots antígeno prostático específicos (Brazhnik et al., 2015), micelas con raloxifeno (Pritchard, Rosengren, Greish, & Taurin, 2016), docetaxel y curcumina coencapsulados (Yan et al., 2016), por mencionar sólo algunos ejemplos.

1.4.4 Células madre cancerosas como blanco en la terapia anti-cáncer

Las células madre se definen por su capacidad para auto-renovarse indefinidamente (capacidad que desempeña un papel clave en la regeneración de tejidos y homeostasis), formar poblaciones individuales de células clonales, y diferenciarse en distintos tipos celulares. Las estrategias basadas en células madre en etapas pre-clínicas son promisorias para su uso en aplicaciones de la terapia dirigida contra el cáncer. Las células madre Normales (NSCs) pueden ser inmortalizadas y transformadas en cancerosas (CSCs) a través de mecanismos específicos como la exposición a arsénico (Tokar, Qu, et al., 2010; Tokar, Diwan, & Waalkes, 2010; Tokar, Qu, & Waalkes, 2011), esto vuelve posible su uso en investigación mediante modelos *in-vitro* (C.-L. Zhang, Huang, Wu, He, & Liu, 2017) permitiendo comparar el comportamiento de los dos tipos de células pertenecientes al

mismo linaje. Las CSCs mantienen gran parte de las propiedades de las NSCs como su capacidad de auto renovación y su inmortalidad, pero además se conoce que son necesarias para mantener una población de células tumorales. Las CSCs son pluripotenciales y puede generar células tumorales con diferentes fenotipos que resultan en el crecimiento del tumor primario y la aparición de nuevos tumores.

Dos estrategias principales son mencionadas por Shabbir y colaboradores (Ahmed, Esfandyari, & Farassati, 2018) para emplear CSCs como dianas en la terapia contra el cáncer: la primera estrategia se basa en entender la señalización celular características de dichas células, ya que ciertas vías de señalización de células pro-oncogénicas se encuentran hiperactivas en CSCs a niveles más altos que en las células cancerosas diferenciadas o células no malignas. La sobreactivación de estas vías contribuye a las características fenotípicas de las CSCs como la resistencia a la apoptosis y la invasividad mejorada, ejemplos de estas vías incluyen JAK/STAT, Wnt/ β -catenina y vías de señalización de TGF- β ; la segunda estrategia es actuar sobre otros objetivos con expresión preferencial en CSCs que incluyen marcadores de superficie (como CD44, CD90, CD33 y CD133), la bomba de resistencia a múltiples fármacos ABC y marcadores de microambiente (tales como CXCL12/CXCR4 y VEGF/VEGFR).

Se cree que las CSCs son responsables del inicio, la progresión, la metástasis, la recurrencia y la resistencia a los medicamentos del cáncer (Tokar et al., 2011). La hipótesis recientemente ha atraído mucha atención debido al potencial de descubrimiento y desarrollo de terapias relacionadas con CSCs y la identificación de moléculas clave involucradas en el control de las propiedades únicas de las poblaciones de las mismas. En los últimos años se ha invertido una gran cantidad de esfuerzo en el desarrollo de nuevos medicamentos, como las nanomedicinas que pueden aprovecharse de dianas específicas de las CSCs al dirigirse a los marcadores moleculares de la superficie celular o a varias vías de señalización como las mencionadas. Nuevos compuestos y estrategias terapéuticas que se dirigen selectivamente a CSCs se han identificado, algunas de las cuales se han estado evaluado en estudios preclínicos y clínicos (Chen, Huang, & Chen, 2013). La combinación de las estrategias y ventajas terapéuticas ofrecidas por los sistemas a base de NPs con la mencionada hipótesis puede abrir una nueva serie de posibilidades y avances en la lucha contra ésta relevante enfermedad.

1.5 Nanotoxicología y Normatividad Aplicable

El diseño de sistemas en nanomedicina requiere considerar la compleja patofisiología adyacente a la aplicación planeada así como las barreras biológicas a superar y los procesos dinámicos y cinéticos a los cuales será sometido dicho sistema nanotecnológico (Duncan & Gaspar, 2011). Bajo esta premisa la nanotoxicología se ocupa de estudiar los efectos y riesgos potenciales de la exposición de cualquier organismo (principalmente humanos) a diferentes tipos de nanomateriales (Oberdörster, Stone, & Donaldson, 2007).

Debido al exponencial desarrollo de la investigación en nanomedicina, la normatividad y legislación sobre el tema se ha visto retrasada y superada. En México existen proyectos gubernamentales para establecer normas mexicanas (NMX) para regular el uso de la nanotecnología aplicada a la salud: NMX-R-80004-SCFI-2015 (Nanotecnologías-Vocabulario) y NMX-R-12901-1-SCFI-2015 (Nanotecnologías-Gestión de riesgo ocupacional aplicado a nanomateriales manufacturados) las cuales aún no se encuentran disponibles en línea para su consulta y aplicación. Iniciativas desarrolladas e impulsadas por investigadores expertos e instituciones públicas como lo es el Sistema Nacional para la Evaluación Nanotoxicológica (SINANOTOX) tienen el objetivo de establecer una vigilancia adecuada y efectiva sobre los nanomateriales, haciendo énfasis en la prevención de la exposición a los nanomateriales que no han sido probados como seguros, previendo incluso desarrollar un sistema virtual de fácil acceso vía internet que contendrá la batería de pruebas para evaluar la toxicidad a través de un software inteligente de guía en función del tipo de nanomaterial (Chávez Alejandro, 2018).

La Organización Internacional para la Estandarización (ISO) tiene disponible la norma ISO 10993-2009, *Biological evaluation of medical device*, la cual consiste de 20 partes que incluyen, entre otros temas, *Pruebas de genotoxicidad, carcinogenicidad y toxicidad para la reproducción* (parte 3), *Pruebas para toxicidad in-vitro* (parte 5) o *Pruebas para toxicidad sistémica* (parte 11). Aún a pesar de que la normatividad disponible no es muy extensa y específica, los sistemas y desarrollos nanotecnológicos para aplicaciones médicas deben ser caracterizados apropiadamente y evaluados de manera sistemática de acuerdo a su desempeño pensado.

2. Justificación

Todo sistema producto de la nanotecnología que pretenda tener aplicaciones en el área biomédica debe poseer propiedades definidas y caracterizadas además de haber sido probado en medios que simulen el entorno biológico en donde se propone aplicar para así determinar, y asegurar en su caso, la funcionalidad del mismo.

El tema de investigación surgió de la necesidad de desarrollar y caracterizar sistemas nanotecnológicos novedosos, así como analizar su interacción con moléculas, agentes de recubrimiento o funcionalización y sistemas biológicos cuyos resultados fueran de interés para la nanomedicina en general, pero con un enfoque particular en aquellas propiedades y características orientadas a ser de gran utilidad para la resolución de las limitaciones y problemas que presenta la terapia contra el cáncer. Consecuentemente se propuso desarrollar y caracterizar tres sistemas formados por AuNPs sintetizadas individualmente con diferentes morfologías: esféricas (AuNSP), en forma de barras/rodillos (AuNRD) y en forma de estrellas o multiramificadas (AuNST), todas ellas con dimensiones inferiores a los 100 nm las cuales pueden ser aclaradas por vía hepática (X. D. Zhang et al., 2011), además se propuso evaluar la posibilidad de ser recubiertas y funcionalizadas con poli-etilenglicol amino tiolado (NH₂-PEG-SH), ácido fólico (AF) y β-ciclodextrina (BCD) para obtener sistemas con propiedades óptimas para su desempeño en el campo de la nanomedicina contra el cáncer.

El desarrollo y análisis de los sistemas mencionados se fundamentó en las propiedades de los componentes individuales: la plataforma se basó en AuNSP, AuNRD y AuNST las cuales exhiben baja toxicidad inherente, fácil funcionalización superficial y una gama única de propiedades ópticas, producto de su Plasmón de Resonancia Superficial (SPR), que se genera al someterse a radiación de longitudes de onda en la región del ultra violeta al infrarrojo cercano (Bodelón, Costas, Pérez-Juste, Pastoriza-Santos, & Liz-Marzán, 2017; Jain, Hirst, & O'Sullivan, 2012; Shakeri-Zadeh et al., 2010; Y. Shi, Goodisman, & Dabrowiak, 2013) permitiendo la bifuncionalidad del sistema proponiendo sinergizar, en una potencial práctica experimental, un tratamiento farmacológico con la técnica de foto ablación térmica.

Referente a la funcionalización, el NH₂-PEG-SH tuvo como propósito evitar la aglomeración de las nanopartículas en solución, facilitar el paso a través de membranas lipídicas, evadir (una vez dentro de un organismo completo) el reconocimiento por parte del sistema inmune y mejorar la biocompatibilidad en un sistema biológico (Heo et al., 2012; X. D. Zhang et al., 2011), además de actuar como molécula de anclaje entre la nanopartícula y un ligando funcional como lo es el AF, cuyo objetivo es lograr una mayor especificidad de tejido o “targeting” activo (Alvarez-Berríos & Vivero-Escoto, 2016) en un medio fisiológico. A este respecto existen diversos reportes que señalan que la funcionalización de DDSs con AF aumenta la internalización celular de los sistemas nanotecnológicos, debido a que distintos tipos de cáncer muestran una elevada sobre-expresión de los receptores específicos para ésta biomolécula (Alvarez-Berríos & Vivero-Escoto, 2016; Brandenburg, Hashemian, & Mansoori, 2011; Castillo, Bertel, Páez-Mozo, & Martínez, 2013; Shakeri-Zadeh et al., 2010) la cual es precursora para la síntesis de ácidos nucleicos, esenciales para la sobre-reproducción celular.

Finalmente, el uso de la BCD tuvo un doble propósito, al fungir como estabilizante anti-agregación y como molécula hospedera de fármacos antineoplásicos (función que se prevé evaluar en futuros trabajos), los cuales pueden ser acoplados dentro de la cavidad interna hidrofóbica de la BCD (Challa et al., 2005; Heo et al., 2012).

Una vez caracterizados por técnicas de ciencias de materiales, solamente aquellos sistemas que demostraron las propiedades fisicoquímicas y de funcionalización buscadas, se evaluaron *in-vitro* en líneas de células madre normales (NSCs) y cancerosas (CSCs) de la próstata humana para determinar la potencialidad citotóxica, incluyendo la inducción de daño a la membrana plasmática y su efecto sobre el metabolismo celular (en comparación a los sistemas no funcionalizados), mediante pruebas básicas como lo son los ensayos de Liberación de Deshidrogenasa Láctica (LDH) y Reducción de Sales de Tetrazolio (MTS). En la Fig.3 se muestra esquemáticamente la propuesta de funcionalización de las 3 distintas morfologías de AuNPs con las moléculas descritas (BCD, PEG y AF) y posterior evaluación en el modelo celular *in-vitro*.

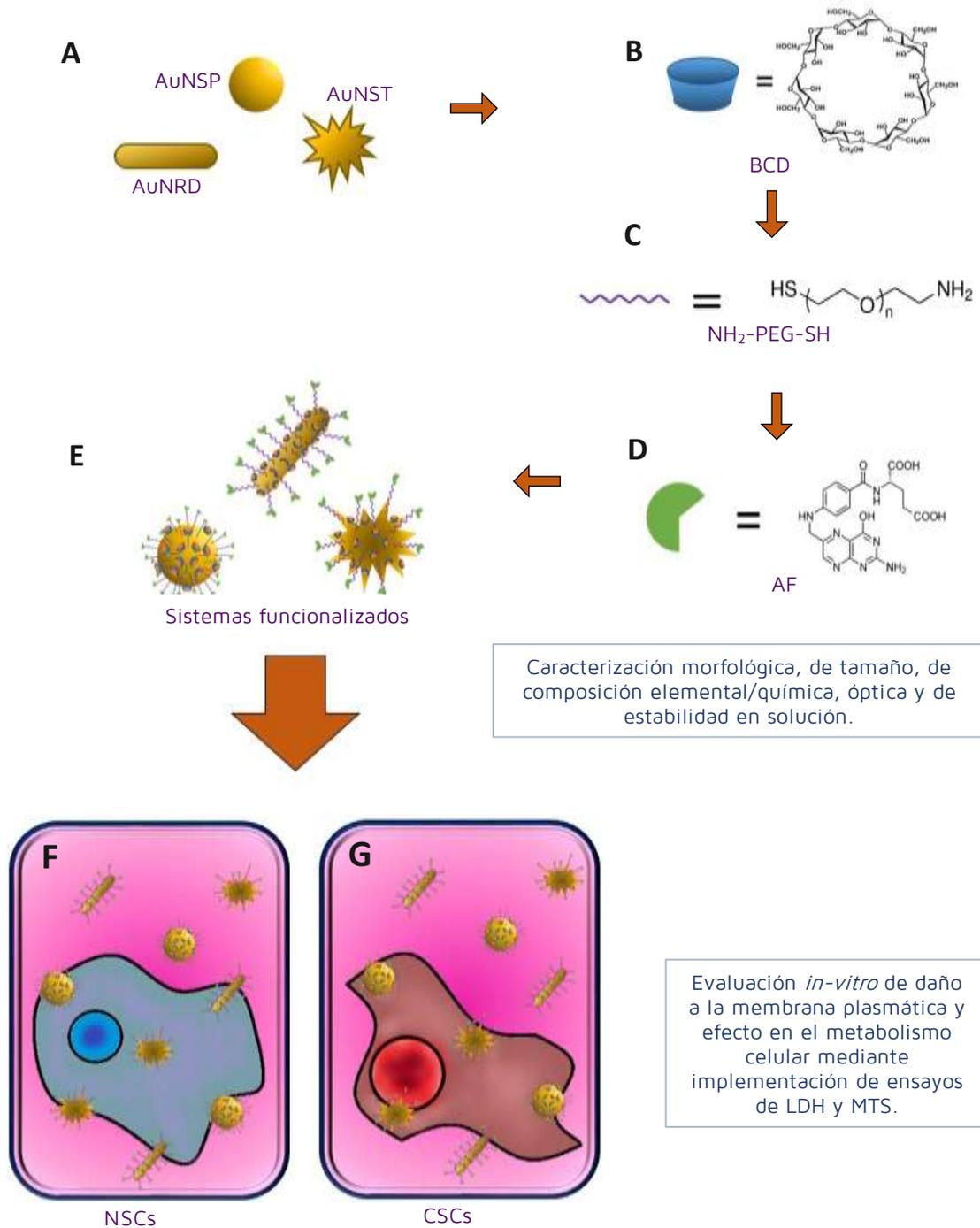


Figura 3. Propuesta de recubrimiento y funcionalización para los complejos sintetizados así su posterior evaluación en un modelo celular *in-vitro* de cáncer de próstata de los sistemas con características fisicoquímicas esperadas. (A) nanopartículas de oro, AuNSP, AuNRD y AuNST, (B) β -Ciclodextrina, BCD (para la nanopartícula esférica de oro, el revestimiento se realiza *in situ* durante la síntesis), (C) polietilenglicol amino tiolado, NH₂-PEG-SH, (D) ácido fólico, AF, (E) sistemas funcionalizados, (F) células madre prostáticas normales (NSCs) y (G) células madre prostáticas cancerosas (CSCs).

3. Objetivos

3.1 General

Sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente tres diferentes sistemas basados en nanopartículas de oro con diferentes morfologías (AuNSP, AuNRD, AuNST), evaluando su capacidad de ser funcionalizadas con β -ciclodextrina, poli-etilenglicol amino tiolado y ácido fólico, así como determinar su potencial citotóxico en términos de daño a la membrana plasmática y efecto en el metabolismo sobre dos tipos de células del mismo linaje: en células madre normales (NSCs) y células madre cancerosas (CSCs) de la próstata humana.

3.2 Específicos

1. Implementar protocolos de síntesis química de las tres distintas AuNPs propuestas utilizando variables controladas que permitan obtener consistentemente NPs metálicas de las morfologías requeridas y tamaño < 100 nm.
2. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de estos sistemas como morfología, tamaño, composición elemental/química y respuesta óptica a través de técnicas de ciencia de materiales (TEM, SEM, EDS, XPS, ICP-OES y FTIR).
3. Evaluar mediante UV-VIS la función de la BCD como molécula estabilizante además de conocer la respuesta óptica de los sistemas FTIR) para justificar su potencial uso como efectores de ablación foto-térmica.
4. Evaluar el potencial citotóxico de aquellas AuNPs que muestren evidencias de una exitosa funcionalización sobre NSCs y CSCs de la próstata humana mediante los ensayos básicos de LDH y MTS.

4. Hipótesis

Los sistemas AuNSP, AuNRD y AuNST funcionalizados con BCD, poli-etilenglicol amino tiolado y ácido fólico presentarán una actividad citotóxica (daño membranal y alteración del metabolismo celular) significativamente menor a las NPs no funcionalizadas al ser evaluadas en un modelo *in-vitro* de cáncer de próstata de células madre.

5. Materiales y Métodos

5.1 Síntesis de AuNSP

La síntesis de AuNSP se basó en el protocolo de Liu y colaboradores (Liu, Male, Bouvrette, & Luong, 2003) en el cual los átomos de oro provenientes del HAuCl_4 son reducidos en solución acuosa a su estado metálico por otro agente químico (citrato de sodio) empleando a la BCD como surfactante y estabilizante de tamaño durante la reacción. Se realizaron adaptaciones técnicas al protocolo hasta obtener reproducibilidad del mismo; Todo el material fue lavado previamente con agua regia ($\text{HCl} + \text{HNO}_3$ en proporción 3:1 v/v respectivamente) y todas las soluciones fueron preparadas empleando agua ultrapura Milli-Q® esterilizada (resistividad de 18 $\text{M}\Omega/\text{cm}$).

La reacción (volumen final de 50 mL) se llevó a cabo en un matrás fondo redondo de tres cuellos uniendo al cuello central un condensador de reflujo, un termómetro de mercurio a uno de los cuellos laterales y finalmente un tapón de vidrio esmerilado al cuello lateral restante. El matrás fue colocado en una mantilla de calentamiento con agitación magnética para proveer de agitación continua a la solución. Dentro del matraz se agregaron 10 mL de una solución 5 mM de HAuCl_4 ($\geq 99.9\%$, Aldrich®) y se añadieron 15 mL de agua para llevar a ebullición (93°C) bajo fuerte agitación. Una vez alcanzado el reflujo se agregaron 20 mL de una solución que contiene 0.4256 g de BCD ($\geq 97\%$, Sigma®) disuelta previamente por agitación ultrasónica durante 10 minutos para obtener una concentración final de 15 mM de BCD en el matrás. Posteriormente se añadieron rápidamente 5 mL de una solución 40 mM de citrato de sodio ($\geq 99.5\%$, Sigma®) al matrás manteniendo el reflujo durante 15 minutos más observando el cambio de color de la solución hasta un rojo tinto. Finalmente se dejó enfriar la solución resultante a temperatura ambiente y se filtró por membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 100 nm.

Las NPs obtenidas fueron lavadas de acuerdo a la siguiente metodología: en tubos para microcentrífuga (de 1.5 mL de volumen) se colocaron 1.3 mL de la síntesis previa hasta completar el volumen total disponible y se llevaron a centrifugación durante 10 min a 13 000 rpm, una vez centrifugadas en cada tubo se obtuvieron pellets de coloración oscura y sobrenadantes moderadamente transparentes a la vista a contraluz los cuales se

descartaron mediante aspiración por pipeteo cuidadoso mientras que el manejo de los tubos debió ser con precaución para evitar resuspender los pellets de AuNSP antes de descartar los sobrenadantes. Posteriormente se llevaron los tubos con los pellets a sonicación en baño de agua durante 5 min (se observó una redispersión completa sin aglomerados visibles), después se resuspendió el contenido de cada tubo en 1.2 mL de agua y se llevaron nuevamente a sonicación por otros 5 min. Se repitió el proceso descrito por 3 veces bajo las mismas condiciones mencionadas y finalmente se procedió a almacenar a 4°C.

5.2 Síntesis de AuNRD

Se empleó el protocolo descrito por Nikoobakht y El-Sayed (Nik & Sayed, 2003) implementando algunas adaptaciones técnicas del mismo. La síntesis de AuNRD se llevó a cabo por reducción química del HAuCl_4 con CTAB como surfactante y con AgNO_3 como agente regulador de la razón entre el largo/ancho de los rods. Todo el material fue lavado previamente con agua regia ($\text{HCl} + \text{HNO}_3$ en proporción 3:1 en v/v respectivamente) y en todas las preparaciones se hizo uso de agua ultrapura Milli-Q® esterilizada. La síntesis se llevó a cabo en dos fases:

- **Síntesis de semillas**

Se prepararon 5 mL 0.2 M de CTAB ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich®) disolviendo por sonicación evitando formar espuma hasta obtener una solución totalmente transparente y se mezcló con 5 mL 0.5 mM de HAuCl_4 en un matríz de 25 mL colocado en una parrilla de calentamiento a 25 °C y bajo agitación moderada, posteriormente se preparó 1 mL 10 mM de NaBH_4 (manteniendo en todo momento la solución efrida en baño de hielo) y se agregaron rápidamente 0.6 mL a la solución del matríz y se elevó la agitación a vigorosa durante 5 minutos. Se obtuvo una solución color café la cual se mantuvo a temperatura ambiente (25 °C) hasta su utilización.

- **Crecimiento de AuNRD**

Para el crecimiento de los nanorods de oro se empleó una solución de 20 mL 0.2 M de CTAB (disuelto por el mismo método descrito en el punto anterior) a la cual se agregan 1.2 mL 4 mM de AgNO_3 y 20 mL 1 mM de HAuCl_4 en un matraz de 50 mL a 25 °C sobre una placa de calentamiento. Transcurridos 5 minutos bajo agitación moderada se añadieron 280 μL 78.8 mM de ácido ascórbico cambiando el color de la solución de amarillo-naranja a transparente. Finalmente se agregaron 96 μL de la solución de semillas (recién preparada) elevando la agitación a vigorosa por 15 min más hasta que se obtuvo una solución color rosa canela.

Los AuNRD obtenidos se lavaron de acuerdo al protocolo de descrito de la sección 5.1 y se procedió a su almacenaje a 4°C.

5.3 Síntesis de AuNST

El protocolo empleado es el descrito por Yuang y colaboradores (Yuan et al., 2012) al cual se realizaron modificaciones específicas. El procedimiento implica la reducción química de HAuCl_4 por citrato de sodio en una primer etapa y por ácido ascórbico en la segunda y con AgNO_3 como agente regulador de crecimiento anisotrópico de brazos (picos) para formar las AuNST. Todo el material fue lavado previamente con agua regia ($\text{HCl} + \text{HNO}_3$ en proporción 3:1 en v/v respectivamente) y en todas las preparaciones se hizo uso de agua ultrapura Milli-Q® estéril. La síntesis se llevó a cabo en dos fases:

- **Síntesis de semillas**

En un matríz redondo de 3 cuellos se adaptó un condensador de reflujo al cuello central, en un cuello lateral un termómetro de mercurio y al cuello restante un tapón esmerilado de vidrio y se colocó en una mantilla de calentamiento con agitación magnética. Dentro del matríz se agregaron 10 mL 1 mM de HAuCl_4 y se llevó la solución a ebullición bajo agitación vigorosa, una vez alcanzado el reflujo se agregaron 1.5 mL al 1% en p/v de citrato de sodio manteniendo el reflujo y la agitación por 10 minutos más para posteriormente enfriar a temperatura ambiente, se filtró por membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 100 nm y se almacenó a 4 °C.

- **Crecimiento de AuNST**

En un matríz de 50 mL a temperatura ambiente y bajo vigorosa agitación se colocaron 40 mL 0.25 mM de HAuCl_4 con 40 μL 1 M de HCl y 400 μL de la solución de semillas previamente sintetizada, rápidamente 400 μL 3 mM de AgNO_3 (recién preparado) y 200 μL 0.1M de ácido ascórbico (recién preparado) se agregaron simultáneamente agitando la solución vigorosamente por 5 segundos más y obteniendo una coloración azul grisácea, inmediatamente se llevó a refrigeración a 4°C durante 15 min.

Las AuNST obtenidas se lavaron de acuerdo al protocolo descrito de la sección 5.1 y se procedió a su almacenaje a 4°C.

5.4 Caracterización Morfológica de las AuNPs

La caracterización morfológica de las AuNPs sintetizadas se realizó por medio de SEM y TEM empleando un microscopio de barrido por electrones (FIB/SEM) Dual Beam FEI-Helios Nanolab 600 y un microscopio de transmisión por electrones HR-TEM FEI Tecnai F30 (300 KeV) respectivamente (ambos pertenecientes al LINAN, IPICYT).

De cada una de las muestras (AuNSP, AuNRD y AuNST) se tomaron alícuotas de 1.3 mL y se lavaron adicionalmente por 10 veces siguiendo el protocolo mencionado (sección 5.1). Posteriormente se diluyeron con agua ultrapura Milli-Q® en tres tubos de microcentrífuga hasta obtener soluciones cuasi-transparentes a observación directa a contraluz.

Para el análisis por SEM se emplearon tres pines de aluminio previamente lavados colocando en cada uno de ellos un corte de cinta de carbono doblecara (0.5 X 0.5 cm aproximadamente) y sobre ella a su vez se colocó una placa pequeña de Silicio (previamente lavada por sonicación con etanol y acetona por triplicado). Finalmente 10 μ L de cada una de las soluciones obtenidas del lavado de las AuNps se colocaron sobre las superficies de Si inmediatamente después de sonicación en baño de agua por 5 min para obtener una adecuada dispersión y se secaron en estufa a 50 °C por 1 hr. Se analizaron las muestras a una potencia del haz de electrones de 25 KeV a distintas magnificaciones en los modos de detección de electrones secundarios y electrones retrodispersados.

Para el análisis de las muestras por TEM se siguió el mismo procedimiento de dilución descrito para cada una de las AuNPs sintetizadas, las soluciones cuasi-transparentes respectivas a cada muestra se llevaron a sonicación por 10 min e inmediatamente después se colocaron 10 μ L (mediante goteo cercano) de cada una de ellas sobre rejillas para microscopía electrónica de transmisión de Cu (grid 300 con film de carbono) colocadas a su vez sobre papel filtro para absorber el excedente, se cubrieron con un recipiente plástico lavado y libre de polvo para evitar contaminación y se secaron a temperatura ambiente durante 4 hrs. Las muestras se analizaron a una potencia de 300 KeV en el modo imagen mediante las técnicas de campo claro (BF) y de alta resolución (HRTEM).

5.5 Análisis de Tamaño de las AuNPs

El análisis del tamaño de las AuNPs obtenidas por las síntesis descritas se llevó a cabo mediante la medición digital de imágenes de TEM obtenidas con un Microscopio Electrónico de Transmisión HR-TEM FEI Tecnai F30, 300 keV (LINAN, IPICYT) y empleando el software ImageJ versión 1.51j8 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

Las mediciones se realizaron en imágenes representativas de las AuNPs y se llevaron a cabo de la siguiente manera:

- Para la muestra correspondiente a AuNSP se realizó la medición de 100 NPs tomando en cada una de ellas la distancia más larga posible entre los bordes de una misma nanopartícula como la longitud a registrar, es decir, se consideró que las nanopartículas eran cuasi-esféricas y la longitud registrada correspondió al diámetro de las mismas.
- Referente a los AuNRD, se realizaron mediciones a un total de 100 nanopartículas y en cada una de ellas se efectuaron dos registros, uno correspondiente a su sección longitudinal y el otro correspondiente a su sección transversal tomando las distancias más largas posibles entre su borde como el largo y el ancho respectivamente formando líneas perpendiculares entre ellas.
- Finalmente, para la muestra de AuNST, de la misma manera se midieron 100 nanopartículas y por su particular morfología la medición se llevó a cabo tomando la distancia más larga posible entre dos puntas correspondientes a dos brazos (ramificaciones) de la estructura como la longitud a registrar y se consideró tal distancia como el diámetro de las nanopartículas.

La calibración del equipo se realizó por parte del técnico, el Dr. Héctor Gabriel Silva Pereyra, dos semanas previas al análisis en el equipo de microscopía, las imágenes se obtuvieron en archivos con formato digital de micrografías (extensión .dm3) las cuales mantenían la calibración previa, es decir su tamaño al visualizarlas estaba dado en nm.

5.6 Funcionalización

Una alícuota de 20 mL de cada una de las tres soluciones obtenidas de las síntesis fue adicionalmente lavada empleando el procedimiento descrito en el apartado 5.1 por 10 veces. Para las AuNSP se esperaba que la funcionalización con la BCD se hubiese llevado a cabo *in situ* durante la síntesis de acuerdo al protocolo empleado mientras que para las dos muestras restantes, AuNRD y AuNST, se siguió el procedimiento descrito en la Ref. (del Pozo et al., 2017), en donde a cada solución de NPs se agregaron 500 μL de una solución acuosa de BCD (disuelta previamente por sonicación en baño de agua por 5 min) para obtener una concentración final de 1 mM. Se mantuvieron dichas soluciones resultantes bajo agitación vigorosa constante durante 48 hrs y se procedió a su lavado por el método descrito en la sección 5.1 por triplicado. Se obtuvieron las soluciones de AuNSP@BCD, AuNRD@BCD y AuNST@BCD respectivamente y se almacenaron a 4 °C.

Se tomaron alícuotas de 15 mL de cada una de las tres soluciones anteriores y se procedió a la siguiente etapa de funcionalización por PEG-SH ($\geq 99.5\%$, Aldrich®, Mw=7500 g/mol) para lo cual a cada alícuota se agregaron 500 μL de una solución acuosa de NH₂-PEG-SH (disuelta previamente por sonicación en baño de agua por 5 min) para obtener una concentración final resultante de 0.1 mM en cada muestra manteniéndolas en agitación mediante sonicación en baño de agua durante 1 hr siguiendo la estrategia descrita en la Ref. (X. D. Zhang et al., 2011). Se repitió el proceso de lavado descrito (sección 5.1) por 3 veces. Las soluciones obtenidas fueron nombradas como AuNSP@BCD-PEG, AuNRD@BCD-PEG y AuNST@BCD-PEG.

Finalmente para la funcionalización con AF ($\geq 99.9\%$, Sigma Aldrich®) a cada solución obtenida en la etapa anterior se agregaron 500 μL de una solución acuosa de AF (disuelta previamente por sonicación en baño de agua por 5 min y manteniéndola sin exposición a la luz directa) para obtener una concentración final resultante de 0.1 mM en cada muestra. Las soluciones se mantuvieron en sonicación en baño de agua durante 1 hr y se procedió a lavar cada muestra por triplicado. Se obtuvieron los sistemas (muestras/soluciones) AuNSP@BCD-PEG-AF, AuNRD@BCD-PEG-AF y AuNST@BCD-PEG-AF las cuales se almacenaron a 4 °C en frascos ámbar.

5.7 Evaluación de Estabilidad y Respuesta Óptica

Se analizaron por UV-VIS las soluciones correspondientes a cada una de las AuNPs recién sintetizadas además de las soluciones obtenidas después del proceso de funcionalización con BCD (AuNSP@BCD, AuNRD@BCD y AuNST@BCD) para comparar los espectros de aquellas sin funcionalizar, esto una vez transcurridos 30 días de almacenamiento de las muestras a 4 °C para evaluar la capacidad de la BCD como estabilizante de las NPs en solución acuosa evitando su precipitación y aglomeración además de conocer la respuesta óptica de cada sistema, propiedad que en posteriores trabajos puede emplearse para que las AuNPs sean irradiadas con láseres de longitud de onda cercana a donde presentan su máxima absorbancia debido al SPR característico de cada una de ellas.

Para el análisis se empleó un espectrofotómetro Agilent Cary 60 UV-Vis. Se colocaron 4 mL de cada muestra (previa sonicación en baño de agua ultrasónico por 15 min) en una celdilla de cuarzo de 10 mm de paso óptico y se realizó la lectura de la absorbancia en el modo estándar de análisis en un intervalo de 300 a 1000 nm de longitud de onda a una velocidad media de escaneo y empleando agua ultrapura Milli-Q® como blanco. Los datos resultantes se analizaron y normalizaron con el software OriginPro versión 9.1.0 (OriginLab, Northampton, MA).

5.8 Caracterización Elemental y Química

La composición elemental de las 3 muestras de AuNPs previa funcionalización se analizó mediante EDS empleando un microscopio de barrido por electrones (FIB/SEM) Dual Beam FEI-Helios Nanolab 600 con un detector de rayos X acoplado (EDAX) por medio del cual se registraron, cualitativamente, los rayos X característicos de los elementos químicos presentes en la superficie de la muestra mostrando un análisis semi-cuantitativo de la composición elemental detectada. La preparación de las muestras AuNSP, AuNRD y AuNS fue la especificada en la sección 5.4.

Para analizar la composición elemental y química de muestras una vez completado el proceso de funcionalización así como para cada etapa individual se empleó XPS y FTIR respectivamente cuyos resultados fueron complementarios entre sí y permitieron determinar si la funcionalización se realizó o no exitosamente de acuerdo a la propuesta planteada. Los equipos empleados fueron un espectrómetro de electrones fotoemitidos por rayos-X PHI 5000 VersaProbe II (LINAN, IPICYT) y un espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier Thermo Nicolet 6700 (DCA, IPICYT) respectivamente.

La preparación de las muestras para XPS se realizó tomando alícuotas de 1.3 mL de cada una de las soluciones (AuNSP@BCD-PEG-AF, AuNRD@BCD-PEG-AF y AuNST@BCD-PEG-AF) las cuales se colocaron en tubos para microcentrífuga y se llevaron a centrifugación durante 30 min a 13 000 rpm. El sobrenadante se descartó por aspiración por pipeteo con especial cuidado en el manejo de los tubos para no resuspender el pellet al fondo de cada uno, después, los pellets obtenidos (aproximadamente 100 μ L) se redispersaron mediante sonicación en baño de agua durante 5 min con el fin de obtener soluciones concentradas de cada uno de los sistemas, posteriormente se gotearon por pipeteo 5 μ L de cada solución sobre placas de Si pequeñas (previamente lavadas por sonicación con etanol y acetona por triplicado con cada solvente) y se llevaron a secado en estufa a 50 °C por 30 min para repetir el goteo y secado 3 varias veces más hasta formar una película homogénea (sin huecos o espacios) sobre cada placa de Si (durante el proceso se mantuvieron las placas en un recipiente limpio y estéril para evitar contaminación superficial a la cual la técnica es muy sensible). El análisis se realizó obteniendo para cada muestra el espectro de inspección en un intervalo de 0 a 1000 eV, mientras que en alta

resolución se realizaron análisis para la regiones de carbono (C 1s), oxígeno (O 1s), nitrógeno (N 1s), azufre (S 2p) y oro (Au 4f) aplicando un número de barridos de 50, 50, 100, 100 y 100, a una energía de paso de 23.5, 23.5, 58.7, 117.3 y 58.7 eV respectivamente para cada región. El análisis de los espectros obtenidos se realizó por medio del software CasaXPS versión 2.3.19PR1.0 (Accolyte Science, Knutsford, UK) empleando la base de datos *NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database* (Naumkin, Kraut-Vass, Gaarenstroom, & Powell, 2012).

El análisis por FTIR de los sistemas se llevó a cabo reservando muestras en cada etapa de funcionalización que se trataron mediante el procedimiento descrito en el párrafo anterior para obtener soluciones concentradas de cada una de ellas, es decir, se analizaron las AuNSP, AuNRD y AuNST después de su respectiva síntesis así como después de ser funcionalizadas con cada una de las moléculas propuestas (BCD, PEG-SH y AF) con el objetivo de obtener información sobre los grupos funcionales que permanecían libres posterior a cada uno de los procesos de funcionalización. En el equipo de FTIR se empleó el modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR) colocando 10 μ L de cada solución en el portamuestras y aplicando entre 64 y 256 barridos a cada muestra hasta obtener espectros con picos definidos. Se obtuvieron además los espectros correspondientes a los compuestos de BCD, PEG-SH y AF en su estado de reactivo químico sólido (polvos). El análisis de los espectros obtenidos se realizó por medio del software OriginPro versión 9.1.0 (OriginLab, Northampton, MA) empleando como bibliografía y base de datos la publicación a cargo de Socrates G. (Socrates, 2007).

5.9 Análisis y Ajuste de Concentración

Una vez evaluada la funcionalización de las AuNPs mediante los análisis químicos descritos en la sección 5.7 se prosiguió a analizar la concentración de los sistemas AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF, para ello se empleó la técnica de ICP-OES en un equipo Varian modelo 738 ES (LAMBAMA, IPICYT).

Las soluciones a analizar se sometieron a digestión ácida para disolver las AuNPs presentes. Se empleó un matraz de 25 mL colocado sobre una placa de calentamiento bajo fuerte agitación magnética y se agregaron 5 mL de la solución de AuNST junto con 3 mL de agua ultrapura Milli Q® y 2 mL de agua regia recién preparada. La solución resultante se llevó a ebullición por 5 min y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente dentro de campana de extracción para eliminar los vapores residuales y se repitió el procedimiento para la muestra de AuNST@BCD-PEG-AF. Dichas soluciones fueron analizadas para concentración de Au junto con una muestra de agua regia tratada por el mismo procedimiento y la cual fungió como muestra blanco.

Las concentraciones obtenidas para la solución de AuNST fue de 81.65 $\mu\text{g/mL}$ y para AuNST@BCD-PEG-AF 78.59 $\mu\text{g/mL}$ (microgramos por mililitro de Au). Con base en los resultados obtenidos se ajustaron las soluciones de cada una de las dos muestras: se tomaron 7.35 mL de la solución de AuNST y 7.73 mL de AuNST@BCD-PEG-AF, se llevaron a centrifugación a 13 000 rpm por 30 min, se retiró el sobrenadante por pipeteo cuidadoso y se resuspendieron en 3 mL medio de cultivo celular (medio para keratinocitos libre de suero y bajo en calcio, KSFM). Las respectivas soluciones resultantes tenían una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ de Au y a partir de ellas se realizaron diluciones sucesivas en escala logarítmica (20, 2, 0.2, y 0.02 $\mu\text{g/mL}$ de Au). Todas las soluciones fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso en los ensayos de LDH y MTS.

5.10 Evaluación de Citotoxicidad *in-vitro*

Para las pruebas de citotoxicidad se emplearon NSCs y CSCs, ambas líneas celulares fueron donadas al laboratorio de inmunotoxicología de la Facultad de Ciencias Químicas (UASLP) por el *Laboratory of Comparative Carcinogenesis, National Cancer Institute at the National Institute of Environmental Health Sciences* (National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, North Carolina, USA) a cargo del Dr. Erik J. Tokar.

Todo el manejo experimental con los modelos celulares se realizó bajo campana de esterilidad clase II empleando materiales esterilizados por autoclave o en su caso por filtración (filtros con poro de 0.22 μm). Los dos tipos celulares fueron cultivados de manera independiente en placas de 75 cm^2 , cuyas superficies fueron cubiertas con una solución de fibronectina y colágeno IV a una concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada componente e incubando a 37 °C para formar una matriz soporte (previo al pase celular). Transcurridas 24 la solución de matriz se retiró de la placas y se procedió al cultivo celular en medio KFSM que contenía 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de hipófisis bovina y 5 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (todos de Gibco®, Rockville, MD) para mantener el estado fenotípico de células madre (Tokar, Diwan, et al., 2010). Las células se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO_2 al 5% y se realizó cambio de medio cada 72 horas con pases al llegar al 90% de confluencia. La evaluación de la citotoxicidad se diseñó para ser analizada a dos niveles celulares: daño en la membrana plasmática y alteración del metabolismo celular.

5.10.1 Ensayo de LDH

La integridad de la membrana plasmática de las células tras la exposición a los sistemas AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF se analizó mediante el ensayo de liberación de deshidrogenasa láctica (LDH), el cual está basado en la determinación de la actividad enzimática. En el primer paso de la reacción, el NAD^+ es reducido a NADH/H^+ por conversión de lactato a piruvato, la cual es catalizada enzimáticamente por la deshidrogenasa láctica presente en el medio de cultivo celular. En el segundo paso el catalizador (diaforasa) transfiere H/H^+ del NADH/H^+ a la sal de tetrazolio la cual es

reducida a formazan. Un incremento en la cantidad de células con daño en la membrana plasmática resulta en un incremento de la actividad enzimática de la deshidrogenasa láctica en el sobrenadante de cultivo.

Para el ensayo, las NSCs fueron separadas de la placa de cultivo agregando 4 mL de tripsina 1X e incubando por 8-10 min hasta el desprendimiento celular cercano al 100%, posteriormente para neutralizar la actividad de la tripsina se agregaron 4 mL de PBS suplementado con suero bovino fetal al 2%. Las células fueron aspiradas y colocadas en un tubo Falcon de 15 mL el cual se centrifugó durante 5 min a 1000 rpm, después se descartó el sobrenadante por aspiración cuidadosa y se resuspendió el botón celular en medio KSFM para ajustar la concentración a 100 000 cell/mL. Se colocaron 200 μ L de la suspensión celular en cada pozo de una placa de 96 pozos (previa colocación y retiro de matriz de fibronectina/colágeno) y se llevó a incubación a 37 °C con 5 % de CO₂ hasta alcanzar el 80% de confluencia. De cada pozo fueron retirados 100 μ L de medio sobrenadante y se agregaron 100 μ L de las diluciones de AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF en KSFM (sección 5.8) para tener concentraciones finales de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0 μ g/mL de Au en los pozos (por cuadruplicado), además se colocaron como control negativo las células lisadas sin interacción con AuNPs y como control de fondo o ruido (background), el medio KSFM sin células.

La placa se llevó a incubación para exposición de las células a los sistemas, transcurridas 24 hrs de exposición se transfirieron 50 μ L del sobrenadante de cada pozo a otra placa de 96 pozos de fondo plano y se agregaron a cada uno 50 μ L de la mezcla de reacción (LDH Roche assay Cat. No. 11 644 793 001), se llevó a incubación a 37 °C durante 30 min y posteriormente se analizó en un espectrofotómetro uv-visible con lector de placas de 96 pozos, la absorbancia registrada fue la obtenida a 492 nm a la cual se sustrajo la absorbancia a 630 nm además del promedio de absorbancia obtenido en los pozos correspondientes al control con medio KSFM (background). Los datos se procesaron mediante el software Excel 2013 (Microsoft Corporation) para ser expresados como integridad de la membrana celular en función de las concentraciones establecidas de AuNPs.

A	concentración final de Au (µg/mL)	NSCs							
		AuNST				AuNST@BCD-PEG-AF			
		cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells
100.00	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
10.00	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
1.00	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
0.10	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
0.01	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
0.00 (liberación espontánea LDH)	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
Control negativo (células lisadas)	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
Medio KFSM (background)									

B	concentración final de Au (µg/mL)	CSCs							
		AuNST				AuNST@BCD-PEG-AF			
		cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells
100.00	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
10.00	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
1.00	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
0.10	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
0.01	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
0.00 (liberación espontánea LDH)	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
Control negativo (células lisadas)	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	cells	
Medio KFSM (background)									

Figura 4. Diseño experimental para la exposición de los modelos celulares *in vitro* en placas de cultivo de 96 pozos a AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF para (A) NSCs y (B) CSCs.

El mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior fue implementado para las CSCs empleando las mismas concentraciones de AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF bajo las mismas condiciones experimentales y de análisis de datos. El diseño experimental para ambos tipos celulares se esquematiza en la Fig 4.

5.10.2 Ensayo de MTS

La modificación del metabolismo celular por exposición a los sistemas seleccionados de AUNPs se evaluó mediante el ensayo de MTS en el cual ocurre la reducción de (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) a formazan soluble en medio acuoso en células metabólicamente activas por deshidrogenasas mitocondriales, predominantemente la succinato deshidrogenasa (Rai et al., 2018).

Experimentalmente, para el cultivo las NSCs y CSCs así como exposición a los sistemas AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF, se procedió siguiendo el mismo protocolo y diseño mencionado de la sección anterior. 100 µL de la mezcla de reacción (Promega Celltiter 96. No. G5440) se colocaron directamente en cada pozo y las placas se incubaron a 37 °C durante 4 hr, posteriormente se determinaron las absorbancias en un espectrofotómetro uv-visible con lector de placas de 96 pozos a 492 nm (sustrayendo la absorbancia a 630 nm además del promedio obtenido para el background). Los datos se analizaron mediante el software Excel 2013 (Microsoft Corporation) para ser expresados

como absorbancia en función de las concentraciones establecidas de AuNPs. El aumento de la absorbancia es una función indirecta del incremento de la actividad metabólica celular.

A fin de determinar de forma indirecta el grado de interacción (por asociación a la membrana o internalización celular) de las AuNPs con las NSCs y CSCs, los sobrenadantes de los pozos con células expuestas al sistema AuNST@BCD-PEG-AF se reservaron junto con los residuos de los lavados con PBS (por triplicado), tales soluciones fueron filtradas a través de una membrana de nitrocelulosa de 1 μm de poro y procesados para ser analizadas por ICP-OES de acuerdo al protocolo de la sección 5.9 para cuantificación total de Au.

6. Discusión de Resultados

6.1 Caracterización Morfológica de las AuNPs

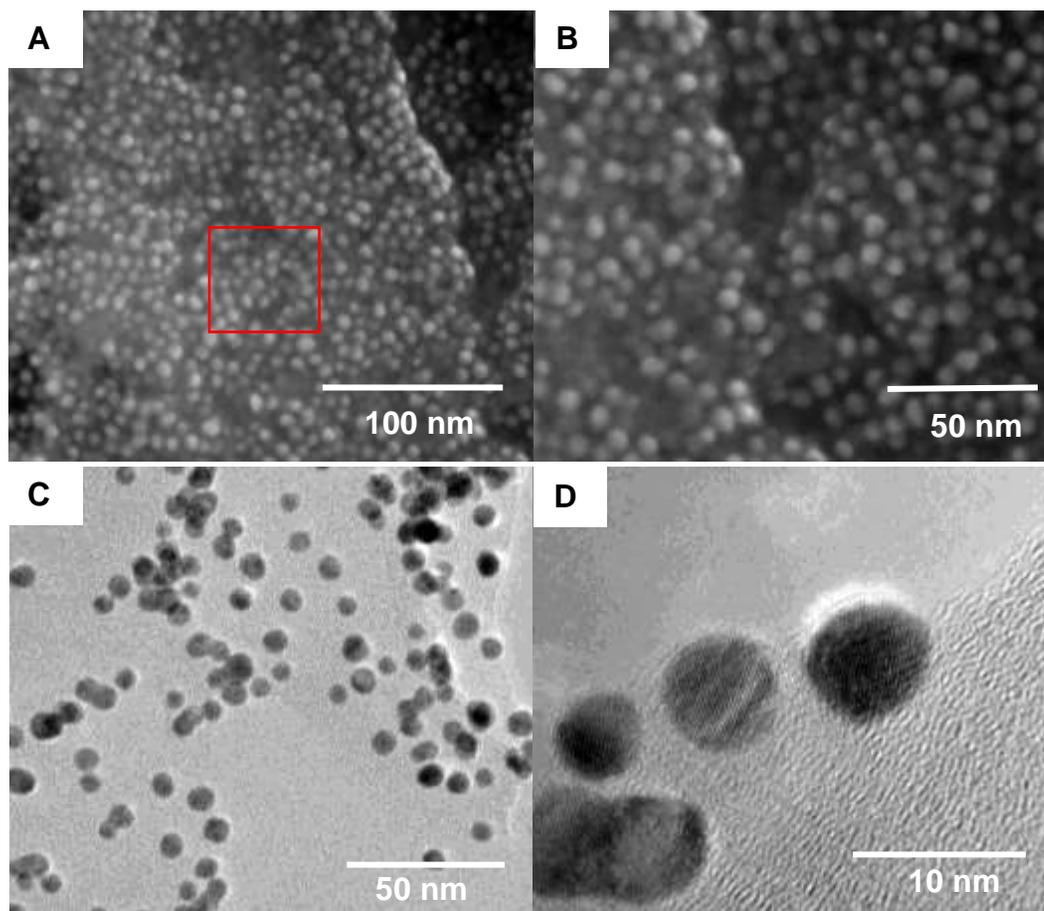


Figura 5. Imágenes representativas de AuNSP obtenidas por SEM y TEM. (A) y (B) Imágenes obtenidas por electrones secundarios en SEM. (C) y (D) AuNS vistas en modo imagen por BF y HRTEM en TEM. El recuadro rojo corresponde a la región donde fue tomado el espectro EDS (sección 6.3).

Las imágenes obtenidas por SEM y TEM evidencian una morfología cuasi-esférica para las AuNSP la cual es visualmente homogénea para la gran mayoría de las NPs. En la Fig. 5. se muestran imágenes representativas de la muestra, particularmente en las Figs. 5A y 5B obtenidas por SEM se puede observar una matriz la cual se atribuye corresponde a la BCD empleada durante la síntesis de las NPs y cuya concentración fue relativamente alta (15 mM) respecto al HAuCl_4 siendo su función el actuar como estabilizante y regulador de tamaño.

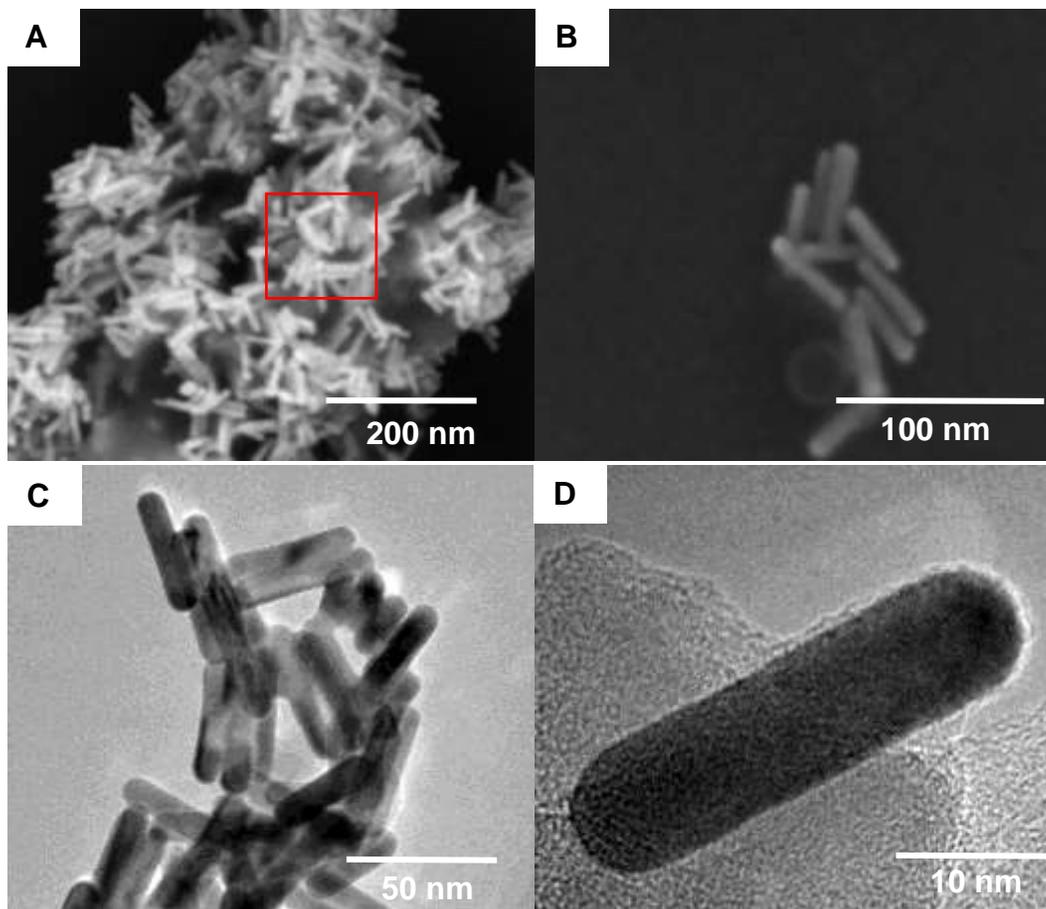


Figura 6. Imágenes representativas de AuNRD obtenidas por SEM y TEM. (A) y (B) imágenes por electrones retrodispersados en SEM. (C) y (D) Capturas en modo imagen por BF y HRTEM respectivamente en TEM. El recuadro rojo corresponde a la región donde fue tomado el espectro EDS (sección 6.3).

La Fig. 6 se muestra imágenes representativas de AuNRD obtenidas por SEM (A) - (B) y por TEM (C) - (D). Los AuNRD presentan una morfología de barras constante y homogénea además una ligera matriz embebiendo las estructuras (Fig. 6A) y atribuida a la presencia de CTAB remanente aún después de los procesos de lavado. El CTAB es un surfactante catiónico que forma fuertes uniones a la superficie del Au haciendo que la solvatación superficial sea difícil. Solo algunas publicaciones se ocupan de ésta cuestión al utilizar una fase de transferencia a solventes orgánicos lo cual logran bajo condiciones experimentales muy estrictas (Pastoriza-Santos, Pérez-Juste, & Liz-Marzán, 2006), condiciones no implementadas en nuestros protocolos al mantener siempre los AuNRD en una fase acuosa previendo algún tipo de interacción no favorable o tóxica para los sistemas biológicos en los cuales se plantea implementar nuestros sistemas.

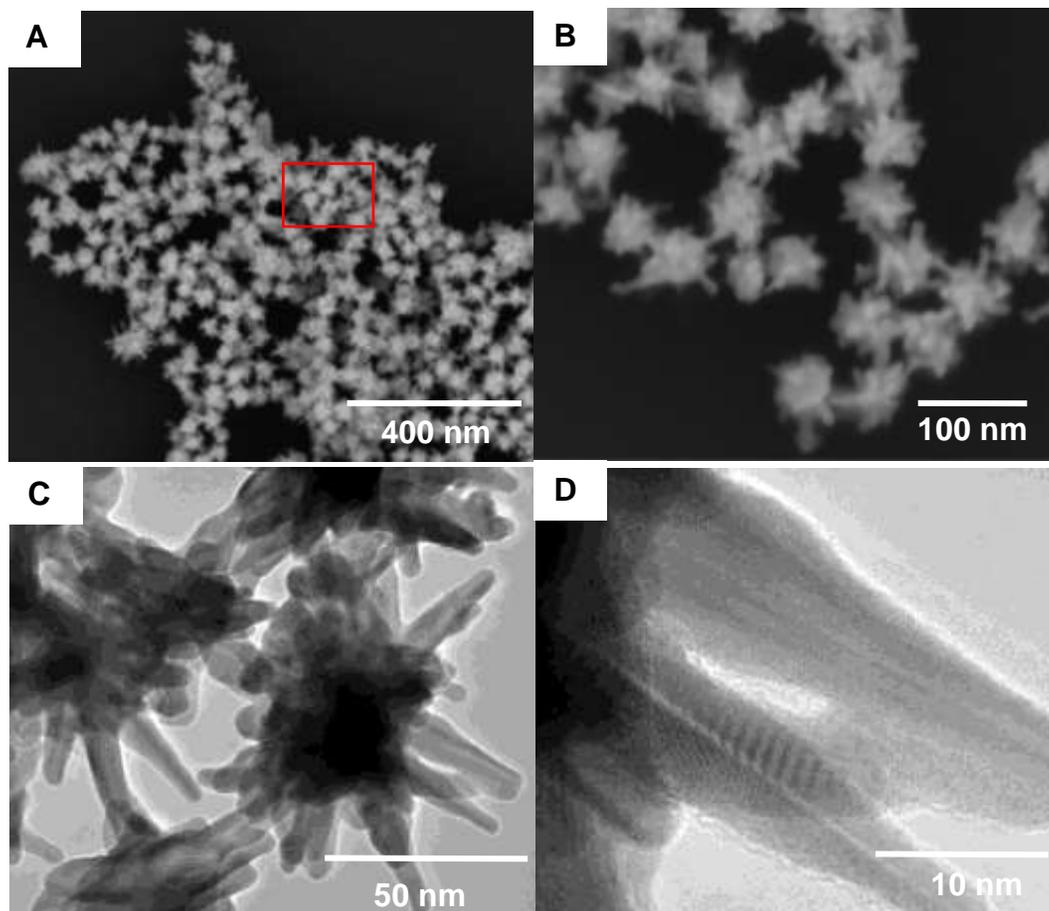


Figura 7. Imágenes representativas de AuNST obtenidas por SEM y TEM. (A) y (B) Imágenes obtenidas por electrones retrodispersados en SEM. (C) y (D) Capturas obtenidas en modo imagen por BF y HRTEM respectivamente en TEM. El recuadro rojo corresponde a la región donde fue tomado el espectro EDS (sección 6.3).

Imágenes representativas de AuNST por SEM y TEM se muestran en la [Fig. 7](#). Las nanoestructuras obtenidas presentan múltiples ramificaciones las cuales parten de un núcleo o semilla central asemejando a una forma de estrellas. El reporte en el cual se basa su síntesis (Yuan et al., 2012) indica que la relación de aspecto (largo de las ramificaciones o brazos) y el tamaño de las NPs es una función de diferentes variables experimentales las cuales pueden ser controladas fácilmente (concentración del HAuCl_4 , la concentración de iones de Ag, la relación entre HAuCl_4 /ácido ascórbico y el uso o no de semillas de Au). Las variables implementadas en nuestra síntesis fueron aquellas que nos permitieran obtener AuNST de tamaño promedio < 100 nm y con una relación de aspecto que ofreciera una respuesta óptica de su SPR en la región del infrarrojo cercano planificando su potencial aplicación como efectores de ablación por terapia foto-térmica.

6.2 Análisis de Tamaño de las AuNPs

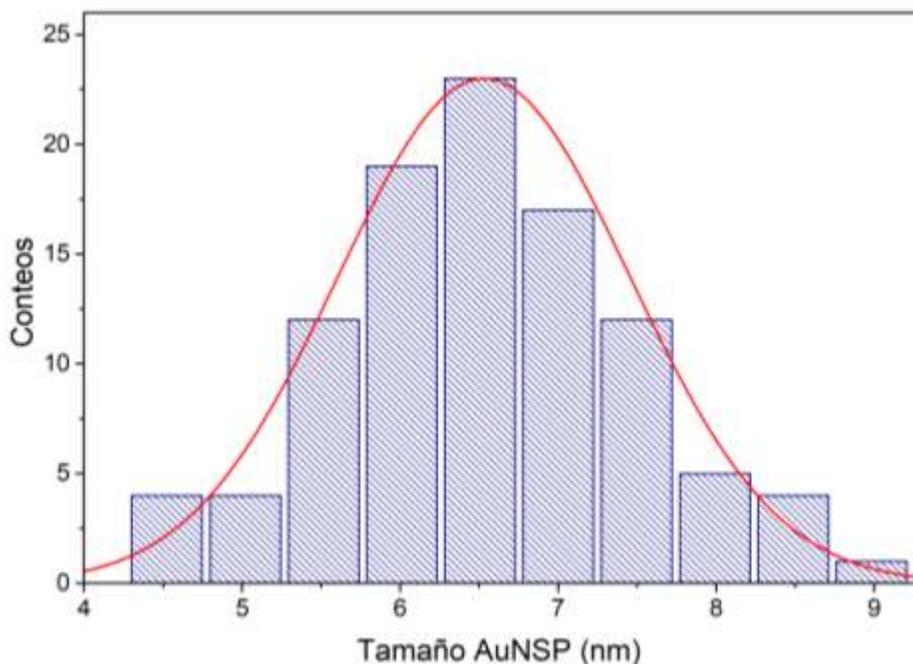


Figura 8. Histograma de distribución de tamaño de AuNSP.

Las distribuciones de tamaño para las AuNSP, AuNRD y AuNST se observan en las Figs. 8, 9 y 10 respectivamente. Los histogramas y los parámetros estadísticos muestran una baja dispersión de los datos con coeficientes de variación no mayores a 20 % en ningún caso mientras que la [Tabla 1](#) resume los resultados obtenidos.

Las AuNSP ([Fig. 8](#)) presentaron un tamaño promedio de 6.53 nm con una desviación estándar de 0.93 nm y un 14.18 % de coeficiente de variación, las partículas fueron considerablemente homogéneas en sus dimensiones con lo cual es posible deducir que el papel de la BCD es importante como molécula moderadora de tamaño fungiendo como surfactante entre las NPs metálicas y el medio acuoso.

Los AuNRD poseen dos parámetros dimensionales por su morfología particular, largo (longitudinal) y ancho (transversal), ambos histogramas de distribución se presentan en la [Fig. 9](#). Se obtuvo un largo promedio de 37.39 nm con una desviación estándar de 4.43 nm y 0.97 % de coeficiente de variación y un ancho promedio de 8.23 nm con una

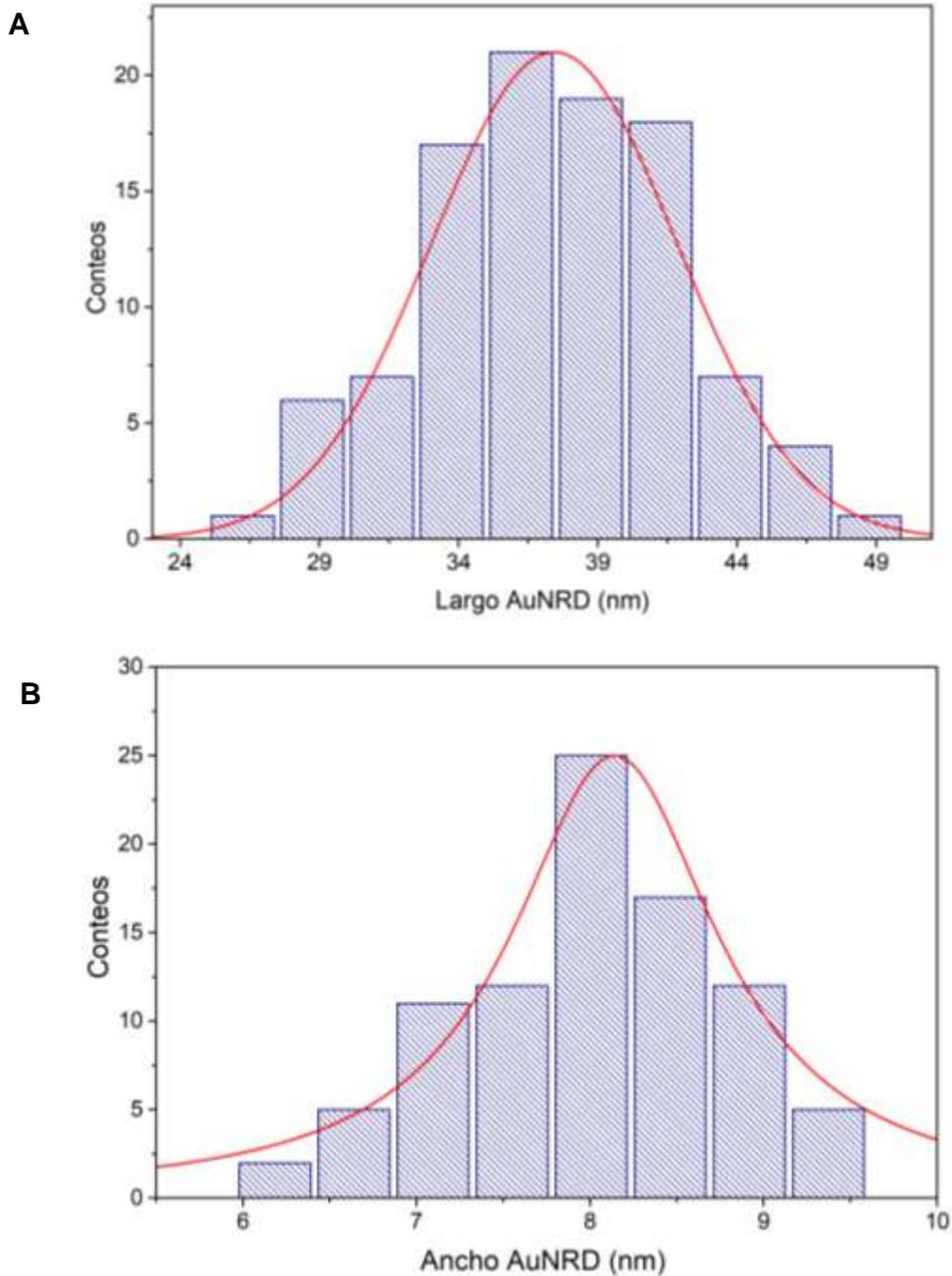


Figura 9. Histogramas de distribución de las dimensiones de los AuNRD. (A) Dimensión longitudinal (largo) y (B) transversal (ancho) de las NPs.

desviación estándar de 11.84 nm y un coeficiente de variación de 11.74 % lo que da evidencias de una baja dispersión de tamaño entre las NPs tanto en su sección longitudinal como transversal.

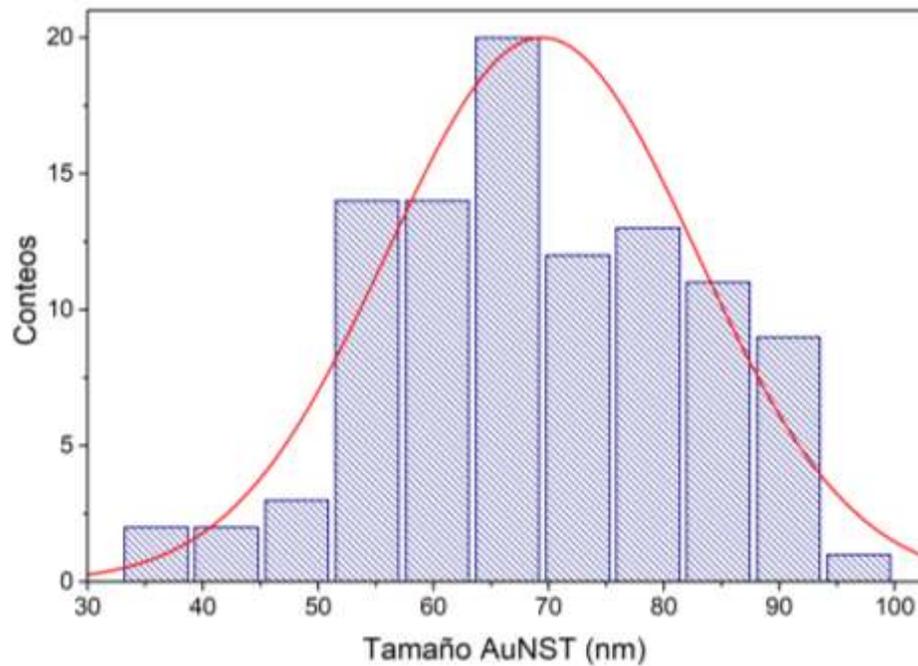


Figura 10. Histograma de distribución tamaño de AuNST.

Las AuNST presentan un tamaño promedio de 69.41 nm con una desviación estándar de 13.40 nm y un coeficiente de variación de 19.31 %. De las tres AuNPs sintetizadas son las que presentan relativamente mayor variación y dispersión en sus dimensiones. Las tres AuNPs tienen dimensiones promedio < 100 nm lo que permite justificar que uno de los objetivos específicos planteados para el proyecto (junto con la morfología buscada) fue logrado.

Tabla 1. Media (X), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV) obtenidos del análisis del tamaño de AuNSP, AuNRD y AuNST.

AuNPs	X (nm)		DE (nm)		CV (%)	
AuNSP	6.53		0.93		14.18	
AuNRD	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho
	37.39	8.23	4.43	11.84	0.97	11.74
AuNST	69.41		13.40		19.31	

6.3 Evaluación de Estabilidad y Respuesta Óptica

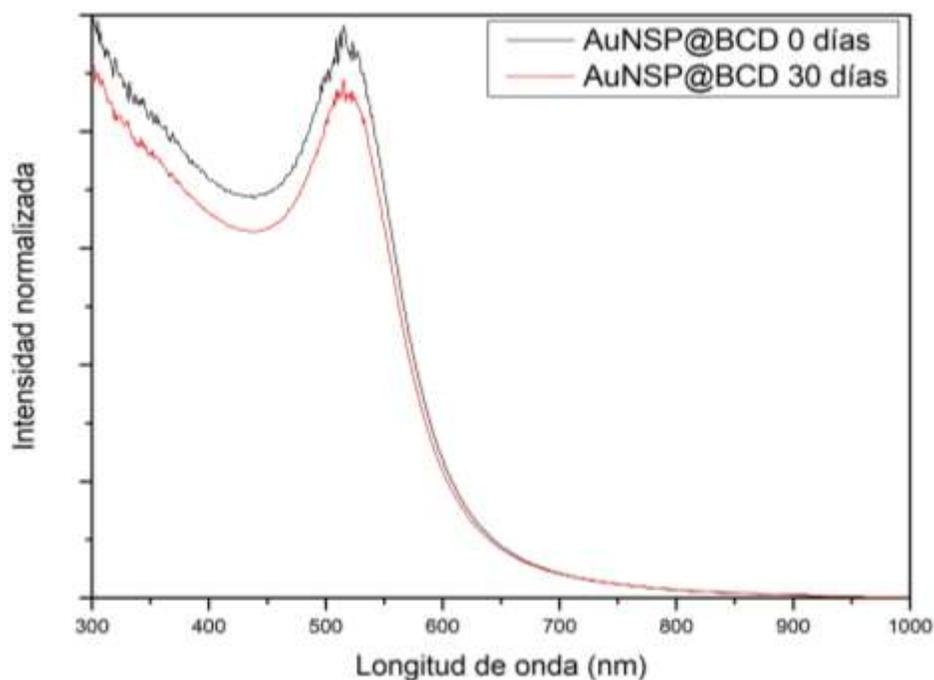


Figura 11. Espectros UV-VIS correspondientes al sistema AuNSP.

En las Figs. 11, 12 y 13 se muestran respectivamente los espectros obtenidos por UV-VIS de los sistemas AuNSP, AuNRD y AuNST así como de los mismos después de 30 días de almacenamiento a 4 °C, además, se incluyen los espectros de los sistemas obtenidos después de su etapa para la funcionalización con BCD. Particularmente, el sistema AuNSP@BCD fue obtenido durante la síntesis misma de estas NPs. Tanto la forma característica de los espectros, la ubicación espectral de su SPR, así como las intensidades relativas de los mismos una vez normalizados, fueron interpretados como la estabilidad en solución acuosa de los sistemas en cuestión.

Las AuNSP presentaron una estabilidad considerable después de 30 días desde su síntesis y al ser almacenadas a 4 °C, estas NPs fueron sintetizadas junto con la BCD como estabilizador y molécula controladora de tamaño por lo que la estabilidad mostrada es atribuida en parte a dicha molécula.

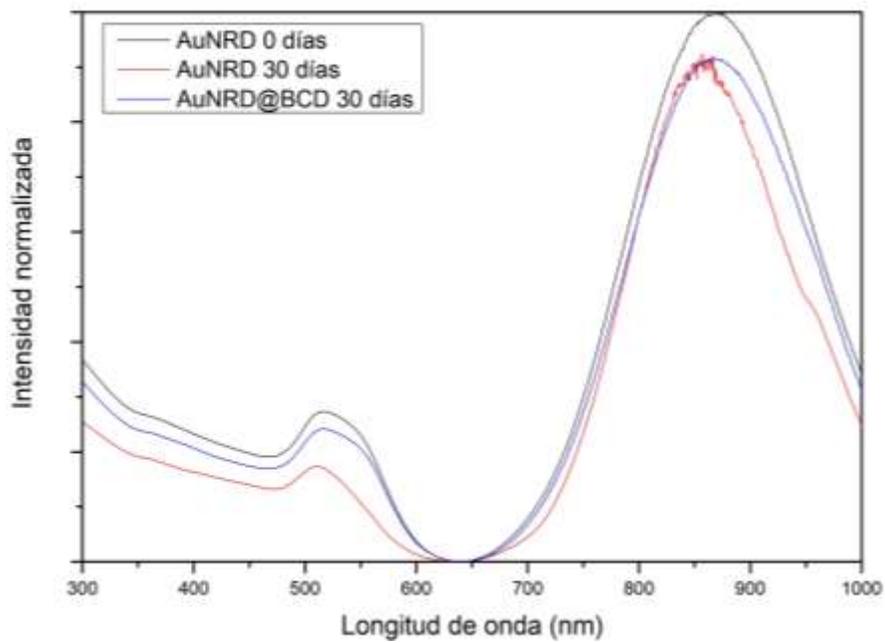


Figura 12. Espectros UV-VIS correspondientes al sistema AuNRD.

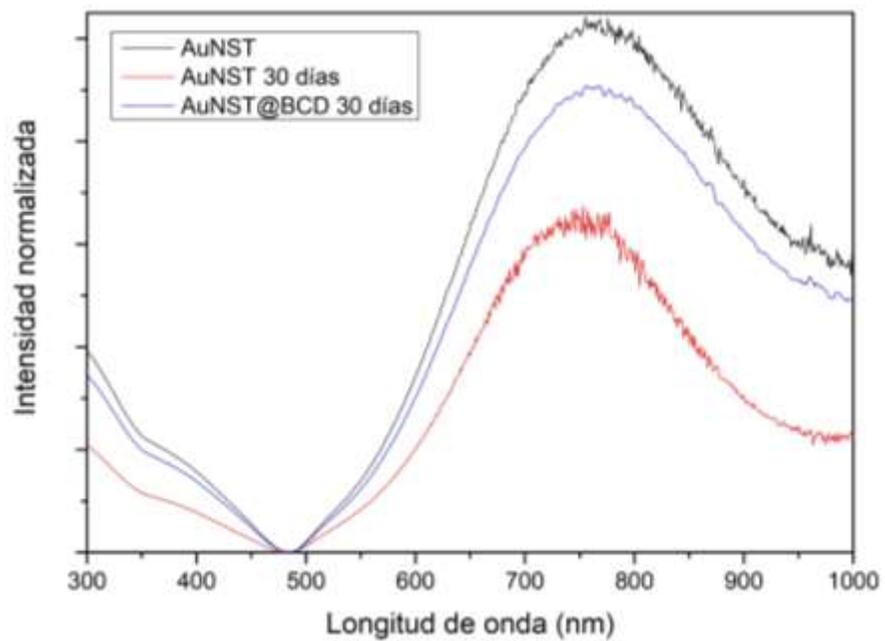


Figura 13. Espectros UV-VIS correspondientes al sistema AuNST.

En el caso de los AuNRD los espectros indicaron una buena estabilidad en solución después del tiempo de almacenaje, tanto con la BCD como sin ella, por lo que no es posible aseverar que la estabilidad sea una función de tal molécula.

Por último el sistema AuNST mostró una clara funcionalidad de estabilidad atribuida a BCD, ya que después del tiempo de almacenaje mencionado el sistema AuNST@BCD es claramente más estable que la muestra que no fue procesada para ser funcionalizada. Lo anterior concuerda con la simple observación directa de las muestras, ya que el sistema AuNST mostraba una tendencia a precipitar y formar pequeños aglomerados visibles directamente sin el uso de algún microscopio.

Las tres AuNPs presentaron el plasmón de resonancia superficial (SPR) característico de cada una de sus morfologías con máximos de absorbancia en 514 nm para AuNSP, en 868 nm para AuNRD y en 765 nm para AuNST.

6.4 Caracterización Elemental y Química

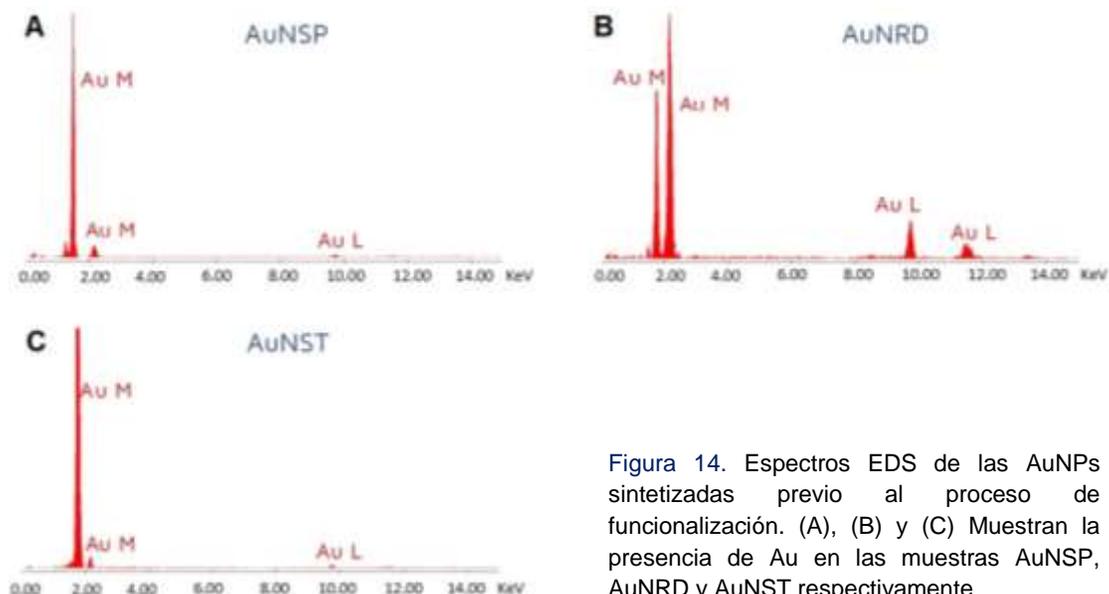


Figura 14. Espectros EDS de las AuNPs sintetizadas previo al proceso de funcionalización. (A), (B) y (C) Muestran la presencia de Au en las muestras AuNSP, AuNRD y AuNST respectivamente

El análisis por EDS de las tres AuNPs sintetizadas (Fig. 14) confirmó que las NPs se encontraban conformadas por Au casi en su totalidad puesto que no se observaron señales de otro tipo de elementos. Los espectros fueron tomados en las regiones señaladas por un recuadro rojo en las Figs. 5A, 6A y 7A que corresponden respectivamente a AuNSP, AuNRD y AuNST. En las Figs. 14A y 14B pueden observarse pequeñas señales alrededor de 0.3, 0.5 y 1.3 KeV correspondientes a C, O y Si, las cuales son justificables ya que en las AuNSP se esperaba la presencia de BCD (por funcionalización *in-situ*) y en el caso de AuNRD se propone corresponden a residuos provenientes de la síntesis (CTAB). La señal del Si proviene del sustrato (oblea de silicio) sobre el cual se depositaron las muestras. Debido a que la obtención de los espectros EDS se realiza sobre regiones muy puntuales de la muestra los resultados son considerados semicuantitativos y permiten corroborar la presencia de Au en las NPs.

Los espectros resultantes del análisis de datos obtenidos por XPS de las AuNPs, una vez implementados los protocolos de funcionalización en los tres sistemas, se pueden observar en las Figs. 15, 16 y 17 las cuales corresponden respectivamente a AuNSP@BCD-PEG-AF, AuNRD@BCD-PEG-AF y AuNST@BCD-PEG-AF.

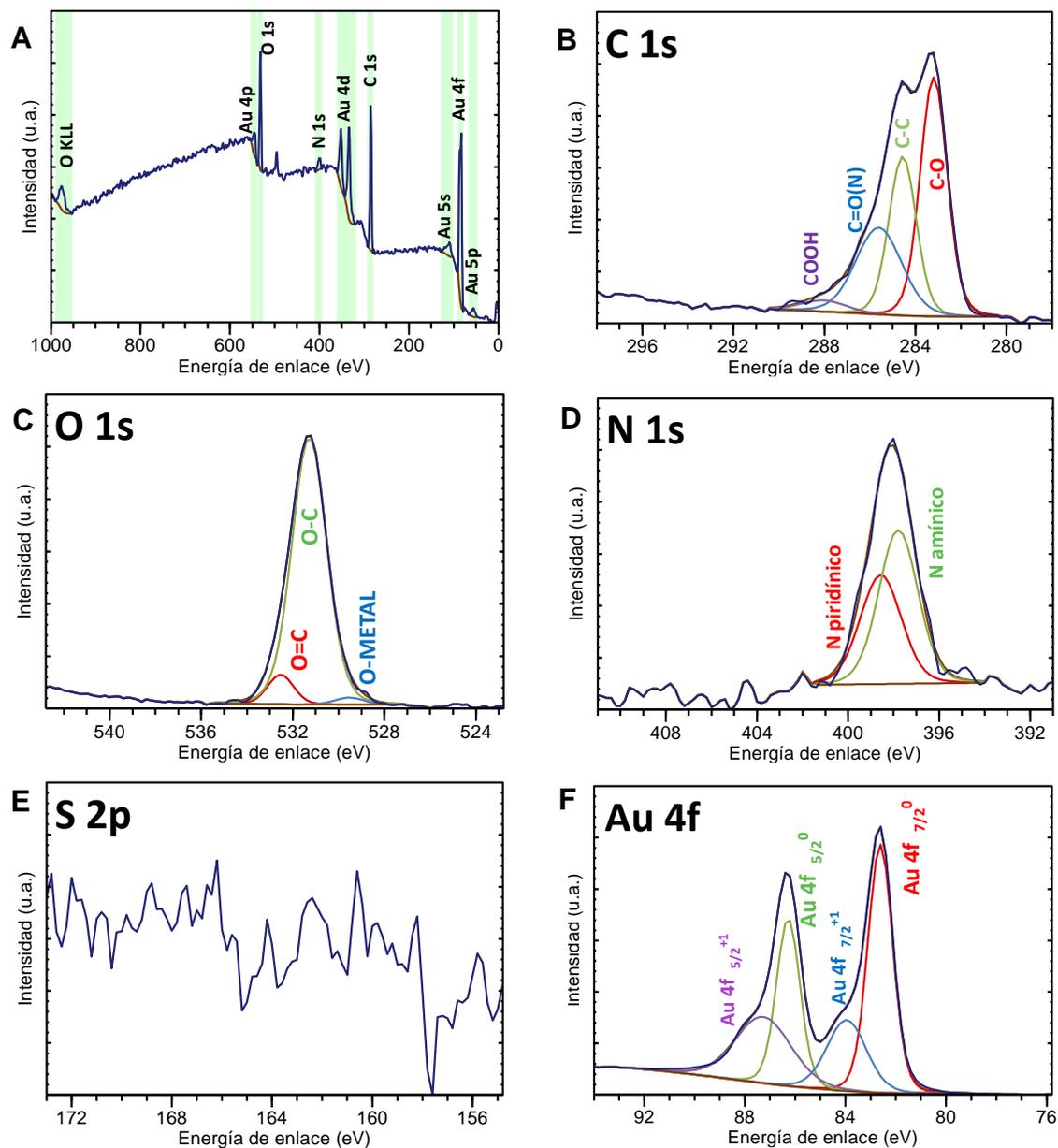


Figura 15. Espectros obtenidos por XPS en AuNSP. (A) Espectro de inspección, (B) – (F) espectros de alta resolución de las regiones C1s, O1s, N1s, S2p y Au4f respectivamente.

En la [Tabla 2](#) se resume la ubicación en su correspondiente energía de enlace (E_e) en electrón-volts (eV) de los picos identificados en los espectros de inspección así como las componentes de los espectros de alta resolución para las regiones C 1s, O 1s, N 1s, S 2p y Au 4f para los tres sistemas en cuestión.

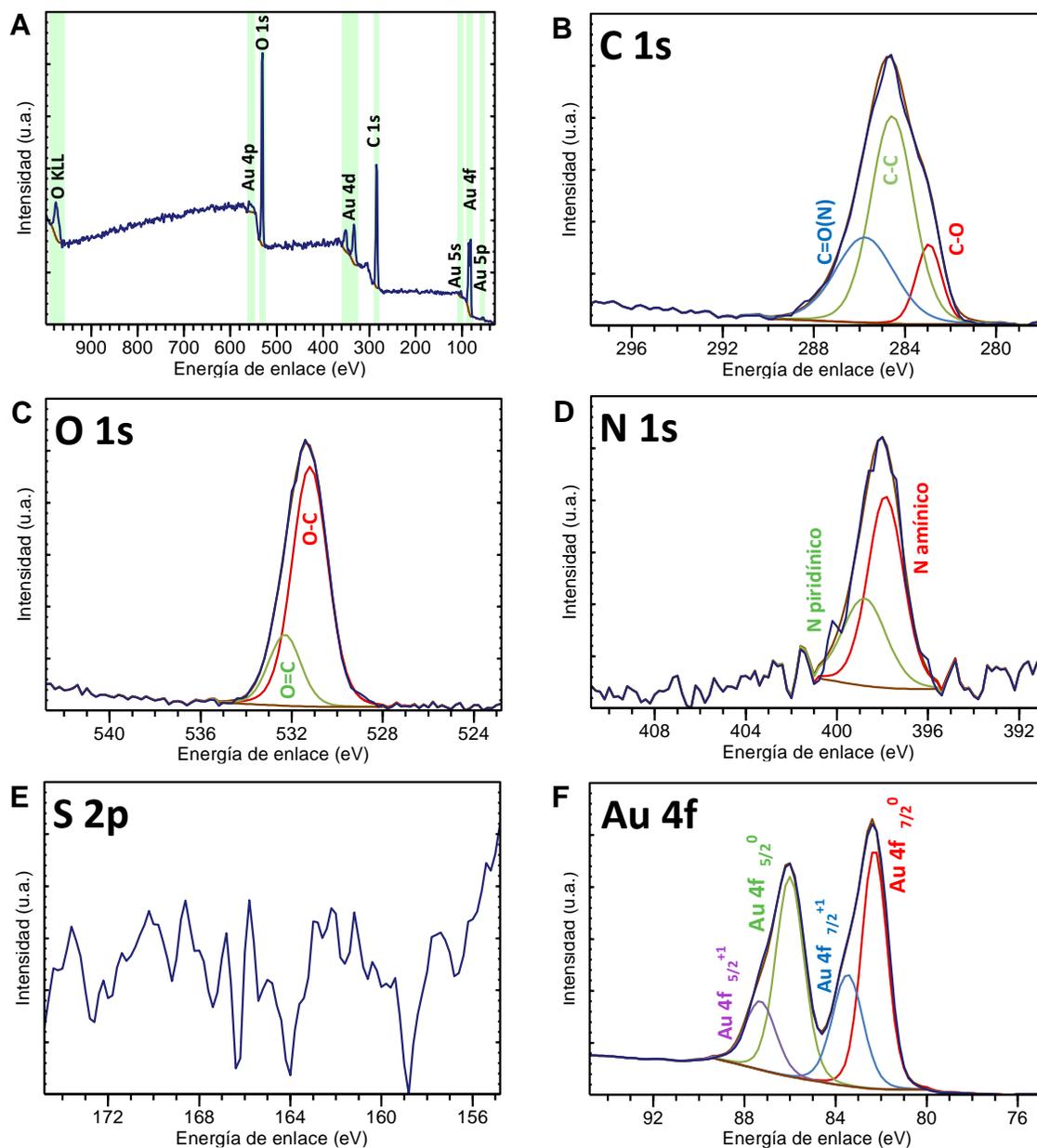


Figura 16. Espectros obtenidos por XPS en AuNRD. (A) Espectro de inspección, (B) – (F) espectros de alta resolución de las regiones C1s, O1s, N1s, S2p y Au4f respectivamente.

El espectro de inspección correspondiente a AuNSP@BCD-PEG-AF (Fig. 15A) presenta un pico alrededor de 495 – 496 eV el cual no pudo ser atribuido a algún elemento correspondiente a la muestra y, por la energía de enlace a la cual se detecta su emisión, correspondería a Ir 3p o Rh 4p, elementos cuya presencia se atribuyó a contaminación por muestras previas analizadas en equipo de XPS siendo el único pico de emisión no identificado adecuadamente.

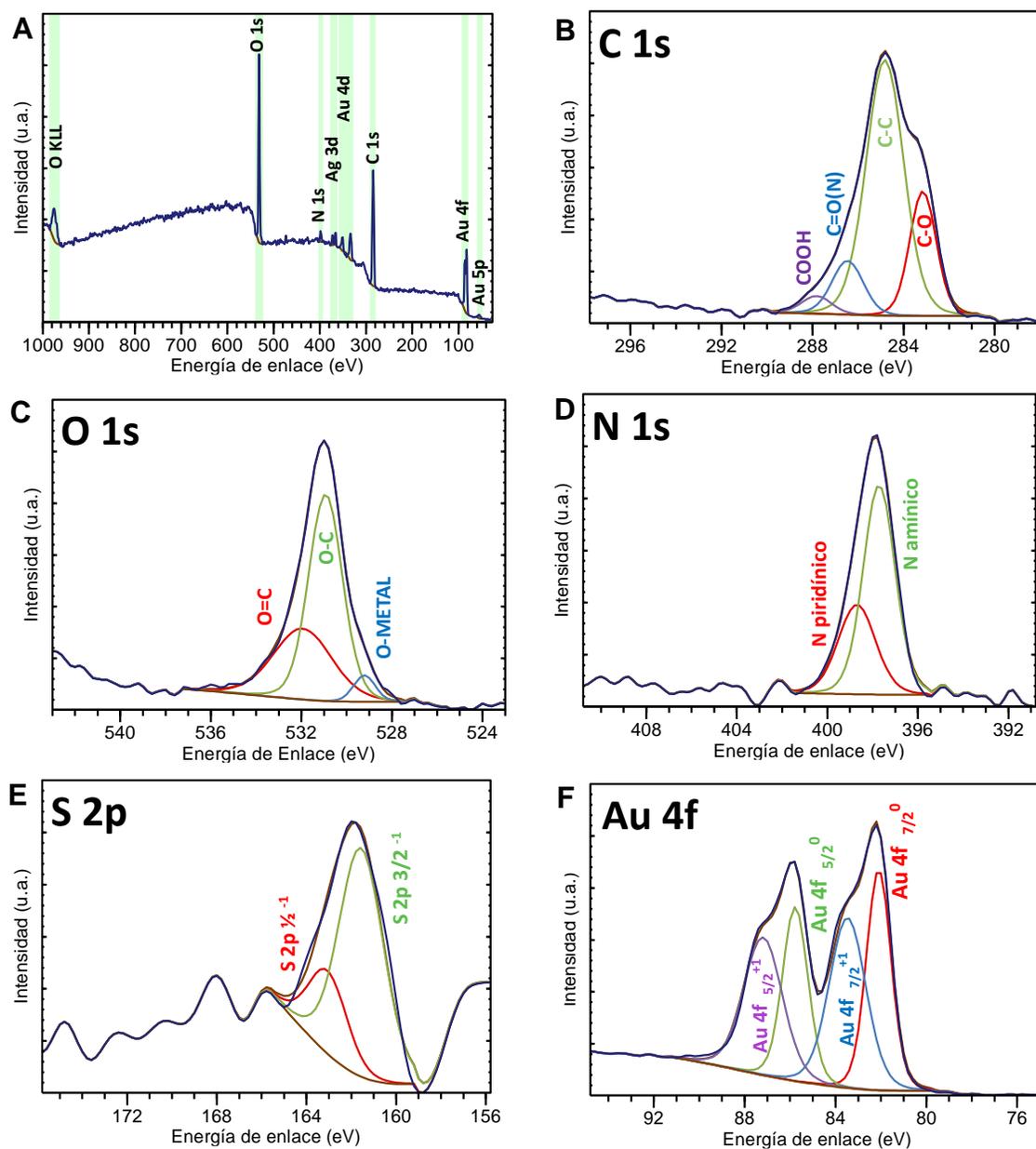


Figura 17. Espectros obtenidos por XPS en AuNST. (A) Espectro de inspección, (B) – (F) espectros de alta resolución de las regiones C1s, O1s, N1s, S2p y Au4f respectivamente.

El sistema AuNSP@BCD-PEG-AF mostró la presencia y el enlace químico con la BCD a las NPs metálicas, el cual se propone se llevó a cabo durante el proceso de síntesis entre los átomos de oro de la superficie de las AuNSP y el grupo hidroxilo primario de las subunidades de glucosa de la BCD (Figs. 15C y 15F). No se observó la presencia del enlace entre el S y el Au, además la componente correspondiente al enlace C – C (Fig. 15B) fue menor de lo que se esperaría al estar presente la cadena polimérica del NH₂-PEG-SH lo

que hubiese indicado su unión covalente a la superficie metálica. Tanto por el espectro de inspección como por el espectro de alta resolución del N 1s (Figs. 15A y 15D), se puede inferir que el nitrógeno está presente en forma de anillos amínicos y piridínicos los cuales corresponden a la presencia de AF en el sistema, sin embargo no corresponde a la funcionalización propuesta ya que la molécula puede estar anclada por interacciones físicas (fisisorción) al sistema base.

Por otro lado, la muestra AuNRD no mostró un enlace covalente entre O y la superficie de Au (Fig. 16C) que demostrara la unión química de la BCD a la nanopartícula, sin embargo la presencia de la componente correspondiente al enlace C – C (Fig. 16B) da indicios de la presencia remanente del CTAB lo cual correlaciona con la observación de una ligera matriz en las imágenes obtenidas por SEM. El doblete Au 4f con estado de oxidación +1 (Fig. 16F) también es indicativo de que es posible que la unión del CTAB a la superficie metálica sea a través de un enlace covalente entre el N cuaternario y el Au. La presencia de nitrógeno en forma amínica y piridínica (Fig. 16D) indican que el AF se encuentra presente y posiblemente adsorbido físicamente al sistema.

Finalmente, el análisis por XPS del sistema AuNST@BCD-PEG-AF mostró en los espectros de alta resolución para el O 1s y Au 4f (Figs. 17C y 17F) las componentes correspondientes al enlace entre el O del grupo hidroxilo primario de las subunidades de glucosa de la BCD y los átomos de oro superficiales de las NPs. La componente del enlace C – O también sustenta la presencia de la BCD en el sistema. El espectro de alta resolución para la región del S (Fig. 17E) presentó el doblete asignado al orbital 2p con estado de oxidación -1 que junto con el doblete del orbital 4f del Au (Fig. 17F) con estado de oxidación +1 indican el posible enlace químico entre éstos dos elementos y el correspondiente anclaje directo entre el NH₂-PEG-SH a la superficie metálica. Se infiere la presencia del AF en el sistema con base en la presencia de las componentes de la región N 1s (Fig. 17D) sin embargo no se puede concluir con éstos resultados la ubicación (estructuralmente hablando) del AF en el sistema.

Para complementar los resultados del análisis XPS se realizó el estudio por FTIR de los sistemas en cuestión y en cada etapa correspondiente de funcionalización (Figs. 18, 19 y 20). Los espectros FTIR de la BCD, NH₂-PEG-SH y AF se incluyeron en cada

Tabla 2. Picos de emisión XPS identificados en los espectros de inspección así como las componentes (Comp.) de los espectros de alta resolución en los sistemas AuNSP@BCD-PEG-AF, AuNRD@BCD-PEG-AF y AuNST@BCD-PEG-AF. Se muestran las regiones C 1s, O 1s, N 1s, S 2p y Au 4f con su correspondiente energía de enlace (Ee) asignada en electrón-volts (eV).

Región de análisis / picos o componentes identificados													
Espectro de inspección	C 1s			O 1s			N 1s			S 2p		Au 4f	
	Pico de emisión	Ee (eV)	Comp.	Ee (eV)	Comp.	Ee (eV)	Comp.	Ee (eV)	Comp.	Ee (eV)	Comp.	Ee (eV)	
AuNSP@BCD-PEG-AF	Au 5p	54	C-O	282.9	O-Metal	529.1	N aminico	397.8				Au 4f 7/2 ⁰	82.7
	Au 4f	83	C-C	284.6	O-C	530.8	N piridinico	398.4				Au 4f 7/2 ⁺¹	84.0
	Au 5s	108	C=O	285.7	O=C	532.0						Au 4f 5/2 ⁰	86.2
	C 1s	284	COOH	288.1								Au 4f 5/2 ⁺¹	87.3
	Au 4d	334											
	N 1s	399											
	O 1s	532											
	Au 4p	546											
	O KLL	983											
AuNRD@BCD-PEG-AF	Au 5p	54	C-O	282.9	O-C	531.1	N aminico	397.8				Au 4f 7/2 ⁰	82.2
	Au 4f	83	C-C	284.4	O=C	532.3	N piridinico	398.8				Au 4f 7/2 ⁺¹	83.4
	Au 5s	108	C=O	285.9								Au 4f 5/2 ⁰	85.9
	C 1s	284										Au 4f 5/2 ⁺¹	87.3
	Au 4d	334											
	O 1s	532											
	Au 4p	546											
	O KLL	983											
AuNST@BCD-PEG-AF	Au 5p	54	C-O	283.1	O-Metal	529.5	N aminico	397.7	S 2p 3/2 ⁻¹	161.5		Au 4f 7/2 ⁰	82.7
	Au 4f	83	C-C	284.8	O-C	531.1	N piridinico	398.6	S 2p 1/2 ⁻¹	163.1		Au 4f 7/2 ⁺¹	84.0
	C 1s	284	C=O	286.4	O=C	532.5						Au 4f 5/2 ⁰	86.2
	Au 4d	334	COOH	287.9								Au 4f 5/2 ⁺¹	87.3
	Ag 3d	367											
	N 1s	399											
	O 1s	532											
	O KLL	983											

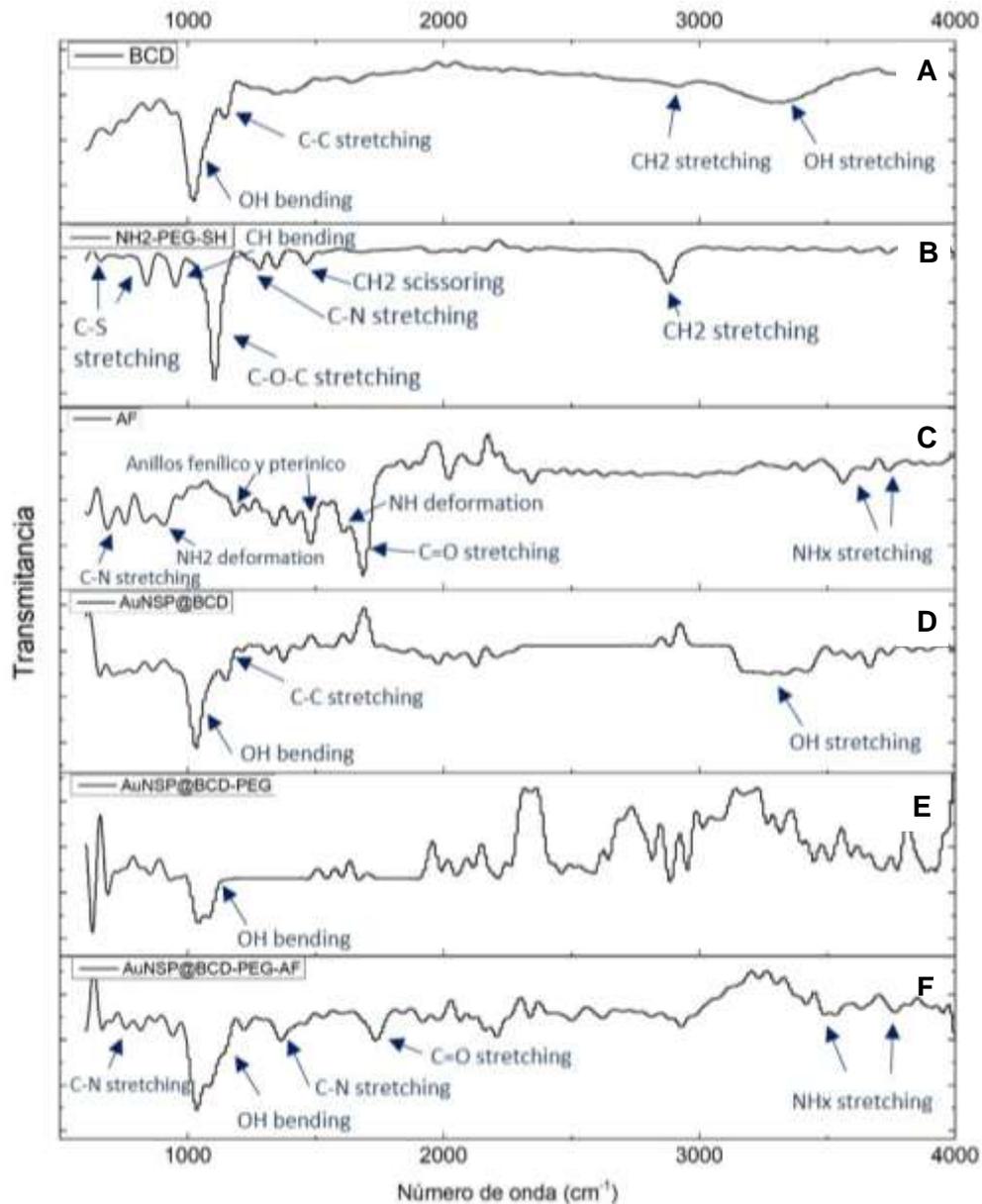


Figura 18. Espectros por FTIR correspondientes al sistema AuNSP@BCD-PEG-AF con sus respectivos picos característicos. (A) BCD, (B) NH₂-PEG-SH, (C) AF. (D) – (F) AuNSP en sus distintas etapas de funcionalización.

figura correspondiente para poder comparar los picos correspondientes a las vibraciones de los grupos funcionales característicos de cada uno de ellos.

De acuerdo al análisis por FTIR, tanto la BCD (Fig. 18D) como el AF (Fig. 18E) se encuentran presentes en el sistema basado en AuNSP al mostrar sus grupos funcionales

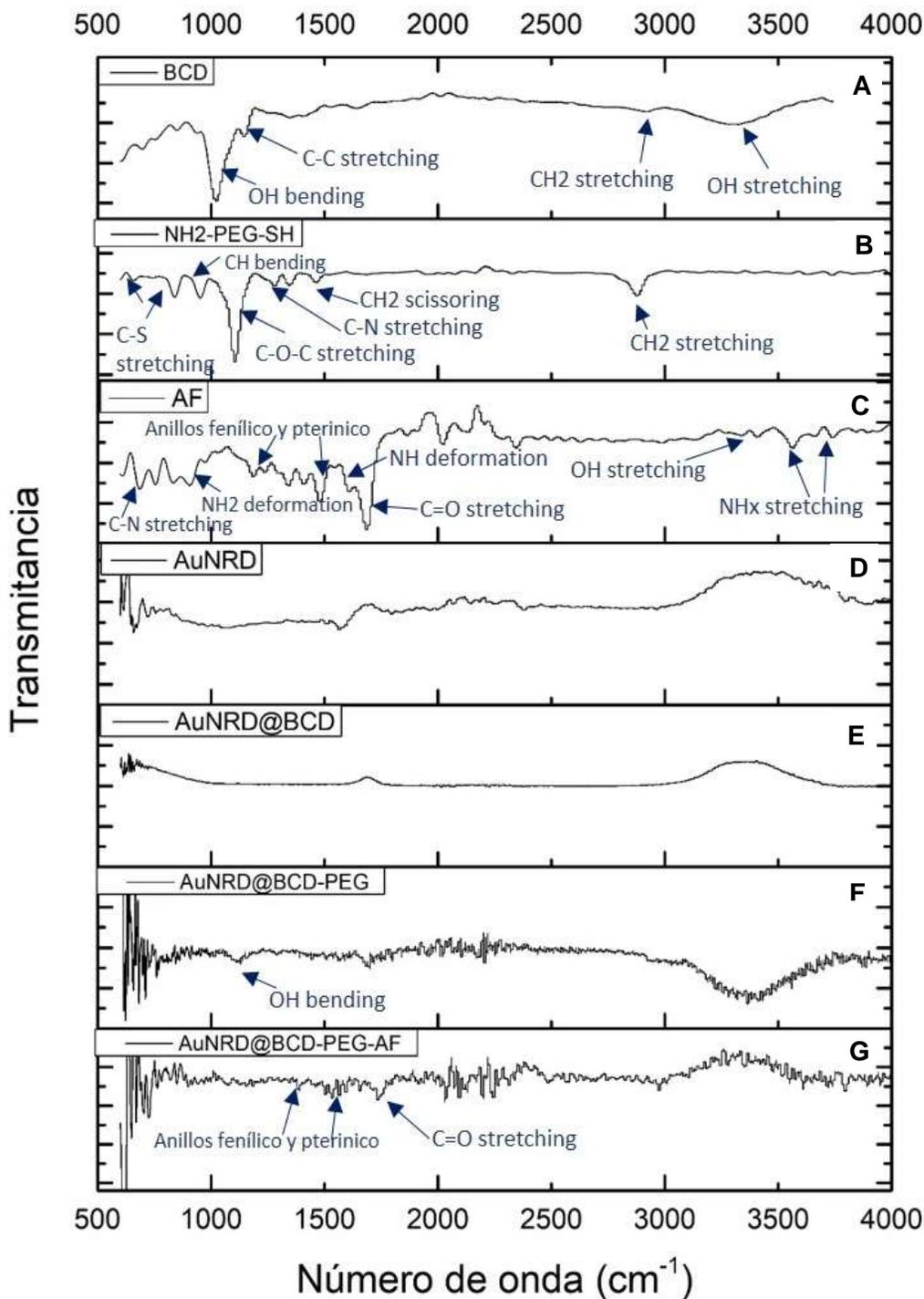


Figura 19. Espectros por FTIR correspondientes al sistema AuNRD@BCD-PEG-AF con sus respectivos picos característicos. (A) BCD, (B) NH₂-PEG-SH, (C) AF. (D) – (G) AuNRD en sus distintas etapas de funcionalización.

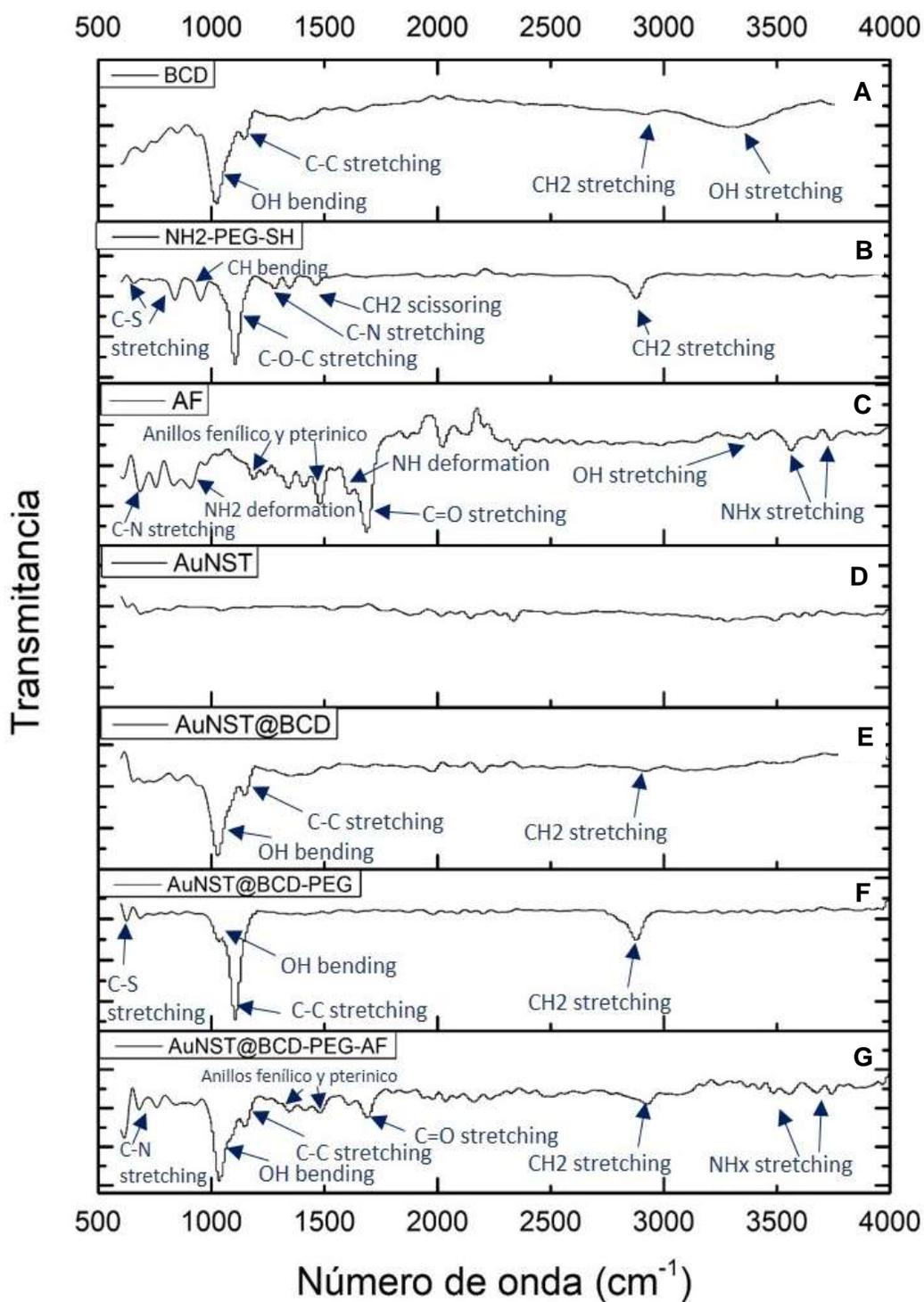


Figura 20. Espectros por FTIR correspondientes al sistema AuNST@BCD-PEG-AF con sus respectivos picos característicos. (A) BCD, (B) NH₂-PEG-SH, (C) AF. (D) – (G) AuNRD en sus distintas etapas de funcionalización.

característicos después de cada etapa de funcionalización con sus respectivos procesos de lavado, sin embargo el NH₂-PEG-SH no mostró evidencias de haber sido anclado al sistema con éxito (Fig. 18E). De manera similar el sistema AuNRD mostró la presencia del AF (Fig. 19G) más no así de la BCD (Fig. 19E) ni del NH₂-PEG-SH (Fig. 19F) de acuerdo a los grupos químicos identificados por FTIR. Finalmente, los espectros correspondientes al sistema basado en AuNST presentaron los grupos funcionales característicos de cada compuesto empleado para su funcionalización, BCD (Fig. 20E), NH₂-PEG-SH (Fig. 20F) y AF (Fig. 20G).

Correlacionando los resultados obtenidos por XPS y FTIR se puede deducir que los sistemas basados en AuNSP y AuNRD no fueron satisfactoriamente funcionalizados o, al menos no de la manera propuesta y esperada. Específicamente para la AuNSP los resultados indican que la BCD recubre a las NPs y además el AF se encuentra presente y ligado al sistema, sin embargo se propone que el NH₂-PEG-SH no pudo anclarse a la superficie de Au debido a la alta concentración de BCD presente. Para el caso particular del sistema AuNRD la posible presencia remanente de un surfactante catiónico fuerte como el CTAB impidió el anclaje por enlace covalente de la BCD y el NH₂-PEG-SH a la superficie metálica ya que tiende a envolver a los AuNRD mediante la formación de una especie de micela.

El sistema AuNST@BCD-PEG-AF mostró evidencias de una exitosa funcionalización de acuerdo al diseño y propuesta, por ello fue el sistema seleccionado para realizar las pruebas celulares *in-vitro* comparando el desempeño con el sistema no funcionalizado (AuNST) en NSCs y CSCs prostáticas humanas, resultados que se discuten en el apartado siguiente.

6.5 Evaluación de Citotoxicidad *in-vitro*

6.5.1 Ensayo de LDH

Con el ensayo de LDH se evaluó la integridad de la membrana plasmática celular al exponer a las NSCs y las CSCs a los sistemas de AuNPs seleccionados (AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF) en concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (en μg de Au) durante 24 hrs (Fig. 21).

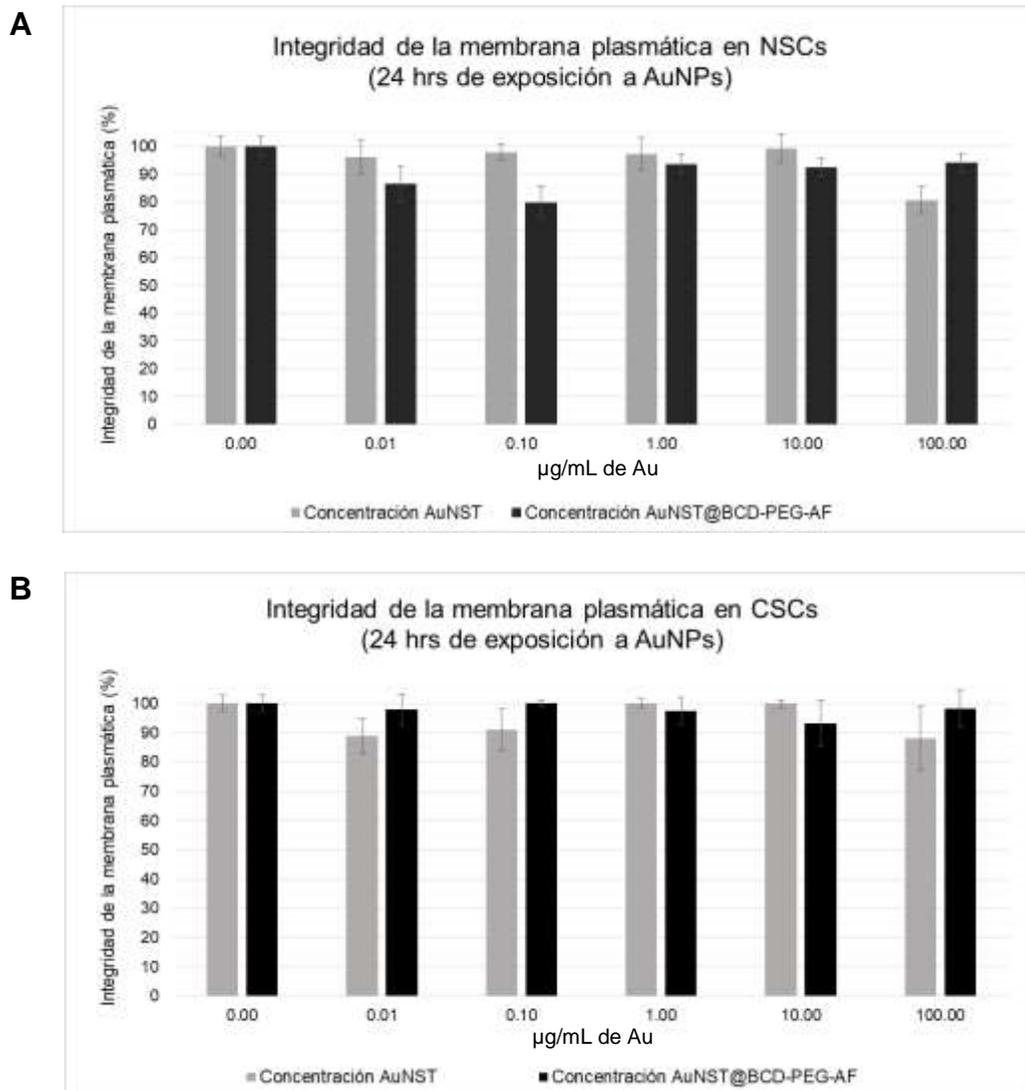


Figura 21. Integridad de la membrana plasmática evaluada por el ensayo de LDH en un modelo *in-vitro* de cáncer de próstata tras exposición por 24 hrs a AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF. (A) NSCs y (B) CSCs.

Las NSCs (Fig. 21A) mantienen la integridad de la membrana plasmática por encima del 90% después de la exposición durante 24 hrs a las AuNST en las concentraciones experimentalmente evaluadas excepto en la concentración mayor analizada (100 µg/mL de Au), donde la viabilidad celular se redujo al 80.7%, mientras que la exposición a las AuNST@BCD-PEG-AF generó una mayor variabilidad en la integridad de la membrana sin una tendencia clara que correlacione con las concentraciones evaluadas; El mayor daño a la membrana plasmática para éste sistema se dio al exponer las células a una concentración de 0.1 µg/mL de Au con un 79.8% mientras que el resto de concentraciones no redujeron la viabilidad más allá del 86.5%.

Por otra parte, las CSCs (Fig. 21B) mantuvieron la integridad de su membrana plasmática arriba del 88% en todas las concentraciones de AuNST evaluadas mientras que al ser expuestas al sistema AuNST@BCD-PEG-AF la membrana plasmática no redujo su integridad por debajo del 93% en ningún caso, es decir, las CSCs indican mantener mayor estabilidad membranal ante los sistemas analizados.

El análisis estadístico de análisis de varianza con una probabilidad $p < 0.05$ indicó que las variaciones en la integridad de la membrana plasmática se deben a la exposición a las AuNPs en las concentraciones empleadas respecto al control (0.0 µg/mL de Au).

6.5.2 Ensayo de MTS

El efecto de las AuNPs sobre la actividad metabólica de las NSCs y de las CSCs fue evaluado mediante el ensayo de MTS (Fig. 22) bajo las mismas condiciones experimentales de exposición de las células a los sistemas AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF que fue descrito para el ensayo de LDH, a fin de lograr una comparabilidad y correlación de resultados.

Los resultados indicaron que las NSCs presentan un incremento (en relación al control positivo: células no expuestas a las AuNPs) en su metabolismo celular tras la exposición por a los sistemas evaluados hasta concentraciones del orden de 10 µg/mL de Au, sin embargo al ser expuestas a una concentración de 100 µg/mL de Au la actividad metabólica disminuye drásticamente hasta niveles inferiores a los observados en células

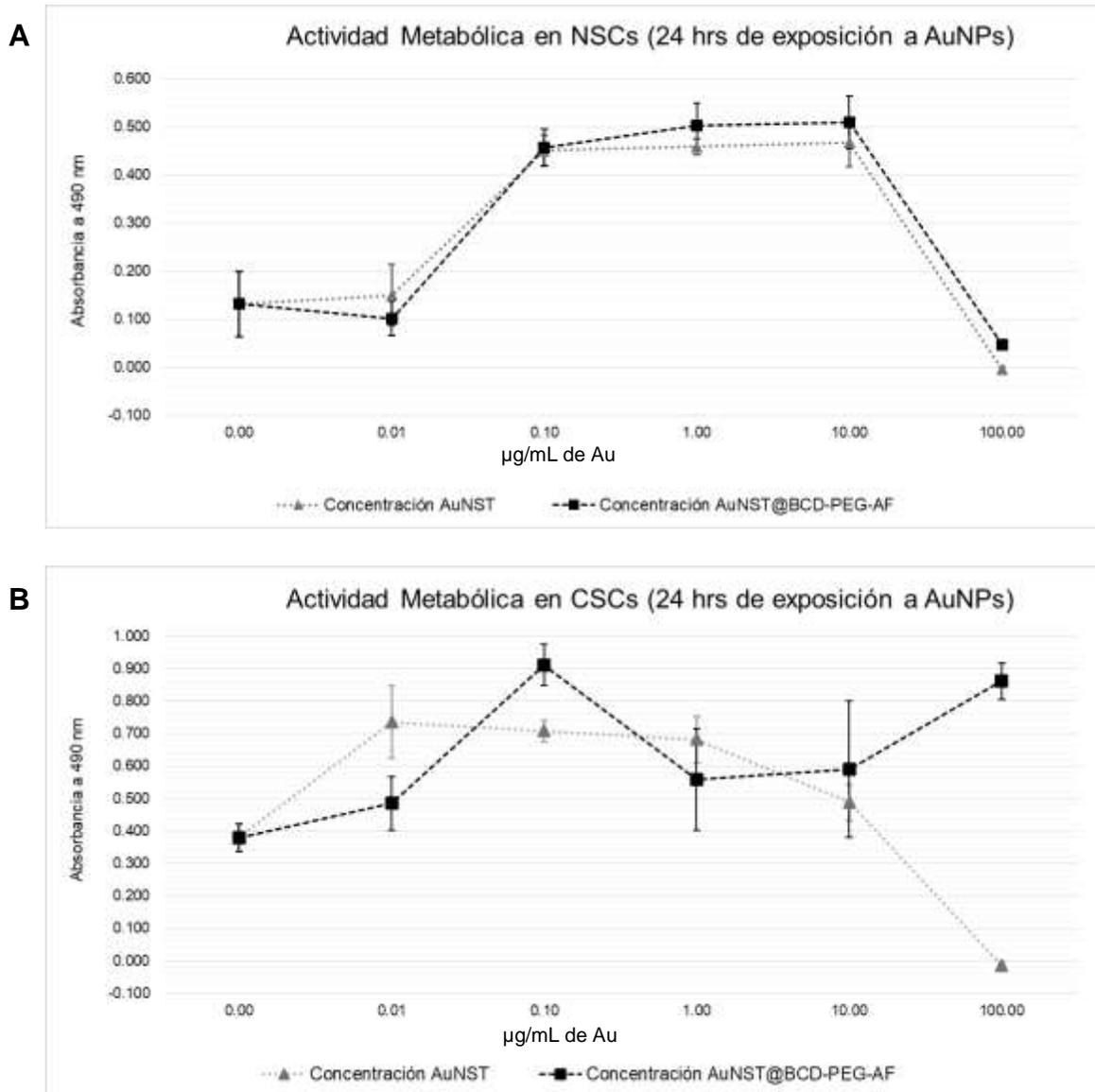


Figura 22. Alteración del metabolismo celular en un modelo *in-vitro* de cáncer de próstata tras exposición por 24 hrs a AuNST y AuNST@BCD-PEG-AF. (A) NSCs y (B) CSCs cuya actividad metabólica fue evaluada por el ensayo de MTS.

no expuestas a AuNPs (Fig. 22A), tendencia muy similar en respuesta tanto a AuNST como a AuNST@BCD-PEG-AF.

Por otro lado, las CSCs al ser expuestas a las AuNPs también muestran un incremento relativo en actividad metabólica hasta una concentración de 1 µg/mL de Au para ambos sistemas evaluados. Al ser expuestas a concentraciones mayores de AuNST su

Tabla 3. AuNST@BCD-PEG-AF ligadas a la membrana plasmática e internalizadas en NSCs y CSCs analizado por ICP-OES.

	NSCs		CSCs	
Concentración nominal de Au de exposición ($\mu\text{g/mL}$)	100.00	1.00	100	1.00
Concentración de Au reportada en sobrenadante ($\mu\text{g/mL}$)	89.19	0.76	23.79	0.43
Concentración de Au internalizada (%)	10.81	23.82	76.21	57.41

metabolismo comienza a mostrar una tendencia a reducirse hasta niveles inferiores al control positivo, sin embargo ante una alta concentración de AuNST@BCD-PEG-AF (100 $\mu\text{g/mL}$ de Au) las células continúan con la tendencia de incremento de actividad metabólica (Fig. 22B).

Los resultados sugieren que tras la exposición a los sistemas de AuNPs a concentraciones bajas y medias tanto las NSCs como las CSCs muestran sobre-activación metabólica, mientras que a altas concentraciones, disminuyen drásticamente su metabolismo. Sin embargo, al parecer la células madre cancerosas incluso a altas concentraciones (100 $\mu\text{g/mL}$) de AuNST@BCD-PEG-AF, son resistentes a la muerte celular inducida por las NPs, incrementando su actividad metabólica.

Al igual que en el ensayo de LDH, el análisis estadístico de análisis de varianza con una probabilidad $p < 0.05$ indicó que las alteraciones en el metabolismo celular se deben a la exposición a las AuNPs en las concentraciones empleadas.

Finalmente, los resultados del análisis de ICP-OES de los sobrenadantes de los cultivos celulares expuestos al sistema AuNST@BCD-PEG-AF sugieren que existe mayor asociación de estas NPs a las CSCs en comparación con las NSCs ya que los datos muestran una menor concentración de Au en el sobrenadante de éstas células tras su exposición a las NPs. Estos resultados sugieren que los sistemas en cuestión tienen afinidad para ser ligados a la membrana plasmática y/o internalizados preferentemente en células cancerosas, propiedad que se atribuye a la funcionalización AF como molécula encargada del direccionamiento activo y específico a éste tipo de células (la Tabla 3 resume los resultados del análisis).

7. Conclusiones y Perspectivas

Se diseñaron las AuNPs con las morfologías y tamaños promedio propuestos: nanopartículas de oro esféricas (AuNSP) de 6.53 nm, nanorodillos de oro (AuNRD) de 37.39 nm de sección longitudinal con 8.23 nm de sección transversal y nanopartículas de oro multiramificadas o en forma de estrella (AuNST) de 69.41 nm.

Se caracterizó la morfología mediante SEM y TEM, el tamaño por análisis de imágenes obtenidas por TEM, la composición elemental y química mediante EDS, XPS y FTIR de las AuNPs sintetizadas.

A través de estos análisis se estableció que solamente el sistema AuNST (AuNST@BCD-PEG-AF) fue exitosamente funcionalizado BCD, NH₂-PEG-SH y AF, por ello fue seleccionado para continuar con los estudios para evaluar su potencial citotóxico en un modelo celular *in-vitro* de cáncer de próstata. El análisis químico y elemental fue considerado cualitativo/semicuantitativo ya que para obtener datos numéricos confiables se propone emplear técnicas como nano-HPLC acoplado a espectrometría de masas que permitan cuantificar exactamente la cantidad conjugada mediante el uso de estándares y una curva de calibración de cada compuesto empleado en la funcionalización.

Se corroboró que la BCD desempeña la función de molécula estabilizadora en solución acuosa al mantener la intensidad y forma del espectro UV-VIS de los sistemas AuNSP y AuNST, mientras que en el caso de los AuNRD la estabilidad se le atribuyó al CTAB remanente.

Tanto el sistema funcionalizado (AuNST@BCD-PEG-AF), así como el sistema sin funcionalizar (AuNST) no afectaron significativamente la integridad de la membrana plasmática de las NSCs ni de las CSCs al exponerlas a concentraciones de los sistemas que se ubicaban en un intervalo desde 0.01 hasta 100 µg/mL de Au (en ningún caso inferior al 79.8%). Tales resultados son relevantes ya que una de las características deseables más importantes de este tipo de sistemas es que no induzcan toxicidad por daño en la membrana plasmática de células normales o sanas. Para complementar y reforzar estas observaciones se cree necesario implementar pruebas que incluyan concentraciones al menos un orden

de magnitud mayor a la más alta empleada además de tiempos de exposición superiores a 24 hrs.

El ensayo de reducción del MTS indicó que ambos sistemas evaluados promueven un incremento en el metabolismo celular, efecto que debe ser estudiado para obtener información específica acerca de los mecanismos que lo generan y de las vías celulares y moleculares de señalización involucradas o bien, evaluar el metabolismo celular a tiempos mayores para determinar si se trata de una respuesta celular aguda con posterior estabilización.

Por otro lado, los resultados de la determinación de Au mediante ICP-OES en las muestras de sobrenadantes y lavados, sugieren que el sistema funcionalizado AuNST@BCD-PEG-AF presenta mayor afinidad por las CSCs (por anclaje a la membrana plasmática o por internalización) en comparación de las NSCs. Estas observaciones, a su vez nos permiten sugerir que el AF es un ligando con potencial uso como molécula de direccionamiento activo contra células neoplásicas.

Se propone para trabajos futuros que las AuNPs sintetizadas se analicen bajo concentraciones y metodologías de funcionalización distintas a las aquí descritas así como la implementación de otros recubrimientos o compuestos de funcionalización para su posterior evaluación toxicológica, mediante una serie ampliada de pruebas que incluyan, entre otras, pruebas de hemólisis, de generación de especies reactivas de oxígeno y pruebas de genotoxicidad de acuerdo a la normatividad disponible al momento (ISO 10993-2009).

Finalmente, se propone evaluar si los sistemas diseñados presentan la capacidad de hospedar (dentro de la BCD) y liberar un fármaco antineoplásico como por ejemplo doxorubicina o paclitaxel (Heo et al., 2012; Nyoung et al., 2012) en respuesta a un estímulo externo como lo es la radiación electromagnética de una longitud de onda cercana a la ubicación espectral del SPR (que corresponde al máximo de absorbancia en la región UV-Vis), a la cual las nanopartículas de oro son sensibles y capaces de transformar en energía térmica, lo anterior para determinar que en efecto, las células cancerosas sufren un daño significativo y se induce de ésta forma su muerte celular, mientras que las células sanas

resultan sin afectaciones graves que comprometan permanentemente su viabilidad y funciones normales.

Actualmente existen reportes en la literatura donde sistemas basados en nanoestrellas de oro funcionalizadas con aptámeros son evaluados en modelos *in-vitro* de cáncer de próstata siendo irradiados para generar lisis celular mediante terapia foto-térmica (Hunho, Hyungjun, Seonghwan, & Changill, 2016), así mismo sistemas de AuNPs han sido empleados en Dispersión Raman de Superficie Mejorada (SERS, por sus siglas en inglés) para imagenología de distintos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer prostático (Harmsen et al., 2015; Vendrell, Maiti, Dhaliwal, & Chang, 2013), sin embargo como se ha descrito en los capítulos anteriores, en el presente trabajo la funcionalización de las AuNPs va encaminada a obtener potenciales sistemas bifuncionales que actúen como DDSs además de efectores de ablación foto-térmica en la terapia contra el cáncer.

8. Referencias

- Abbasi, E., Milani, M., Fekri Aval, S., Kouhi, M., Akbarzadeh, A., Tayefi Nasrabadi, H., ... Samiei, M. (2014). Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical Reviews in Microbiology*, 7828(December), 1–8. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200>
- Abidi, W., Selvakannan, P. R., Guillet, Y., Lampre, I., Beaunier, P., Pansu, B., ... Remita, H. (2010). One-pot radiolytic synthesis of gold nanorods and their optical properties. *Journal of Physical Chemistry C*. <https://doi.org/10.1021/jp104819c>
- Ahmed, S., Esfandyari, T., & Farassati, F. (2018). Cancer stem cells , the ultimate targets in cancer therapy. *OncoTargets and Therapy*, 11, 183–184.
- Alvarez-Berríos, M. P., & Vivero-Escoto, J. L. (2016). In vitro evaluation of folic acid-conjugated redox-responsive mesoporous silica nanoparticles for the delivery of cisplatin. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 6251–6265. <https://doi.org/10.2147/IJN.S118196>
- Bao, G., Mitragotri, S., & Tong, S. (2013). Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 15(1), 253–282. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071812-152409>
- Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., & Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research*, 33(10), 2373–2387. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>
- Bodelón, G., Costas, C., Pérez-Juste, J., Pastoriza-Santos, I., & Liz-Marzán, L. M. (2017). Gold nanoparticles for regulation of cell function and behavior. *Nano Today*, 13, 40–60. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.12.014>
- Brandenburg, K. S., Hashemian, R., & Mansoori, G. A. (2011). Folate-Conjugated Gold Nanoparticles for Cancer Nanotechnology Applications Folate-Receptor Endocytosis. *Pulse*, 3(Mc 063), 404–407.
- Brazhnik, K., Sokolova, Z., Baryshnikova, M., Bilan, R., Efimov, A., Nabiev, I., & Sukhanova, A. (2015). Quantum dot-based lab-on-a-bead system for multiplexed detection of free and total prostate-specific antigens in clinical human serum samples. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(5), 1065–1075. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.03.003>

- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>
- Cáncer, Datos y cifras. (2018, February). Retrieved June 28, 2018, from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Cao, Z., Peng, F., Hu, Z., Chu, B., Zhong, Y., Su, Y., ... Zuilhof, H. (2017). In vitro cellular behaviors and toxicity assays of small-sized fluorescent silicon nanoparticles. *Nanoscale*, 9(22), 7602–7611. <https://doi.org/10.1039/C7NR00530J>
- Castillo, J., Bertel, L., Páez-Mozo, E., & Martínez, F. (2013). Photochemical Synthesis of the Bioconjugate Folic Acid-Gold Nanoparticles. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 3, 18. <https://doi.org/10.5772/57144>
- Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., & Khar, R. K. (2005). Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech*, 6(2), E329–E357. <https://doi.org/10.1208/pt060243>
- Chávez Alejandro. (2018). Sinanotox, Sistema Nacional de Evaluación Nanotoxicológica. Retrieved June 29, 2018, from <https://www.mypress.mx/tecnologia/sinanotox-nanotecnologia-con-responsabilidad-2399>
- Chen, K., Huang, Y., & Chen, J. (2013). Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), 732–740. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.27>
- Dawidczyk, C. M., Russell, L. M., & Searson, P. C. (2014). Nanomedicines for cancer therapy: state-of-the-art and limitations to pre-clinical studies that hinder future developments. *Frontiers in Chemistry*, 2(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00069>
- del Pozo, M., Casero, E., & Quintana, C. (2017). Visual and spectrophotometric determination of cadaverine based on the use of gold nanoparticles capped with cucurbiturils or cyclodextrins. *Microchimica Acta*, 184(7), 2107–2114. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2226-z>
- Doane, T. L., & Burda, C. (2012). The unique role of nanoparticles in nanomedicine: Imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2885–2911. <https://doi.org/10.1039/c2cs15260f>
- Duncan, R., & Gaspar, R. (2011). Nanomedicine (s) under the Microscope. *Molecular Pharmaceutics*, 8(6), 2101–2141. <https://doi.org/10.1021/mp200394t>
- Erathodiyil, N., & Ying, J. Y. (2011). Functionalization of inorganic nanoparticles for bioimaging applications. *Accounts of Chemical Research*, 44(10), 925–935.

- <https://doi.org/10.1021/ar2000327>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Freitas, R. A. (2005). What is nanomedicine? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1(1), 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2004.11.003>
- Gou, L., & Murphy, C. J. (2005). Fine-tuning the shape of gold nanorods. *Chemistry of Materials*, 17(14), 3668–3672. <https://doi.org/10.1021/cm050525w>
- Harmsen, S., Huang, R., Wall, M. A., Karabeber, H., Samii, J. M., Spaliviero, M., ... Kircher, M. F. (2015). Surface-enhanced resonance Raman scattering nanostars for high-precision cancer imaging. *Science Translational Medicine*, 7(271), 271ra7-271ra7. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010633>
- Heo, D. N., Yang, D. H., Moon, H. J., Lee, J. B., Bae, M. S., Lee, S. C., ... Kwon, I. K. (2012). Gold nanoparticles surface-functionalized with paclitaxel drug and biotin receptor as theranostic agents for cancer therapy. *Biomaterials*, 33(3), 856–866. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.064>
- Horikoshi, S., & Serpone, N. (2013). Introduction to Nanoparticles. *Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications*, 1–24. <https://doi.org/10.1002/9783527648122.ch1>
- Huang, T., Meng, F., & Qi, L. (2009). Facile Synthesis and One-Dimensional Assembly of Cyclodextrin-Capped Gold Nanoparticles and Their Applications in Catalysis and Surface-Enhanced Raman Scattering. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(31), 13636–13642. <https://doi.org/10.1021/jp903405y>
- Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2008). Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science*, 23(3), 217–228. <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0470-x>
- Hunho, J., Hyungjun, Y., Seonghwan, L., & Changill, B. (2016). Ultra-Effective Photothermal Therapy for Prostate Cancer cells using Dual Aptamer-Modified Gold Nanostars. *Journal of Materials Chemistry B Journal*. <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>
- Jain, S., Hirst, D. G., & O'Sullivan, J. M. (2012). Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *The British Journal of Radiology*, 85(1010), 101–113. <https://doi.org/10.1259/bjr/59448833>

- Kereselidze, Z., Romero, V. H., Peralta, X. G., & Santamaria, F. (2012). Gold Nanostar Synthesis with a Silver Seed Mediated Growth Method. *Journal of Visualized Experiments*, (59), 2–6. <https://doi.org/10.3791/3570>
- Khosravian, P., Ardestani, M. S., Khoobi, M., Ostad, S. N., Dorkoosh, F. A., Javar, H. A., & Amanlou, M. (2016). Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid/methionine for active targeted delivery of docetaxel. *OncoTargets and Therapy*, 9, 7315–7330. <https://doi.org/10.2147/OTT.S113815>
- Kim E. Sapsford, W. Russ Algar, L. B. (2013). Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *American Chemical Society*, 113(3), 1904–2074. <https://doi.org/10.1021/cr300143v>
- Kumari, P., Ghosh, B., & Biswas, S. (2016). Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 24(3), 179–191. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1051049>
- Kwon, S., Singh, R. K., Perez, R. A., Abou Neel, E. A., Kim, H.-W., & Chrzanowski, W. (2013). Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery. *Journal of Tissue Engineering*, 4, 204173141350335. <https://doi.org/10.1177/2041731413503357>
- Lakshmanan, V.-K. (2016). Therapeutic efficacy of nanomedicines for prostate cancer: An update. *Investigative and Clinical Urology*, 57(1), 21. <https://doi.org/10.4111/icu.2016.57.1.21>
- Liu, Y., Male, K. B., Bouvrette, P., & Luong, J. H. T. (2003). Control of the Size and Distribution of Gold Nanoparticles by Unmodified Cyclodextrins. *Chemistry of Materials*, 15(22), 4172–4180. <https://doi.org/10.1021/cm0342041>
- Melillo, J. M., Bowles, F. P., Steudler, P. A., Rayment, M., Trumbore, S. E., Amundson, R., ... Currie, W. S. (2002). Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles, 298(December), 2176–2180.
- Mout, R., Moyano, D. F., Rana, S., & Rotello, V. M. (2012). Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2539–2544. <https://doi.org/10.1039/c2cs15294k>
- Naumkin, A. V., Kraut-Vass, A., Gaarenstroom, S. W., & Powell, C. J. (2012). NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database. <https://doi.org/10.18434/T4T88K>
- Nik, B., & Sayed, a El. (2003). Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed - Mediated Growth Method. *Chemistry of Materials*, 15(16), 1957–1962. <https://doi.org/Doi.10.1021/Cm020732I>

- Nyoung, D., Hyeok, D., Moon, H., Bok, J., Soo, M., Cheon, S., ... Keun, I. (2012). Biomaterials Gold nanoparticles surface-functionalized with paclitaxel drug and biotin receptor as theranostic agents for cancer therapy. *Biomaterials*, *33*(3), 856–866. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.064>
- Oberdörster, G., Stone, V., & Donaldson, K. (2007). Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, *1*(1), 2–25. <https://doi.org/10.1080/17435390701314761>
- Pastoriza-Santos, I., Pérez-Juste, J., & Liz-Marzán, L. M. (2006). Silica-Coating and Hydrophobation of CTAB-Stabilized Gold Nanorods. *Chemistry of Materials*, *18*(10), 2465–2467. <https://doi.org/10.1021/cm060293g>
- Perumal, O., & Vyas, D. (2014). Applications of Nanomedicine in Breast Cancer Detection , Imaging , and Therapy, *14*(1). <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8755>
- Pritchard, T., Rosengren, R. J., Greish, K., & Taurin, S. (2016). Raloxifene nanomicelles reduce the growth of castrate-resistant prostate cancer. *Journal of Drug Targeting*, *24*(5), 441–449. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1086360>
- Rai, Y., Pathak, R., Kumari, N., Sah, D. K., Pandey, S., Kalra, N., ... Bhatt, A. N. (2018). Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific Reports*, *8*(1), 1531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>
- Rodríguez, S. (2007). *Obtención de nanopartículas y nano-ordenamientos metálicos empleando la química de compuestos de inclusión*.
- Rojas-Aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K., & González-Méndez, I. (2016). La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educacion Quimica*, *27*(4), 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>
- Shakeri-Zadeh, A., Ghasemifard, M., & Ali Mansoori, G. (2010). Structural and optical characterization of folate-conjugated gold-nanoparticles. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, *42*(5), 1272–1280. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2009.10.039>
- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., & Farokhzad, O. C. (2016). Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, *17*(1), 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>
- Shi, Y., Goodisman, J., & Dabrowiak, J. C. (2013). Cyclodextrin capped gold nanoparticles as a delivery vehicle for a prodrug of cisplatin. *Inorganic Chemistry*, *52*(16), 9418–9426. <https://doi.org/10.1021/ic400989v>

- Shmarakov, I., Mukha, I., Vityuk, N., Borschovetska, V., Zhyshchynska, N., Grodzyuk, G., & Eremenko, A. (n.d.). Antitumor Activity of Alloy and Core-Shell- Type Bimetallic AgAu Nanoparticles, *8785*(87). <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2112-y>
- Socrates, G. (2007). *Infrared and raman characteristic group frequencies : tables and charts*. John Wiley & Sons. Retrieved from https://books.google.com.mx/books/about/Infrared_and_Raman_Characteristic_Group.html?id=LDoAAjMnwEIC&redir_esc=y
- Sperling, R. A., & Parak, W. J. (2010). Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal Inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *368*(1915), 1333–1383. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273>
- Tokar, E. J., Diwan, B. A., & Waalkes, M. P. (2010). Arsenic exposure transforms human epithelial stem/progenitor cells into a cancer stem-like phenotype. *Environmental Health Perspectives*, *118*(1), 108–115. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901059>
- Tokar, E. J., Qu, W., Liu, J., Liu, W., Webber, M. M., Phang, J. M., & Waalkes, M. P. (2010). Arsenic-specific stem cell selection during malignant transformation. *Journal of the National Cancer Institute*, *102*(9), 638–649. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq093>
- Tokar, E. J., Qu, W., & Waalkes, M. P. (2011). Arsenic, stem cells, and the developmental basis of adult cancer. *Toxicological Sciences*, *120*(SUPPL.1), 192–203. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq342>
- Vendrell, M., Maiti, K. K., Dhaliwal, K., & Chang, Y. T. (2013). Surface-enhanced Raman scattering in cancer detection and imaging. *Trends in Biotechnology*, *31*(4), 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.013>
- Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., & Huwyler, J. (2015). Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release*, *200*, 138–157. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, *29*(20), 2941–2953. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>
- Wongpinyochit, T., Uhlmann, P., Urquhart, A. J., & Seib, F. P. (2015). PEGylated Silk Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01003>
- Wu, Z., Song, N., Menz, R., Pingali, B., Yang, Y. W., & Zheng, Y. (2015). Nanoparticles functionalized with supramolecular host-guest systems for nanomedicine and

- healthcare. *Nanomedicine*, 10(9), 1493–1514. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.1>
- Yan, J., Wang, Y., Zhang, X., Liu, S., Tian, C., & Wang, H. (2016). Targeted nanomedicine for prostate cancer therapy: docetaxel and curcumin co-encapsulated lipid–polymer hybrid nanoparticles for the enhanced anti-tumor activity in vitro and in vivo. *Drug Delivery*, 23(5), 1757–1762. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1069423>
- Yang, Y., & Wang, H. (2013). Perspectives of Nanotechnology in Minimally Invasive Therapy of Breast Cancer. *Journal of Healthcare Engineering*, 4(1), 67–86. <https://doi.org/10.1260/2040-2295.4.1.67>
- Yohan, D., & Chithrani, B. D. (2014). Applications of nanoparticles in nanomedicine. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(9), 2371–2392. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.2015>
- Yuan, H., Houry, C. G., Hwang, H., Wilson, C. M., Grant, G. A., & Vo-Dinh, T. (2012). Gold nanostars: Surfactant-free synthesis, 3D modelling, and two-photon photoluminescence imaging. *Nanotechnology*, 23(7). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/7/075102>
- Zhang, C.-L., Huang, T., Wu, B.-L., He, W.-X., & Liu, D. (2017). Stem cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Oncotarget*, 8(43), 75756–75766. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20798>
- Zhang, L., Xia, K., Lu, Z., Li, G., Chen, J., Deng, Y., ... He, N. (2014). Efficient and facile synthesis of gold nanorods with finely tunable plasmonic peaks from visible to near-IR range. *Chemistry of Materials*, 26(5), 1794–1798. <https://doi.org/10.1021/cm403109k>
- Zhang, L., & Zhang, N. (2013). How nanotechnology can enhance docetaxel therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 2927–2941. <https://doi.org/10.2147/IJN.S46921>
- Zhang, X. D., Wu, D., Shen, X., Liu, P. X., Yang, N., Zhao, B., ... Fan, F. Y. (2011). Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2071–2081. <https://doi.org/10.2147/IJN.S21657>
- Zhang, X. Q., Xu, X., Bertrand, N., Pridgen, E., Swami, A., & Farokhzad, O. C. (2012). Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(13), 1363–1384. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.005>