



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Respuesta al Estrés Oxidativo de Células Endoteliales
Humanas a Nanopartículas Ramificadas de Oro**

Tesis que presenta
Andrea Castorena Robles

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Directores del trabajo de tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez
aleonr@ipicyt.edu.mx

Dr. José Luis Rodríguez López
jlrdz@ipicyt.edu.mx

Asesores internos:

Dra. Daphne Edith González Juárez
daphne.gonzalez@ipicyt.edu.mx

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
jbremont@ipicyt.edu.mx



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Respuesta al Estrés Oxidativo de Células Endoteliales Humanas a Nanopartículas Ramificadas de Oro**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ing. Andrea Castorena Robles** y aprobada el 25 de junio del 2024 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio de León Rodríguez
Director de la tesis

Dr. José Luis Rodríguez López
Codirector de la tesis

Dra. Daphne Edith González Juárez
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Miembro del Comité Tutorial



IPICYT

Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Antonio de León Rodríguez y el Dr. José Luis Rodríguez López.

Durante la realización del trabajo se realizó con el apoyo parcial del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C y el LINAN. La autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología no. 1241945

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

Dedicatorias

Quiero dedicar este trabajo y a todo mi esfuerzo a mi familia que me ha apoyado incondicionalmente en este viaje. En especial a:

Antonio Arroyo, mi compañero de vida desde mis 16 años

Mis papás que me han impulsado a soñar en grande, Osvaldo Castorena y Susana Robles

Mi compañera de travesuras y hermana, Regina Castorena

Mis abuelitos por su amor incondicional, Socorro, Juanita y Salvador

Mis dos ángeles que me cuidan desde el cielo, mi tía Lupe y mi tía Elena, y a todos mis tíos y tías que me siguen apoyando día a día

Mis peluditos que me traen muchas alegrías y me recuerdan que no necesitas mucho para ser feliz. Luffy, Tito, Migue, Pulguis y Chopa

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Antonio de León Rodríguez por permitirme formar parte del laboratorio de Biotecnología molecular y por guiarme a lo largo de mi proyecto.

A la Dra. Daphne Edith González Juárez y al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por sus comentarios y sugerencias.

Al LINAN por el trabajo de microscopia. En especial a la Mtra. Ana Iris Peña Maldonado y la Dra. Gladis Judith Labrada Delgado por su apoyo durante las sesiones de SEM.

Al técnico el Dr. Víctor Balderas por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por otorgarme la beca No. 1241945

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por brindarme lo necesario para completar mis estudios de maestría.

A mi pareja, Antonio Arroyo por ser mi soporte cuando creía que ya no podía más.

A mis papás Susana y Osvaldo, a mi hermana Regina, y a toda mi familia por su apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 4, Osvaldo, Francisco y Jorge por sus consejos, su ayuda y sobre todo por su amistad que me hizo sentir parte de un gran equipo de trabajo.

A mis compañeras del Laboratorio de Bio-nanomateriales, Andrea y Alexa por compartirme su conocimientos de nanociencia y apoyarme en el proceso de aprendizaje.

Índice

RESUMEN.....	IX
Respuesta al Estrés Oxidativo de Células Endoteliales Humanas a Nanopartículas Ramificadas de Oro.....	ix
ABSTRACT	X
Oxidative stress response of human endothelial cells to Multi-Branched Gold Nanoparticles	x
INTRODUCCIÓN	1
Nanociencia y nanotecnología	1
Bio-nanociencia	2
El endotelio.....	4
Participación de ROS en la respuesta inflamatoria.....	5
Superóxido dismutasas.....	6
Tiorredoxina.....	7
GAPDH	8
OBJETIVO GENERAL	9
Objetivos específicos	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Síntesis de nanopartículas esféricas de oro por el método de Turkevich	10
Síntesis de nanopartículas ramificadas de oro por el método de Carreón.....	10
Síntesis de nanopartículas ramificadas de oro por el método de Yuang.....	11
Caracterización de la respuesta óptica de las Nanopartículas	11
Caracterización de Nanopartículas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	12
Cuantificación de MBAuNPs por ICP y curva de calibración estándar.....	13
Condiciones de cultivo y tratamientos	13
Ensayo de viabilidad celular	13
Ensayo de respuesta al estrés oxidativo.....	14
PCR cuantitativa en tiempo real de transcripción inversa (qRT-PCR).....	14

Análisis estadístico	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
Síntesis de nanopartículas esféricas de oro por el método de Turkevich	16
Síntesis de nanopartículas ramificadas de oro por el método de Carreón y Yuang.....	17
Cuantificación de MBAuNPs por ICP y curva de calibración estándar.....	19
Efecto de la exposición de nanopartículas de oro sobre la viabilidad celular	19
Producción de especies reactivas de oxígeno.....	22
Efectos de los tratamientos con MBAuNPs en la expresión de los genes SOD-1, TXN y GAPDH	25
CONCLUSIONES.....	29
PERSPECTIVAS.....	30
BIBLIOGRAFÍA	31

Lista de Figuras

Figura 1: Reacción catalítica de las SODs.....	7
Figura 2: Ciclo Redox de la TXN.	8
Figura 3: Respuesta óptica característica de AuNPs.	12
Figura 4: Caracterización de AuNPs del método de Turkevich.	16
Figura 5: Caracterización de MBAuNPs del método de Carreón.	17
Figura 6: Caracterización de AuNPs del método de Yuang.	18
Figura 7: Curva de calibración estándar de MBAuNPs.	19
Figura 8: Viabilidad celular ante la exposición de los tratamientos.	20
Figura 9: Producción de ROS por las células EA.hy926 ante la exposición a nanopartículas de oro.	23
Figura 10: Cambios en la expresión de los genes SOD-1, TXN y GAPDH ante los tratamientos con MBAuNPs de Carreón y Yuang a 24h de exposición.	26

Lista de Tablas

Tabla 1: Oligonucleótidos para la amplificación de los genes diana.	14
--	----

Resumen

Respuesta al Estrés Oxidativo de Células Endoteliales Humanas a Nanopartículas Ramificadas de Oro

Los tratamientos convencionales para el cáncer presentan limitaciones en su eficacia debido a la falta de especificidad y al daño en células sanas. La nanomedicina propone el uso de nanopartículas de oro (AuNPs) como tratamiento alternativo para el cáncer por su alta biocompatibilidad. Donde las AuNPs multi-ramificadas (MBAuNPs) se destacan como agentes fototérmicos eficaces para inducir la muerte celular selectiva en tejidos específicos. Dependiendo de su forma y composición, los nanomateriales poseen propiedades que influyen en su comportamiento en sistemas biológicos, lo que afecta la respuesta a dosis y su eficacia.

En este estudio, se realizó la síntesis de nanopartículas de oro esféricas utilizando el método de Turkevich y dos tipos de nanopartículas ramificadas o anisotrópicas mediante el método de Carreón y Yuang. Para evaluar la biocompatibilidad de las MBAuNPs en EA.hy926 se evaluó la viabilidad celular, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y la expresión de los genes SOD-1, TXN y GAPDH mediante q-PCR.

Los resultados mostraron que después de 24h y 48h de exposición la viabilidad celular se mantuvo entre 80-95% para MBAuNPs de Carreón y de Yuang en todas las condiciones. El nivel de ROS en las células tratadas fue similar a los obtenidos en los cultivos control. La expresión de los genes SOD-1 y TXN fue menor al del control, mientras que la expresión de GAPDH similar al control tratamientos con MBAuNPs de Carreón; sin embargo, su expresión disminuyó significativamente con MBAuNPs de Yuang.

Se concluyó que ambas MBAuNPs son biocompatibles con las células EA.hy926 a corto plazo, pero muestran una leve citotoxicidad a 1 ppm y a tiempos prolongados. Los ensayos de estrés oxidativo no muestran un aumento en la acumulación de ROS. El nivel de expresión de los genes SOD-1 y TXN sugiere que no hay estrés oxidativo, pero la reducción en la expresión del gen GAPDH con las MBAuNPs de Yuang sugiere una interferencia en el metabolismo celular.

Palabras clave: Nanopartículas multi-ramificadas de oro, biocompatibilidad, respuesta al estrés oxidativo, citotoxicidad

Abstract

Oxidative stress response of human endothelial cells to Multi-Branched Gold Nanoparticles

Conventional cancer treatments present limitations in their effectiveness due to lack of specificity and to the damage caused to healthy cells. Nanomedicine suggests the use of gold nanoparticles (AuNPs) as an alternative cancer treatment because of their high biocompatibility. Among them, multi-branched gold nanoparticles (MBAuNPs) stand out as effective photothermal agents for inducing selective cell death in specific tissues. Depending on their shape and composition, nanomaterials possess properties that influence their behavior in biological systems, affecting dose response and efficacy.

Spherical gold nanoparticles were synthesized using the Turkevich method, while two types of branched or anisotropic nanoparticles were synthesized using the methods of Carreón and Yuang. To assess the biocompatibility of MBAuNPs in EA.926, cell viability, reactive oxygen species (ROS) generation, and the expression of SOD-1, TXN, and GAPDH genes were evaluated using q-PCR.

The results showed that after 24 and 48 h, cell viability remained between 95-80% for both nanoparticles under all conditions. ROS levels in treated cells were similar to those in control cultures. Expression of SOD-1 and TXN was lower compared to the control, while GAPDH expression was normal in treatments with Carreón's MBAuNPs; however, its expression decreased significantly with Yuang's MBAuNPs.

It was concluded that both MBAuNPs are biocompatible with EA.hy926 cells in the short term, but show slight cytotoxicity at 1 ppm and prolonged exposure. Oxidative stress assays did not show an increase in ROS production, indicating absence of oxidative stress. The expression of SOD-1 and TXN suggests no oxidative stress, but the reduction in GAPDH gene expression with Yuang's MBAuNPs suggests interference with cellular metabolism.

Keywords: Multi-branched gold nanoparticles, biocompatibility, oxidative stress response, cytotoxicity

Introducción

De acuerdo con la definición de la Organización Mundial de la Salud (WHO), el cáncer es una serie de enfermedades progresistas graduales caracterizada por el desarrollo de células anormales que crecen sin control más allá de lo habitual y llegan a invadir tejidos u órganos adyacentes (WHO, n.d.). Este proceso ocurre por alteraciones en mecanismos apoptóticos, es decir, la activación de oncogenes o la desactivación de genes que los suprimen (Bala et al., 2023). Según los reportes preliminares del INEGI, en el periodo de enero-junio 2023, la tercera causa de muerte en México se debió al cáncer con 45,409 decesos (INEGI, 2024).

Por muchas décadas la cirugía, quimioterapia y radioterapia han sido los principales tratamientos para el cáncer, los cuales se emplean en combinación o como tratamiento único (National Cancer Institute, 2015). Estos tratamientos se basan en que el potencial de las células cancerosas es similar, no obstante, dado que la naturaleza de cada caso es única, la eficacia de estos disminuye a falta de especificidad (Chakraborty and Rahman, 2012). Además, su aplicación se ve limitada por el daño en células sanas y el deterioro en el estado físico del paciente, como por ejemplo la supresión del sistema inmune que abre paso a infecciones oportunistas (Sharma et al., 2023).

Nanociencia y nanotecnología

La nanotecnología es la aplicación de los conocimientos teóricos de la nanociencia sobre átomos y moléculas nanométrica para desarrollar nanomateriales, los cuales pueden ser manipulados en cuando a forma, tamaño y

composición para aprovechar sus propiedades y funciones novedosas (Bayda et al., 2019). Del potencial de la nanotecnología emergen aplicaciones en campos como la Física, Química, Biología, Medicina, Informática, Biotecnología e Ingeniería (Logothetidis, 2012).

Las nanopartículas (NPs) son partículas sintetizadas de forma intencional con dimensiones de 1 a 100 nm. Se caracterizan por poseer propiedades físicas distintas a las de materiales no nanométricos con la misma composición química (Auffan et al., 2009). Se clasifican según su composición química y su dimensionalidad. Por composición química se clasifican en: nanopartículas orgánicas (polímeros, lípidos, proteínas, etc.), nanopartículas inorgánicas (metales, no metales y óxidos), nanopartículas con estructura de carbono (por ejemplo, flúrenos, nanofibras y nanotubos) y nanopartículas híbridas (dióxido de titanio y dióxido de silicio). Por su dimensionalidad se clasifican en: 3D (tienen largo, alto y ancho), 2D (tienen largo y ancho), 1D (sólo tienen un parámetro), y 0D (longitud, altura y ancho se limitan en un solo punto) (Harish et al., 2022).

Bio-nanociencia

Estudios de la nanomedicina; disciplina que estudia la interacción de sistemas nanoestructurados diversos con entornos biológicos y sus aplicaciones en salud; sugieren el aprovechamiento de las nanopartículas de oro (AuNPs) para tratamientos contra el cáncer (Gerosa et al., 2020). Por ejemplo, en el diagnóstico en etapas tempranas de ciertos padecimientos, construcción de biosensores, estudios genómicos, fototermólisis contra microorganismos y células cancerígenas;

así como la entrega dirigida de fármacos, ácidos nucleicos y anticuerpos a tejidos de interés (Dykman y Khlebtsov, 2011).

Los nanomateriales poseen propiedades químicas y físicas que definen su desempeño en los sistemas biológicos. Su naturaleza está asociada a la distribución, deposición y eliminación dentro del organismo. Además, es importante tener en cuenta estas características ya que la regulación de la dosis-respuesta depende completamente de los materiales. Aquellos nanomateriales considerados como biocompatibles poseen una mejor captación celular, mejor retención en la célula diana y se reduce la citotoxicidad (Ranjha et al., 2022). Tomando en cuenta lo anterior, las NPs de oro (AuNPs) poseen alta biocompatibilidad al estar compuestas por un metal inerte que no reacciona con los tejidos y células humanas. Además, el oro es un metal conductor por excelencia con alta resistencia a la oxidación y corrosión (Vines et al., 2019).

Debido a las desventajas en los métodos convencionales para tratar el cáncer, se ha introducido a la hipertermia como un tratamiento fototérmico alternativo. La hipertermia consiste en elevar la temperatura entre 39°C y 45°C un tejido específico con el objetivo de inducir la muerte celular o hacer que las células cancerosas sean más susceptibles a los tratamientos convencionales (Beik et al., 2016). Esto se debe a los cambios fisiológicos que sufre la célula por la hipertermia, volviendo su membrana más permeable (Bala et al., 2023).

Las AuNPs se caracterizan por funcionar como agentes fototérmicos ya que absorben la radiación en el infrarrojo cercano (NIR) y la emiten en forma de calor, es decir, en contraste con otras formas de tratamiento fototerapéutico, se observa

una mayor penetración de la radiación en el tejido tumoral, lo que resulta en una eficacia aumentada (Vines et al., 2019). Sin embargo, esta interacción difícilmente se logra con NPs esféricas. Dicho lo anterior, surge el diseño de nanopartículas de oro multi-ramificadas (MBAuNPs). Como su nombre lo indica, están compuestas por un núcleo en forma de esferas y picos que salen de él, similar a una estrella en tres dimensiones. Estas modificaciones producen grandes cambios en el plasmón de superficie y consecuentemente en la absorción de luz en la región del infrarrojo cercano, que difícilmente se logra con las AuNPs esféricas (Sajanlal et al. 2011).

El endotelio

El endotelio es una monocapa de células adherentes que recubre los vasos sanguíneos de los tejidos del cuerpo humano, e interactúa con otras células y moléculas que circulan en la sangre (Michiels, 2003). Participa en funciones homeostáticas del sistema vascular como el abastecimiento de oxígeno y nutrientes y la eliminación de desechos. El endotelio suele ser un objetivo terapéutico de interés por su papel ante respuestas inflamatorias y otras patologías (Reschke et al., 2022). Además que la administración de MBAuNPs vía intravenosa proporciona rápida acción y mayor biodisponibilidad a dosis bajas (Chenthamara et al., 2019). Estudiar la interacción del endotelio con las MBAuNPs es pertinente para comprender su biocompatibilidad y de efectos no deseados, esto con el objetivo de mejorar su seguridad y eficacia en futuras aplicaciones.

Los cultivos *in vitro* de células endoteliales permiten evaluar sus interacciones con las MBAuNPs en un entorno experimental más controlado que se asimila al cuerpo humano, sobre todo para predecir su respuesta ante la exposición

a distintas concentraciones de nanopartículas antes de realizar ensayos clínicos. Un ejemplo es la línea células EA.hy926, la cual es de interés en estudios de respuesta inflamatoria por ser un híbrido de células somáticas de la vena umbilical humana y un clon resistente a la Tioguanina de A549 (ATCC, s.f.).

Participación de ROS en la respuesta inflamatoria

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) es una familia de moléculas que contienen oxígeno molecular y que debido a sus electrones desapareados son altamente reactivos, las cuales a concentraciones suprafisiológicas son potencialmente tóxicas (Sies et al., 2022). Están compuestas principalmente por anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y radical hidroxilo ($\bullet HO$). Las ROS se generan de forma habitual durante los procesos celulares sanas, por ejemplo, en la respiración mitocondrial, en el plegamiento de proteínas, en la inflamación y en respuesta a factores externos e internos, como la exposición a la radiación UV y radiación ionizante (Juan et al., 2021).

A niveles basales, las ROS participan en la regulación de funciones fisiológicas esenciales para el buen funcionamiento celular, por ejemplo, señalización de patrones transcripcionales, expresión genética, promoción del crecimiento celular y apoptosis, así como en la activación de la respuesta inmune por infección de microorganismos patógenos (Senoner y Dichtl, 2019). Sin embargo, la sobreproducción de ROS induce estrés oxidativo en la célula, es decir, respuesta inflamatoria y se manifiesta en daño en macromoléculas que derivan en enfermedades como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, problemas cardiovasculares, etc. (Yang et al., 2019).

El sistema inmune innato y adaptativo están relacionados con el desencadenamiento de una serie de reacciones de defensa complejas que dan como resultado el aumento de los niveles de ROS, o también conocida como respuesta inflamatoria, las cuales se activan presencia de patógenos. Sin embargo, si la acumulación de ROS perdura, las células entran en un estado de estrés oxidativo el cual afecta sus funciones principales de forma negativa (Agita y Alsagaff, 2017). Para contrarrestar los efectos nocivos de la acumulación de las ROS, las células animales desarrollaron un mecanismo enzimático para regular sus niveles de ROS, por ejemplo, las enzimas Tiorredoxina (Txn) y Superóxido dismutasa 1 (SOD-1). No obstante, si los niveles de ROS son mayores a la capacidad catalítica de las enzimas, la célula no es capaz de metabolizarlas y entran en el estado de estrés oxidativo (Mittal et al., 2014).

Superóxido dismutasas

La familia de las superóxido dismutasas (SODs) son enzimas ligadas con un metal como grupo prostético, el cual, dependiendo del tipo de SOD, puede ser Fe, Cu, Zn o Mn. Estas enzimas son consideradas como una de las principales líneas de defensa ante del estrés oxidativo por su capacidad para convertir el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular a pH neutro, como se muestra en la Fig. 1 (Esquivel-Hernández, 2018).

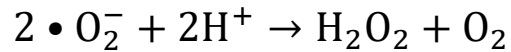
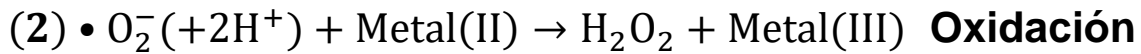
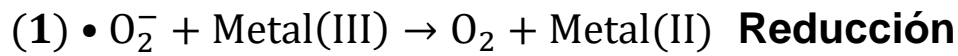


Figura 1: Reacción catalítica de las SODs. La catálisis consta de dos pasos. En primer lugar (1), el grupo prostético de la enzima oxidada se une al anión superóxido, de esta forma la molécula adquiere un protón y se libera el oxígeno molecular. En el segundo (2) paso se une otra molécula de anión superóxido y un protón a la enzima reducida, de esta forma se libera H_2O_2 y la enzima vuelve a su estado oxidado.

En los seres humanos, las SODs se clasifican según su localización y su estructura molecular, de esta última también se considera el metal unido a su grupo prostético. Por localización se clasifican de la siguiente forma: SOD-1 (citosol), SOD-2 (mitocondria) y SOD-3 (extracelular). En cuanto a estructura pueden formar interacciones entre ellas, como dímeros para la SOD-1 (Zn/Cu), o tetrameros para la SOD-2 (Mn) y para la SOD-3 (Cu) (Johnson y Giulivi, 2005).

Tiorredoxina

La Tiorredoxina o Txn es una enzima antioxidante que se encuentra en bacterias, plantas y animales. Algunas Txn abundan en el citosol y algunas otras en mitocondrias, núcleo e incluso se secretan al entorno extracelular (Collet y Messens, 2010). Txn posee múltiples funciones como la regulación de la apoptosis a través de la desnitrosilación, actúa como reductasa en el control redox, regula el estrés ambiental y protege a las proteínas celulares de la oxidación e inactivación. En este mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo, Txn reduce los grupos disulfuro de proteínas oxidadas para mantenerlas en su forma reducida y funcional (Fig. 2) (Lu y Holmgren, 2014).

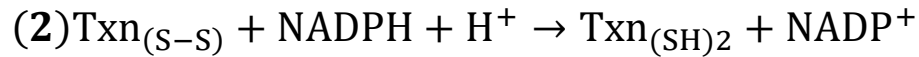
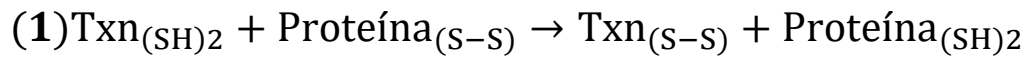


Figura 2: Ciclo Redox de la TXN. (1) Txn transfiere electrones a partir de las cisteínas para formar puentes disulfuro en su estructura y reducir la proteína oxidada. (2) Después, los puentes disulfuro se oxidan nuevamente por la transferencia de electrones de NADPH hacia la Txn oxidada para que recupere su capacidad como agente reductor.

GAPDH

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una de las enzimas dentro de la glucólisis que oxida el gliceraldehído 3-fosfato (G3P) en 1,3-bifosfoglicerato en presencia de NAD⁺, por lo que su expresión es abundante y constitutiva. Si bien GAPDH no es una enzima reguladora de ROS, se ha reportado que su expresión es sensible a los cambios en las condiciones celulares como por ejemplo: flujo de calcio, hipoxia, progresión del ciclo celular y estrés oxidativo (Nicholls et al., 2012).

Objetivo general

Evaluar la biocompatibilidad de las MBAuNPs en la línea celular EA.hy926.

Objetivos específicos

- Caracterizar las MBAuNPs por su respuesta óptica y mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- Analizar la viabilidad celular de la línea EA.hy926 en respuesta a los tratamientos con MBAuNPs.
- Analizar el efecto de la aplicación de las MBAuNPs en la respuesta al estrés oxidativo en la línea EA.hy926.
- Determinar los efectos de las MBAuNPs en la expresión de genes y la acumulación de proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo como SOD-1 y TXN, también en enzimas sensibles al ROS como la GAPDH.

Materiales y métodos

Síntesis de nanopartículas esféricas de oro por el método de Turkevich

La síntesis mediante el método de Turkevich se basa en la reducción del Ácido cloroáurico (HAuCl_4) utilizando citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) como agente reductor a una temperatura de 75°C (Turkevich et al., 1951). A partir de una solución Stock de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 75 mM se tomaron 0.2 ml, se aforó a 20 ml y se agitó durante 10 seg. Después se descartaron 0.2 ml de la solución y se calentó a 75°C , una vez alcanzada esta temperatura se agregaron 0.2 ml de solución Stock de HAuCl_4 25 mM y se mantuvieron las condiciones constantes por 10 min hasta que la solución se tornó rojo vino. Finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió el espectro. El color final de la solución debe ser morado.

Síntesis de nanopartículas ramificadas de oro por el método de Carreón

Las MBAuNPs de este método se sintetizan a partir de las esferas obtenidas con el método anterior (Carreón Álvarez, 2016). La baja temperatura en esta síntesis es factor importante, es por eso que se lleva a cabo en un vaso de precipitado sumergido en un recipiente con hielo para mantenerlo a 4°C . Se agregaron 12.5 ml de solución de sal de sodio Hepes 50 mM a pH 7.4 ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{H}_2\text{NaO}_4\text{S}$) y en agitación constante se agregaron 150 μl de AuNPs y 400 μl de NH_2OH 100 mM. Después gota por gota se añadió 2.2 ml de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.8 mM con intervalos de 8 segundos entre cada gota. Finalmente, la solución se agita por 15 min más y se remueve del hielo y agitación para que alcance temperatura ambiente antes de analizar su espectro. El color final de la solución es azul grisáceo.

Síntesis de nanopartículas ramificadas de oro por el método de Yuang

Al igual que el método de Carreón, este tipo de nanopartículas también utiliza de base las AuNPs sintetizadas con el método de Turkevich. Primero se colocaron 40 ml de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ a 0.25 mM en un vaso de precipitado. Después de manera simultánea y manteniendo agitación vigorosa constante, se añadió 40 μ l de HCl 1M y 400 μ l de AuNPs e inmediatamente se agregó 400 μ l de $AgNO_3$ 3 mM y 200 μ l de $C_6H_8O_6$ 0.1 M. Se agitó la solución por 5 segundos más y se retiró de la parrilla. El color final de la solución es azul grisáceo.

Caracterización de la respuesta óptica de las Nanopartículas

Se midió la respuesta óptica mediante espectroscopia UV-VIS. Dependiendo del tipo de nanopartícula y del método de síntesis se espera obtener cierto valor en el pico de absorbancia máxima (Fig. 3).

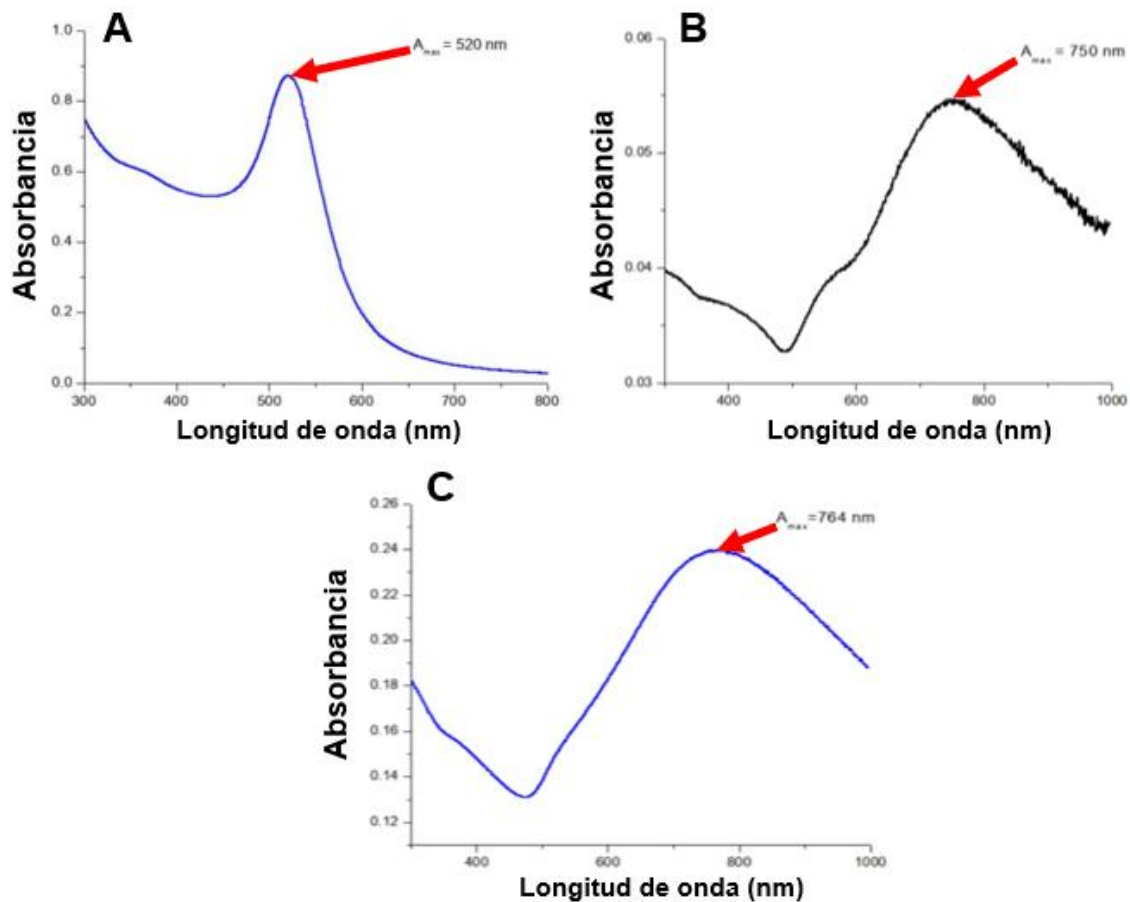


Figura 3: Respuesta óptica característica de AuNPs. La figura A corresponde a la respuesta óptica de nano esferas sintetizadas con el método de Turkevich, la B corresponde a las MBAuNps del método de Carreón y la C a las MBAuNps del método de Yuang. Las gráficas de referencia se tomaron del manual del Laboratorio de Bionanoestructuras del IPICYT (Méndez-Medrano y Quilumba-Dután, 2021)

Caracterización de Nanopartículas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Se colocó una gota de cada muestra en pines de aluminio previamente pulidos, lavados y secados. Se dejó secar las muestras toda la noche en el horno a 60-80°C. Se analizaron las muestras el microscopio electrónico de barrido (Dual Beam FEI-Helios Nanolab 600). Las imágenes fueron observadas con un aumento de 50,000x, 150,000x y 300,000x a 8 KV, 86 pA y distancia de trabajo de 4 mm.

Cuantificación de MBAuNPs por ICP y curva de calibración estándar

Del volumen total de la síntesis se tomaron 600 µl y se aforó a 6 ml para obtener una solución al 10% de MBAuNPs, la cual se envió al LANBAMA para analizar por ICP. Con los resultados obtenidos se construyó una curva de calibración estándar donde se utilizaron concentraciones conocidas (2, 4, 6, 8 y 10 ppm).

Condiciones de cultivo y tratamientos

Se cultivó la línea celular EA.hy926 en medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO) y 1% de penicilina/estreptomina/anfotericina (sigma) a 37°C y 5% de CO_2 . Para los ensayos de viabilidad celular y de especies reactivas de oxígeno, se sembraron 10,000 células por pozo en placas de 96 pocillos 24 h antes de la exposición, todo esto por triplicado para cada tratamiento. Las concentraciones de MBAuNPs a estudiar son 0.01, 0.1 y 1 ppm por 24, 48 y 72 h.

Ensayo de viabilidad celular

Siguiendo las condiciones de cultivo establecidas y una vez concluido el tiempo designado, se removió el medio de cultivo y se agregaron 100 µl de medio con 5 mg/ml de Bromuro de Tetrazolio Azul de Tiazolilo (MTT). Después, se incubó por 4 h a 37°C. Finalmente, para solubilizar los cristales producidos en la reacción, se retiró el medio de los pocillos y se agregaron 100 µl de DMSO. Se incubó la placa por 10 min a 37 °C y se midió la absorbancia a 590 nm para calcular el porcentaje de células viables.

Ensayo de respuesta al estrés oxidativo

Para evaluar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) se utilizó diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFDA). Las células fueron sometidas a tratamiento con las condiciones establecidas, después del tiempo de exposición se incubaron con DCFDA 25 mM por 45 minutos a 37°C y finalmente se midió la fluorescencia a Ex/Em =485/535.

PCR cuantitativa en tiempo real de transcripción inversa (qRT-PCR)

Extrajimos el RNA total de las células expuestas a tratamiento con el reactivo TRIzol (sigma) siguiendo el protocolo del fabricante. Después, con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) obtuvimos el ADNc. Finalmente, para la q-PCR utilizamos SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) y ARN ribosomal 18S como gen de referencia. Realizamos todos los ensayos por triplicado y calculamos la expresión génica con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los primers que utilizamos para la q-PCR se muestran en la Tabla 1. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 1: Oligonucleótidos para la amplificación de los genes diana.

Gen	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
SOD-1	ACTGGTGGTCCATGAAAAAGC	AACGACTTCCAGCGTTTCCT
TXN	AGATGTGGATGACTGTCAGGATG	ATGGTGGCTTCAAGCTTTTCC
GAPDH	GGAGTCAACGGATTTGGTC	CCATTGATGACAAGCTTCCC

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se muestran como el promedio \pm desviación estándar. Se realizó un ANOVA para evaluar la significancia estadística ($p < 0.05$).

Resultados y discusión

Síntesis de nanopartículas esféricas de oro por el método de Turkevich

En la Figura 4, se muestra el producto de la síntesis de nanopartículas de oro por el método de Turkevich y su caracterización espectral y morfología. En la Figura 4A se observó que el producto de la síntesis es de color morado vino. Con esta característica se asumió que la morfología corresponde a nanoesferas (Turkevich et al., 1951). El espectro de absorción UV-Vis arrojó un pico máximo a 525 nm (Fig. 4B), similar a la que reporta Turkevich et al. (1951). El análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) confirmó la morfología esférica esperada (Fig. 4C).

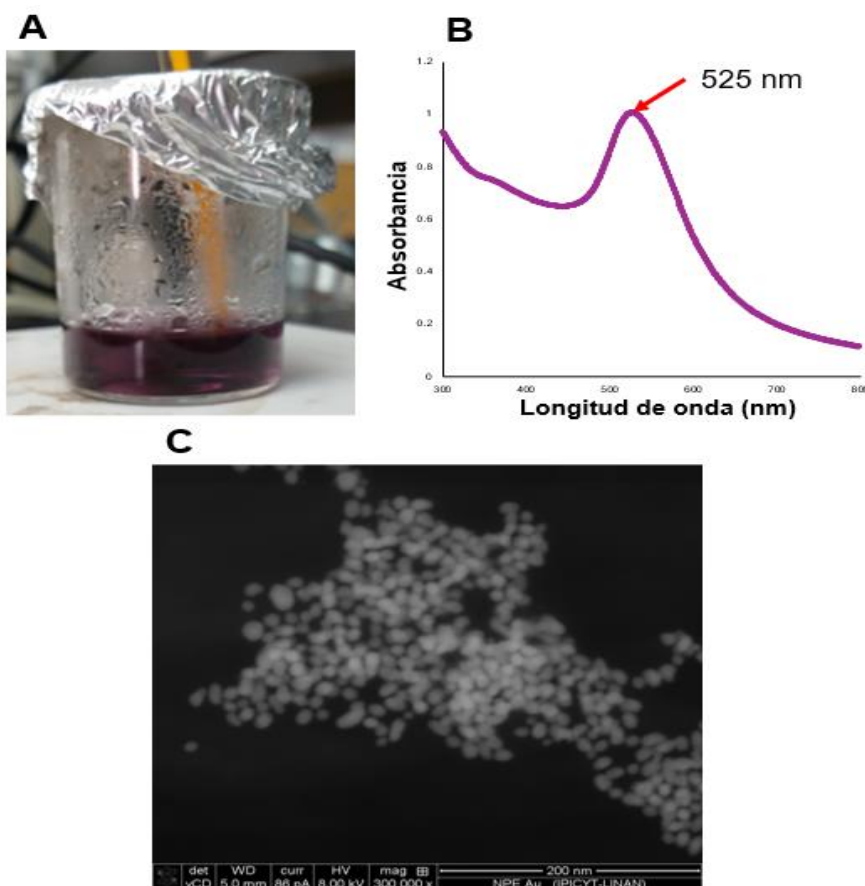


Figura 4: Caracterización de AuNPs del método de Turkevich. (A) Color característico de una síntesis de nanoesferas. (B) Resonancia del plasmón de superficie localizado en 525 nm, correspondiente al método de Turkevich. (C) Micrografía de las nanoesferas sintetizadas.

Síntesis de nanopartículas ramificadas de oro por el método de Carreón y Yuang

En la Figura 5, se muestra el producto de la síntesis de nanopartículas de oro por el método de Carreón et al., (2016) y Yuang et al., (2012) y su caracterización. Tanto el color (Fig. 5A) como la respuesta óptica de la síntesis fue similar a la descrita por Carreón et al. (2016) con un pico máximo de 740 nm (Fig. 5B) y la morfología de estrella se confirmó mediante SEM (Fig. 5C).

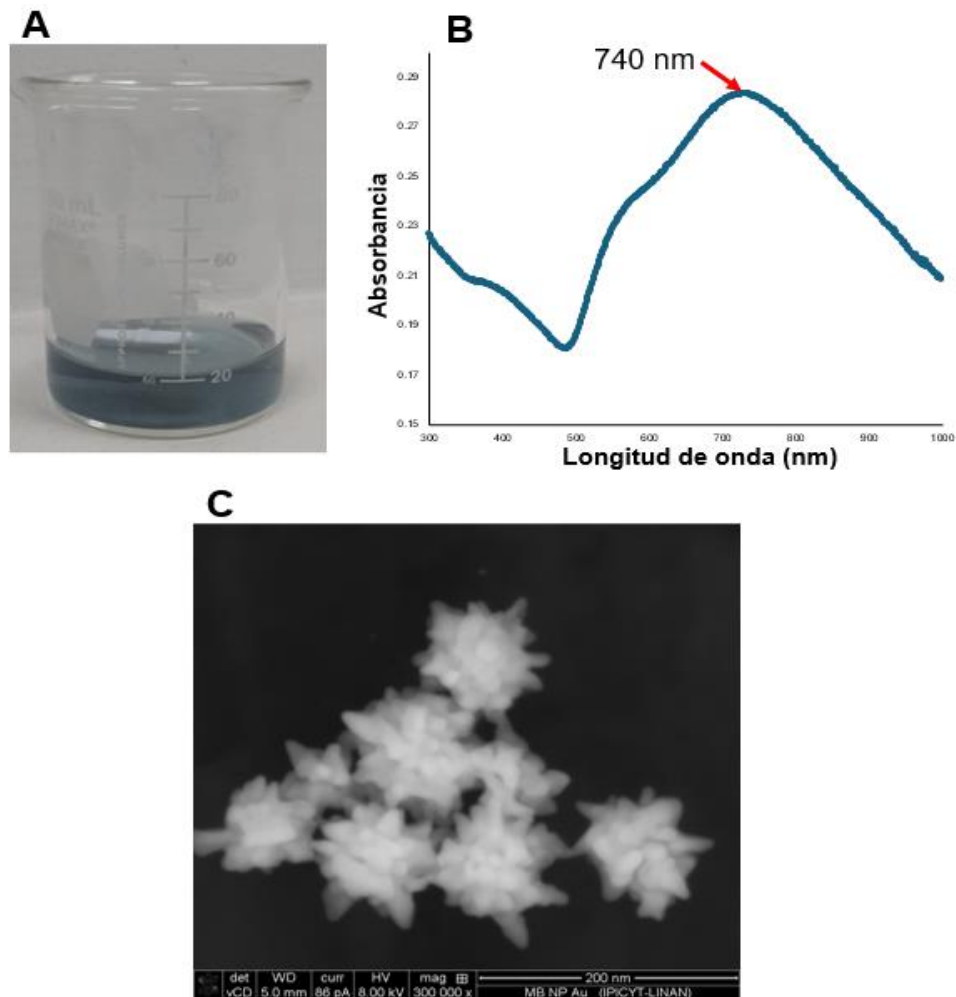


Figura 5: Caracterización de MBAuNPs del método de Carreón. (A) Color característico de una síntesis de MBAuNPs. (B) Resonancia del plasmón de superficie localizado en 740 nm, correspondiente al método de Carreón. (C) Micrografía de las MBAuNPs sintetizadas.

De manera similar, con el método de Yuang et al., (2012) se obtuvieron las características reportadas en la literatura, es decir, solución de síntesis color azul grisácea (Fig. 6A). Un pico de absorción a 794 nm (Fig. 6B) y la morfología de estrella (Fig. 6C).

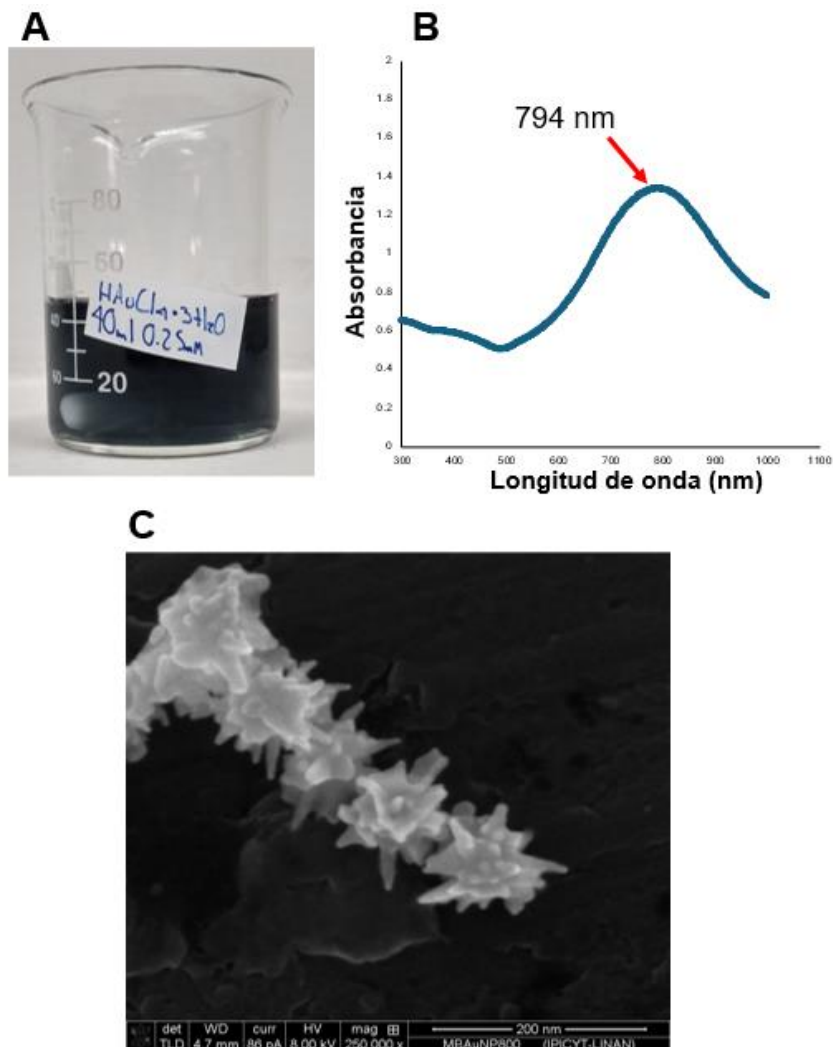


Figura 6: Caracterización de AuNPs del método de Yuang. A) Color característico de una síntesis de MBAuNPs. (B) Resonancia del plasmón de superficie localizado en 794 nm, correspondiente al método de Yuang. (C) Micrografía de las MBAuNPs sintetizadas por SEM.

Cuantificación de MBAuNPs por ICP y curva de calibración estándar

El análisis de Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES) de la muestra arrojó una concentración de 0.29 ppm de oro. A partir de este dato y con los cálculos correspondientes para preparar soluciones de 2, 4, 6, 8 y 10 ppm de nanopartículas, se construyó la curva de calibración estándar (Fig. 7). A partir de la ecuación de la recta se calculó la concentración de las soluciones de síntesis.

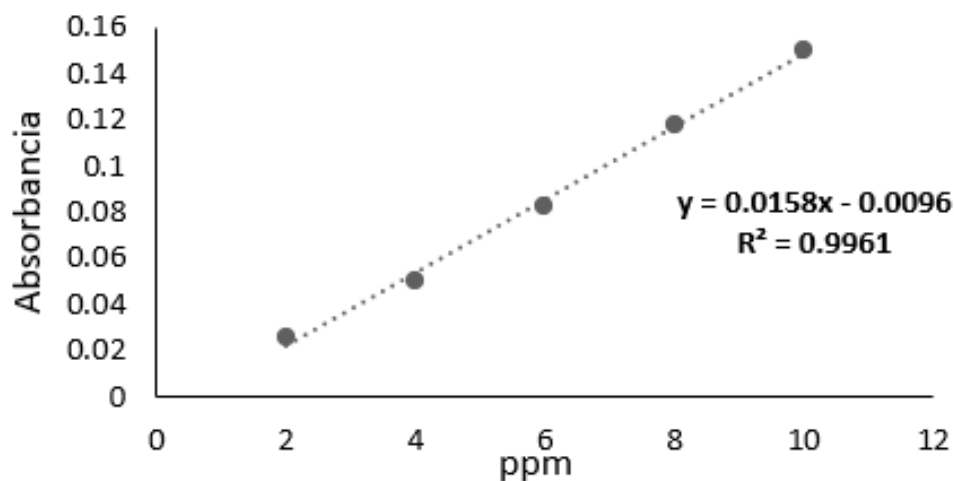


Figura 7: Curva de calibración estándar de MBAuNPs. Con los resultados obtenidos se construyó una curva de calibración estándar donde se utilizaron concentraciones conocidas (2, 4, 6, 8 y 10 ppm).

Efecto de la exposición de nanopartículas de oro sobre la viabilidad celular

En la Figura 8, se muestra el efecto de la concentración de nanopartículas de oro sobre la viabilidad de las células de la línea EA.hy926, donde se observó que esta depende tanto de la concentración como del tiempo de los tratamientos. A las 24 h, la viabilidad celular con MBAuNPs fue similar en ambas formulaciones (Figs. 8A y

8D), manteniéndose por encima del 95% a 0.01 ppm y 0.1 ppm, y disminuyendo al 85% a 1 ppm. Después de 48 h, la viabilidad celular con MBAuNPs de Carreón fue del 94% a 0.01 ppm, 80.6% a 0.1 ppm y 79.88% a 1 ppm (Fig. 8B). Para las MBAuNPs de Yuang, la viabilidad fue superior al 95% a 0.01 ppm y 0.1 ppm, disminuyendo a 77.76% a 1 ppm (Fig. 8E). A las 72 h, los tratamientos con MBAuNPs de Carreón redujeron la viabilidad a 81.71%, 77.71% y 74.07% para las concentraciones ascendentes de 0.01, 0.1 y 1 ppm, respectivamente (Fig. 8C). Por otro lado, con MBAuNPs de Yuang, la viabilidad a las mismas concentraciones fue de 83%, 88% y 82.2%, respectivamente (Fig. 8F).

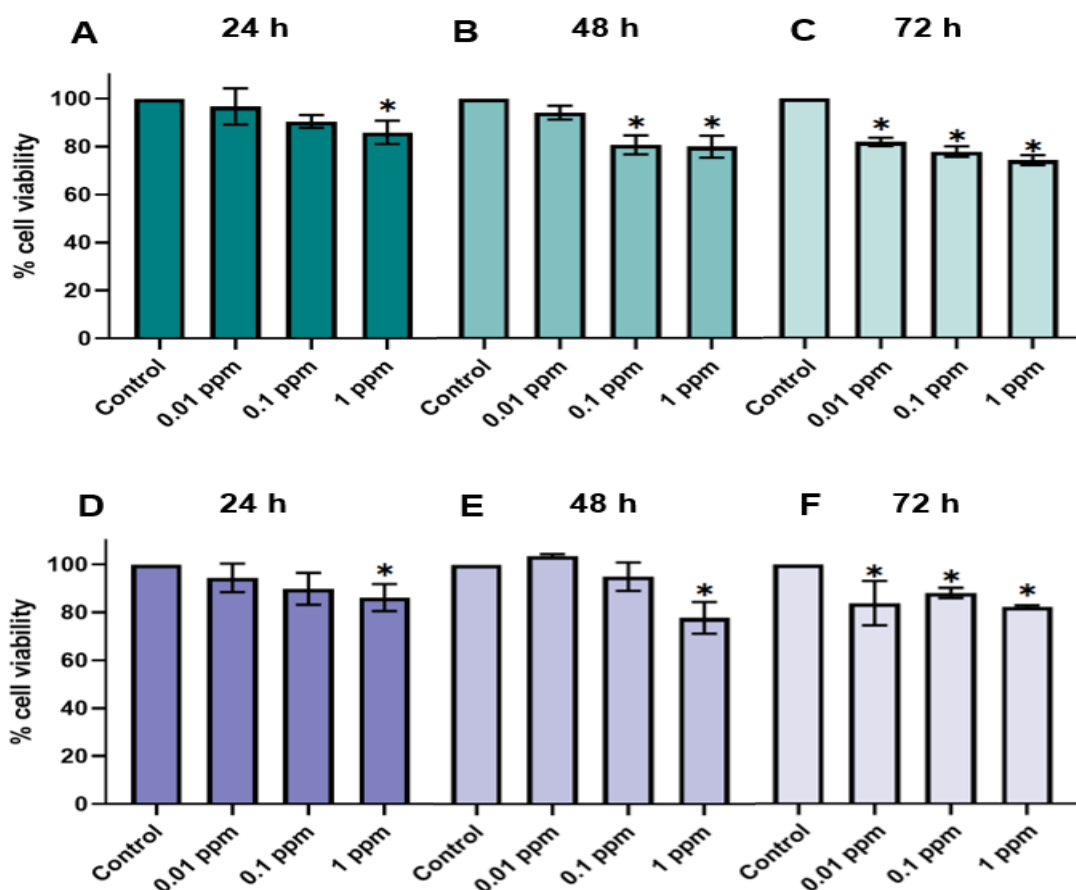


Figura 8: Viabilidad celular ante la exposición de los tratamientos. (A)(B)(C). Porcentaje de viabilidad celular como efecto de los tratamientos con MBAuNPs de Carreón a 24, 48 y 72 horas respectivamente, (D)(E)(F) tratamientos con MBAuNPs de Yuang.

De acuerdo con la ISO 10993-5, los criterios para evaluar la citotoxicidad en células animales son las siguientes: viabilidad celular igual o mayor al 80% no hay citotoxicidad, entre 80-60% la citotoxicidad es leve, entre 60-40% la citotoxicidad es moderada y menores al 40% se considera como fuertemente citotóxico (ISO, 2009). Tomando en cuenta esto se puede reportar que las MBAuNPs de Carreón no fueron citotóxicas a las 24h y 28h de exposición; sin embargo, después de 72h su citotoxicidad fue leve a 1 ppm. Mientras que las MBAuNPs de Yuang no fueron citotóxicas en ningún periodo de tiempo, con excepción del tratamiento con 1ppm a las 48 h que mostró leve citotoxicidad. Con estos resultados se infirió que la citotoxicidad es dependiente de la concentración de oro.

Pearl et al. (2022) pusieron a prueba dos muestras de MBAuNPs (NSt-1 con plasmón de 600nm y NSt-2 con plasmón de 750 nm) en la línea celular A549. Primero sintetizaron AuNSP de 3 nm de diámetro con el protocolo de Duff (Duff et al., 1993) y después las utilizaron de base para sintetizar MBAuNPs con el protocolo de Yuan (Yuan et al., 2012). Se probaron concentraciones de 12, 24, 36, 48 y 60µg/ml y se incubaron por 24 y 48 h. Los resultados de este primer ensayo mostraron que, comparando con el control la viabilidad celular es prácticamente del 100% a concentraciones de entre 12 a 60 µg/ml después de 24 y 48 h de exposición para ambas formas de MBAuNPs. De forma similar, Favi et al. (2015) compararon los efectos de nanoesferas de oro (AuNSP) y MBAuNPs en la viabilidad de células endoteliales a concentraciones de 0.2, 0.4, 2, 4, 20, 40, 200 y 400 µg/ml de ambas nanopartículas con tiempos de exposición de 1 a 4 días. Los resultados obtenidos demostraron que las AuNPs son letales a concentraciones de 40 µg/ml de 1 a 4 días

de exposición, mientras que las MBAuNPs la letalidad se presentó hasta 400 µg/ml. Dado lo anterior, se dice que la citotoxicidad de las AuNPs está estrechamente relacionada con la forma y tamaño de la partícula, así como su método de síntesis. Como se observó en este estudio, aunque las MBAuNPs de Carreón y Yuang están formadas por el mismo núcleo esférico, difieren en la forma de sus picos. Estas diferencias no solo afectan su respuesta óptica, sino también la interacción con las células y la citotoxicidad inducida.

Producción de especies reactivas de oxígeno

En la Figura 9, se muestra la acumulación de ROS en las células EA.hy926 al ser expuestas a las nanopartículas de oro. Se observó que las dos formas de MBAuNPs no afectaron los niveles de ROS en todos los tratamientos establecidos en comparación del control.

Los resultados obtenidos sugieren que las MBAuNPs tanto de Carreón como de Yuang no afectaron los niveles de ROS, lo que indica que no inducen estrés oxidativo en las células de la línea EA.hy926 bajo las condiciones experimentales utilizadas 1, 0.1 y 0.01 ppm.

Las ROS se producen constantemente en el medio intra y extracelular de las células humanas y participan como mensajeros en la señalización redox, lo cual es crucial para el buen funcionamiento fisiológico de la célula. No obstante, en casos específicos, como la exposición a agentes exógenos, los niveles de ROS aumentan y desencadenan una serie de reacciones que dañan macromoléculas como el ADN, proteínas y lípidos (Milkovic et al., 2019). El aumento en los niveles de ROS se ha relacionado con diversas enfermedades metabólicas, neurodegenerativas,

cardiovasculares, entre otras (Hussain et al., 2016). En este contexto, evaluar la producción de ROS ante la exposición a nanopartículas proporciona información importante para determinar la dosificación y la seguridad del tratamiento.

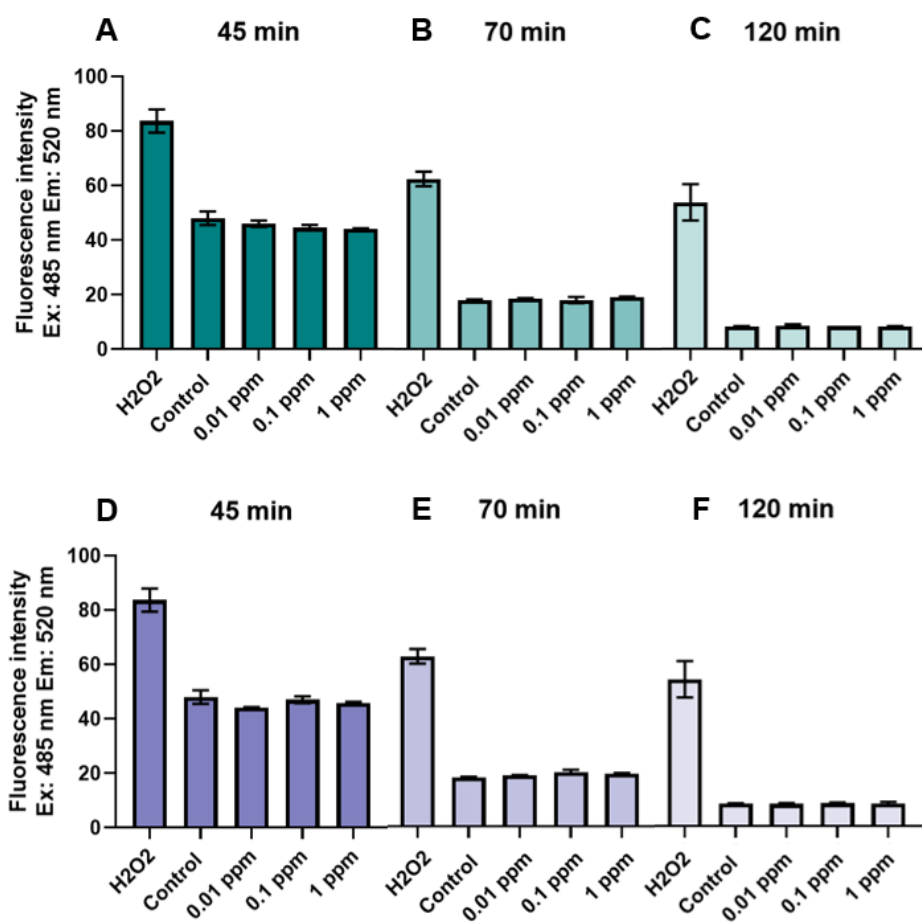


Figura 9: Producción de ROS por las células EA.hy926 ante la exposición a nanopartículas de oro. (A)(B)(C) Lecturas de intensidad de fluorescencia emitida por la presencia de ROS como efecto de los tratamientos con MBAuNPs de Carreón a los 45, 70 y 120 min respectivamente, (D)(E)(F) Tratamientos con MBAuNPs de Yuang.

En diversos estudios se ha reportado que las AuNPs no generan estrés oxidativo en las células. Por ejemplo, Lorenzo-Anota et al. (2021) evaluaron la citotoxicidad de las AuNPs funcionalizadas con quitosano, un polisacárido derivado de la quitina,

en células HUVEC a concentraciones de 25, 50, 75, 100 y 125 μM . Es importante destacar que las nanoesferas fueron sintetizadas mediante el método de Turkevich, el mismo método utilizado para sintetizar las MBAuNPs por Carreón y Yuang. En resumen, se encontró que la producción de ROS es muy baja en comparación con el control y los experimentos realizados con células cancerosas. Por lo tanto, se concluyó que estas nanopartículas son biocompatibles y potencialmente seguras para su uso en diversas aplicaciones médicas, sin inducir estrés oxidativo significativo. Por otro lado, Lai et al. (2015) estudiaron los efectos de AuNPs sin funcionalizar en células endoteliales vasculares (CE). Las células se trataron por 16 h con 2 y 5 ppm de AuNPs, posteriormente, realizaron lecturas de producción de ROS a los 10, 15, 23 y 30 min. Se reportó que los niveles de ROS se mantuvieron por debajo de los niveles basales durante los 4 periodos de tiempo establecidos.

Si bien el ensayo con DCFDA es sensible para medir los niveles de ROS, se puede ver limitado en cuanto a la precisión, esto debido a que se ha encontrado que la conversión de H_2DCFDA en DCF aumenta en presencia de albúmina sérica bovina y en medio de cultivo DMEM (Tetz et al., 2013). A pesar de no haber observado aumento en los niveles de ROS, es importante confirmar que los resultados no se deben a problemas técnicos del ensayo. Por lo anterior, se realizaron ensayos de qRT-PCR con el objetivo de validar los resultados y detectar cambios sutiles pero significativos en algunos genes de respuesta a ROS.

Efectos de los tratamientos con MBAuNPs en la expresión de los genes SOD-1, TXN y GAPDH

Se evaluó la expresión de los genes SOD-1, TXN y GAPDH en la línea celular EA.hy926 con el tratamiento con MBAuNPs (1, 0.1 y 0.01 ppm) durante 24h de exposición. Los niveles de expresión de los genes SOD-1, TXN y GAPDH en los tratamientos con MBAuNPs de Carreón se vieron afectados a concentraciones de 1 y 0.1 ppm comparados con el control ($p < 0.05$), mientras que en el tratamiento con 0.01 ppm de MBAuNPs la expresión de los genes SOD-1, TXN y GAPDH disminuyó hasta el 90% en comparación al control (Fig. 10A, 10B y 10C). Por otro lado, en los tratamientos con MBAuNPs de Yuang se observaron diferencias significativas a las tres concentraciones de las nanopartículas en todos los genes analizados. En particular, para el gen SOD-1, los niveles de expresión no pasaron del 30% en todos los tratamientos (Fig. 10D). Para los genes TXN y GAPDH sucedió algo similar (Fig. 10E y 10F), los niveles de expresión génica no superaron el 20% y 7% en todos los tratamientos, respectivamente. Con estos resultados, se concluyó que los tratamientos con ambas MBAuNPs afectaron de forma significativa la expresión de los genes SOD-1, TXN y GAPDH en la línea celular EA.hy926, los cuales mostraron distintos patrones de expresión en función de la forma y concentración de MBAuNPs.

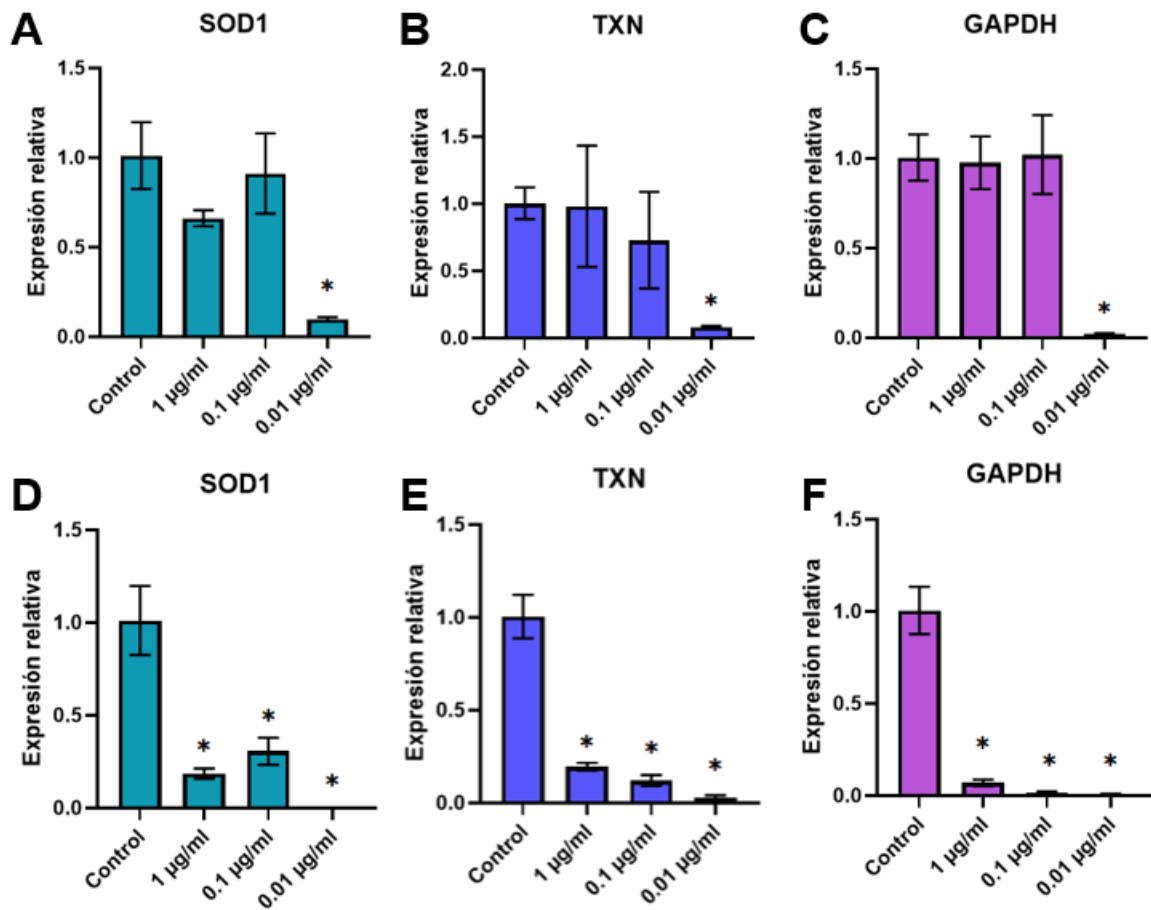


Figura 10: Cambios en la expresión de los genes SOD-1, TXN y GAPDH ante los tratamientos con MBAuNPs de Carreón y Yuang a 24h de exposición. (A, B, C) Niveles de expresión de los genes SOD-1, TXN y GAPDH tras el tratamiento con MBAuNPs de Carreón a concentraciones de 1, 0.1 y 0.01 ppm. (D, E, F) Niveles de expresión de los genes SOD-1, TXN y GAPDH tras el tratamiento con MBAuNPs de Yuang. Los datos se normalizaron tomando como referencia al gen 18S. Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media.

Como mecanismo de defensa ante el aumento excesivo de los niveles de ROS, la célula desarrolló un sistema antioxidante para neutralizar el exceso de ROS, el cual está compuesto principalmente por enzimas detoxificantes como por ejemplo, la superóxido dismutasa (SOD) y la tioredoxina (TXN). Se ha encontrado que la familia de enzimas SOD es la primera defensa contra los radicales superóxido, proceso mediante el cual se mantiene la homeostasis redox y se previene el estrés oxidativo, el cual puede dañar proteínas, lípidos y ADN (He et al., 2017). De manera similar,

las tioredoxinas mantienen la homeostasis redox reparando el ADN y las proteínas al reducir las oxidaciones provocadas por las ROS (Bjørklund et al., 2021).

El estrés oxidativo conduce la expresión diferencial de genes que participan en la respuesta inflamatoria por la activación de diversos factores de transcripción (Hussain et al., 2016). Por lo que medir la expresión de estos genes permite analizar la respuesta ante el estrés oxidativo y el metabolismo de la línea celular EA.hy926 en respuesta a los tratamientos con MBAuNPs de Carreón y Yuang.

SOD-1 es un gen que codifica para la enzima Superóxido dismutasa 1, una proteína que participa en la regulación de ROS, el cual aumenta su expresión en presencia de estrés oxidativo (Terrazzano et al., 2014). Dado que los niveles de expresión de este gen se mantienen similares a los del control en las Figs. 10A y 10D se sugiere que las MBAuNPs no están generando estrés oxidativo como para alterar la expresión de SOD-1. No obstante, es importante considerar que la deficiencia de SOD-1 se ha asociado con la inflamación de diversas patologías, como el cáncer (Hwang et al., 2020). El TXN codifica para una enzima cuya principal función es actuar como donante de electrones a aquellas proteínas que han sido oxidadas debido al estrés oxidativo (Hawkes et al., 2014). Retomando el análisis de las Figuras 10B y 10E, se infiere que no hubo estrés oxidativo dado que los niveles de expresión de TXN en las muestras tratadas con ambas MBAuNPs fueron más bajos o similares a los del control. Al igual que con SOD-1, se ha observado que la baja expresión de TXN está asociada a padecimientos de cáncer (Lim et al., 2012). Esto sugiere que hay una interacción MBAuNPs-célula que no se está considerando y

que provocaría la disminución de la expresión tanto del gen SOD-1 como del gen TXN.

El estrés oxidativo puede inducir respuestas celulares complejas. Se ha encontrado que altos niveles de ROS pueden afectar la estabilidad de los mRNA en el citosol (Mikhed et al., 2015). Si bien GAPDH no está relacionado directamente con la regulación de ROS, se ha reportado que su expresión es susceptible a variaciones en las condiciones celulares (Nicholls et al., 2012). Los resultados de la Figura 10C sugieren que no hay interferencias en la expresión génica en las muestras tratadas en comparación con el control. Sin embargo, se observa una disminución en la expresión del gen a una concentración de 0.01 ppm en la Fig. 10C, así como en todas las concentraciones mostradas en la Figura 10F. Aunque esto podría indicar una posible alteración, se recomienda repetir el ensayo o emplear técnicas adicionales para validar estos resultados. Dado que el gen GAPDH se expresó a 1 ppm, se esperaría que también haya expresión a concentraciones menores de MBAuNPs.

Conclusiones

Las dos formas de MBAuNPs son biocompatibles con las células EA.hy926 después de 24h y 48h de exposición. Sin embargo, se observa una leve citotoxicidad a la concentración de 1 ppm después de 72h con las MBAuNPs de Carreón y a las 48h con las nanopartículas de Yuang. Estos resultados sugieren que la citotoxicidad está relacionada con la concentración de oro.

Los ensayos de estrés oxidativo en las células YXYX indican que la exposición a ambas formas de MBAuNPs no incrementan la acumulación de ROS en las células, lo que sugiere que estas nanopartículas no provocan estrés oxidativo.

En cuanto a los efectos sobre la expresión génica en las células de la línea EA.hy926, no se observa cambios en la expresión de los genes SOD-1 y TXN lo que sugiere que las MBAuNPs no inducen estrés oxidativo.

Por otro lado, la expresión gen GAPDH no se ve afectado por las MBAuNPs, ya que su expresión es similar a la del control. Sin embargo, en presencia de las MBAuNPs de Yuang, la reducción en su expresión sugiere una interferencia en el metabolismo celular.

Perspectivas

- Probar los efectos citotóxicos de las MBAuNPs de Carreón y de Yuang funcionalizadas y sin funcionalizar en cultivos primarios de células endoteliales y en una línea celular como PC-3.
- Evaluar los niveles de ROS producidos por dichos cultivos en presencia de las MBAuNPs.
- Evaluar los cambios en la expresión de otros genes reguladores de ROS o bien mediante RNAseq.
- Analizar los efectos en proteínas citoplasmáticas, mitocondriales y nucleares ante los tratamientos con MBAuNPs.

Bibliografía

- Agita, A., Alsagaff, M.T., 2017. Inflammation, Immunity, and Hypertension. *Acta Medica Indones.* 49, 158–165.
- ATCC, n.d. EA.hy926 - CRL-2922 | ATCC [WWW Document]. URL <https://www.atcc.org/products/crl-2922> (accessed 5.8.23).
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M.R., 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotechnol.* 4, 634–641. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.242>
- Bala, V.-M., Lampropoulou, D.I., Grammatikaki, S., Kouloulis, V., Lagopati, N., Aravantinos, G., Gazouli, M., 2023. Nanoparticle-Mediated Hyperthermia and Cytotoxicity Mechanisms in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 296. <https://doi.org/10.3390/ijms25010296>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., Rizzolio, F., 2019. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* 25, 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Beik, J., Abed, Z., Ghoreishi, F.S., Hosseini-Nami, S., Mehrzadi, S., Shakeri-Zadeh, A., Kamrava, S.K., 2016. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *J. Controlled Release* 235, 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.062>
- Bjørklund, G., Zou, L., Wang, J., Chasapis, C.T., Peana, M., 2021. Thioredoxin reductase as a pharmacological target. *Pharmacol. Res.* 174, 105854. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105854>
- Carreón Álvarez, C. de la L., 2016. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro funcionalizadas con seroalbúmina bovina para aplicaciones biomédicas (Tesis de maestría). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, SLP.
- Chakraborty, S., Rahman, T., 2012. The difficulties in cancer treatment. *ecancermedicallscience* 6, ed16. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2012.ed16>
- Che, M., Wang, R., Li, X., Wang, H.-Y., Zheng, X.F.S., 2016. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov. Today* 21, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.10.001>
- Chenthamara, D., Subramaniam, S., Ramakrishnan, S.G., Krishnaswamy, S., Essa, M.M., Lin, F.-H., Qoronfleh, M.W., 2019. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomater. Res.* 23, 20. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0166-x>
- Collet, C., Messens, J., 2010. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid. Redox Signal.* 13. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3114>
- Duff, D.G., Baiker, A., Edwards, P.P., 1993. A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation. *Langmuir* 9, 2301–2309. <https://doi.org/10.1021/la00033a010>
- Esquivel-Hernández, L.Y., 2018. Participación de la enzima superóxido dismutasa y la producción del peróxido de hidrógeno en la tolerancia al aluminio de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. [WWW Document]. Repocitorio

- CICY. URL <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1139> (accessed 5.13.24).
- Favi, P.M., Gao, M., Johana Sepúlveda Arango, L., Ospina, S.P., Morales, M., Pavon, J.J., Webster, T.J., 2015. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars. *J. Biomed. Mater. Res. A* 103, 3449–3462. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35491>
- Gerosa, C., Crisponi, G., Nurchi, V.M., Saba, L., Cappai, R., Cau, F., Faa, G., Van Eyken, P., Scartozzi, M., Floris, G., Fanni, D., 2020. Gold Nanoparticles: A New Golden Era in Oncology? *Pharmaceuticals* 13, 192. <https://doi.org/10.3390/ph13080192>
- Ghareeb, H., Metanis, N., 2020. The Thioredoxin System: A Promising Target for Cancer Drug Development. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 26, 10175–10184. <https://doi.org/10.1002/chem.201905792>
- Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J.H., Tankou, S.K., Hester, L.D., Ferris, C.D., Hayward, S.D., Snyder, S.H., Sawa, A., 2005. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.* 7, 665–674. <https://doi.org/10.1038/ncb1268>
- Harish, V., Tewari, D., Gaur, M., Yadav, A.B., Swaroop, S., Bechelany, M., Barhoum, A., 2022. Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: Bioimaging, Biosensing, Drug Delivery, Tissue Engineering, Antimicrobial, and Agro-Food Applications. *Nanomaterials* 12. <https://doi.org/10.3390/nano12030457>
- Hawkes, H.-J.K., Karlenius, T.C., Tonissen, K.F., 2014. Regulation of the human thioredoxin gene promoter and its key substrates: A study of functional and putative regulatory elements. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1840, 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.013>
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X., 2017. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 44, 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M.C.B., Rahu, N., 2016. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 7432797. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Hwang, J., Jin, J., Jeon, S., Moon, S.H., Park, M.Y., Yum, D.-Y., Kim, J.H., Kang, J.-E., Park, M.H., Kim, E.-J., Pan, J.-G., Kwon, O., Oh, G.T., 2020. SOD1 suppresses pro-inflammatory immune responses by protecting against oxidative stress in colitis. *Redox Biol.* 37, 101760. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101760>
- INEGI, 2024. Estadísticas de Defunciones Registradas (EDR) de enero a junio de 2023 (preliminar).
- ISO, 2009. ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity [WWW Document]. Organ. Int. Norm. URL <https://www.iso.org/standard/36406.html> (accessed 5.21.24).

- Johnson, F., Giulivi, C., 2005. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol. Aspects Med., Trace Elements and Human Health* 26, 340–352. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.006>
- Juan, C.A., Pérez de la Lastra, J.M., Plou, F.J., Pérez-Lebeña, E., 2021. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Lai, T.-H., Shieh, J.-M., Tsou, C.-J., Wu, W.-B., 2015. Gold nanoparticles induce heme oxygenase-1 expression through Nrf2 activation and Bach1 export in human vascular endothelial cells. *Int. J. Nanomedicine* 10, 5925–5939. <https://doi.org/10.2147/IJN.S88514>
- Lim, J.Y., Yoon, S.O., Hong, S.W., Kim, J.W., Choi, S.H., Cho, J.Y., 2012. Thioredoxin and thioredoxin-interacting protein as prognostic markers for gastric cancer recurrence. *World J. Gastroenterol. WJG* 18, 5581–5588. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i39.5581>
- Logothetidis, S., 2012. Nanotechnology: Principles and Applications, in: Logothetidis, Stergios (Ed.), *Nanostructured Materials and Their Applications, NanoScience and Technology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–22. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22227-6_1
- Lorenzo-Anota, H.Y., Zarate-Triviño, D.G., Uribe-Echeverría, J.A., Ávila-Ávila, A., Rangel-López, J.R., Martínez-Torres, A.C., Rodríguez-Padilla, C., 2021. Chitosan-Coated Gold Nanoparticles Induce Low Cytotoxicity and Low ROS Production in Primary Leucocytes, Independent of Their Proliferative Status. *Pharmaceutics* 13, 942. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070942>
- Lu, J., Holmgren, A., 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med., Antioxidants* 66, 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
- Méndez-Medrano, A., Quilumba-Dután, V., 2021. Synthesis and Characterization of Nanostructured Materials.
- Michiels, C., 2003. Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* 196, 430–443. <https://doi.org/10.1002/jcp.10333>
- Mikhed, Y., Görlach, A., Knaus, U.G., Daiber, A., 2015. Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair. *Redox Biol.* 5, 275–289. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.05.008>
- Milkovic, L., Cipak Gasparovic, A., Cindric, M., Mouthuy, P.-A., Zarkovic, N., 2019. Short Overview of ROS as Cell Function Regulators and Their Implications in Therapy Concepts. *Cells* 8, 793. <https://doi.org/10.3390/cells8080793>
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., Malik, A.B., 2014. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- National Cancer Institute, 2015. Treatment for Cancer [WWW Document]. URL <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment> (accessed 3.7.24).
- Nicholls, C., Li, H., Liu, J.-P., 2012. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39, 674–679. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x>

- Pearl, W.G., Perevedentseva, E.V., Karmenyan, A.V., Khanadeev, V.A., Wu, S.-Y., Ma, Y.-R., Khlebtsov, N.G., Cheng, C.-L., 2022. Multifunctional plasmonic gold nanostars for cancer diagnostic and therapeutic applications. *J. Biophotonics* 15, e202100264. <https://doi.org/10.1002/jbio.202100264>
- Ranjha, M.M.A.N., Shafique, B., Rehman, A., Mehmood, A., Ali, A., Zahra, S.M., Roobab, U., Singh, A., Ibrahim, S.A., Siddiqui, S.A., 2022. Biocompatible Nanomaterials in Food Science, Technology, and Nutrient Drug Delivery: Recent Developments and Applications. *Front. Nutr.* 8, 778155. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.778155>
- Reschke, M., Piotrowski-Daspit, A.S., Pober, J.S., Saltzman, W.M., 2022. Nucleic Acid Delivery to the Vascular Endothelium. *Mol. Pharm.* 19, 4466–4486. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00653>
- Senoner, T., Dichtl, W., 2019. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients* 11, 2090. <https://doi.org/10.3390/nu11092090>
- Sharma, A., Jasrotia, S., Kumar, A., 2023. Effects of Chemotherapy on the Immune System: Implications for Cancer Treatment and Patient Outcomes. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02781-2>
- Sies, H., Belousov, V.V., Chandel, N.S., Davies, M.J., Jones, D.P., Mann, G.E., Murphy, M.P., Yamamoto, M., Winterbourn, C., 2022. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 499–515. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>
- Terrazzano, G., Rubino, V., Damiano, S., Sasso, A., Petrozziello, T., Ucci, V., Palatucci, A.T., Giovazzino, A., Santillo, M., De Felice, B., Garbi, C., Mondola, P., Ruggiero, G., 2014. T cell activation induces CuZn superoxide dismutase (SOD)-1 intracellular re-localization, production and secretion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1843, 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.10.020>
- Tetz, L.M., Kamau, P.W., Cheng, A.A., Meeker, J.D., Loch-Caruso, R., 2013. Troubleshooting the dichlorofluorescein assay to avoid artifacts in measurement of toxicant-stimulated cellular production of reactive oxidant species. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 67, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.01.195>
- Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J., 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>
- Vines, J.B., Yoon, J.-H., Ryu, N.-E., Lim, D.-J., Park, H., 2019. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front. Chem.* 7.
- White, M.R., Garcin, E.D., 2017. D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Structure and Function, in: Harris, J.R., Marles-Wright, J. (Eds.), *Macromolecular Protein Complexes: Structure and Function*. Springer International Publishing, Cham, pp. 413–453. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46503-6_15
- WHO, n.d. Cancer [WWW Document]. World Health Organ. URL <https://www.who.int/health-topics/cancer> (accessed 3.7.24).

- Xu, J., Su, X., Burley, S.K., Zheng, X.F.S., 2022. Nuclear SOD1 in Growth Control, Oxidative Stress Response, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Cancer. *Antioxidants* 11, 427. <https://doi.org/10.3390/antiox11020427>
- Yang, B., Chen, Y., Shi, J., 2019. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem. Rev.* 119, 4881–4985. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00626>
- Yuan, H., Khoury, 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, 075102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/7/075102>