



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**“SÍNTESIS DE UN SISTEMA A BASE DE NP_sAu-3MPS-MTX Y
SU EVALUACIÓN EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER
CERVICOUTERINO (HeLa) Y MELANOMA (B16-F10) EN
CULTIVOS CELULARES”**

TESIS

Presenta:

MANJURY JATZIRY HERNÁNDEZ ESPARZA

**A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería
Química como requisito parcial para obtener el grado de:**

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA**

Dirigida por:

D. C. Rafael Huirache Acuña

D. C. Ilaria Fratoddi

Morelia, Mich.

Febrero, 2024.

RESUMEN

SÍNTESIS DE UN SISTEMA A BASE DE NPsAu-3MPS-MTX Y SU EVALUACIÓN EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER CERVICOUTERINO (HeLa) Y MELANOMA (B16-F10) EN CULTIVOS CELULARES

Por

Manjury Jatziry Hernández Esparza

Febrero del 2024

Doctora en Ciencias en Ingeniería Química

Dirigida por: D. C. Rafael Huirache Acuña, D. C. Ilaria Fratoddi.

En los últimos años, el incremento en el índice de mortalidad a nivel mundial ha sido causado por enfermedades de las cuales no existe cura ni un tratamiento efectivo que pueda disminuir los daños ocasionados a órganos aledaños, como es el caso del cáncer, el principal problema de los tratamientos quimioterápicos son los efectos secundarios en diversos órganos debido a la toxicidad de las moléculas que se usan para combatir el cáncer y no el ataque directo únicamente a las células malignas. Por ello, desde la nanotecnología se exploran rutas alternativas, por ejemplo, el transporte de fármacos hasta el tumor utilizando nanopartículas o los tratamientos alternativos a los fármacos, como la hipertermia, elevación de temperatura local, entre otros.

Esta investigación presenta una evaluación de un material híbrido basado en nanopartículas de oro (NPsAu), estabilizadas con el tiol 3-mercaptopropanosulfonato (3MPS) y cargadas con el fármaco metotrexato (MTX). El nanosistema NPsAu-3MPS-MTX se ensayó para el tratamiento del cáncer de cuello de útero y el melanoma, utilizando las líneas celulares de melanoma B16-F10 y HeLa. Las pruebas realizadas en cultivos celulares evaluaron la eficacia del nanosistema estudiado sobre las células tumorales, así como su toxicología.

Palabras clave: Cáncer, nanotecnología, metotrexato, cultivos celulares.

ABSTRACT

In recent years, the increase in the mortality rate worldwide has been caused by diseases for which there is no cure or effective treatment that can reduce the damage caused to surrounding organs, as is the case of cancer, the main problem of chemotherapy treatments are the side effects in various organs due to the toxicity of the molecules used to fight cancer and not the direct attack only to malignant cells. For this reason, nanotechnology is exploring alternative routes, for example, the transport of drugs to the tumor using nanoparticles or alternative treatments to drugs, such as hyperthermia, local temperature elevation, among other.

This research presents an evaluation of a hybrid material based on gold nanoparticles (AuNPs) stabilized with the thiol 3-mercaptopropanesulfonate (3MPS) and loaded with the drug methotrexate (MTX). The AuNPs-3MPS-MTX nanosystem was tested for the treatment of cervical cancer and melanoma, using the B16-F10 and HeLa melanoma cell lines. Tests performed on cell cultures evaluated the efficacy of the studied nanosystem on tumor cells, as well as its toxicology.

AGRADECIMIENTOS

El apoyo de este trabajo fue proporcionado por los siguientes proyectos: Proyectos CIC-UMSNH 2023 y PICIR-047. IF y SC reconocen el apoyo financiero de la Universidad Sapienza de financiación Beca Ateneo Ricerca 2020 (RM120172B6B660AB) y Ateneo Arrozrca 2022 (RM1221867C322C1), de igual manera el apoyo financiero brindado por el PAPIIT-UNAM AI204223.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	8
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1 Las nanopartículas	12
2.2 Subtipos de nanopartículas de Au	13
2.3 Técnicas de síntesis	15
2.4 Aplicaciones de las nanopartículas	16
2.5 Importancia en la bio-nanotecnología	17
2.6 El cáncer	19
2.7 El cáncer cérvico uterino	20
2.7.1 Virus del papiloma humano	21
2.7.2 Tratamiento del cáncer cervicouterino	23
2.8 Cáncer de piel	24
2.8.1 Melanoma	24
2.8.2 Tratamientos del melanoma	25
2.8.3 Metotrexato	26
3. ANTECEDENTES	28
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
5. JUSTIFICACIÓN	30
6. HIPÓTESIS	31
7. OBJETIVOS	32
7.1 Objetivo General	32
7.2 Objetivos específicos	32
8. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	33
8.1 Síntesis de NPsAu-3-mercaptopropanosulfonato (NPsAu-3MPS)	33
8.2 Incorporación de metotrexato en NPsAu-3MPS (NPsAu-3MPS-MTX)	33
8.3 Caracterización de los nanomateriales	33
8.3.1 Análisis por dispersión de la luz dinámica (DLS)	33
8.3.2 Análisis por espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis)	34
8.3.4 Análisis por difracción de rayos X (XRD)	34
8.3.5 Análisis por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	34

8.3.6	Análisis por microscopia electrónica de transmisión (TEM)	35
8.3.7	Análisis por microscopia de fuerza atómica (AFM)	35
8.4	Cultivo de células de melanoma y células HeLa	35
8.5	Ensayos de viabilidad celular por reducción de MTT.....	36
8.6	Detección de las especies reactivas de oxígeno (ERO)	37
8.6.1	Cultivo celular para la detección de ERO	37
8.7	Permeabilidad de la membrana celular	38
8.8	Ensayo de muerte celular por apoptosis y necrosis	38
8.9	Evaluación de la captación de NPsAu	38
8.10	Análisis estadístico	39
9.	RESULTADOS	40
9.1	Síntesis de NPsAu funcionalizadas con 3MPS	40
9.2	Síntesis del conjugado NPsAu-3MPS-MTX.....	41
9.3	Viabilidad celular de células HeLa y células del melanoma B16-F10	46
9.4	Permeabilidad de la membrana celular de las células B16-F10 y HeLa ...	46
9.5	Generación de ERO en células HeLa y células de melanoma B16-F10	47
9.6	Determinación de la muerte celular por apoptosis y necrosis para las células B16F10 y HeLa	48
9.7	Determinación de la internalización de las NPsAu en células B16-F10 y HeLa	50
10.	DISCUSIÓN	51
11.	CONCLUSIONES	55
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Mapa genómico del VPH16.....	13
Fig. 2 Estructura química del MTX.....	16
Fig. 3 Efecto del MTX.....	17
Fig. 4 Espectro UV-vis de NPsAu-3MPS.....	29
Fig. 5 Espectro DLS de NPsAu-3MPS.....	29
Fig. 6 Difractograma de XRD de NPsAu-3MPS.....	30
Fig. 7 Espectro UV-vis de NPsAu-3MPS y NPsAu-MTX.....	32
Fig. 8 FT-IR del MTX	32
Fig. 9 FT-IR de NPsAu-3MPS-MTX	32
Fig. 10 DLS y potencial Z.....	33
Fig. 11 FE-SEM y AFM de NPsAu-3MPS-MTX.....	35
Fig. 12 Viabilidad celular.....	36
Fig. 13 Permeabilidad celular.....	37
Fig. 14 Producción de ERO.....	38
Fig. 15 Muerte celular.....	39
Fig. 16 Internacionalización de NPs.....	40
Fig. 17 FE-SEM de NPsAu-3MPS-MTX.....	42

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el uso de la nanotecnología en el campo biomédico ha suscitado un gran interés en el diagnóstico y tratamiento de ciertas enfermedades importantes, como el cáncer. Este interés surge debido a los efectos tóxicos notificados de los fármacos para el tratamiento del cáncer. En este contexto, la selección de un sistema de transporte adecuado para liberar la sustancia activa desempeña un papel crucial. La nanotecnología no sólo mejora la solubilidad, estabilidad y biodistribución¹ del fármaco, sino que también permite una liberación mínimamente invasiva. La capacidad de fabricar dispositivos a nanoescala facilita su paso a través de poros y membranas celulares. Además, el control de la liberación del fármaco aumenta su eficacia, por lo que es esencial tener en cuenta la dosis requerida, el tamaño, la morfología y las propiedades superficiales del compuesto. Cuando las nanopartículas son capaces de asociarse a órganos, tejidos o células dañadas específicos y liberar el principio activo *in situ*, puede reducirse la toxicidad del fármaco. Por otro lado, la liberación gradual del fármaco en función de las necesidades del paciente ayuda a mitigar los posibles efectos adversos que pueden derivarse de la administración directa incontrolada del fármaco²⁻³.

El uso de fármacos nanoparticulados permite alcanzar niveles de sobresaturación que antes sólo se conseguían al pasar de un fármaco cristalino a uno amorfo. El tamaño de las partículas desempeña un papel crucial en la velocidad de disolución de los fármacos. La reducción del tamaño de partícula puede aumentar significativamente la velocidad de disolución y, en consecuencia, mejorar la biodisponibilidad⁴. Este efecto puede conducir a una mejor biodisponibilidad del fármaco. Si la nanopartícula se recubre con un polímero, la liberación se controla mediante la difusión del fármaco a través de la membrana polimérica, haciendo que el recubrimiento de la membrana actúe como barrera de liberación.

Las nanopartículas de oro (NPsAu) han demostrado su utilidad como portadoras de fármacos y plataformas de diagnóstico debido a su tamaño, ausencia de toxicidad, fácil funcionalización y elevada relación superficie/volumen⁵. El uso de NPsAu ha mejorado la eficacia de las terapias contra el cáncer al aumentar la liberación de fármacos en el tumor, debido a sus propiedades fisicoquímicas distintivas. Otros

estudios han puesto de relieve el potencial de las NPsAu como portadoras de fármacos biocompatibles o como potenciadoras de la eficacia terapéutica. Por ejemplo, las NPsAu ligadas a platino mostraron citotoxicidad en la línea celular de cáncer de pulmón A549⁵. Además, un complejo doxorubicina-NPsAu indujo la apoptosis y aumentó la regulación de genes supresores de tumores en células A549⁶. Por otra parte, las NPsAu cargadas con paclitaxel han demostrado su eficacia en comparación con el fármaco libre para inducir citotoxicidad en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 y en la línea celular no cancerosa HEK293. Estas NPsAu demostraron menor toxicidad en células normales que en células de cáncer de mama⁷.

Las NPsAu conjugadas con ácido retinoico-PEG-tiol mostraron una potencia seis veces mayor que el ácido retinoico-polietilenglicol-tiol solo cuando se administraron a la misma dosis en células de cáncer de cuello de útero⁸. Además, Paino *et. al.* (2018) realizaron un análisis comparativo de los efectos citotóxicos de las NPsAu recubiertas con citrato sódico o dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) en células de hepatoma HepG2 y células mononucleares normales de sangre periférica (PBMCs)⁹. La utilización de NPsAu de 15 nm portadoras de cisplatino condujo a una reducción significativa de la densidad de fibroblastos asociados a cáncer colorrectal (CAFs)¹⁰. En resumen, la estabilidad y biocompatibilidad demostradas por el complejo NPsAu implican que podría ser muy prometedor como enfoque terapéutico para abordar diferentes tipos de cáncer.

El desarrollo de una nanoformulación basada en NPsAu ultrafinas conjugadas con MTX permitió mejorar la eficacia del fármaco y reducir al mínimo su toxicidad en el tratamiento del cáncer de mama. El tamaño ultrapequeño de las NPsAu (5 nm) facilitó una mejor captación¹¹. En comparación con otras nanoplataformas, el sistema híbrido NPsAu-3MPS-MTX aprovecha su capacidad en el tratamiento del cáncer debido a la presencia de MTX cargado (un fármaco contra el cáncer), mientras que otras terapias contra el cáncer basadas en nanomateriales, como el efecto de oxidación relacionado con la ferroptosis¹², la amplificación del estrés oxidativo¹³ y la irradiación de luz inducida por calor (terapias fototérmica y fotodinámica)¹⁴ no dependen de la presencia de un fármaco específico en las nanoestructuras, por lo que son menos específicas. La elevada relación superficie-volumen permite la funcionalización múltiple, tanto *in situ* como *ex situ*, con diferentes agentes bioactivos¹⁵. Además, el oro nanoestructurado no

es propenso a la oxidación en comparación con otros iones metálicos libres (por ejemplo, Fe^{2+} , Cu^{2+} , etc.) y mostró una capacidad de penetración significativa en células cancerosas de hasta el 70%¹⁶. Además, la capacidad de controlar su tamaño y funcionalización ha sido estudiada por Bessar *et al.* (2018) que examinaron la eficacia de las MTX-NPsAu para el tratamiento de la psoriasis¹⁷. Dado que los atributos fisicoquímicos desempeñan un papel importante en la difusión de las NPs, existe la preocupación por encontrar metodologías de síntesis que influyan en estos atributos y sean eficientes para aplicaciones posteriores. Por ello, este proyecto de investigación se centra en el estudio de la formulación y evaluación de un material híbrido basado en nanopartículas de oro (NPsAu), estabilizadas con el tiol hidrofílico 3-mercaptopropanesulfonato (3MPS) y cargadas con el fármaco metotrexato (MTX). Como se ha señalado, los agentes funcionalizantes cortos y cargados negativamente mostraron mejores niveles de captación intracelular en los queratinocitos de piel humana (HaCaT) y en las células epiteliales humanas de adenocarcinoma colorrectal (CaCo-2), en comparación con las AuNPs largas cubiertas con PEG-COOH y PEG-NH₂¹⁸. Así pues, se eligió el tiol 3MPS como agente estabilizador/funcionalizador de las NPsAu, ya que presenta varias ventajas en comparación con otros ligandos de superficie: (i) el grupo terminal -SH garantiza una funcionalización covalente a través del enlace Au-S, evitando la liberación del agente de superficie durante los estudios de aplicación, (ii) al llevar un grupo -SO₃⁻ cargado negativamente confiere un comportamiento hidrófilo al coloide final de NPsAu, esencial en aplicaciones biomédicas, y (iii) la fracción de sulfonato se ha identificado como la principal contrapartida para la interacción MTX a través de fuerzas electrostáticas¹⁹. Además, las NPsAu-3MPS y las NPsAu-3MPS-MTX ensayadas *in vitro* en modelos cutáneos y en estudios *in vivo* en ratones con psoriasis inducida por imiquimod no mostraron citotoxicidad, induciendo una disminución de la gravedad del eritema y la descamación de las lesiones cutáneas en los ratones tratados^{17,20}. Las NPsAu sintetizadas, con un tamaño aproximado de 5 nm, contienen aproximadamente 720 moléculas de tiol en una sola nanopartícula, y la muestra cargada con el fármaco, NPsAu-3MPS-MTX, mostró un porcentaje de carga del $80 \pm 5\%$, con una liberación del 80% en una hora y de hasta el 95% en 24 horas¹⁷. Se sabe

que no hay referencias en la literatura sobre el uso de este nanosistema NPsAu-3MPS-MTX para el tratamiento del cáncer de cuello de útero y el melanoma.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Las nanopartículas

La nanociencia y la nanotecnología se presentan como un área de investigación en el estudio de los materiales donde convergen diversas ramas del conocimiento que permiten estudiar fenómenos desconocidos que ocurren a nivel atómico y molecular.

La trascendencia de la nanotecnología reside en que en mundo nanométrico los materiales pueden lograr o acentuar propiedades diferentes a las que tienen a escala macroscópica; principalmente, la nanotecnología tiene como objeto el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala nanométrica¹⁶.

La nanotecnología es un campo de investigación interdisciplinario que involucra química, ingeniería, biología y medicina.

Las nanopartículas son típicamente más pequeñas que varios cientos de nanómetros, en comparación con las moléculas biológicas grandes, como las enzimas, los receptores y los anticuerpos. Con un tamaño de aproximadamente cien a diez mil veces más pequeño que las células humanas, estas nanopartículas pueden ofrecer interacciones con biomoléculas tanto en la superficie como dentro de las células, lo que puede revolucionar el diagnóstico y el tratamiento de ciertas enfermedades¹⁷.

Las nanopartículas mejor estudiadas incluyen puntos cuánticos^{22,23}, nanotubos de carbono²⁴, nanopartículas paramagnéticas²⁵, liposomas²⁶, nanopartículas de oro²⁷ y muchos otros^{28,29}.

Las nanopartículas inorgánicas son particularmente atractivas como piezas de construcción y aplicaciones en la biomedicina, debido a sus propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y catalíticas únicas, muchas de las cuales pueden ser moduladas simplemente cambiando su tamaño, forma, o la funcionalización de la superficie de la nanopartícula, sin cambiar la composición del material, dentro de estas, se encuentran las nanopartículas de oro (NPsAu), una de las características principales de las NPsAu es su preciso control sobre su tamaño, composición y funcionalidad; representan una opción eficaz para los sistemas de administración de fármacos tópicos gracias a su pequeño tamaño, no toxicidad, facilidad de funcionalización y alta relación

superficie-volumen³⁰. Se utilizan como herramientas de diagnóstico / imagen, agentes radiosensibilizadores, fármacos y sistemas de suministro de genes, terapia fototérmica, biosensores e ingeniería de tejidos. En todas estas aplicaciones biomédicas, la forma, dimensión (2–500 nm) y funcionalización de superficie (natural, positivo, negativo, bioconjugación) juega un papel clave en la estabilidad, biodistribución y escape de las NPsAu de Sistema RES, liberación cinética y captación celular (fagocitosis, difusión, endocitosis)³¹. Por otra parte, las NPsAu funcionalizados son utilizadas como prometedores sistemas de administración de fármacos para fármacos hidrófobos, como los esteroides o los medicamentos contra el cáncer¹⁷.

2.2 Subtipos de nanopartículas de Au

Existen muchos subtipos de nanopartículas de oro según el tamaño, la forma y las propiedades físicas, como se describen a continuación:

Nanoesferas de oro: También conocidas como coloides de oro, de 2 nm a más de 100 nm de diámetro se pueden sintetizar mediante la reducción controlada de una solución acuosa de HAuCl_4 utilizando diferentes agentes reductores en condiciones variables. El agente reductor más utilizado es el citrato, que puede producir nanoesferas de oro casi monodispersas^{32,33}. El tamaño de las nanoesferas se puede controlar variando la proporción de citrato / oro. Generalmente, una cantidad más pequeña de citrato producirá nanoesferas más grandes. Las principales limitaciones de este método son el bajo rendimiento y la restricción de usar agua como disolvente. Un método de dos fases, inspirado en el sistema de dos fases utilizado por Faraday en 1857, capaz de producir nanoesferas de oro térmicamente y estables al aire de dispersidad, las relaciones molares tiol / oro pueden afectar el tamaño promedio de las nanoesferas. Las proporciones de tiol / oro más grande y la adición más rápida del reductor en soluciones enfriadas producirán nanoesferas de oro más pequeñas y más monodispersas³⁴.

Nanorods de oro: Se suelen sintetizar utilizando el método de plantilla, basado en la deposición electroquímica de oro dentro de los poros de policarbonato nanoporoso o membranas de plantilla de alúmina^{35,36}. El diámetro del nanorod de oro

se determina por el diámetro de poro de la membrana de la plantilla, mientras que la longitud del nanorod se puede controlar a través de la cantidad de oro depositado dentro de los poros de la membrana. Una desventaja fundamental de este método es el bajo rendimiento, ya que solo se prepara una monocapa de nanorods; la síntesis mediada por semillas, es el método más establecido para la preparación, puede proporcionar relaciones de aspecto más altas que las preparadas por otros métodos^{37,38}, se producen mediante la reducción química de una sal de oro con un agente reductor fuerte como el NaBH_4 .

Nanoshells de oro: La composición y las dimensiones de sus capas se pueden diseñar y fabricar con picos de resonancia de plasmón de superficie (SPR) que van desde la región visible a la NIR³⁹, se pueden preparar recubriendo perlas de sílice o polímero con cáscaras de oro de espesor variable^{39,40}. Para recubrir las nanopartículas de sílice con oro en un ambiente acuoso, se usa una técnica de crecimiento sembrado. Pueden unirse pequeñas nanoesferas de oro (2–4 nm de diámetro) al núcleo de sílice utilizando un silano terminado en amina como molécula de revestimiento, lo que permite que se reduzca el oro adicional hasta que las partículas se unan³⁹. El diámetro del nanoshell de oro está determinado en gran medida por el diámetro del núcleo de sílice, y el grosor de la cubierta se puede controlar a través de la cantidad de oro depositado en la superficie del núcleo; también se pueden sintetizar a través de la formación de nanopartículas de oro in situ utilizando partículas termosensibles de núcleo-cáscara como plantilla⁴¹. El uso de microgel como núcleo ofrece una agregación de partículas significativamente reducida, así como un control del grosor de las nanocarcasas de oro utilizando un baño de oro no electrolítico.

Nanocubos de oro: Se han sintetizado mediante una reacción de reemplazo galvánico entre los nanotubos de plata truncados y el HAuCl_4 acuoso⁴². Las nanoestructuras de plata con morfologías controladas se pueden generar a través de la reducción de polirol, donde AgNO_3 se reduce con etilenglicol para generar átomos de plata y luego nanocristales. La posterior adición de átomos de plata a los nanocristales produce las nanoestructuras deseadas mediante el control de las estructuras cristalinas de los nanocristales de plata en presencia de poli (vinilpirrolidona), un polímero que

puede unirse selectivamente a la superficie. Las nanoestructuras de plata, utilizadas como plantilla de sacrificio, pueden transformarse en nanoestructuras de oro con interiores huecos a través de la sustitución galvánica^{43,44}. La dimensión y el espesor de la pared de las nanocages de oro resultantes podrían controlarse fácilmente, con una precisión muy alta, ajustando la relación molar de plata a H₂AuCl₄.

Nanopartículas SERS: Es una técnica óptica que ofrece muchas ventajas, como la fluorescencia y la quimioluminiscencia; incluida una mejor sensibilidad, altos niveles de multiplexación, robustez y un rendimiento superior en la sangre y otras matrices biológicas^{45,46}. Básicamente se utilizan nanoesferas de oro modificadas, ya sea con oligonucleótidos⁴⁷, polietilglicol (PEG) tiolado⁴⁸, o un recubrimiento de sílice⁴⁹. Es de gran importancia el uso de grupos tioles para mejorar la biocompatibilidad.

2.3 Técnicas de síntesis

En la actualidad, existe un gran número de investigaciones en el mundo para perfeccionar, afinar y descubrir técnicas experimentales que produzcan nanoestructuras. Suelen agruparse en dos categorías^{50,51}:

- **Top-down o de arriba-abajo:** Técnica que consiste en la división de sólidos másicos en porciones más pequeñas, se inicia con una pieza grande de material y a través de grabado o molienda se obtiene de ella una nanoestructura mediante la remoción del material; esto puede hacerse mediante técnicas de alta precisión como las litográficas; este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, métodos químicos, y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados³¹. Involucra también principalmente métodos físicos que describen la evaporación térmica, la preparación de clusters gaseosos, la implantación de iones, el depósito químico en fase vapor y la molienda o activación mecanoquímica. Las técnicas ofrecen confiabilidad y con ellas se obtienen dispositivos bastante complejos, sin embargo, tienen la desventaja de requerir mucha energía y generar desperdicios⁵².

- **Bottom-up o de abajo-arriba:** Técnica que consiste en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución. Se pueden separar en tres partes⁵³:

a) **Síntesis química:** Método para producir materias primas como moléculas o partículas, que se puedan utilizar directamente como productos o bien, para fabricar materiales más avanzados o complejos.

b) **Autoensamble:** Técnica en la que, los átomos o moléculas se ordenan a sí mismas dentro de nanoestructuras mediante interacciones físicas y/o químicas entre las unidades básicas, este ha ocurrido en la naturaleza durante todo el tiempo, pues es la base de la formación de todo organismo vivo. Su uso en la industria es relativamente nuevo, produce pocos desperdicios y utiliza poca energía.

c) **Ensamble posicional:** Los átomos, moléculas o sus agregados son manipulados deliberadamente y posicionados uno por uno. Este método es extremadamente laborioso y no es conveniente como proceso industrial.

2.4 Aplicaciones de las nanopartículas

La investigación de nanopartículas es una rama fascinante de la ciencia que expresó un creciente interés debido a una gran variedad de aplicaciones prometedoras en áreas tecnológicas de impacto clave⁵⁴.

Dos áreas principales de aplicaciones de nanopartículas son la ciencia de los materiales y la biomedicina. El hecho de que los aparatos electrónicos sean cada vez más rápidos, mejores y más pequeños es una clara y sólida evidencia de tal logro. La multifuncionalidad es la característica clave de los agentes basados en nanopartículas. Las NPs son materiales versátiles con una amplia gama de aplicaciones en una variedad de campos⁵⁵. Los investigadores han recubierto partículas de oro con ADN y las han inyectado en embriones de plantas o células de plantas. Esto asegurará que algún material genético entrará en las células y las transformará. Este método realza plastidios vegetales; por otro lado, han utilizado nanopartículas de oro para detectar el cáncer de mama. Más tarde también se descubrió que las nanopartículas podían detectar toxinas y patógenos. Las propiedades de la electrónica

óptica de las nanopartículas de oro se están explorando ampliamente para su uso en aplicaciones de alta tecnología como sondas sensoriales⁵⁶, conductores electrónicos⁵⁷, agentes terapéuticos⁵⁸, fotovoltaica orgánica⁵⁹, administración de medicamentos en aplicaciones biológicas y médicas⁴⁵ y catálisis⁵⁴.

Otras aplicaciones de las nanopartículas de oro en los dos campos de estudio, se enumeran a continuación⁶⁰:

- Como agente antimicótico, antimicótico y antimicrobiano cuando se agrega en plásticos, recubrimientos, nanofibras y textiles.
- En nanocables y aplicaciones de catalizadores.
- Para conectar resistencias, conductores y otros elementos de un chip electrónico.
- En terapia fotodinámica: cuando se aplica luz a un tumor que contiene nanopartículas de oro, las partículas se calientan rápidamente y matan a las células tumorales⁴⁶.
- Como sustratos para permitir la medición de las energías vibracionales de los enlaces químicos en la espectroscopia Raman mejorada en superficie.
- Los colores dispersos de las nanopartículas de oro se utilizan actualmente para aplicaciones de imágenes biológicas.
- Detectar biomarcadores en el diagnóstico de cánceres, enfermedades cardíacas y agentes infecciosos.
- Como catalizadores en una serie de reacciones químicas.
- Para aplicaciones en celdas de combustible.
- Ligando los ligandos, etiquetas de imágenes, fármacos terapéuticos, y otras funcionalidades pueden integrarse para permitir la obtención de imágenes moleculares y la terapia molecular de cierta enfermedad⁶⁰.

2.5 Importancia en la bio-nanotecnología

Dentro de las nanotecnologías se encuentran las bio-nanotecnologías que investigan las interacciones entre los materiales nanométricos y los sistemas biológicos⁵⁹. Los productos de las bio-nanotecnologías incluyen a los

nanomedicamentos y sus componentes como: aditivos para mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de fármacos muy poco solubles; vehículos de administración de fármacos para desarrollar la persistencia circulatoria y la liberación dirigida hacia lugares específicos a determinadas células; transportadores para favorecer su liberación controlada; adyuvantes para vacunas; medios de diagnóstico y dispositivos de administración de fármacos⁶¹.

Las nanopartículas pueden imitar o alterar procesos biológicos por lo que su uso en la medicina podría dar solución a viejos problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los medicamentos de uso tradicional⁶². Las nanopartículas utilizadas en la administración de fármacos para terapia o para diagnóstico son sólidos coloidales que varían su tamaño de 2 nm a 1000 nm. Normalmente, el fármaco de interés es disuelto, encapsulado, adsorbido o adherido dentro o sobre nanocápsulas (sistema vesicular, en el cual el fármaco es confinado a una cavidad rodeada por una membrana polimérica) o nanoesferas (sistema matricial en el que el fármaco es física y uniformemente dispersado⁶³.

La nanotecnología permite que la liberación del fármaco sea mínimamente invasiva, ya que posibilita la fabricación de dispositivos a escala nanométrica, tamaño que permite a estos dispositivos atravesar poros y membranas celulares. Otra gran ventaja es que con el control de la liberación se incrementa la efectividad del fármaco, por lo que es importante la dosis requerida, el tamaño, la morfología y las propiedades superficiales del compuesto. De lograr que las nanopartículas se asocien a órganos, tejidos o células dañadas y liberen *in situ* al principio activo deberá disminuir la toxicidad asociada al fármaco. Por otra parte, al ser posible la liberación paulatina del medicamento de acuerdo con las necesidades del paciente, se consigue disminuir los posibles eventos adversos que puedan producirse como consecuencia del suministro directo no controlado del fármaco^{2,57}. Entre las ventajas de usar fármacos nanoparticulados se encuentran una mejor biodisponibilidad, una rápida instalación del efecto terapéutico en la administración oral y una disminución de la variabilidad en la respuesta obtenida entre los estados de ayuno y no-ayuno. La utilización de fármacos nanoparticulados permite alcanzar niveles de sobresaturación que solo podrían ser

logrados cuando se pasa de un fármaco cristalino a uno amorfo. El tamaño de partícula desempeña un papel importante en la velocidad de disolución de los fármacos. La reducción del tamaño de partícula puede aumentar la velocidad de disolución y con esto dar una mayor biodisponibilidad^{4,61}. Este efecto puede determinar una mejor biodisponibilidad del fármaco. Si la nanopartícula está cubierta por algún polímero, la liberación es controlada por la difusión del fármaco a través de la membrana polimérica. El revestimiento de la membrana actúa como una barrera de liberación del fármaco, por lo tanto, la solubilidad de los fármacos y su difusión a través de la membrana polimérica se convierte en un factor determinante en la liberación del fármaco. Por otra parte, la velocidad de liberación también puede verse afectada por interacciones iónicas entre el fármaco y los aditivos de la formulación. Cuando el fármaco atrapado interactúa con los aditivos puede formarse un complejo menos soluble en agua, lo que puede retrasar la liberación del fármaco⁴.

2.6 El cáncer

El término cáncer engloba a un grupo de más de 100 diferentes tipos de la enfermedad el cual se caracteriza como el rápido y desordenado crecimiento de células anormales⁶³.

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial; en 2015 se calcula que provocó 8.8 millones de defunciones⁶⁴.

El cáncer se inicia cuando una célula escapa a los controles de división y muerte celular y comienza a proliferar descontroladamente. Todas las células de un organismo multicelular complejo están sometidas a un riguroso control que abarca tanto su potencial de proliferación y diferenciación, como la muerte celular por senescencia o apoptosis. El triángulo que se establece entre los índices de proliferación, diferenciación y apoptosis constituye la base sobre la cual se asienta la homeostasia de órganos y tejidos⁶⁵.

La proliferación y diferenciación celular son esenciales para la formación, reparación y mantenimiento de la adecuada funcionalidad de todos los tejidos y órganos en el organismo. Cuando un tejido en desarrollo alcanza cierto tamaño y organización, sus

células dejan progresivamente de proliferar y se diferencian. El retorno al estado proliferativo se produce cuando el tejido debe regenerarse, pero al diferenciarse, ciertas células pierden irreversiblemente, por tanto, la capacidad de división. Desequilibrios de este control conducen a trastornos de proliferación y junto a ciertas mutaciones convierten genes reguladores de proliferación y diferenciación en oncogenes desencadenantes de cáncer^{63,65}.

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento anormal y diseminado de células, que, al desarrollarse en forma incontrolada, avanzan entre los tejidos normales y los destruyen, alterándose así el funcionamiento del organismo. Se inicia casi siempre como una enfermedad localizada. En la mayoría de los casos se trata de padecimientos crónico-degenerativos, por lo tanto, sus incidencias y tasas de mortalidad tienden a incrementarse con la edad⁶⁶.

2.7 El cáncer cérvico uterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, acontece en 10% de todos los cánceres, es la tercera neoplasia más diagnosticada y la causa de muerte entre los cánceres ginecológicos a nivel mundial⁶⁷.

La población femenina originaria de Latinoamérica es considerada como de alto riesgo para desarrollar CaCu, cada año se reportan 68,000 casos nuevos. Estudios comparativos de las tasas de mortalidad por esta patología, señalan que las tasas más altas corresponden a Chile y México, mientras que las más bajas ocurren en Cuba, Puerto Rico y Argentina⁶⁸.

En nuestro país, el cáncer de tipo cérvico uterino se ubica como la segunda causa de muerte por neoplasias malignas; de tal forma que en 2016 tres de cada 10 fallecimientos femeninos por cáncer se deben a este padecimiento, se tienen entre 4 mil y 6 mil casos al año de CaCu y al día fallecen entre 11 y 13 pacientes⁶⁴.

El cáncer cérvico uterino o de cérvix es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de lenta y progresiva evolución, que suceden en etapas de displasia leve, moderada y severa, que evolucionan a cáncer, in situ, en grado variable cuando esta se circunscribe a la lesión epitelial y luego a cáncer invasor cuando el compromiso traspasa a la membrana basal⁶⁹.

El carcinoma del cuello uterino es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la mujer. Se reconocen dos tipos histológicos: el epidermoide o de células escamosas y el adenocarcinoma. El primero se origina en el epitelio plano estratificado que recubre el ectocérvix y el segundo en el epitelio cilíndrico que tapiza el canal endocervical⁷⁰.

Con raras excepciones, el cáncer de cuello uterino es el resultado de una infección genital con el virus del papiloma humano (VPH), que es un carcinógeno humano conocido. Aunque las infecciones por VPH pueden transmitirse a través de rutas no sexuales, la mayoría es resultado del contacto sexual. En consecuencia, los principales factores de riesgo identificados son:

- Sexo a una edad temprana
- Múltiples parejas sexuales
- ETS
- Exposición a dietilestilbestrol (DES)
- Tabaquismo
- Deficiencia del sistema inmunitario
- Anticonceptivos orales
- Edad
- Factores socioeconómicos

Si bien los factores de riesgo con frecuencia influyen en el desarrollo del cáncer, la mayoría no provoca cáncer de forma directa⁷¹.

2.7.1 Virus del papiloma humano

Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares establecen la infección persistente con el Virus del Papiloma Humano (HPV, *Human Papillomavirus*) como causa necesaria para el desarrollo del CaCu⁷².

El virus presenta diferentes genes a lo largo de su ADN que codificarán para proteínas capaces de generar nuevos viriones y amplificar la infección viral. El VPH tiene diferentes subtipos, pero el de tipo 16 es uno de los más severos porque se lo asocia al desencadenamiento de cáncer cérvico uterino debido a que al expresarse es idóneo de inhibir a p53 y a pRb, que son proteínas capaces de suprimir a las células tumorales. El

HPV es un virus pequeño de aproximadamente 55 nm, no envuelto que pertenece a la familia *Papillomaviridae*, la cápside del HPV está constituida por 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros), conformada por las proteínas estructurales L1 y L2 que albergan el genoma viral⁷³.

El genoma viral consiste en ADN circular de doble cadena de 7900 pares de bases (pb), con más de 10 marcos de lectura abiertos (ORFs) y generalmente una hebra es transcripcionalmente activa. El genoma del virus (Fig. 1) ha sido dividido en tres regiones: la región larga de control (LCR: Long Control Region), la cual contiene los sitios de regulación de la transcripción y replicación viral; región temprana (E: Early) que codifica para los genes implicados en replicación y mantenimiento del genoma viral (E1-E8), las proteínas E1 y E2 participan en la replicación del ADN viral, la proteína E2 reprime la transcripción de los genes de expresión temprana, a través de la unión con sitios consenso para la proteína E2 en la LCR; y por último, la región tardía (L: Late), la cual codifica a las proteínas estructurales de la cápside L1 y L2, También hay promotores como PE Y PL que están relacionados con la fase temprana y tardía, los promotores PAE y PAL se asocian a la protección del ARNm viral mediante la poliadenilación⁷⁴.

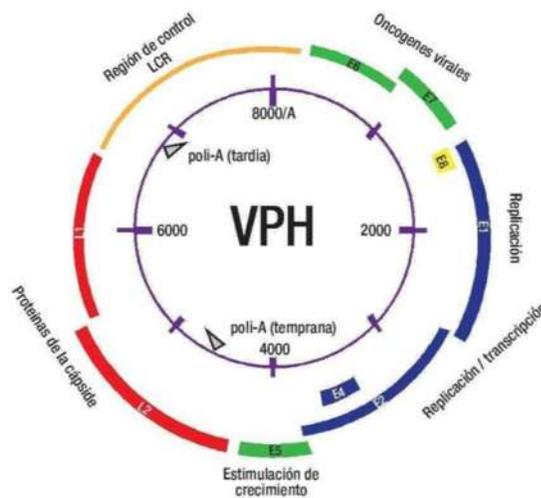


Figura 1. Mapa genómico del VPH16, donde se muestran los genes E1, E2, E5, E6, E7, la región de control y la región codificadora de las proteínas de la cápside⁷⁵.

Existen varios géneros para la familia *Papillomavirus*, de los cuales sólo *Alpha-papillomavirus*, *Beta-papillomavirus* y *Gamma-papillomavirus* infectan humanos. Se han

descrito más de 200 tipos de VPH, los cuales tienen tropismo por epitelios escamosos estratificados, infectando piel, mucosa oral y/o del tracto ano-genital⁷⁵.

Los tipos de VPH cutáneos, entre ellos los tipos 1, 2, 3, 7 y 10, tienen como blanco principalmente manos y pies, formando verrugas típicas de la infección. Los VPH que tienen preferencia por tejidos mucosos infectan las células epiteliales basales de la boca, garganta tracto respiratorio o epitelio ano-genital y en cualquiera de ellos VPH podría dar origen a un proceso carcinogénico⁷⁶.

Los VPH transmitidos por vía sexual son aproximadamente 40, los que pueden ser agrupados en VPH de bajo riesgo (BR) y alto riesgo (AR) oncogénico. Los VPH de BR incluyen los tipos 6, 11, 42, 43 y 44, entre los más frecuentes. De ellos, los más importantes son los tipos 6 y 11, que producen verrugas genitales tanto en hombres como en mujeres. Los VPH de AR son los tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70. De estos tipos virales, el más importante y más frecuente en el CCU es VPH 16⁷⁷.

2.7.2 Tratamiento del cáncer cervicouterino

El Sistema Nacional de Salud Mexicano brinda atención médica aproximadamente a 9,000 casos de cáncer cervicouterino invasor y se registran 4,000 muertes anualmente. En México existe un Programa Nacional de Detección Oportuna del Cáncer (DOC), mediante la prueba de Papanicolaou desde 1974⁶⁴.

El cáncer de útero se puede tratar de varias formas. El tratamiento depende del tipo de cáncer de útero y de cuánto se haya extendido. Los tratamientos incluyen cirugía, radioterapia, terapia hormonal y quimioterapia.

- **Cirugía:** El médico extirpa el tejido canceroso por medio de una operación.
- **Radioterapia:** El uso de radiación de alta intensidad (similar a los rayos X) para matar el cáncer.
- **Terapia hormonal:** La terapia hormonal elimina hormonas o bloquea su acción y detiene el crecimiento de las células cancerosas. Las hormonas son sustancias producidas por las glándulas del organismo que circulan en el torrente sanguíneo.

- **Quimioterapia:** Tratamiento que utiliza medicinas especiales para reducir el tamaño del tumor o eliminarlo. Estos medicamentos pueden administrarse en píldoras o por vía intravenosa y, en ocasiones, de ambas maneras.
- **Terapia con diana específica:** Los tratamientos con medicamentos con diana específica se enfocan en debilidades específicas presentes dentro de las células cancerosas. Al bloquear estas debilidades, los tratamientos con medicamentos con diana específica pueden producir la muerte de las células cancerosas. La farmacoterapia con diana específica se combina generalmente con la quimioterapia. Podría ser una opción para el cáncer de cuello uterino avanzado⁷⁸.

2.8 Cáncer de piel

El cáncer de piel es una de las neoplasias más comunes, en algunos países ocupa el primer lugar en frecuencia⁷⁹. El riesgo de una persona para desarrollar cáncer en la piel depende de factores constitucionales y ambientales. Los factores constitucionales incluyen la historia familiar, cabello claro o rojo, múltiples nevos melanocíticos, sensibilidad a la exposición solar, entre otros. Mientras que la radiación ultravioleta (UV) es un factor de riesgo ambiental bien establecido, y el más importante⁸⁰.

El término de cáncer de piel incluye tumores de diversa estirpe celular y diferente agresividad y pronóstico, los cuales son:

- Carcinoma basocelular.
- Carcinoma espinocelular o epidermoide.
- Melanoma maligno.
- Adenocarcinoma de glándulas sebáceas.
- Sarcomas y linfomas⁸¹.

2.8.1 Melanoma

El melanoma es una neoplasia maligna que se desarrolla a partir de los melanocitos, las células productoras de melanina⁸². A pesar de ser un tipo raro de cáncer de piel, es responsable de la gran mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer de piel⁸³. Además, el melanoma metastásico es uno de los tipos de cáncer más

mutados, heterogéneos y letales⁸⁴. Con frecuencia el primer signo de un melanoma es un cambio de tamaño, forma, color o textura de un lunar. La mayoría de los melanomas tienen un área negra o negra azulada. El melanoma también puede aparecer como un lunar nuevo, puede ser negro o anormal⁸⁵. Normalmente, las células de la piel se desarrollan de una manera controlada y ordenada: las nuevas células sanas empujan las células más antiguas hacia la superficie de la piel, donde mueren y finalmente se caen. Cuando algunas células desarrollan daños del ADN, las células nuevas pueden comenzar a crecer sin control y, con el tiempo, pueden formar una masa de células cancerosas⁸⁶. El daño en el ADN en las células de la piel y cómo produce un melanoma es probable que se deba a una combinación de factores, entre ellos factores ambientales y genéticos, produzca el melanoma. Sin embargo, se cree que la exposición a la radiación ultravioleta (UV) del sol y de las lámparas y camas de bronceado es la principal causa del melanoma⁸⁷. La luz UV no provoca todos los melanomas, especialmente aquellos que se producen en lugares del cuerpo que no están expuestos a la luz solar. Esto indica que otros factores pueden intervenir en el riesgo de tener melanoma⁸³.

2.8.2 Tratamientos del melanoma

La extirpación es el tratamiento más común de este tipo de lesiones, que puede completarse con la llamada cirugía de Mohs dependiendo de la localización o si la mancha tiene un tamaño considerable, sin embargo, existen diversos tratamientos para tratar este tipo de cáncer:

- Escisión simple: Consiste en la extirpación del tumor y parte del tejido que lo rodea.
- Cirugía de Mohs: Se elimina la capa de la piel afectada por el cáncer y posteriormente, el médico extrae el tejido que rodea la zona comparando ambos en el microscopio.
- Criocirugía: Mediante nitrógeno líquido se congelan y destruyen las células cancerosas.

- Cirugía láser: Se utiliza en carcinomas muy superficiales sobre los que se aplica el rayo láser para vaporizar las células cancerosas.
- Electrodesecación: El tumor se extrae raspando el tejido y después se trata la zona donde se encontraba la mancha con una aguja eléctrica para destruir las células cancerosas que quedan.
- Quimioterapia: El medicamento que más frecuentemente se utiliza es el fluorouracilo, que usado de forma tópica llega a las células más cercanas de la superficie de la piel.
- Radioterapia: Consiste en el empleo de radiación para destruir las células cancerosas⁸⁰.

2.8.3 Metotrexato

Dentro de la farmacoterapia, existen diversos fármacos para tratar el cáncer, uno de ellos y con gran relevancia es el metotrexato (MTX) (Fig. 2), el cual es un antimetabolito que posee actividad antiproliferativa e inmunosupresora inhibe competitivamente la dihidrofolato-reductasa, enzima responsable de convertir el ácido fólico a tetrahidrofolato, el cofactor necesario para la transferencia de un carbono en muchas reacciones metabólicas. Algunas de estas reacciones afectan la proliferación celular, incluyendo la síntesis de ácido timidílico y de los precursores nucleótidos del ADN y ARN⁸⁸.

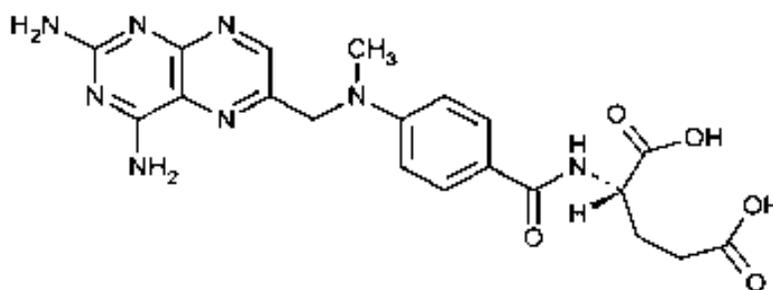


Fig. 2. Estructura química del metotrexato (MTX), el cual actúa como inhibidor alostérico de la DHRF⁸⁹.

La inhibición de la timidilato-sintasa es uno de los efectos más destacados del MTX resultando en una inhibición de la síntesis del DNA, sus efectos inhibidores dependen de sus concentraciones intracelulares, y los tejidos con mayor metabolismo celular y crecimiento más rápido son los más afectados. Entre estos, se encuentran los

tejidos neoplásicos, los folículos capilares, las células epiteliales del tracto digestivo y las células de la médula ósea. El metotrexato inhibe la proliferación celular en la fase S del ciclo celular. En dosis altas ($> 30 \text{ mg/m}^2$) el metotrexato inhibe las células en la fase S y ralentiza la entrada desde G1 a S⁹⁰.

El metotrexato es específico de la fase S del ciclo de división celular. Su acción consiste en la inhibición de la síntesis de ADN, ARN, timidato y proteínas como resultado de la unión relativamente irreversible con la dihidrofolato reductasa (Fig. 3), lo que evita la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato activo⁹¹.

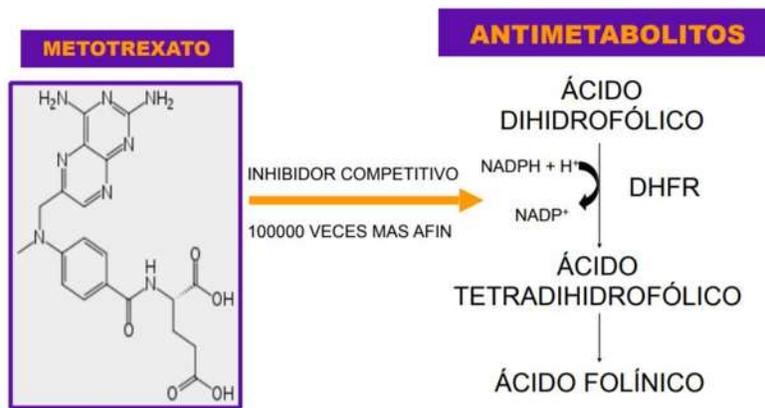


Fig.3.: Efecto del MTX como inhibidor alostérico de la DHFR generando ácido folínico⁹⁰.

3. ANTECEDENTES

Las nanopartículas se han desarrollado en las últimas décadas, particularmente en Tecnología Farmacéutica, pues al incorporarse a diversas formas farmacéuticas ocasionan incremento en el tiempo de permanencia del medicamento en el lugar de absorción, prolongando la efectividad del fármaco. También puede formularse como sistemas de liberación controlada⁹².

Estos materiales se emplean para retener el principio activo en la zona de absorción de la membrana epitelial, consiguiendo así una liberación sostenida del fármaco lo que se traduce en una menor frecuencia de administración⁹³.

El metotrexato (MTX), el cual ha sido estudiado en la última década por su uso en distintas enfermedades como la artritis reumatoide, la psoriasis y el cáncer; es un antagonista del folato, conocido como adyuvante para el tratamiento de varios tipos de cáncer y adecuado para inhibir la dihidrofolato reductasa en sistemas de expresión de proteínas basados en DHFR^{88,89}. MTX también es eficaz en el tratamiento de la malaria por *Plasmodium vivax* resistente a los parásitos y muestra efectos inmunosupresores. Sin embargo, los estudios clínicos han revelado que su reacción fue limitada porque llevó a efectos secundarios tóxicos relacionados con la dosis y debido a la resistencia farmacológica de las células tumorales⁹⁴.

Las nanopartículas inorgánicas son particularmente atractivas como piezas de construcción y aplicaciones en la biomedicina, debido a sus propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y catalíticas únicas, muchas de las cuales pueden ser moduladas simplemente cambiando su tamaño, forma, o la funcionalización de la superficie de la nanopartícula, sin cambiar la composición del material, dentro de estas, se encuentran las nanopartículas de oro (NPsAu), una de las características principales de las NPsAu es su preciso control sobre su tamaño, composición y funcionalidad; representan una opción eficaz para los sistemas de administración de fármacos tópicos gracias a su pequeño tamaño, no toxicidad, facilidad de funcionalización y alta relación superficie-volumen³⁰. Por lo cual, en estos antecedentes las NPsAu en el tratamiento del cáncer cervicouterino y melanoma utilizando como sustancia activa al MTX, es un prometedor avance nanotecnológico en pro de mejorar la calidad de vida de los pacientes de dichas enfermedades.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a los cambios en el crecimiento poblacional y el envejecimiento, la OMS estima que para el 2030 los casos de cánceres sobrepasarán los 20 millones anuales. Sin embargo, esos números podrían reducirse significativamente, ya que se calcula que entre el 30% y el 50% de los cánceres son prevenibles mediante la adopción de hábitos saludables, vacunación y diagnósticos y tratamientos oportunos⁶⁴.

La efectiva administración de sustancias activas en las células tumorales en la actualidad, no ha sido posible en su totalidad, ya que algunos fármacos han presentado efectos secundarios tóxicos en el organismo, por lo que es necesario su vectorización, direccionamiento y ausencia de toxicidad para actuar únicamente sobre las células blanco que son afectadas por el cáncer cervicouterino o del melanoma; las NPsAu son de gran relevancia para este problema, ya que debido a sus propiedades como son tamaño, ausencia de toxicidad y fácil funcionalización (utilizando un polímero), es posible asegurar que esas moléculas solamente actúen sobre el órgano seleccionado, además de favorecer la solubilidad del fármaco y disminuir los efectos secundarios tóxicos que presenta en el organismo, estas ventajas se pueden lograr en conjunto, ya que dicho sistema tiene la posibilidad de permanecer adherido a las células tumorales y modular la liberación del principio activo.

5. JUSTIFICACIÓN

La administración y las formulaciones de fármacos han sido revolucionadas con el advenimiento de las nanotecnologías. El empleo de las nanopartículas (NPs) en la medicina promete resolver los problemas de administración de fármacos en células específicas y facilitar el movimiento de los mismos, a través de diferentes barreras en el organismo. Esto influiría de manera positiva en el tratamiento de enfermedades, al poder controlar el paso de sustancias activas que normalmente, sin el uso de las nanopartículas, limitarían su función. El desafío consiste en la caracterización precisa de los blancos moleculares, así como, en asegurar que esas moléculas solamente actúen sobre el órgano seleccionado y disminuya la toxicidad de la sustancia activa en el organismo.

Debido a que el tamaño, forma y carga superficial de las NPs juegan un papel importante en la difusión a través de la membrana celular y la posterior liberación de fármacos en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, es de gran importancia la búsqueda de metodologías de síntesis que influyan en dichos atributos y que sean eficientes para su posterior aplicación. En el área biomédica, el uso de fármacos como el MTX por su carácter hidrofílico no puede atravesar la membrana celular, por lo que, para entrar en la célula, debe usar un sistema de transporte específico, así como la modulación de la liberación del fármaco, en este contexto, utilizar las NPsAu es un método eficiente. Por lo anterior, el estudio de la síntesis de este material generará conocimiento interdisciplinario, el cual será de importancia para el posible control y disminución del cáncer cervicouterino.

6. HIPÓTESIS

La síntesis de un sistema híbrido a base de NPsAu-3MPS-MTX proporcionará la habilidad de adhesión, direccionamiento y modulación para la liberación de metotrexato (MTX) en las células HeLa y B16-F10 en cultivos celulares.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Sintetizar un material a base de NPsAu-3MPS-MTX que permita el transporte de MTX como sustancia activa y evaluarlo en cultivos celulares.

7.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar y encontrar las condiciones de síntesis de NPsAu con propiedades fisicoquímicas tales que permitan su posterior funcionalización con grupos tiol (3-mercaptopropanosulfonato) e incorporación de la sustancia activa metotrexato (MTX).
2. Caracterizar los materiales propuestos mediante diferentes técnicas analíticas: UV vis, DLS, XRD, TEM (NPsAu-3MPS); DLS, FTIR, SE-TEM, AFM (NPsAu-3MPS-MTX).
3. Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* utilizando líneas celulares del cáncer de piel (B16-F10) y del cáncer cervicouterino (HeLa) a diferentes concentraciones de NPsAU-3MPS y del sistema NPsAu-3MPS-MTX.
4. Evaluar la biocompatibilidad de NPsAU-3MPS y del sistema NPsAu-3MPS-MTX a diferentes concentraciones en las líneas celulares.

8. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

8.1 Síntesis de NPsAu-3-mercapto-propanosulfonato (NPsAu-3MPS)

En una síntesis típica se utilizan 200 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 20 ml de agua desionizada y se agrega una solución de 3MPS (340 mg) en 20 ml de agua desionizada. Se incorpora el agente reductor NaBH_4 (190 mg en 20 ml de agua desionizada) bajo agitación vigorosa. Se permite a la mezcla reaccionar a temperatura ambiente por 3 h y al final un sólido color café se recupera y purifica por centrifugación (13,000 rpm, 20 min). La relación molar (Au/thiol) = $\frac{1}{4}$ y (Au/NaBH_4) = $\frac{1}{10}$ ¹⁷.

8.2 Incorporación de metotrexato en NPsAu-3MPS (NPsAu-3MPS-MTX)

Las NPsAu-3MPS (10 mg) se disuelven en agua (4 ml pH =5.5), posteriormente la solución se somete a agitación por 4 h a temperatura ambiente en presencia de MTX (2 mg) para obtener una relación (NPsAu-3MPS/MTX) = 5/1. La mezcla de reacción se mantiene en la oscuridad para evitar la degradación del MTX con la luz. Después de 4 horas, la mezcla se purifica mediante centrifugación (13,000 rpm, 90 minutos) para separar el material NPsAu-3MPS/MTX del MTX libre en la solución. Para analizar el contenido de MTX en solución se toma un 1 ml y se diluye en 100 ml de agua a pH = 5.5²⁰.

8.3 Caracterización de los nanomateriales

8.3.1 Análisis por dispersión de la luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica que permite determinar el tamaño de partículas en suspensión hasta rangos del orden de los nanómetros, el uso del movimiento Browniano de las partículas en suspensión permite alcanzar estos límites de sensibilidad. Adicionalmente, este método no altera de ninguna manera la matriz de estudio debido a que es una técnica no invasiva. Los parámetros que se midieron fue la dispersión del tamaño por el diámetro hidrodinámico en una solución de H_2O a una temperatura de 25 °C mediante el uso de un aparato de dispersión *Malvern Nano ZS90 (Malvern Zetasizer Nanoseries Instruments Ltd., Worcestershire)* a una concentración de nanopartículas en soluciones acuosas (0,01–0,20 mg/mL). El

potencial zeta se midió utilizando un aparato *Malvern NanoZS90* con cubetas capilares plegadas desechables de 1ml, provistas de electrodos.

8.3.2 Análisis por espectroscopía ultravioleta visible (UV-vis)

La espectroscopía ultravioleta-visible (UV-vis) utiliza radiación electromagnética de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR) del espectro electromagnético, por lo que la longitud de onda se encuentra entre 380 nm y 780 nm. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. La espectroscopía UV-visible se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas y, además, para determinar el contenido y fuerza de una sustancia. Se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados. Los espectros UV-vis se corrieron en soluciones de H₂O utilizando celdas de cuarzo, con un espectrofotómetro *Varian Cary 100 Scan UV-vis*.

8.3.4 Análisis por difracción de rayos X (XRD)

La difracción de rayos X (XRD) permite la rápida identificación de materiales particulados. Proporciona información detallada acerca de la estructura cristalográfica de sus muestras, que puede utilizarse para identificar las fases presentes. XRD es especialmente útil para la identificación de fases de grano fino, por lo cual se utilizaron 10 µg de las NPsAu, proporcionando el difractograma con la información correspondiente para posteriormente indexarla y determinar los índices de Miller con el programa *XPertHighScore Plus*.

8.3.5 Análisis por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia de infrarrojos (IR) es una poderosa técnica analítica que permite analizar compuestos químicos estudiando la vibración de sus enlaces. Este tipo de espectroscopía permite identificar enlaces químicos en diferentes regiones del espectro IR, desde el infrarrojo cercano (NIR), hasta el infrarrojo medio (MIR) y el infrarrojo lejano. La región del infrarrojo medio es la zona del espectro con mayor riqueza de información y, por lo tanto, muy deseable para el análisis e identificación de

compuestos. Los espectros FTIR se registraron en películas depositadas a partir de soluciones de etanol usando celdas KRS-5, con un espectrofotómetro *Bruker Vertex 70*.

8.3.6 Análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) proporciona una imagen de las nanopartículas analizadas, ya que los electrones difractados al pasar a través de la muestra generan un difractograma que puede ser transformado directamente en dicha imagen mediante lentes magnéticas que es la proyección de la estructura cristalina a lo largo de la dirección de los electrones. El tamaño y la morfología de las NPsAu se determinaron por el microscopio electrónico de transmisión. Los histogramas de tamaño de las nanopartículas se llevaron a cabo con mediciones realizadas mediante el programa *OriginPro 2019*.

8.3.7 Análisis por microscopía de fuerza atómica (AFM)

El AFM es una técnica de medida superficial que se basa en la interacción de una punta con la superficie de la muestra. Esta técnica permite el análisis superficial de muestras con resolución nanométrica o incluso atómica. Como principal ventaja tiene la posibilidad de hacer medidas sin ningún tratamiento previo de la muestra a medir, y sin la necesidad de emplear vacío. Las imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) se adquirieron con el instrumento *Veeco*, modelo *Icon* con controlador y sistema integrado *Nanoscope-5Harmonix* en una muestra recién colada en un sustrato de Si/SiO₂. Se utilizó una centrífuga *Mini Spin-Eppendorf* para la purificación de las muestras de NPsAu (13000 rpm, 20 min, 5 × con agua desionizada) y se efectuó la operación.

8.4 Cultivo de células de melanoma y células HeLa

La línea celular B16-F10 de melanoma de ratón (ATCC CRL-6475) y células HeLa se cultivan en medio DMEM (por sus siglas en inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés *Fetal Bovine Serum*), 1% v/v de antibiótico/antimicótico, 1% v/v de L-glutamina y de bicarbonato de sodio (2 g/L), ajustado a un pH de 7.4, y esterilizado mediante

filtración a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 μm . Las células se mantuvieron en placas de Petri para cultivo celular a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 hasta la confluencia.

8.5 Ensayos de viabilidad celular por reducción de MTT

El ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT se realizó en una placa de 96 pocillos, en la que se sembraron 10,000 células en cada pocillo, en un volumen final de 100 μL de DMEM, y luego se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Posteriormente, se desechó el medio de cultivo y se añadieron diferentes concentraciones de NPsAu-3MPS, NPsAu-3MPS-MTX y MTX (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a cada pocillo por triplicado en un volumen final de 100 μL de medio de cultivo celular, y luego se incubaron durante 48 horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Las células cultivadas con medio celular se utilizaron como control positivo, mientras que las células expuestas a *TritonX-100* al 0.5% (v/v) se utilizaron como controles negativos. A continuación, se decantó el medio de cultivo de la placa y las células se lavaron tres veces con 200 μl de tampón fosfato (PBS 1x), después se añadieron 10 μl de MTT (5 mg/mL) y 90 μl de medio de cultivo a cada pocillo, la placa se incubó durante 4 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Las células cultivadas con medio celular se utilizaron como control positivo, mientras que las células expuestas a *TritonX-100* al 0,5% (v/v) se utilizaron como controles negativos. A continuación, se decantó el medio de cultivo de la placa y las células se lavaron tres veces con 200 μl de tampón fosfato (PBS 1x), después se añadieron 10 μl de MTT (5 mg/mL) y 90 μl de medio de cultivo a cada pocillo, la placa se incubó durante 4 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Después de esto, se añadieron 100 μL de isopropanol puro a cada pocillo, y la muestra se resuspendió varias veces para disolver los cristales de formazán, después se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Por último, se midió la absorbancia del formazán a una longitud de onda de 570 y 690 nm en un lector de placas *ELISA Thermo Scientific Multiskan GO*. Para calcular la viabilidad celular, se restó la absorbancia de las muestras a 690 nm de la absorbancia a 570 nm. El valor de absorbancia del control

positivo se tomó como el 100% de la viabilidad celular; a partir de ahí, se calculó el porcentaje correspondiente para cada pocillo.

8.6 Detección de las especies reactivas de oxígeno (ERO)

Mediante la evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) es posible determinar si las nanopartículas son capaces de inducir un estrés oxidativo significativo en las líneas celulares expuestas a diferentes concentraciones de NPsAu-3MPS, y NPsAu-3MPS-MTX y MTX libre de fármaco. Para ello, utilizando el kit de detección de especies reactivas de oxígeno *Image-IT Live Green (I36007, Invitrogen)*, fue posible medir por citometría de flujo la fluorescencia de CFDA, un reactivo que se reduce por las ERO generadas en el citoplasma de la célula.

8.6.1 Cultivo celular para la detección de ERO

Para este ensayo, cada línea celular se sembró en una placa de 12 pocillos a una densidad de 150,000 células por pocillo y se incubó durante 48 h a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ con diferentes concentraciones de NPsAu-3MPS, NPsAu-3MPS-MTX y MTX (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 y 64 µg/mL). Después de esto, se cosecharon las células, y el sedimento celular se resuspendió en 250 µL de DMEM con el reactivo carboxyH₂-DCFDA (25 µM) y se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 1 hora. Para medir la producción intrínseca de ERO, las células se cultivaron únicamente en DMEM, mientras que para inducir estrés oxidativo; las células se expusieron a 50 µM de hidroperóxido de terbutilo (TBHP) durante 24 horas. Tras la incubación, las células se centrifugaron a 1,200 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de PBS. Por último, las células se analizaron por citometría de flujo con un citómetro *Attune NxT* utilizando el canal de fluorescencia BL1 (Excitación 488 nm/Emisión 525 nm). Los datos registrados fueron de al menos 30,000 eventos para cada muestra con sus respectivos triplicados. Los datos se analizaron utilizando el software *Attune NxT* versión 3.2.1 (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.*).

8.7 Permeabilidad de la membrana celular

Tras exponer las células a diversas concentraciones de MTX, NPsAu-3MPS y NPsAu-3MPS-MTX, se recogieron las células y se suspendieron en 200 µl de PBS. Posteriormente, las células se incubaron en 25 °C durante 30 min con yoduro de propidio (PI) para evaluar la permeabilidad de la membrana celular. Tras esta incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y se sometieron a análisis adicionales mediante citometría de flujo. Los datos se adquirieron a partir del examen de al menos 10,000 eventos, con detección de PI realizada en el canal BL3 utilizando el citómetro de flujo *Attune NxT* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se analizaron utilizando el software de adquisición Attune NxT versión 3.2.1 (*ThermoFisher*).

8.8 Ensayo de muerte celular por apoptosis y necrosis

La muerte celular, ya sea por apoptosis o necrosis inducida por la incubación de células HeLa y B16-F10 con diferentes concentraciones de MTX, NPsAu-3MPS y NPsAu-3MPS-MTX, se midió mediante citometría de flujo con tinción de isotiocianato de fluoresceína (FITC)-annexina V y yoduro de propidio (PI), utilizando el kit de detección de apoptosis *Annexin V-FITC* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.*).

8.9 Evaluación de la captación de NPsAu

Para evaluar la captación celular de NPsAu-3MPS, NPsAu-3MPS-MTX y MTX, realizamos una comparación de la granularidad celular mediante citometría de flujo. La internalización de las nanopartículas se evaluó comparando los valores de dispersión lateral de las muestras celulares, como se ha documentado previamente²¹. Sembramos una densidad de 4×10^5 células en una placa de 12 pocillos y las cultivamos durante 24 horas a 37 °C con un 5% de CO₂. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con NPsAu-3MPS, NPsAu-3MPS-MTX y MTX a una concentración de 1 a 64 µg/ml durante 48 horas en las mismas condiciones. Posteriormente, las células se sometieron a tres lavados con PBS, se cultivaron utilizando tripsina/EDTA (*Sigma Aldrich, MO, EE.UU.*) y se resuspendieron en 1 mL de PBS. A continuación, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo con un citómetro de flujo *Attune NxT* (Life Technologies, Carlsbad, CA). Se recogieron datos de citometría de flujo de al

menos 10,000 eventos (células) y se analizaron en función de las señales de dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) utilizando el software *Attune NxT* (Life Technologies).

8.10 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron de forma independiente con triplicados internos. Los datos se analizaron estadísticamente con el programa *GraphPad Prism* versión 10.0 (San Diego, CA, EE.UU.) mediante un análisis de varianza ANOVA, seguido de la prueba de comparación múltiple de *Tukey*. Los resultados se representaron como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes y se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

9.1 Síntesis de NPsAu funcionalizadas con 3MPS

El espectro UV-vis (Fig. 4) de las nanopartículas de Au-3MPS mostró una resonancia de Plasmon a aproximadamente 530 nm, típica de nanopartículas de oro de bajo diámetro.

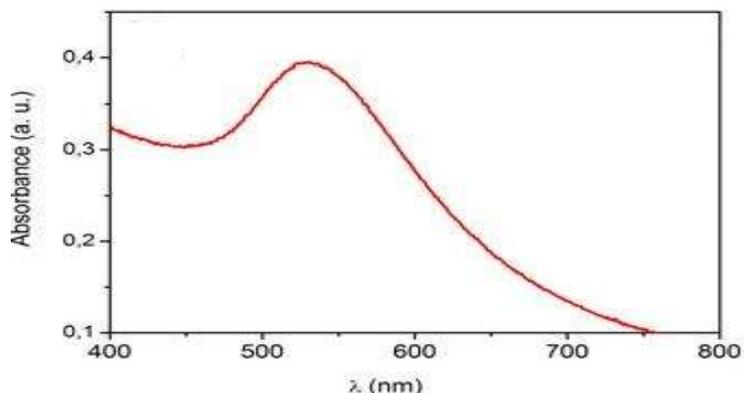


Fig. 4. Espectro UV-vis de NPsAu-3MPS.

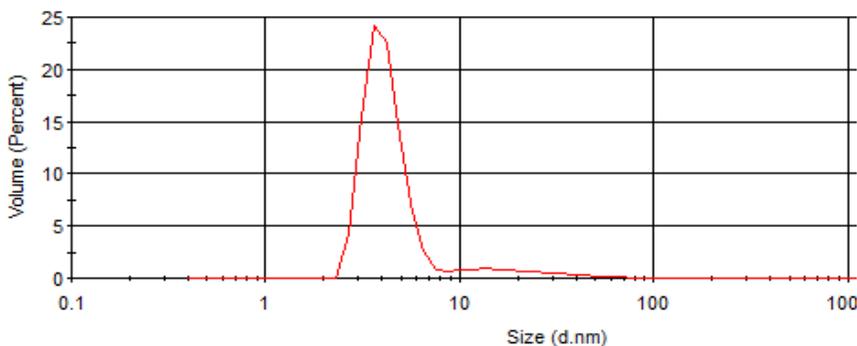


Fig. 5. Espectro DLS de NPsAu-3MPS.

Se prepararon nanopartículas de oro coloidal estable con tiol 3MPS como capa funcionalizadora, los pasos de purificación permitieron obtener NPsAu con un diámetro hidrodinámico medio estrecho igual a 4 ± 1 nm según lo confirmado por la técnica DLS (Fig. 5).

Se llevó a cabo la caracterización por difracción de rayos X de las NPs para determinar su forma y se observa en el difractograma la siguiente información, de

acuerdo a los índices de Miller obtenidos y basándonos en *Downs et al. (1993)* la forma cúbica de las nanopartículas de oro además de la presencia de trióxido de azufre (SO₃).

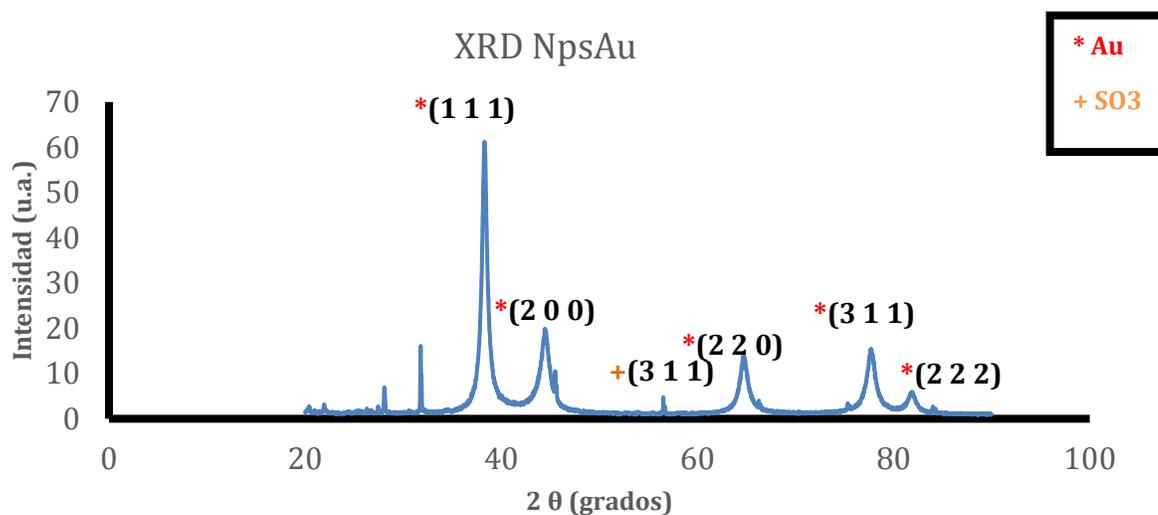


Fig. 6. Difractograma de XRD de NPsAu-3MPS.

9.2 Síntesis del conjugado NPsAu-3MPS-MTX

El tamaño y distribución de NPsAu-3MPS y NPsAu-3MPS-MTX fueron evaluados por DLS. La figura 7 muestra el tamaño hidrodinámico de la distribución de muestras coloidales diluidas en agua desionizada. La curva roja en la Fig. 7 muestra la distribución de tamaño hidrodinámico de NPsAu-3MPS por volumen con $\langle 2RH \rangle 5 \pm 1 \text{ nm}$. La curva azul en la Fig. 7 muestra la distribución de tamaño hidrodinámico de NPsAu-3MPS-MTX con $\langle 2RH \rangle 710 \pm 160 \text{ nm}$. Los resultados destacan un incremento significativo en el tamaño medio de partícula del coloide en presencia de MTX.

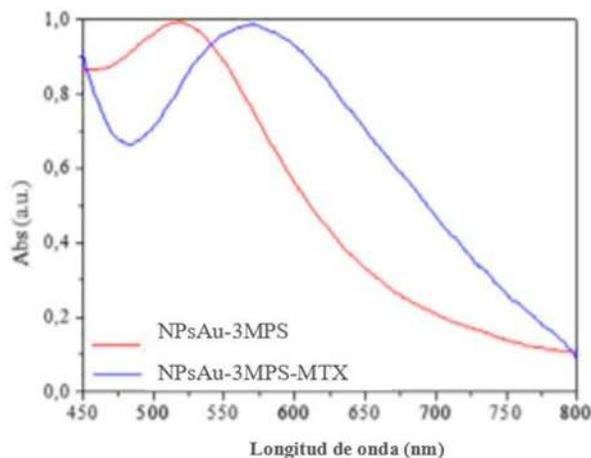


Fig. 7. Espectros UV-Vis normalizados de NPsAu-3MPS y NPsAu-3MPS-MTX en agua desionizada.

Se preparó y caracterizó el conjugado NPsAu-3MPS-MTX para evaluar la interacción entre las NPsAu y el fármaco MTX.

El sistema NPsAU-3MPS-MTX se estudió mediante espectroscopia FT-IR y la interacción se evidenció a partir del análisis de picos. Los espectros FT-IR (informados en la Fig. 8 para el fármaco MTX y el sistema NPsAU-3MPS-MTX en la Fig. 9) confirmaron la presencia de MTX en el sistema, con los picos de absorción típicos en 3059 y 2951 cm^{-1} debido al grupo carboxílico y los modos vibracionales C-N y NH_2 en 1685 , 1616 , 1389 y 1073 cm^{-1} . En particular, los grupos amida fueron observados a 1684 cm^{-1} para el MTX libre y a 1614 cm^{-1} en el sistema.

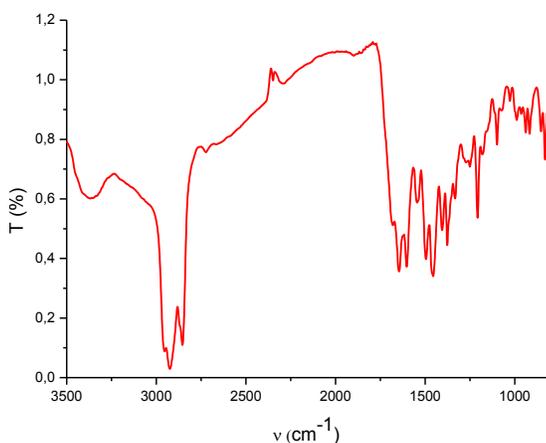


Fig. 8. FT-IR del MTX.

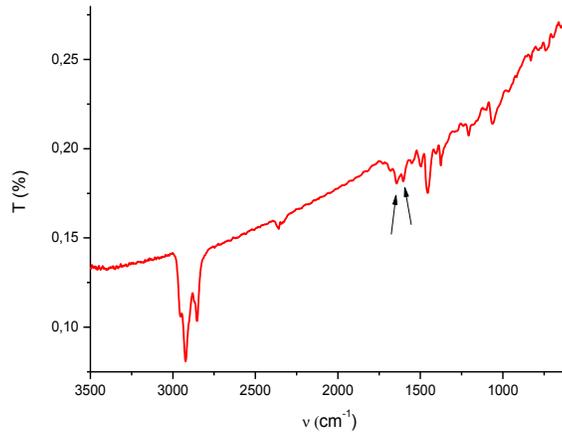
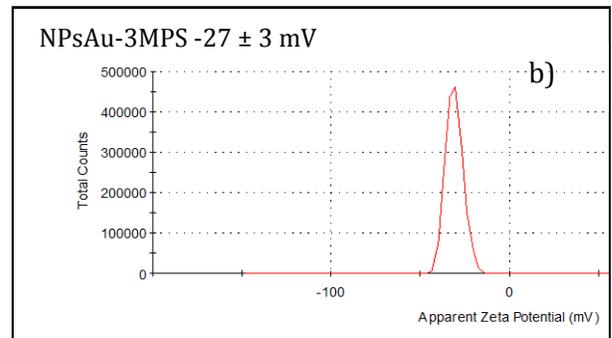
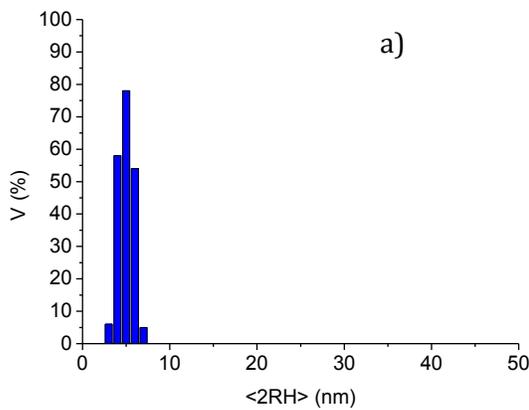


Fig. 9. FT-IR del sistema NPsAu-3MPS-MTX.

Se llevo a cabo la caracterización por DLS de NPsAu- 3MPS y del sistema NPsAu-3MPS-MTX para obtener información sobre la estabilidad, comparando los datos de NPsAu-3MPS y NPsAu-3MPS-MTX, el valor de potencial Z evidenció una pequeña disminución (de -27 ± 3 mV y en NPsAu-3MPS a -32 ± 1 mV en el sistema), como resultado de muestras estables al agua hasta 6 meses como se observa en la Fig. 10.



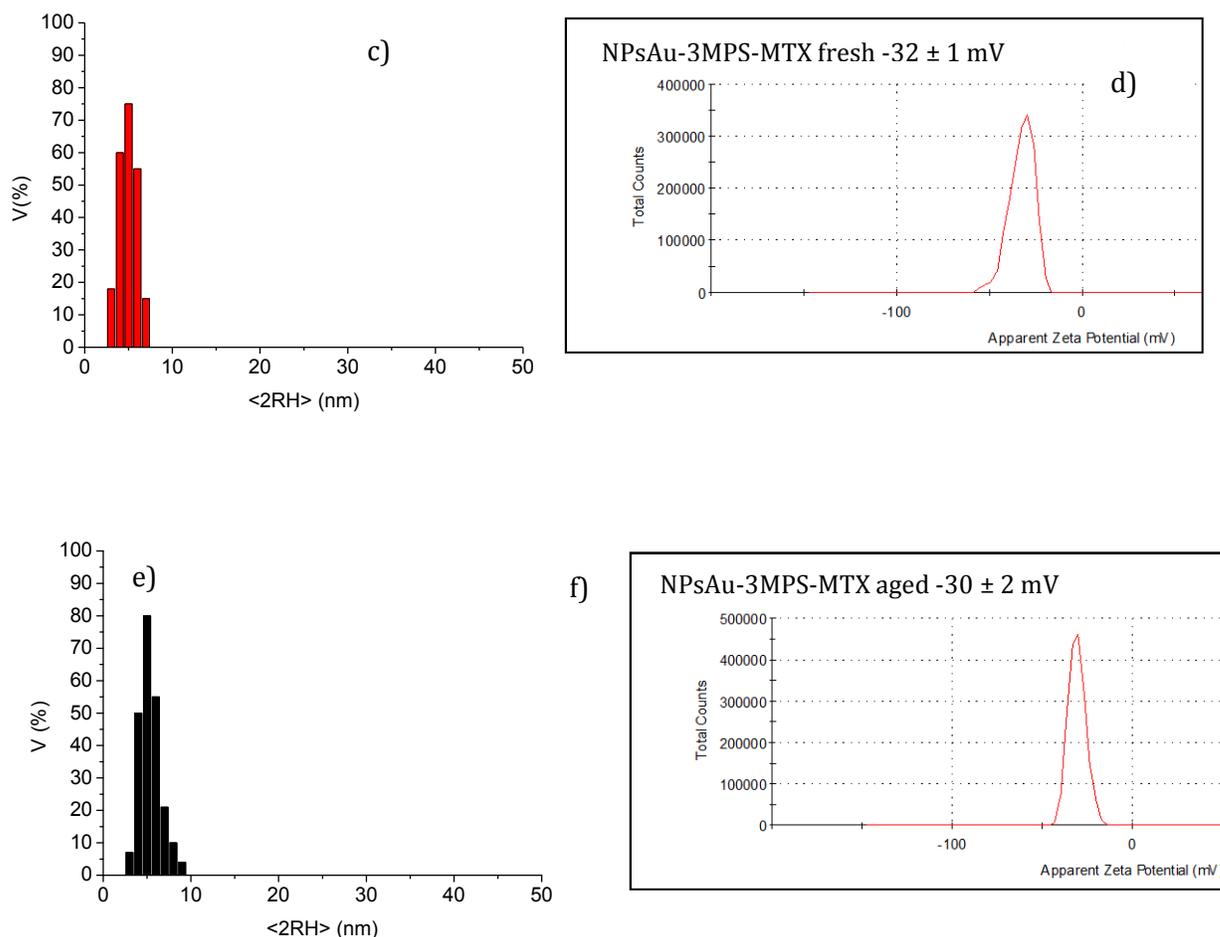


Fig. 10. DLS y potencial Z: (a-b) NPsAu-3MPS; (c-d) NPsAu-3MPS-MTX frescas; (e-f) NPsAu-3MPS-MTX 6 meses (b-d).

La morfología del sistema fue observada por FE-SEM y se observaron microscopías AFM, no se observaron modificaciones en la morfología de NPsAu-3MPS tras la interacción con MTX. Es de destacar que no se observaron estructuras agregadas. En las siguientes figuras se puede observar que en estado sólido se obtienen nanopartículas de tamaño bastante regular con diámetros de aproximadamente 5 nm.

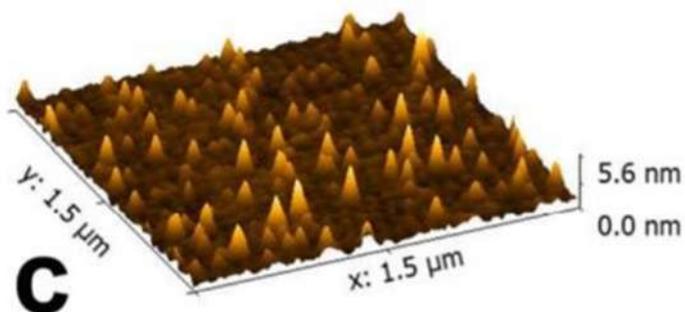
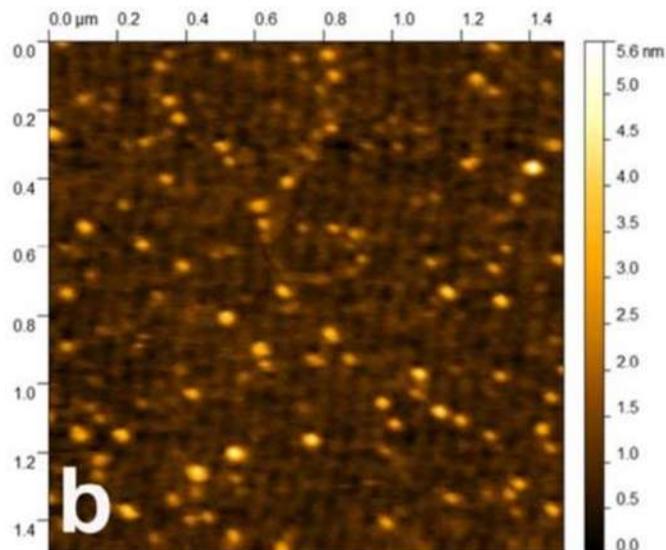
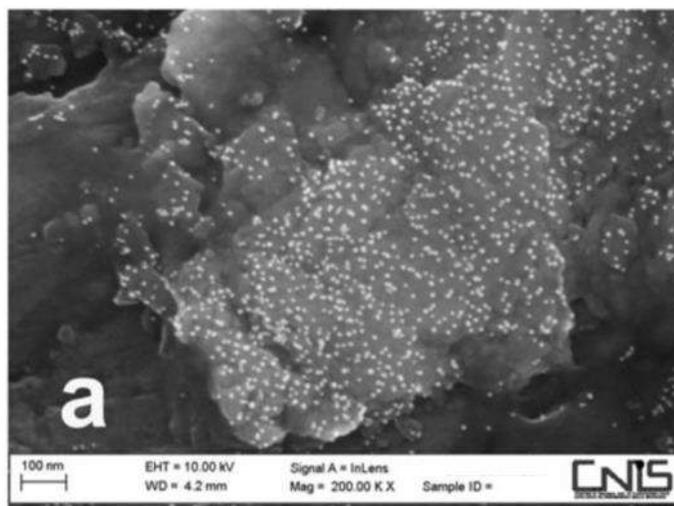


Fig. 11. a) Imagen FESEM del sistema NPsAu-3MPS-MTX; b) y c) Imágenes AFM del sistema NPsAu-3MPS-MTX.

9.3 Viabilidad celular de células HeLa y células del melanoma B16-F10

En la Fig. 12 se presenta el porcentaje de viabilidad celular de las células cancerosas B16-F10 y HeLa en presencia de NPsAu (NPsAu-3MPS), NPsAu-3MPS-MTX y MTX a diferentes concentraciones (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Puede observarse que la exposición de ambas líneas celulares a todas las concentraciones de NPsAu no induce citotoxicidad significativa. Sin embargo, el nanosistema híbrido NPsAu-3MPS-MTX provocó una disminución significativa de la viabilidad celular en ambas líneas celulares de forma dependiente de la concentración. De hecho, a concentraciones más altas del sistema, la viabilidad celular disminuyó casi un 70% tanto para las células B16-F10 como para las HeLa. Además, se observó que el fármaco metotrexato (MTX) inducía menos citotoxicidad que el bioconjugado NPsAu-3MPS-MTX, lo que indica que el nanosistema no afecta a la vectorización del fármaco.

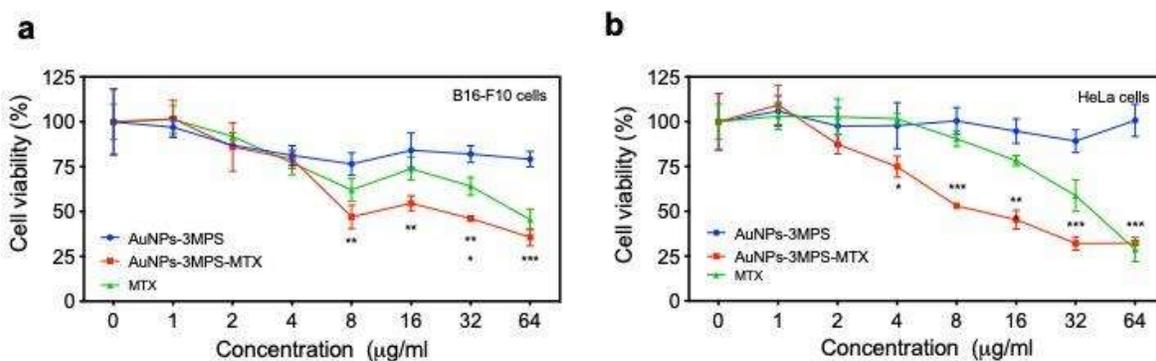


Fig. 12. Viabilidad celular de (a) células de melanoma B16-F10 y (b) células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de NPsAu, NPsAu-MTX y MTX. Los resultados se expresan como la media \pm DE ($n=3$), ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ utilizando ANOVA de dos vías con la prueba de comparación de Tukey.

9.4 Permeabilidad de la membrana celular de las células B16-F10 y HeLa

La Fig. 13 muestra el porcentaje de células permeabilizadas para ambas líneas celulares en relación con las concentraciones utilizadas para cada tratamiento. El uso de NPsAu con la sustancia activa dio lugar a una permeabilización celular significativamente mayor a una concentración de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en comparación con su homólogo sin MTX y con el fármaco MTX solo. Como se mencionó¹⁹ S. Cerra, et al. (2020), la síntesis de NPsAu-3MPS-MTX proporciona un nanosistema que mejora la penetración del fármaco MTX en el interior de las células durante los estudios de

permeabilidad celular. Por otro lado, al estudiar células HeLa, se observó que el MTX induce una mayor permeabilización celular que el efecto provocado por las NPsAu-3MPS-MTX.

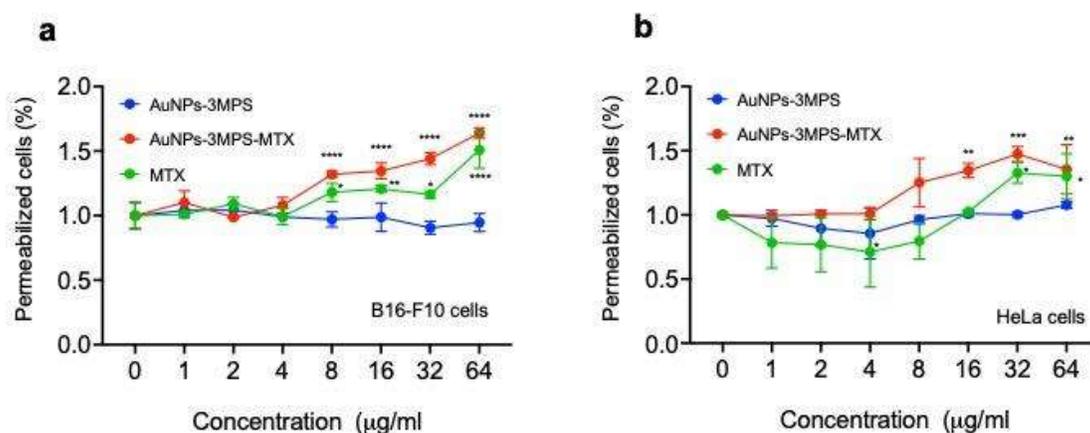


Fig. 13. Permeabilidad celular de (a) células de melanoma B16-F10 y (b) células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de NPsAu, NPsAu-MTX y MTX. Los resultados se expresan como la media \pm DE (n=3), **p<0.01; ***p< 0.001 utilizando ANOVA de dos vías con la prueba de comparación de Tukey.

9.5 Generación de ERO en células HeLa y células de melanoma B16-F10

La Fig. 14 muestra el porcentaje intracelular de ERO producidas en células HeLa y células de melanoma B16-F10 al incubarlas con NPsAu (NPsAu-3MPS), NPsAu-3MPS-MTX y MTX. Este análisis se realizó indirectamente cuantificando la fluorescencia del reactivo carboxyH₂-DCFDA, que se reduce por las ERO generadas en el citoplasma celular y da lugar a DCF, un compuesto fluorogénico. Los resultados demuestran la capacidad de las NPsAu para inducir un estrés oxidativo significativo. Como se muestra en la Fig. 15a, la línea celular de melanoma B16-F10 incubada con NPsAu-3MPS-MTX exhibió un aumento en la producción de ERO en comparación con la contraparte NPsAu-MPS. La producción de ERO aumentó significativamente a concentraciones que oscilaban entre 8 y 64 µg/mL de NPsAu-3MPS-MTX. Por el contrario, el porcentaje de ERO producidas por la línea celular HeLa expuesta a las mismas concentraciones de NPsAu-3MPS-MTX mostró un aumento en la producción de ERO dentro del rango de concentración de 2 a 64 µg/mL de NPsAu-MPS.

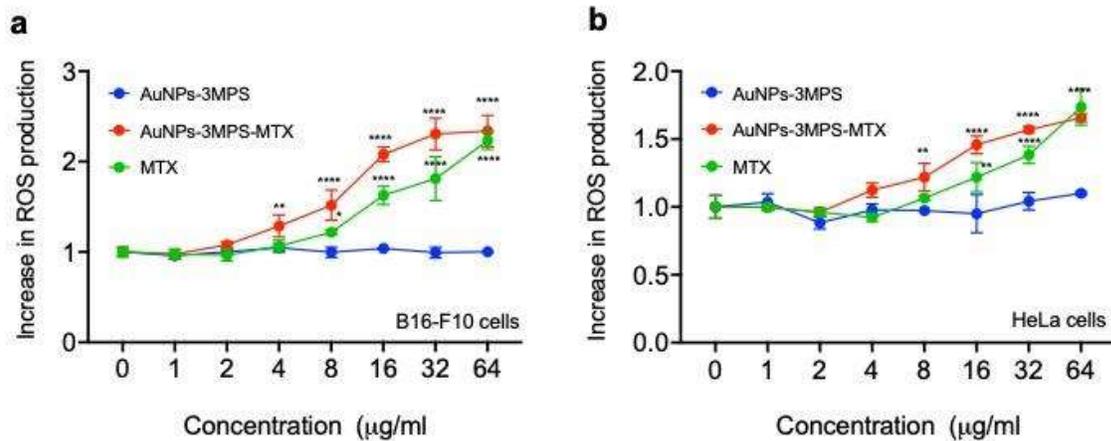


Fig. 14. Producción de ERO de (a) células de melanoma B16-F10 y (b) células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de NPsAu, NPsAu-MTX y MTX. Los resultados se expresan como la media \pm DE ($n=3$), $**p<0.01$; $***p<0.001$ utilizando ANOVA de dos vías con la prueba de comparación de Tukey.

9.6 Determinación de la muerte celular por apoptosis y necrosis para las células B16F10 y HeLa

Se evaluó la muerte celular para ambas líneas celulares, utilizando NPsAu-3MPS, MTX y el sistema propuesto NPsAu-3MPS-MTX. La Fig. 15a muestra los resultados para la línea celular de melanoma B16-F10, indicando que no hubo diferencias significativas en los valores de muerte celular cuando se utilizaron diferentes concentraciones de NPsAu-3MPS y MTX. La muerte celular se mantuvo por debajo del 10%. Sin embargo, cuando las células B16-F10 se trataron con diversas concentraciones de NPsAu-3MPS-MTX que oscilaban entre 4 y 64 µg/mL, se desencadenó la apoptosis en más del 50% de las células.

En la Fig. 15b, se observó el efecto de las NPsAu-3MPS y el MTX sobre las células HeLa. En este caso, las células HeLa fueron más susceptibles al MTX en comparación con las células B16-F10. El MTX a concentraciones superiores de 16 a 64 µg/mL indujo una apoptosis temprana en más del 25% de las células. Sin embargo, cuando las células HeLa se expusieron a diferentes concentraciones de NPsAu-3MPS-MTX, la apoptosis tardía fue el principal modo de muerte celular. Los resultados indican que las células HeLa son más susceptibles a los efectos del nanosistema propuesto NPsAu-3MPS-MTX que las células de melanoma B16-F10.

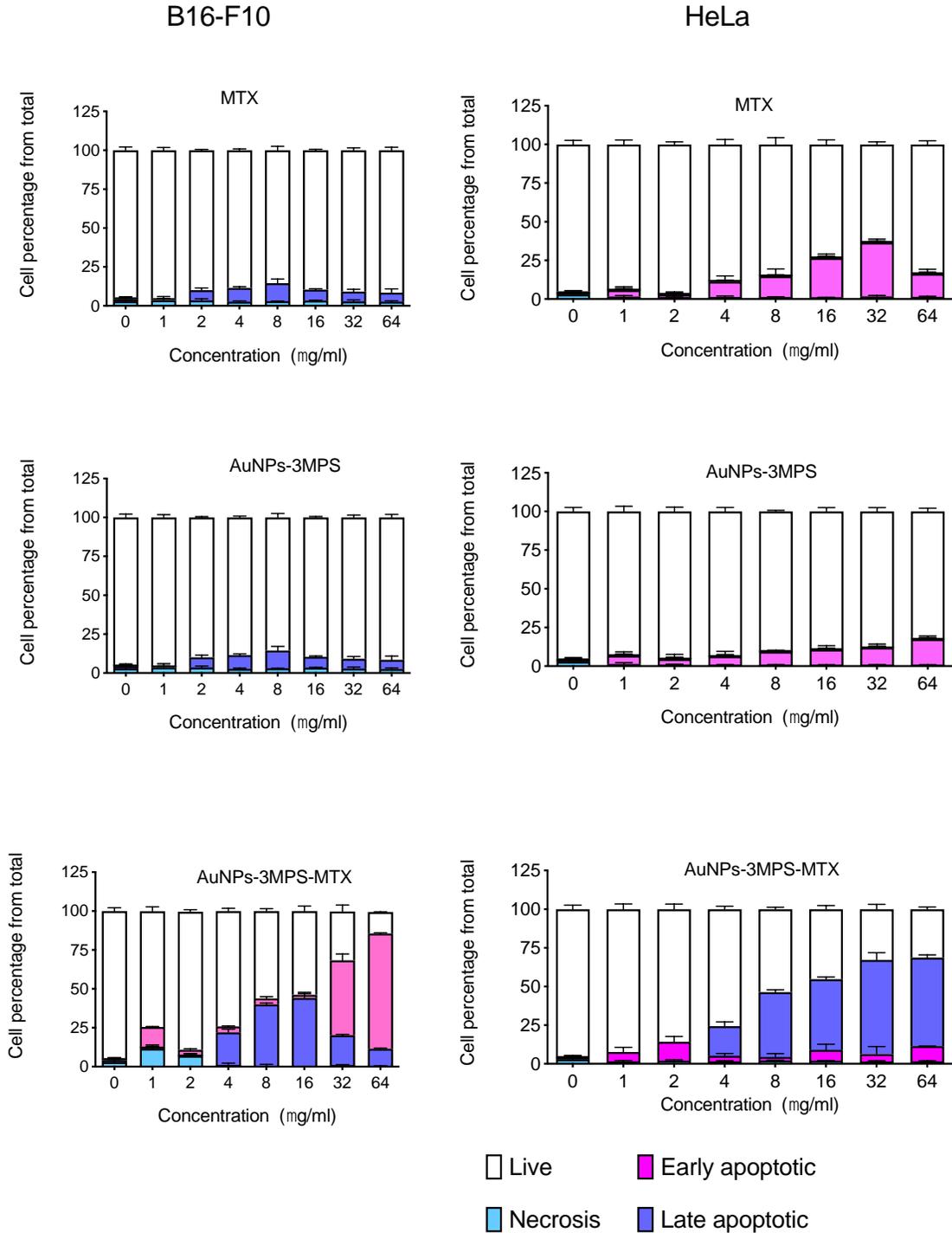


Fig. 15. Muerte celular de (a) células de melanoma B16-F10 y (b) células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de NPsAu, NPsAu-MTX y MTX. Los resultados se expresan como la media \pm DE (n=3).

9.7 Determinación de la internalización de las NPsAu en células B16-F10 y HeLa

Se realizó análisis de citometría de flujo para determinar la capacidad de las NPsAu-3MPS-MTX de ser captadas por células cancerosas. La captación de nanopartículas por las células se ha investigado previamente mediante citometría de flujo, una técnica que permite comparar la complejidad intracelular, a menudo denominada granularidad, entre distintas poblaciones celulares^{22,23}. Las mediciones de citometría de flujo, en concreto la dispersión lateral (SSC), están directamente relacionadas con la complejidad intracelular. En consecuencia, pudimos comparar el contenido de vesículas de las células de control con la complejidad intracelular de las células expuestas a NPsAu-3MPS-MTX. En la Fig. 16 se compara el porcentaje de células que han internalizado NPsAu-3MPS-MTX, NPsAu-3MPS y MTX libre. Como se muestra, las NPsAu-3MPS-MTX fueron internalizadas por las células cancerosas de melanoma B16-F10 y HeLa. Por el contrario, no hay indicios de que el MTX modifique el contenido citoplasmático de ambas líneas celulares.

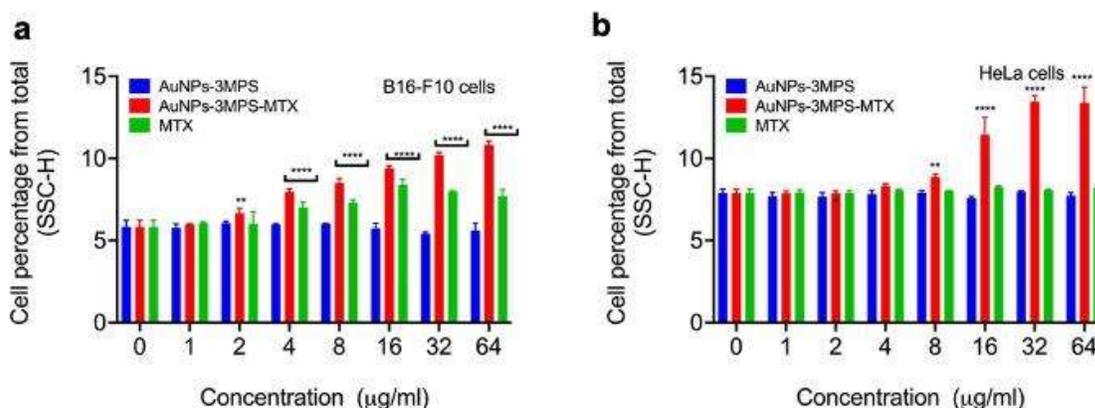


Fig. 16. Internalización de nanopartículas en (a) células de melanoma B16-F10 y (b) células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de NPsAu, NPsAu-MTX y MTX. Los resultados se expresan como media \pm DE ($n=3$). ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ mediante ANOVA de dos vías con la prueba de comparación de Tukey.

10. DISCUSIÓN

La característica bioinerte del oro ofrece formulaciones de nanopartículas que son esencialmente no tóxicas y no inmunogénicas, lo que hace que las nanopartículas de oro sean adecuadas para estudios exploratorios *in vitro* e *in vivo*^{97,98}. En este contexto, se estudió el efecto sobre la viabilidad celular de las células de melanoma B16-F10 y HeLa. Dado que una de las aplicaciones más comunes de las NPsAu es la vectorización y focalización de fármacos, en este estudio se utilizó metotrexato (MTX) como sustancia activa para el tratamiento del cáncer. Para este ensayo se utilizó el ensayo MTT, una técnica colorimétrica que mide la reducción del MTT para determinar la actividad mitocondrial. En comparación con el MTX libre, las AuNPs son biocompatibles como se ha establecido previamente en la literatura¹⁶. Sin embargo, cuando se evaluó el efecto del nanosistema NPsAu-3MPS-MTX para las líneas celulares de melanoma B16-F10, se observó una disminución de la viabilidad celular de forma dependiente de la concentración, presentándose una menor viabilidad celular a mayores concentraciones del nanosistema. Esto indicó que NPsAu-3MPS-MTX era tóxico para la línea celular de melanoma B16-F10, que se considera uno de los cánceres más agresivos⁹⁹, según lo descrito por Miooc, M., et al. (2018). En dicho estudio, los autores informaron de que concentraciones superiores a 100 µg/mL de nanopartículas de oro conjugadas con betulina modificadas en superficie, indujeron una disminución notable de la viabilidad celular. Por el contrario, cuando se utilizó el nanosistema NPsAu-3MPS-MTX, se observó una reducción significativa de la viabilidad celular a 8 µg/mL, que fue incluso superior al efecto causado por el MTX libre. Por otra parte, en comparación con el MTX libre, las células HeLa mostraron una mayor susceptibilidad al nanosistema NPsAu-3MPS-MTX a 4 µg/mL. Esta disminución de la viabilidad celular indica que el fármaco se dirige a las células HeLa y también ejerce sus efectos sobre ellas. Este efecto podría estar asociado a la forma de las NPsAu, como demostraron Zhao, X. F, et al. (2019). En su estudio, los autores observaron una disminución de la viabilidad celular en células HeLa cuando se utilizó MTX junto con NPsAu, en comparación con el uso de MTX solo¹⁰⁰. Siddique, S., et al. (2020) describieron una correlación entre la morfología y la funcionalización de las NPsAu con su efecto citotóxico²⁸. En dicha revisión, los autores afirmaron que el tamaño, la forma y

la funcionalización de las NPs modifican su eficacia^{101, 102}. En este trabajo, se cargaron NPs Au-3MPS esféricas de 5 nm con el fármaco lipofílico MTX, aumentando así su biodisponibilidad (Fig. 17: Imágenes SEM de NPs Au-3MPS prístinas y cargadas con MTX). La elección de la funcionalización directa con tioles altamente hidrofílicos reduce significativamente la posible citotoxicidad de las nanopartículas de oro¹⁶.

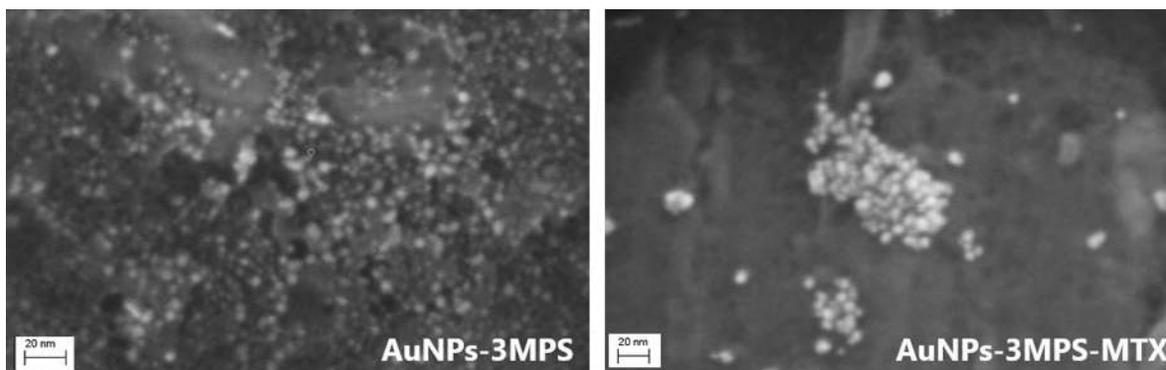


Fig. 17. Imágenes FE-SEM de NPs Au-3MPS prístinas y cargadas con MTX.

Además, el agente funcionalizante 3MPS actúa como plataforma para la conjugación post-síntesis de MTX a través de la unión electrostática (entre los grupos aromáticos $-NH_2$ protonados en la estructura de anillo de MTX y los grupos $-SO_3^-$ cargados negativamente), dando lugar a la formación de grandes grupos con una disposición densamente empaquetada de NPs Au-3MPS-MTX, de acuerdo con los resultados de la literatura¹⁹.

El tamaño del sistema fue un factor importante para su permeabilidad en las células estudiadas, lo que condujo a una liberación adecuada de la sustancia activa utilizada para la muerte celular programada y contrarrestar la proliferación de células malignas a concentraciones más bajas de MTX en células HeLa.

Además, este estudio investigó la permeabilidad de la membrana debido al papel crucial de las interacciones nanomaterial-célula y bicapa lipídica en diversas aplicaciones, como la fototerapia, la obtención de imágenes y la liberación de fármacos/genes. Estas aplicaciones requieren un control preciso de las interacciones nanopartícula-célula, que dependen principalmente de las propiedades superficiales de las nanopartículas¹⁰³. Además, la disminución de la viabilidad celular podría atribuirse al

estrés oxidativo inducido por especies reactivas del oxígeno, como ya se ha descrito anteriormente en la bibliografía^{104,105}. Se ha sugerido que la capacidad de las nanopartículas para inducir toxicidad está relacionada con su mayor reactividad superficial, en la que partículas más pequeñas con mayores áreas superficiales por unidad de masa producen más especies reactivas de oxígeno en el entorno celular, lo que conduce a una mayor muerte celular. Como ya se ha mencionado, el nanosistema propuesto tiene un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 5 nm, lo que contribuye a reducir la proliferación de células malignas. Las interacciones del nanomaterial con las membranas celulares vienen determinadas no sólo por su forma y tamaño, sino también por las funcionalidades químicas de su superficie. El nanosistema propuesto demostró un ligero aumento del porcentaje de células permeabilizadas, lo que indica su eficacia para penetrar la membrana celular en ambas líneas celulares. Este efecto benéfico sobre la permeabilidad celular puede atribuirse al tamaño y la forma del nanomaterial durante su interacción con las células, como confirmaron Kimura, N. et al, 2018, en su estudio¹⁰⁶. Utilizaron liposomas con un diámetro de 25 nm para administrar la sustancia activa en el tratamiento de tumores, lo que dio lugar a un menor porcentaje de penetración. Por otro lado, Jain, A. K. et al, 2019 investigaron la eficacia de vehículos portadores de fármacos como nanopartículas de sílice y nanopartículas de fosfato cálcico (CaP) obteniendo NPs de tamaños comprendidos entre 8 y 20 nm¹⁰⁷. Consiguieron un porcentaje efectivo de células permeabilizadas a menor tamaño. Los autores concluyeron que el tamaño y la forma de las nanopartículas eran fundamentales para aumentar la eficacia del principio activo administrado. Tras determinar la disminución de la viabilidad celular, el aumento de las especies reactivas del oxígeno y la penetración efectiva del nanosistema propuesto en la membrana celular. Resulta esencial identificar el tipo de muerte celular provocada por el nanosistema propuesto. La muerte celular es una parte fundamental del ciclo de vida celular, crucial para mantener la homeostasis. La necrosis representa un tipo de muerte celular accidental o no programada, que se produce cuando factores externos superan las condiciones fisiológicas del tejido, sometiendo a la célula a un estrés excesivo e incontrolable. Por otro lado, la apoptosis es la forma más ampliamente estudiada de muerte celular programada, ya que mantiene el equilibrio fisiológico entre proliferación y

eliminación celular. Diversas sustancias, incluidos ligandos inductores de muerte, ácidos nucleicos, ERO, mediadores inflamatorios, toxinas y fármacos, entre otras sustancias, activan mecanismos que conducen a la célula a su destrucción. Según los resultados obtenidos en este estudio, se observó apoptosis tardía en concentraciones que oscilaban entre 4 y 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las células HeLa, lo que indica una mayor susceptibilidad en comparación con las células de melanoma B16-F10. La presencia de apoptosis tardía a concentraciones más altas sugiere que el nanosistema NPsAu-3MPS-MTX es eficaz para reducir las células vivas y programar eficazmente la muerte celular. Esta característica evita un desequilibrio en el entorno celular. Por lo tanto, el uso del nanosistema propuesto resulta prometedor para promover eficazmente la muerte celular programada.

En este sentido, Liu C. M., et al. 2019, desarrollaron una nanopartícula con estructura de núcleo/cáscara única para el tratamiento del cáncer de próstata¹⁰⁸. Su enfoque implicó el uso de un núcleo de nanopartícula de sílice mesoporosa como contenedor para encapsular fármacos, incluida la doxorubicina (DOX), junto con CaCO_3 altamente eficiente. Su estudio demostró una notable eficacia antitumoral mediante la detección de células vivas/muertas, y su experimento de apoptosis reveló que el material propuesto inducía eficazmente la muerte relacionada con la apoptosis en células de cáncer de próstata.

La apoptosis es un proceso en el que el ADN de las células del núcleo se escinde en fragmentos más pequeños, y ciertos orgánulos celulares, como el retículo endoplásmico, también se rompen en fragmentos. Finalmente, toda la célula se divide en pequeños fragmentos, cada uno de ellos meticulosamente envuelto en un haz de membranas. El presente trabajo indica que el nanosistema propuesto NPsAu-3MPS-MTX probablemente logra una disposición similar, mitigando el riesgo de desequilibrio celular.

11. CONCLUSIONES

Las NPsAu-3MPS altamente hidrofílicas, pequeñas, estables y no citotóxicas como portadoras de fármacos tienen un potencial prometedor para tratar el cáncer de cuello de útero y el melanoma. Mientras que las NPsAu-3MPS libres no mostraron citotoxicidad, el nanoconjugado NPsAu-3MPS-MTX exhibió un efecto más potente que el MTX libre. El papel activo de las AuNPs-3MPS en la administración de fármacos se puso de manifiesto mediante estudios de permeación, que demostraron una mejor penetración del fármaco en el interior de las células. Como se informó previamente¹⁶, las NPsAu-3MPS funcionalizadas tenían un tamaño hidrodinámico medio de 5 nm. Estas características y propiedades del nanosistema indujeron citotoxicidad, probablemente atribuida al aumento de especies reactivas de oxígeno para ambas líneas celulares estudiadas. Además, el tamaño del nanosistema desempeñó un papel crucial en su permeabilidad al interior de las células, provocando la muerte celular programada y contrarrestando la proliferación de células malignas. En las células HeLa, el nanosistema propuesto demostró una disminución más significativa de la viabilidad celular por apoptosis tardía que la línea celular B16-F10. Esta observación sugiere que el sistema propuesto actúa eficazmente sobre el MTX y lo libera, potenciando el efecto terapéutico tanto en las células B16-F10 como en las HeLa. Esto respalda su potencial como enfoque valioso para la administración selectiva de fármacos y el tratamiento del cáncer.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. J.J. Liang, Y.Y. Zhou, J. Wu, Y. Ding. Drug Metab. Curr., 2014, 15, 620–631.**
- 2. N. Bawarski, E. Chidlow, D.J. Bharali, S.A. Mousa. 2008. Emerging nanopharmaceuticals. Nanomed Nanotech Biol Med., 4, 273-282.**
- 3. P.M. Ajayan, J.M. Lambert, P. Bernier, L. Barbedette, C. Colliex, J.M. Planeix. 1993. Chem Phys Let 215, 509-517.**
- 4. M. Moddaresi, M.B. Brown, Y. Zhao, S. Tamburic, S.A. Jones, Intern J Pharmac., 2010, 400(1-2), 176-182.**
- 5. Sarah D. Brown, Paola Nativo, Jo-Ann Smith, David Stirling, Paul R. Edwards, Balaji Venugopal, David J. Flint, Jane A. Plumb, Duncan Graham, and Nial J. Wheate. 2010. Journal of the American Chemical Society, 132 (13), 4678-4684.**
- 6. Vaikundamoorthy Ramalingam, Krishnamoorthy Varunkumar, Vilwanathan Ravikumar & Rajendran Rajaram, 2018, Scientific Reports, 8:3815**
- 7. Satish Kumar Vemuria, Rajkiran Reddy Banala, Sudip Mukherjee, Purushotham Uppula, Subbaiah GPV, Gurava Reddy A.V, Malarvilli T., 2019, Materials Science and Engineering C, 99, 417-4298.**
- 8. Li Ye and Qian Song. 2015. Int. J. Clin. Exp. Med. 8(7), 10501-10507.**
- 9. Iêda Maria Martinez Paino, Valéria Spolon Marangoni, Rita de Cássia Silva de Oliveira, Lusânia Maria Greggi Antunes, Valtencir Zucolotto. 2015. Toxicology Letters, 215(2), 119-125.**
- 10. Xiaoxu Zhao, Jinghua Pan, Wei Li, Wende Yang, Li Qin, Yunlong Pan, Int. J., 2018, Nanomedicine, 13, 6207-6221.**
- 11. Farhat Naz, Amit Kumar Dinda, Arun Kumar, Veena Koul, 2019, International Journal of Pharmaceutics, 569, 118561**
- 12. Mian Yu, Jiayin Yu, Yunfei Yi, Ting Chen, Liu Yu, Weiwei Zeng, Xiaokun**

Ouyang, Chenyi Huang, Shengjie Sun, Yang Wang, Yuanqi Liu, Chuchu Lin, Meiyong Wu, Lin Mei, 2022, *Journal of Controlled Released*, 347, 104-114.

13. Ting Chen, Weiwei Zeng, Changjun Tie, Mian Yu, Huisong Hao, Yang Deng, Qianqian Li, Hairong Zheng, Meiyong Wu, Lin Mei, 2022, *Bioactive Materials*, 10, 515-525.

14. Xiaowei Zeng, Miaomiao Luo, Gan Liu, Xusheng Wang, Wei Tao, Yaoxin Lin, Xiaoyuan Ji, Lin Nie, Lin Mei, 2018, *Advanced Science*, 5, 1800510.

15. Qianqian Li, Zhaoqing Shi, Fan Zhang, Weiwei Zeng, Dunwan Zhu, Lin Mei, 2022, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(1), 107-134.

16. T. A. Salamone, L. Rutigliano, B. Pennacchi, S. Cerra, R. Matassa, S. Nottola, F. Sciubba, C. Battocchio, M. Marsotto, A. Del Giudice, A. Chumakov, A. Davydok, S. Grigorian, G. Canettieri, E. Agostinelli, I. Fratoddi, 2023, *Journal of Colloid and Interface Science*, 649, 264-278.

17. H. Bessar, I. Venditti, L. Benassi, C. Vaschier, P. Azzoni, G. Pellacani, C. Magnon, E. Botti, V. Casagrande, M. Federici, A. Costanzo, L. Fontana, G. Testa, F.M. Fawzia, I.S. Ali, R.M. Vittoria, I. Fratoddi, 2016, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 141, 141–147.

18. M. Magogotya, M. Vetten, MP Roux-van der Merwe, J. Badenhorst, M. Gulumian, 2022, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 883-884, 503556.

19. S. Cerra, R. Matassa, A.M. Beltrán, G. Familiari, C. Battocchio, I. Pis, F. Sciubba, F.A. Scaramuzzo, A. Del Giudice, I. Fratoddi, 2020, *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* 117, 111337.

20. Ilaria Fratoddi, Luisa Benassi, Elisabetta Botti, Cristina Vaschieri, Iole Venditti, Hagar Bessar, Maie A. Samir, Paola Azzoni, Cristina Magnoni, Antonio Costanzo, Viviana Casagrande, Massimo Federici, Luca Bianchi, Giovanni Pellacani, 2019, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 17, 276-286.

21. **Dalia Chávez-García, Karla Juárez Moreno, Itamar Calderón-Osuna, Patricia Navarro, Gustavo A. Hirata, 2020**, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 108 (6), 2396-2406.
22. **Cai W., Hsu A.R., Li Z.B., 2007**, Are quantum dots ready for in vivo imaging in human subjects?. Nanoscale Res Lett, 2:265–81.
23. **Cai W, Shin D.W., Chen K., 2006**, Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. Nano Res Lett, 6:669–76.
24. **Liu Z., Cai W., He L., 2007**, In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. Nat Nanotechnol: 2:47–52.
25. **Thorek D. L., Chen A. K., Czupryna J., 2006**, Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. Ann Biomed Eng, 34:23–38.
26. **Park, J. W., Benz, C. C., & Martin, F. J., 2004**, Future directions of liposome-and immunoliposome-based cancer therapeutics. In Seminars in oncology (Vol. 31, pp. 196-205). WB Saunders.
27. **Huang X, Jain P. K., El-Sayed I. H., 2007**, Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. Nanomed, 2:681–93.
28. **Ferrari, M., 2005**, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. Nature reviews cancer, 5(3), 161-171.
29. **Grodzinski, P., Silver, M., & Molnar, L. K., 2006**, Nanotechnology for cancer diagnostics: promises and challenges. Expert review of molecular diagnostics, 6(3), 307-318.
30. **Venditti, I., 2017**, Gold nanoparticles in photonic crystals applications: A review. Materials, 10(2), 97.
31. **Rossi, A., Donati, S., Fontana, L., Porcaro, F., Battocchio, C., Proietti, E., ... & Fratoddi, I., 2016**, Negatively charged gold nanoparticles as a dexamethasone carrier:

stability in biological media and bioactivity assessment in vitro. *Rsc Advances*, 6(101), 99016-99022.

32. **Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J., 1951**, The nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc*, 11:55–75.

33. **Frens, G., 1973**, Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature physical science*, 241(105), 20-22.

34. **Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., & Whyman, R., 1994**, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid–liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (7), 801-802.

35. **Martin, C. R., 1994**, Nanomaterials: a membrane-based synthetic approach. *Science*, 266(5193), 1961-1966.

36. **Van der Zande, B. M., Böhmer, M. R., Fokkink, L. G., & Schönenberger, C., 1997**, Aqueous gold sols of rod-shaped particles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(6), 852-854.

37. **Jana, N. R., Gearheart, L., & Murphy, C. J., 2001**, Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(19), 4065-4067.

38. **Busbee, B. D., Obare, S. O., & Murphy, C. J., 2003**, An improved synthesis of high-aspect-ratio gold nanorods. *Advanced Materials*, 15(5), 414-416.

39. **Oldenburg, S. J., Jackson, J. B., Westcott, S. L., & Halas, N. J., 1999**, Infrared extinction properties of gold nanoshells. *Applied Physics Letters*, 75(19), 2897-2899.

40. **Caruso, F., 2001**, Nanoengineering of particle surfaces. *Advanced materials*, 13(1), 11-22.

41. **Suzuki, D., & Kawaguchi, H., 2005**, Modification of gold nanoparticle composite nanostructures using thermosensitive core-shell particles as a template. *Langmuir*, 21(18), 8175-8179.

42. **Chen, J., McLellan, J. M., Siekkinen, A., Xiong, Y., Li, Z. Y., & Xia, Y., 2006**, Facile synthesis of gold– silver nanocages with controllable pores on the surface. *Journal of the American Chemical Society*, 128(46), 14776-14777.
43. **Chen, J., Saeki, F., Wiley, B. J., Cang, H., Cobb, M. J., Li, Z. Y., ... & Xia, Y., 2005**, Gold nanocages: bioconjugation and their potential use as optical imaging contrast agents. *Nano letters*, 5(3), 473-477.
44. **Hu, M., Chen, J., Li, Z. Y., Au, L., Hartland, G. V., Li, X., & Xia, Y., 2006**, Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 35(11), 1084-1094.
45. **Sha, M. Y., Xu, H., Penn, S. G., & Cromer, R., 2007**, SERS nanoparticles: a new optical detection modality for cancer diagnosis.
46. **Hering, K., Cialla, D., Ackermann, K., Dörfer, T., Möller, R., Schneidewind, H., & Popp, J., 2008**, SERS: a versatile tool in chemical and biochemical diagnostics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 390, 113-124.
47. **Cao, H., Tegenfeldt, J. O., Austin, R. H., & Chou, S. Y., 2002**, Gradient nanostructures for interfacing microfluidics and nanofluidics. *Applied Physics Letters*, 81(16), 3058-3060.
48. **Qian, X. M., & Nie, S. M., 2008**, Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 37(5), 912-920.
49. **Keren, S., Zavaleta, C., Cheng, Z. D., de La Zerda, A., Gheysens, O., & Gambhir, S. S., 2008**, Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5844-5849.
50. **Rao, C. N. R., Natarajan, S., & Vaidhyanathan, R., 2004**, Metal carboxylates with open architectures. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(12), 1466-1496.
51. **Schmid, G., Goychuk, I. y Hänggi, P., 2004**, Efecto del bloqueo de canales sobre

la actividad de picos de membranas excitables en un modelo estocástico de Hodgkin-Huxley. *Biología física*, 1 (2), 61.

52. **Bai, D., Wang, Q., Song, Y., Li, B., & Jing, H., 2011**, Synthesis of cyclic carbonate from epoxide and CO₂ catalyzed by magnetic nanoparticle-supported porphyrin. *Catalysis Communications*, 12(7), 684-688.

53. **Moddaresi, M., Brown, M. B., Zhao, Y., Tamburic, S., & Jones, S. A., 2010**, The role of vehicle–nanoparticle interactions in topical drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 400(1-2), 176-182.

54. **Gao, J. W., Zheng, R. T., Ohtani, H., Zhu, D. S., & Chen, G., 2009**, Experimental investigation of heat conduction mechanisms in nanofluids. Clue on clustering. *Nano letters*, 9(12), 4128-4132.

55. **Salata, O. V., 2004**, Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology*, 2(1), 1-6.

56. **Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D., & Schnekenburger, J., 2009**, Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 370-377.

57. **Ajayan P. M., Lambert J. M., Bernier P., Barbedette L., Colliex C., Planeix J. M., 1993**, Growth morphologies during cobalt-catalyzed single-shell carbon nanotube synthesis. *Chem Phys Let*, 215:509-517.

58. **Bai D., Xia X., Yow C. M. N., Chu E. S. M., Xu C., 2011**, Hypocretin B-encapsulated nanoparticle-mediated rev-caspase-3 gene transfection and photodynamic therapy on tumor cells. *Europ J Pharmacol*, 650(2-3,15):496-500.

59. **Bianco, A., Kostarelos, K., & Prato, M., 2005**, Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*, 9(6), 674-679.

60. **Alex, S., Tiwari, A., 2015**, Functionalized gold nanoparticles: synthesis, properties, and applications: a review. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 15(3), 1869-

1894.

61. **Foldvari, M., & Bagonluri, M., 2017**, Carbon Nanotubes as Functional Excipients for Nanomedicines: II. Pharmaceutical Properties. *Nanomedicine in Cancer*, 523-548.

62. **Thomas, D. G., Pappu, R. V., & Baker, N. A., 2011**, NanoParticle Ontology for cancer nanotechnology research. *Journal of biomedical informatics*, 44(1), 59-74.

63. **Arnold, M., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Vaccarella, S., Meheus, F., ... & Bray, F., 2022**, Global burden of cutaneous melanoma in 2020 and projections to 2040. *JAMA dermatology*, 158(5), 495-503.

64. **Organización Mundial de la Salud [OMS], 2023**, Cáncer. Nota descriptiva. Recuperado el 1 de septiembre de 2023, de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/human-papilloma-virus-and-cancer>

65. **Ledford, H., 2014**, Metabolic quirks yield tumour hope. *Nature*, 508(7495), 158-9.

66. **Hassanpour, S. H., & Dehghani, M., 2017**, Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of cancer research and practice*, 4(4), 127-129.

67. **Union for International Cancer Control [UICC], 2022**, What is World Cancer Day? Recuperado el 20 de octubre de 2022, de: <http://www.worldcancerday.org/about>

68. **American Cancer Society, 2022**, Cancers That Develop in Young Adults. Recuperado el 6 de noviembre de 2023, de: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-in-young-adults/cancers-in-young-adults.html>

69. **Santamarina A, Verdecia D, Segura M, Santamarina M, Verdecia Y, Fiallo A., 2020**, Evaluation of the National Program for the Early Diagnosis of Cervical Cancer in Bartolomé Masó Márquez. *Rev. Cubana Enfermer.* 12(5), 16-19.

70. **Sureda Peña, M., & Martínez Cárdenas, D., 2014**, Una alerta para la mujer: factores de riesgo del cáncer cervicouterino. *Medicentro Electrónica*, 18(1), 36-38.

71. **Moya-Salazar J, Rojas-Zumaran V, Torres-Martínez R, Rosas-Vargas L., 2019**,

Non-neoplastic findings and epithelial cell abnormalities on cervical cytology. *Rev Cubana Obstet. Ginecol.* 22(3), 6-9.

72. **Bzhalava, D., Guan, P., Franceschi, S., Dillner, J., & Clifford, G., 2018**, A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology*, 445(1-2), 224-231.

73. **Buck, C. B., Day, P. M., & Trus, B. L., 2013**, The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, 445(1-2), 169-174.

74. **Santos-López, G., Márquez-Domínguez, L., Reyes-Leyva, J., & Vallejo-Ruiz, V., 2015**, Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(S2), 166-171.

75. **Vanegas, V. A., Rubio, A. I., Bedoya, A. M., & Sánchez, G. I., 2008**, Antigenic and Molecular Structure of Human Papillomavirus (HPV) 16 Vaccine. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 37-48.

76. **Moya-Salazar, JJ y Rojas-Zumaran, V. A., 2017**, Tendencias en la investigación del virus del papiloma humano en Latinoamérica frente a los países de altos ingresos. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 68 (3), 202-217.

77. **Núñez-Troconis, J., 2022**, Epidemiología del virus del papiloma humano. *Investigación Clínica*, 63(2), 170-184.

78. **Kashyap, N., Krishnan, N., Kaur, S., & Ghai, S., 2019**, Risk factors of cervical cancer: a case-control study. *Asia-Pacific journal of oncology nursing*, 6(3), 308-314.

79. **Garzona Navas, L., & Garzona Navas, G., 2017**, Uso de cámaras de bronceado y cáncer de piel. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 26(1), 22-2

80. **Telich Tarriba, J. E., Monter Plata, A., Víctor Baldín, A., & Apellaniz Campo, A., 2017**, Diagnóstico y tratamiento de los tumores malignos de piel. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 15(2), 154-160.

81. **Gamerosa, P. C., & Téllez, J. E., 2016**, Skin cancer, an actual problem. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 59(2), 6-14.
82. **Madorsky Rowdo, F. P., 2017**, Caracterización de células tumorales de melanoma cutáneo (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
83. **Pópulo, H., Soares, P., & Lopes, J. M., 2017**, Insights into melanoma: targeting the mTOR pathway for therapeutics. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(7), 689-705.
84. **Van Allen, E. M., Miao, D., Schilling, B., Shukla, S. A., Blank, C., Zimmer, L. & Garraway, L. A., 2015**, Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*, 350(6257), 207-211.
85. **Van Zeijl, M. C. T., Van Den Eertwegh, A. J., Haanen, J. B., & Wouters, M. W. J. M., 2017**, (Neo) adjuvant systemic therapy for melanoma. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 43(3), 534-543.
86. **Wilson, M. A., & Schuchter, L. M., 2016**, Chemotherapy for melanoma. *Melanoma*, 209-229.
87. **Testori, A., Ribero, S., & Bataille, V., 2017**, Diagnosis and treatment of in-transit melanoma metastases. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 43(3), 544-560.
88. **Aikins, M. E., Xu, C., & Moon, J. J., 2020**, Engineered nanoparticles for cancer vaccination and immunotherapy. *Accounts of chemical research*, 53(10), 2094-2105.
89. **Chan, H. C., Chia, C. H., Zakaria, S., Ahmad, I., & Dufresne, A., 2013**, Production and characterisation of cellulose and nano-crystalline cellulose from kenaf core wood. *BioResources*, 8(1), 785-794.
90. **Dervieux, T., Zablocki, R., & Kremer, J., 2010**, Red blood cell methotrexate polyglutamates emerge as a function of dosage intensity and route of administration during pulse methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 49(12), 2337-2345.

91. **Bernkop-Schnürch, A., 2005**, Mucoadhesive systems in oral drug delivery. Drug discovery today: Technologies, 2(1), 83-87.
92. **Vallejo Díaz, B. M., & Perilla, J. E., 2008**, Conceptual elements to study the bioadhesive behavior in polymers. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 37(1), 33-61.
93. **Maksimovic, V., Pavlovic-Popovic, Z., Vukmirovic, S., Cvejic, J., Mooranian, A., Al-Salami, H., ... & Golocorbin-Kon, S., 2020**, Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. Molecular biology reports, 47, 4699-4708.
94. **Zhao, X. F., Liu, Z. L., Li, X. D., Li, S. P., & Song, F. G., 2019**, The performance of attapulgite hybrids combined with MTX and Au nanoparticles. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 124, 73-80.
95. **Ashutosh Kumar, Alok K. Pandey, Shashi S. Singh, Rishi Shanker, Alok Dhawan, 2011**, Chemosphere, 83(8), 1124-1132.
96. **Hiroshi Suzuki, Tatsushi Toyooka, Yuko Ibuki, 2007**, Environ. Science, Technol., 41(8), 3018-3024.
97. **A. M. Alkilany and C.J. Murphy, 2010**, Journal of Nanoparticle Research, 12(7), 2313-2333.
98. **S.B. Lee, G. Yoon, S. W. Lee, S.Y. Jeong, B. C. Ahn, D.K. Lim, J. Lee, Y.H. Jeon, 2016**, Small, 12(35), 4894-4901.
99. **M. Mioc, I. Z. Pavel, R. Ghiulai, D.E. Coricovac, C. Farcaş, C.V. Mihali, C. Oprean, V. Serafim, R.A. Popovici, C.A. Dehelean, M.I. Shtilman, A.M. Tsatsakis and C. Şoica, 2018**, Frontiers in Pharmacology, 9, 429.
100. **X.F. Zhao, Z.L. Liu, X.D. Li, S.P. Li, F.G. Song, 2019**, Journal of Physics and Chemistry of Solids, 124, 73-80.
101. **S. Siddique, J.C, Chow, 2020**, Applied Sciences, 10(11), 3824.

102. **D. Mandal, A. Maran, M.J. Yaszemski, M.E. Bolander, G. Sarkar, J. 2008**, Mater. Sci. Mater. Electron, 20, 347–350.
103. **K. Juárez-Moreno, D. Chávez-García, G. Hirata, R, Vázquez-Duhalt, 2022**, Toxicology *in vitro*, 85, 105461.
104. **M.N. O'Brien, M. R. Jones, K. A. Brown, C. A. Mirkin, 2014**, Journal of the American Chemical Society, 136(21), 7603-7606.
105. **N. Pandiyan, B. Murugesan, M. Arumugam, J. Sonamuthu, S. Samayanan, S. Mahalingam, 2020**, Journal of Molecular Liquids, 312, 113245.
106. **N. Kimura, M. Maeki, Y. Sato, Y. Note, A. Ishida, H. Tani, H. Harashima, M. Tokeshi, 2018**, ACS Omega, 3(5), 5044-5051.
107. **R. K. Jain and S. Thareja, S., 2019**, Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 47(1), 524-539.
108. **C. M. Liu, G.B. Chen, H.H. Chen, J.B. Zhang, H.Z. Li, M.X. Sheng, W.B. Weng, S.M. Guo, 2019**, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 175, 477-486.