

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFEECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS EMPLEANDO  
QUITOSANO Y CITRATO DE SODIO COMO AGENTES REDUCTORES,  
SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA  
HUMANA**

**POR**  
**LIZETH IVÓN ÁLVAREZ CHÁIREZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

**DICIEMBRE, 2016**

**EFEECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS EMPLEANDO  
QUITOSANO Y CITRATO DE SODIO COMO AGENTES REDUCTORES, SOBRE  
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA**

**COMITÉ DE TESIS**

---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
DIRECTOR

---

Dra. Diana Ginette Zárate Triviño  
SECRETARIO

---

Dr. Moisés Armides Franco Molina  
VOCAL

---

Dra. Ana Carolina Martínez Torres  
VOCAL

---

Dr. Pablo Zapata Benavides  
VOCAL

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS EMPLEANDO  
QUITOSANO Y CITRATO DE SODIO COMO AGENTES REDUCTORES,  
SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA  
HUMANA**

---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
Director

---

Dra. Diana Ginette Zarate Triviño  
Co-Director

**EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS EMPLEANDO  
QUITOSANO Y CITRATO DE SODIO COMO AGENTES REDUCTORES, SOBRE  
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA**

Dirección de Tesis

---

Dra. Cristina Rodríguez Padilla  
Director

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del laboratorio de inmunología y virología.

## I. AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por darme la oportunidad de estar aquí, en los lugares en los que tengo que llegar y por la fortaleza para seguir adelante.

Agradezco especialmente al personal académico, técnico y administrativo del laboratorio de inmunología y virología por el apoyo que me brindaron durante el desarrollo de este trabajo.

Extiendo mi más sincera admiración y agradecimiento a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, jefa del departamento de inmunología y virología de la facultad de ciencias biológicas de la UANL, por aceptar ser mi directora de tesis, por la oportunidad, facilidad, apoyo y confianza.

A la Dra. Diana Zarate que creo fuimos creciendo juntas al ser su primera estudiante de maestría; por su apoyo, regaños, confianza, orientación laboral y personal, pero sobre todo por su inmensa PACIENCIA en todos los aspectos y su amistad.

A la Dra. Ana Carolina Martínez y todo su equipo de trabajo por el gran apoyo otorgado en lo personal y laboral, por su paciencia al enseñarme técnicas nuevas referentes a citometría de flujo, por todos los regaños recibidos y los números consejos y revisiones, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Moisés Franco Molina y equipo de trabajo por aguantarme tanto tiempo en su laboratorio, por su orientación experimental, numerosos regaños que gracias a ellos modifique muchas cosas en mí y por su apoyo cada uno de los días en los que estuve en los laboratorios.

Al Dr. Pablo Zapata Benavidez por su tiempo, ayuda y disponibilidad al revisar y durante el desarrollo de este proyecto.

Al CONACYT por el apoyo económico para llevar a cabo este trabajo y que gracias a ello, pude salir de mi estado para seguir estudiando.

A mis compañeros y amigos de maestría: Alex, Claudia, Charly, Talyha, Yareellys, Mariela y Felipe por su apoyo, consejos, pero sobre todo que gracias a ellos, cada día me esforzaba debido a que todos son estudiantes de excelencia.

A mis padres y hermanos por todo el esfuerzo realizado, amor y apoyo incondicional siempre, pero sobre todo ejemplo de perseverancia y el ir adelante cada uno de los días sin importar las condiciones adversas.

A mis numerosos amigos y compañeros del LIV y del laboratorio de Nanotecnología: Luis Castillo, Edgar Pacheco, Sara Hernández, Raúl Rangel, Gaby Medina, Magge, Edelin, Don David, Anita, Willy, Edgar Fernández, etc. y a los que deje por un tiempo en Zacatecas: Ángel Belmontes, Fam. Ramírez Ramírez, Rodolfo Hernández, Mayra Rodríguez, Francisco Rodríguez y Moy Betancourt, por su apoyo y por el tiempo compartido.

## **II. DEDICATORIA**

A mis padres por que este proyecto es el reflejo de un esfuerzo conjunto, ya que al estar separada de ellos, me hizo entender aun más lo importante que son para mí.

A mis hermanos que son ejemplo de vida, constancia y dedicación.

A mis sobrinas por recordarme lo fácil, simple y divertida que es la vida sin importar los problemas a enfrentar.

### III. ÍNDICE GENERAL

I. AGRADECIMIENTOS .....	II
II. DEDICATORIA.....	IV
III. ÍNDICE GENERAL .....	V
IV. ÍNDICE DE TABLAS .....	VII
V. ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
VI. ABREVIATURAS .....	X
VII. RESUMEN .....	XIII
VIII. ABSTRACT .....	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. Nanotecnología y nanopartículas de oro.....	3
2.1.1. Subtipos de nanopartículas de oro .....	5
2.1.2. Métodos de caracterización y principales propiedades de nanopartículas de oro.....	6
2.1.3. Aplicaciones de la nanopartículas de oro .....	9
2.1.4. Toxicidad de nanopartículas de Oro .....	10
2.2. Síntesis de nanopartículas de oro usando quitosano.....	15
2.2.1. Quitosano y sistema inmune .....	17
3. JUSTIFICACIÓN .....	22
4. HIPÓTESIS .....	23
5. OBJETIVOS .....	24
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	24
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
6. MATERIAL Y METODOLOGÍA .....	25
6.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro .....	25
6.1.1. Síntesis de nanopartículas de oro con citrato de sodio (CS) .....	25
6.1.2. Síntesis de nanopartículas de oro con quitosano (CTS).....	25
6.1.3. Caracterización de nanopartículas.....	25
6.2. Mantenimiento de cultivo celular .....	26

6.3. Separación de células mononucleares a partir de sangre periférica humana (PBMC´s) por gradiente de densidad.....	26
6.4. Análisis de citotoxicidad de PBMC utilizando marcaje con Anexina V y Ioduro de Propidio.....	27
6.5. Poblaciones celulares .....	28
6.6. Detección de citocinas en sobrenadante de cultivo de PBMC y macrófagos peritoneales de ratón .....	28
6.7. Aislamiento de los macrófagos peritoneales murinos .....	29
6.8. Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) .....	29
6.9. Cuantificación de óxido nítrico (ON) en macrófagos peritoneales de ratón.	30
6.10. Análisis Estadístico .....	31
7. RESULTADOS .....	32
7.1. Caracterización de nanopartículas de oro de 5 -10 nm utilizando quitosano (CTS) y citrato de sodio (CS) como agentes reductores.....	32
7.2. Efecto de nanopartículas de oro sobre la viabilidad en células de adenocarcinoma de colon (HT-29).....	35
7.2.1. Evaluación de la citotoxicidad de los vehículos involucrados en la síntesis de nanopartículas de oro. ....	36
7.3. Efecto de nanopartículas de oro en la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC´s).....	37
7.3.1. Efecto de las nanopartículas de oro con quitosano como agente reductor sobre las poblaciones celulares CD3, CD19 y CD14 en PBMCs.....	38
7.3.2. Producción de citocinas en PBMC´s.....	42
7.4. Efecto de nanopartículas de oro sobre la viabilidad en macrófagos peritoneales de ratón. ....	43
7.4.1. Producción de citocinas en macrófagos peritoneales de ratón. ....	44
7.4.2. Producción de Oxido Nítrico en macrófagos peritoneales de ratón .....	46
8. DISCUSIÓN .....	48
9. CONCLUSIONES.....	54
10. PERSPECTIVAS.....	56
11. BIBLIOGRAFÍA .....	57
12. RESUMEN BIOGRÁFICO .....	67

#### IV. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Contenido</b>	<b>Pag.</b>
<b>1</b>	Receptores Toll-like y sus ligandos	18
<b>2</b>	Síntesis de nanopartículas de oro	32
<b>3</b>	Producción de citocinas Th1 y Th2 en sobrenadante de PBMC's a 24 hrs con nanopartículas de oro con CS como agente reductor	42
<b>4</b>	Producción de citocinas Th1 y Th2 en sobrenadante de PBMC's a 24 hrs con nanopartículas de oro con CTS como agente reductor	43
<b>5</b>	Producción de citocinas inflamatorias en sobrenadante macrófagos peritoneales de ratón a 24 hrs con nanopartículas de oro con citrato de sodio	45
<b>6</b>	Producción de citocinas inflamatorias en sobrenadante macrófagos peritoneales de ratón a 24 hrs con nanopartículas de oro con quitosano.	45

## V. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Contenido</b>	<b>Pag.</b>
<b>1</b>	Tamaño y comparación de escalas	3
<b>2</b>	Método Turkevich- Frens, síntesis de Np's de Au con citrato de sodio como agente reductor	4
<b>3</b>	Diferentes tipos de nanopartículas de oro	6
<b>4</b>	Localización de la frecuencia de plasmón de superficie	7
<b>5</b>	Estructura Química de la Quitina y Quitosano	16
<b>6</b>	Síntesis de Np's de Au con quitosano como agente reductor	16
<b>7</b>	Principales familias de receptores de reconocimiento de patrones	20
<b>8</b>	Espectroscopia de UV-vis CTS y CS	33
<b>9</b>	Dispersión de Luz Dinámica. a) Tamaño de nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano (CTS) como agente reductor, obteniendo tamaños de nanopartículas y b) potencial Z	33
<b>10</b>	Dispersión de Luz Dinámica. a) Tamaño de nanopartículas de oro sintetizadas con citrato de sodio (CS) como agente reductor, obteniendo tamaños de nanopartículas y potencial Z	34
<b>11</b>	SEM. Microscopia electrónica de Barrido de Nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano (a, azul) y citrato de sodio (b, rojo) como agentes reductores	34
<b>12</b>	Efecto de nanopartículas de oro sobre la viabilidad en células de adenocarcinoma de colon (HT-29)	35
<b>13</b>	Viabilidad celular por nanopartículas de oro con quitosano (CTS, azul) y citrato de sodio (CS, rojo) en células HT29 evaluadas por citometría de flujo	36
<b>14</b>	Citotoxicidad de los vehículos involucrados en la síntesis de nanopartículas de oro	37
<b>15</b>	Efecto de nanopartículas de oro sobre las PBMC's humanas	38
<b>16</b>	Células monucleares de sangre periférica tratadas a 24 horas con 150	39

	$\mu\text{M}$ (DL50) de nanopartículas de oro sintetizadas con CTS como agente reductor y marcadas con CD3+ y anexina V	
<b>17</b>	Células monucleares de sangre periférica tratadas a 24 horas con 150 $\mu\text{M}$ (DL50) de nanopartículas de oro sintetizadas con CTS como agente reductor y marcadas con CD19+ y anexina V	40
<b>18</b>	Células monucleares de sangre periférica tratadas a 24 horas con 150 $\mu\text{M}$ (DL50) de nanopartículas de oro sintetizadas con CTS como agente reductor y marcadas con CD14+ y anexina V	41
<b>19</b>	Producción de IL-6 (pg/ml) en sobrenadante de PBMC's a 24 hrs con nanopartículas de oro con CS y CTS como agentes reductores. b. Producción de TNF (pg/ml) en sobrenadante de PBMC's a 24 hrs con nanopartículas de oro con CS y CTS	43
<b>20</b>	Viabilidad celular relativa en macrófagos peritoneales de ratón	44
<b>21</b>	Citocinas inflamatorias en sobrenadante de macrófagos peritoneales. a. Producción de IL-6 (pg/ml) a diferentes concentraciones de nanopartículas de oro con CS y CTS a 24 hrs. b. Producción de TNF (pg/ml) y c. Producción de MCP-1(pg/ml)	46
<b>22</b>	Concentración de nitrato/nitrito en macrófagos peritoneales de ratón	47

## VI. ABREVIATURAS

<b>SIGNIFICADO</b>	<b>ABREVIATURA</b>
Nanopartículas	Np's
Nanopartículas de oro	Np's de Au
Ácido acético	AA
Oro	Au
Plata	Ag
Cobre	Cu
Quitosano	CTS
Citrato de sodio	CS
Ácido cloroáurico	HAuCl <sub>4</sub>
Micromolar	Mm
Nanómetros	Nm
Mililitros	ml
Microlitros	μl
Resonancia superficial del plasmón	SRP
Interleucina	IL
Proteína asociada a apoptosis que contiene un reclutamiento de caspasas	ASC
Dominios de reclutamiento de caspasas	CARD
Ultravioleta visible	UV-Vis
Microscopía electrónica de transmisión	TEM
Microscopía electrónica de barrido	SEM
Dispersión de luz dinámica	DLS
Microscopía de fuerza atómica	AFM
espectroscopia de fotoelectrones de rayos x	XPS
Difracción de Rayos X	XRD
Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier	FTIR

Deserción láser asistida por matriz/espectrometría de ionización de masas de tiempo de vuelo	MALDI-TOF
espectrometría de retro dispersión de Rutherford	RBS
Interferometría dual de polarización y de resonancia magnética nuclear	NMR
Espectroscopia de infrarrojo cercano	NIR
Receptor del factor humano de crecimiento epidérmico	EGFR
Receptores de herceptina	HER2
Patrones moleculares asociados a patógenos	PAMPs
Lipopolisacárido	LPS
Receptores de reconocimiento de patrones	PRR
Receptores NOD-like	NLRP3
Receptores tipo toll	TLR
Receptores de tipo lectina C	CLR
Receptor de manosa	MR
Anticuerpo	Ac
Línea celular de adenocarcinoma de colón humano	HT-29
Fibroblasto derivados de riñón de mono	COS-1
Lactato deshidrogenasa	LDH
Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol)	MTT
Sal interna 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil) 2H-tetrazolio	MTS
Ioduro de propidio	IP
Especies reactivas del oxígeno	ROS
Factor nuclear kB	NF-kB

Células T cooperadoras 1	Th1
Células T cooperadoras 2	Th2
Células mononucleares de sangre periférica humana	PBMC's
Suero fetal bovino	SFB
Buffer de fosfatos salinos	PBS
Ficoeritrina	PE
Clorofila peridina	PerCP
Isotiocianato de fluoresceína	FITC
Densidad óptica	DO
MiliVolts	mV
Dosis letal media	DL <sub>50</sub>
Medio de Eagle modificado de Dulbecco	DMEM
Células de exudado peritoneal	PEC
Factor de necrosis tumoral	TNF
Proteína quimiotáctica de monocitos 1	MCP-1

## VII. RESUMEN

Las nanopartículas de oro (Np's de Au) han tomado gran importancia en disciplinas como la biología, ya que pueden ser empleadas en la detección, diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer. Sin embargo, el riesgo que presenta la inclusión de esta nueva tecnología al área de la biomedicina ha sido un tema controversial, ya que, se debe tomar en cuenta la toxicidad de estos materiales al entrar a nuestro cuerpo y los riesgos que podrían implicar para el sistema inmune.

En este trabajo se sintetizaron y compararon los efectos de las Np's de Au con dos agentes reductores, citrato de sodio y quitosano sobre células de adenocarcinoma de colon (HT-29), células mononucleares de sangre periferia humana (PBMC's) y macrófagos peritoneales de ratón, expuestos a diferentes concentraciones de partículas in vitro.

Las nanopartículas de oro se caracterizaron por espectrofotometría ultravioleta-visible (Uv-Vis), dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopia electrónica de barrido (SEM) y se evaluó su efecto en la viabilidad por medio de la técnica de MTT y citometría de flujo. A partir de estos resultados, se analizó el efecto de las Np's de Au en PBMC's por citometría de flujo determinando el porcentaje de poblaciones CD3<sup>+</sup>(linfocitos T), CD19<sup>+</sup>(linfocitos B) y CD14<sup>+</sup>(macrófagos). Finalmente se evaluó la producción de Óxido Nítrico (ON), y secreción de citocinas en PBMC y macrófagos peritoneales de ratón

Las nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano presentaron mayor citotoxicidad en células HT-29 en comparación con las de citrato de sodio, así mismo se vio que la viabilidad de las PBMC's no se afectó a las mismas concentraciones. A concentraciones de 150  $\mu$ M las Np's de Au sintetizadas con quitosano afectaron las poblaciones celulares CD14<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>, pero no causó daño a la población CD3<sup>+</sup>. Las Np's de Au con citrato de sodio generaron un incremento en la producción de TNF e IL-6 tanto en PBMC's como en macrófagos murinos comparado con el control. La producción de óxido nítrico fue baja en ambos casos. Por lo cual se determinó que bajas concentraciones de Np's de Au recubiertas con quitosano son una alternativa prometedora en el tratamiento del cáncer.

## VIII. ABSTRACT

Gold nanoparticles (Au Np's) have become very important in disciplines such as biology, since it can be used in the detection, diagnosis and treatment of diseases such as cancer. However, the risk posed by the inclusion of this new technology to biomedicine has been a controversial issue since, take into account the toxicity of these materials to enter our bodies and the risks that could lead to the immune system.

In this paper they were synthesized and compared the effects of Np's Au with two reducing agents, sodium citrate and chitosan on cells colon adenocarcinoma (HT-29), mononuclear cells from human peripheral blood (PBMC's) and peritoneal macrophages mouse exposed to different concentrations of particles in vitro.

Gold nanoparticles were characterized by spectrophotometry ultraviolet-visible (UV-Vis), dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM) and its effect on the viability was assessed by means of the technique of MTT and Cytometry flow. From these results, the effect of Au Np's was analyzed by flow cytometry PBMC's determining the percentage of CD3<sup>+</sup> populations (T lymphocytes), CD19<sup>+</sup> (B cells) yCD14<sup>+</sup> (macrophages). Finally the production of nitric oxide (NO), and secretion of cytokines in PBMC and mouse peritoneal macrophages was evaluated

Gold nanoparticles synthesized with chitosan showed greater cytotoxicity in HT-29 cells compared with sodium citrate, and it became clear that the viability of PBMC's not affected at the same concentrations. At concentrations of 150 uM the Np's Au synthesized with chitosan affected cell populations CD14<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup>, but caused no damage to the population CD3<sup>+</sup>. The Au Np's sodium citrate generated an increase in the production of TNF and IL-6 both in murine macrophages PBMC's as compared to control. Nitric oxide production was low in both cases. Therefore it was determined that low concentrations of Au Np's coated with chitosan are a promising alternative for cancer treatment.

# 1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es definida como el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas para controlar la forma y tamaño de la partícula dependiendo de la naturaleza del material a utilizar, a una escala nanométrica (Jain *et al.* 2010). A esta escala las propiedades físicas y químicas cambian, con respecto a los materiales sólidos macroscópicos (Rico *et al.* 2010). Actualmente, la síntesis de nanopartículas metálicas ha generado gran interés debido a sus múltiples aplicaciones y su uso en la detección, diagnóstico específico, y tratamiento personalizado en cáncer.

Las nanopartículas de oro (nanopartículas monometálicas) son dispersiones coloidales de carácter liofóbico, es decir, presentan afinidad prácticamente nula por la fase dispersante (Medina 2006). Uno de los métodos más usados para la obtención de las nanopartículas de oro es el método químico, que implica el tratamiento de sales de metal con un agente reductor (citrato de sodio, borohidruro de sodio) y un agente estabilizante (biomoléculas y organismos). El quitosano es un polisacárido de origen biológico cuyas características intrínsecas tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, sensibilidad al pH, (Huang y Yang 2004; Jin *et al.* 2012; Nguyen *et al.* 2013; Laudenslager *et al.* 2008), así como ser un buen polielectrolito (grupos amino e hidroxilo libres), sugieren que puede ser un buen candidato para la síntesis de nanopartículas de oro (Np's de Au), algunos agentes pueden no ser amigables con el medio ambiente, generando así la búsqueda de métodos menos contaminantes, debido al creciente interés en la minimización o eliminación total de los residuos y la implantación de procesos sustentables; y además que sean biocompatibles, al introducirlas en el cuerpo humano, para ser utilizadas como terapia génica, vectorización y liberación de fármacos o como terapia fototérmica contra células cancerosas.

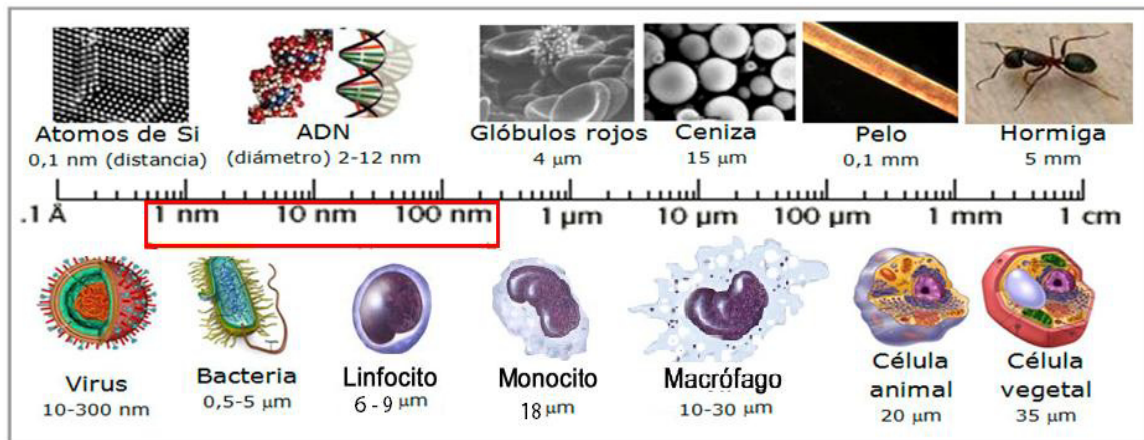
Las células del sistema inmune presentes en la sangre, tales como los macrófagos, células dendríticas, los linfocitos específicos frente al antígeno y otros diversos

leucocitos proporcionan gran cantidad de información sobre la respuesta inmunológica a diversos estímulos y desempeñan funciones especializadas en las respuestas inmunitarias innatas o adaptativas, tratando de eliminar agentes extraños. Las nanopartículas de oro son reconocidas por el sistema inmune desencadenando una serie de reacciones dependiendo de las células involucradas (Zolnik *et al.* 2010). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es obtener nanopartículas de oro con un tamaño de 5 a 10 nm por el método químico con quitosano (CTS) y citrato de sodio (CS) como agentes reductores, y evaluar su efecto citotóxico sobre diferentes líneas celulares *in vitro* enfocándose en la producción de citocinas e inmunofenotipificación de las poblaciones celulares CD3<sup>+</sup> (linfocitos T), CD14<sup>+</sup> (monocitos) y CD19<sup>+</sup> (linfocitos B) en PBMC.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Nanotecnología y nanopartículas de oro

La nanotecnología es definida como el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas para controlar la forma y tamaño de la partícula dependiendo de la naturaleza del material a utilizar, a una escala nanométrica (Figura 1) (Jain *et al.* 2010). A esta escala las propiedades físicas y químicas cambian, con respecto a los materiales sólidos macroscópicos (Rico *et al.* 2010).

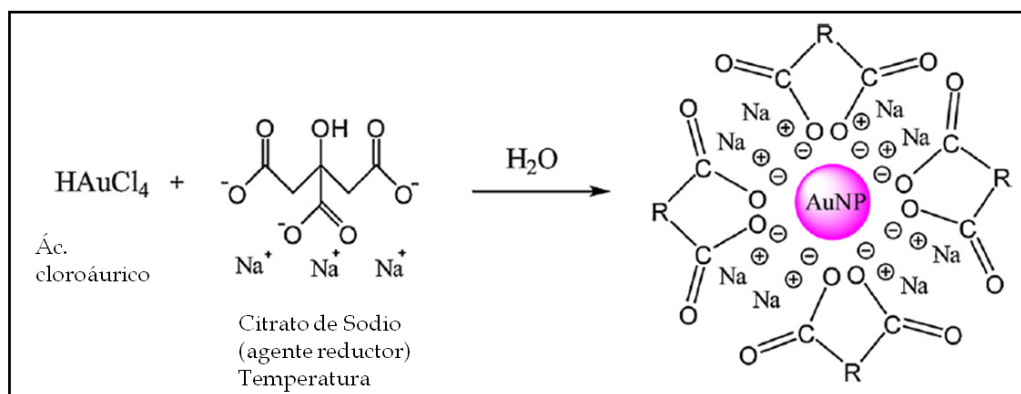


**Figura 1.** Tamaño y comparación de escalas. Imagen modificada de <http://www.faba.org.ar/fabainforma/464/ABCL.htm>

Según la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM, por sus siglas en inglés) son partículas con longitud de 1 a 100 nm. (Jain *et al.* 2012). Es importante poder manipular y controlar las características de las nanopartículas, ya que de ello dependerán sus novedosas propiedades (Cai *et al.* 2008).

De la variedad de nanomateriales, los que están siendo más estudiados son los nanotubos de carbono, las nanopartículas de oro (NP's de Au), puntos cuánticos de seleniuro de cadmio, nanopartículas paramagnéticas, liposomas, etc; sin embargo las nanopartículas de oro son de considerable interés debido a su versatilidad y uso

potencial en química, biología, medicina, óptica, aplicaciones en catálisis y farmacéutica (Jain *et al.* 2010; Kim *et al.* 2013). El oro coloidal es una suspensión de partículas de oro de tamaño nanométrico en un líquido usualmente agua (Viudez 2011). Michael Faraday (quien se considera el fundador de la ciencia de los coloides metálicos), publicó el primer artículo científico de la síntesis de nanopartículas de oro, describiendo la producción de oro coloidal (“metal dividido”) por la reducción de la solución de ácido tetra cloroáurico y el fosforo como agente reductor. El método de síntesis más popular es el desarrollado por Turkevich en 1940 y que procede de la reducción de citrato, conduciendo a partículas muy homogéneas en el intervalo de tamaño comprendido entre 10 y 40 nm. Los iones citrato en exceso en el medio se adsorben sobre las nanopartículas hasta que haya suficiente repulsión electrostática para evitar que se aglomeren (figura 2) (Sungunan *et al.* 2005). Este último método fue mejorado por Frens en 1973 y en 1993 Mulvaney y Giersing reportaron la primera síntesis y estabilización de NP’s de Au por tiolatos, y finalmente Schiffrin y colaboradores en 1994 con el informe de los Brust-Schiffrin, reportan el método bifásico y más convenientes NP’s de Au estabilizados con tiolatos. Sin embargo, métodos más sofisticados han aparecido durante la última década (Viudez 2011).



**Figura 2.** Método Turkevich- Frens, síntesis de Np’s de Au con citrato de sodio como agente reductor. Imagen modificada de (Zhao *et al.* 2013).

Varios métodos de síntesis de nanopartículas están disponibles, las cuales pueden ser clasificadas en general en: métodos descendentes (top-down) y ascendentes (bottom-up) (Toshima y Yonezawa 1998).

Para los procedimientos de "top down", un estado de Au a granel se rompe sistemáticamente para generar NP's de Au de dimensiones deseadas. En este caso, el montaje de partículas y la formación es controlado por un patrón o matriz. Sin embargo, el método de "top down" de microfluidos y fotolitografía puede ofrecer algún tipo de control de forma, pero con oportunidades limitadas por debajo de 1  $\mu\text{m}$  de tamaño (Euliss et al.2006). En contraste, en la estrategia de "bottom up", la formación de NP's de Au se origina a partir de moléculas individuales, porque se trata de una reducción química o biológica. Este método de reducción química implica dos pasos: nucleación y crecimiento consecutivo y pueden a su vez seguir un enfoque termodinámico de equilibrio o cinético. Cuando la nucleación y crecimiento es sucesiva se completa en el mismo proceso, se llama la síntesis *in situ*, de lo contrario se le llama método semilla-crecimiento (seed-grown) (Zhao *et al.* 2013; Viudez 2011 ).

### **2.1.1. Subtipos de nanopartículas de oro**

Hay subtipos de nanopartículas de oro basados en el tamaño, forma y propiedades físicas, entre las que se encuentran:

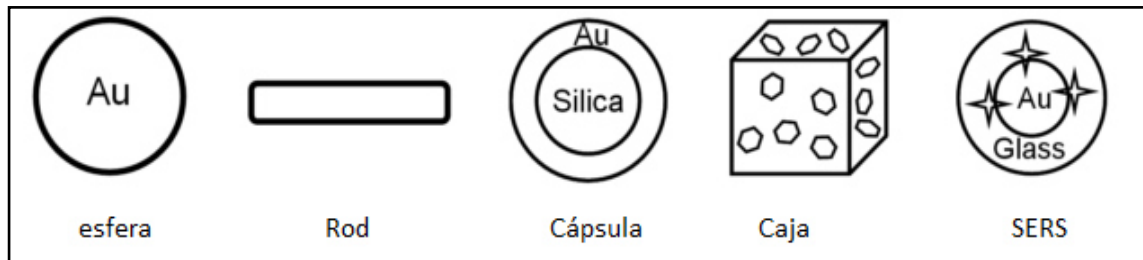
Nanoesferas.- De 2 nm a 100 nm de diámetro. El tamaño de la nanoesfera puede ser controlado al variar el radio del agente reductor (más comúnmente citrato) y el oro. Típicamente, nanoesferas de oro son visibles a un solo pico de absorción en el rango visible entre los 510 nm y 550 nm. Con un incremento en el tamaño de la partícula, el pico de la absorción cambia a una longitud de onda mayor y el ancho del espectro de absorción es relacionado al tamaño del rango de distribución.

Nanorods.- El diámetro de los nanorods de oro está determinado por el diámetro del poro de la plantilla de la membrana.

Nanocápsulas.- Para una composición dada de nanocápsulas de oro, la banda de SRP (resonancia superficial del plasmón) se puede ajustar cambiando la relación del tamaño del núcleo a su grosor de la superficie.

Nano-cajas.- nano-cajas de oro con poros controlables en la superficie están siendo sintetizados vía reacción de reemplazo galvánico entre nanocubos de plata y  $\text{HAuCl}_4$  acuoso.

**SERS**.- Nanopartículas que tiene fluorescencia y quimioluminiscencia, lo que incluye mejor sensibilidad, alto nivel de multiplexación, robustes y rendimiento superior en sangre y otros matrices biológicos (figura 3) (Cai *et al.* 2008).



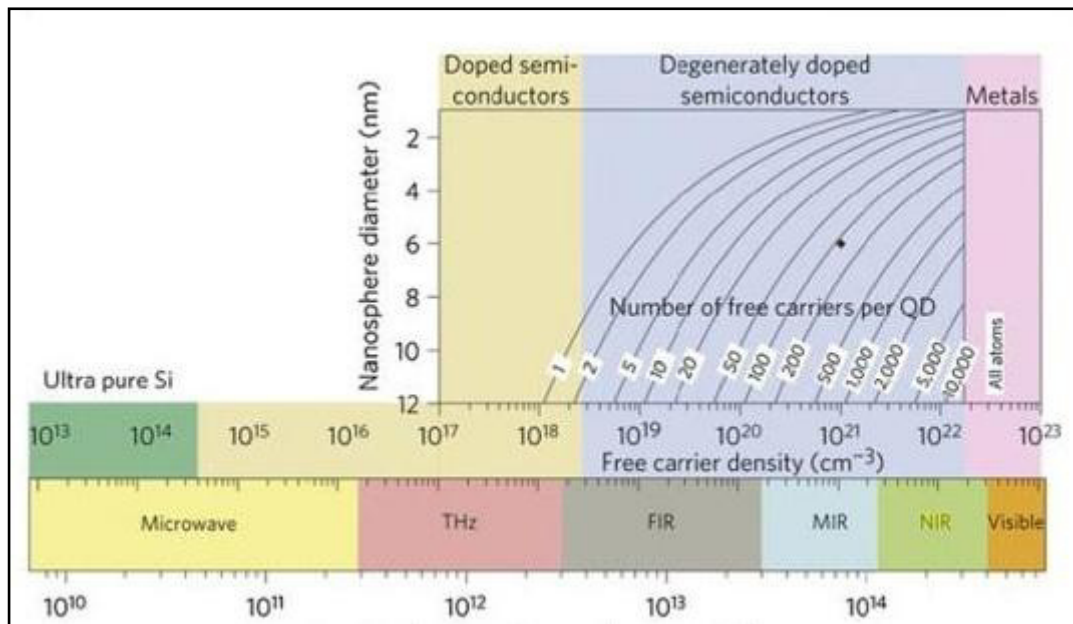
**Figura 3.** Diferentes tipos de nanopartículas de oro. Imagen modificada de (Cai *et al.* 2008).

### 2.1.2. Métodos de caracterización y principales propiedades de nanopartículas de oro.

La caracterización de las nanopartículas es necesaria para establecer el entendimiento, control de la síntesis y aplicaciones de las nanopartículas. La caracterización se lleva a cabo usando diferentes técnicas, entre las más comunes está la espectroscopia ultravioleta visible (UV/Vis), microscopía de electrones (TEM, SEM), dispersión de luz dinámica (DLS), microscopía de fuerza atómica (AFM), espectroscopia de fotoelectrones de rayos x (XPS), difracción de Rayos X (XRD), espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR), deserción láser asistida por matriz/espectrometría de ionización de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), espectrometría de retro dispersión de Rutherford (RBS), interferometría dual de polarización y de resonancia magnética nuclear (NMR).

La espectroscopia visible ultravioleta (UV-Vis) se puede usar, ya que, según la teoría de Mie, la resonancia de plasmón de superficie (SRP) es una frecuencia electromagnética que induce una oscilación coherente de resonancia de los electrones libres, en la superficie de una nanopartícula esférica en una solución. Esta absorción se encuentra en la región visible para el Au, Ag y Cu. La resonancia de plasmón de NP's de Au se observa a 3 nm de diámetro, por debajo del cual las nanopartículas de oro ya no pueden ser consideradas como una pieza de metal, si no como una banda de conducción, pero se convierte en una molécula representada por orbitales moleculares.

Como resultado, un campo electromagnético aparece en la superficie NP's de Au por encima de este tamaño que permite propiedades ópticas de superficie lo que permite la utilización de técnicas espectroscópicas. Ya que sus SRPs son intensos y geoméricamente sintonizables a través de las regiones visible y NIR (figura 5) (Boisselier *et al.* 2009).



**Figura 4.** Localización de la frecuencia de plasmón de superficie. Imagen de Kumar, 2013.

Entonces la relación entre la resonancia del plasmón máxima y el diámetro de la partícula esférica, están siendo usados como herramienta para estabilizar un rango de tamaño en estudios con Np's metálicas. Sin embargo TEM es la técnica fundamental para medir con precisión una determinada partícula (Kumar 2013).

El microscopio electrónico de barrido (SEM), como el de transmisión (TEM), se componen de una columna óptica de electrones, un sistema electrónico de vacío y un software. En el SEM el haz de electrones escanea un tramo rectangular sobre la muestra y las intensidades de diversas señales creadas por la interacción entre los electrones del haz y la muestra se miden y se almacenan en la memoria del ordenador. El cañón de electrones y las lentes son similares a las de un microscopio electrónico de transmisión. Las diferencias más importantes entre un microscopio electrónico de transmisión y un microscopio electrónico de barrido son:

- En lugar de la barra amplia estática en el TEM, SEM enfoca el haz de luz a un punto y la exploración fina se lleva a cabo línea por línea sobre la superficie de la muestra en un patrón rectangular.
- Los voltajes de aceleración son mucho más bajos que en TEM van desde 50 a 30,000 voltios; ya que no es necesario penetrar la muestra.
- La muestra no tiene por qué ser delgada, lo que simplifica la preparación de muestras.

La dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños, debido al movimiento browniano de partículas en suspensión o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros (foord *et al.* 1970; Xu *et al.* 2014). Se emplea para medir señales de esparcido de la luz en un punto, sin embargo por el movimiento browniano las posiciones de la partículas varían constantemente entre sí, otro aspecto que afecta el movimiento browniano es que, es sensible a la viscosidad del medio de suspensión y la viscosidad está relacionada con la temperatura, por lo que se tiene que controlar; el tiempo es otro aspecto importante a tomar en cuenta, ya que un tiempo de adquisición largo está lejos de dimensionar las nanopartículas en tiempo real. A continuación, las señales medidas son procesadas por correladores digitales para obtener las funciones de autocorrelación intensidad/ tiempo. Por lo tanto “dinámica” se refiere a la “vibración” de las partículas que componen la muestra (Xu *et al.* 2014; Moreno *et al.* 2014).

El potencial Z o potencial electrocinético es una propiedad importante de los coloides y por tanto de las nanopartículas. Ya que es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido unido a la partícula dispersada y es una manera efectiva de controlar el comportamiento de estos, puesto que, indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión. A mayor potencial Z (>30 mV) mayor fuerzas de repulsión entre las partículas y menor agregación, por consecuencia, mayor estabilidad de los coloides en dispersiones acuosas (Greenwood y kendall 1999; Hanaor *et al.* 2012).

### 2.1.3. Aplicaciones de la nanopartículas de oro

En general las aplicaciones de las nanopartículas de oro en el área de biología se resumen en cuatro grandes ramas: Terapia génica, liberación de fármacos, vectorización de fármacos en el tratamiento principalmente del Cáncer y Terapia fototérmica.

- Terapia génica

Las nanopartículas de oro como mediadores para la liberación de DNA y RNA es una de la mayores investigaciones en los últimos años, debido a la centralidad de los ácidos nucleicos, en sistemas biológicos, ya que para realizar terapia génica es necesario aprender a modular la transcripción y traducción del DNA y RNA requerida para la liberación de una amplia variedad de oligonucleótidos, (plásmidos, dsDNA, ssDNA, ssRNA) los cuales no podrían entrar a la célula por si solos, debido a sus cargas altamente negativas y para lo cual se están usando las nanopartículas de oro funcionalizadas con grupos tiol (-SH) en sus superficie, a los cuales se unen los oligonucleótidos mediante interacciones no-covalentes (fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrogeno, efectos hidrofobicos) (Vigderman y Zubarev 2012).

Mirkin y colaboradores han utilizando nanopartículas de oro sintetizadas con citrato de sodio y funcionalizadas con grupos tiol, para el silenciamiento de genes. Las nanopartículas de oro mejoran la estabilidad del DNA frente la degradación enzimática, química y física y aumentan la eficacia de transfección intracelular.

- Liberación de Fármacos

En cuanto a la liberación de fármacos un ejemplo destacado es el desarrollado por Bhumkar y col. para el transporte transmucosal de la insulina, utilizando nanopartículas de oro, funcionalizadas y estabilizadas con un polímero biodegradable y catiónico el quitosano que administrado por la vía oral y nasal, da lugar a un efecto hipoglucémico comparable al de la insulina inyectada subcutáneamente (Bhumkar et al.2009).

- Vectorización de Fármacos y Terapia Fototérmica

La vectorización de fármacos, consiste en la localización selectiva de dicho fármaco en el lugar de acción, lo que implicaría una gran ventaja en un sin número de

enfermedades y esto apoyado por la terapia fototérmica nos brinda mejores resultados, ya que la terapia fototérmica se basa en la teoría de Mie que consiste en la existencia de una banda de conducción de electrones libres en la superficie de estas nanopartículas, resonantes en presencia de luz, (Boisselier *et al.* 2009) por lo cual pueden radiar luz o absorber luz que se transforma rápidamente en calor, cuando son estimuladas con una frecuencia correcta de luz láser u otra fuente de calor, podremos matar células cancerosas específicamente, por su baja tolerancia al calor, lo que comparada con la inespecífica quimioterapia, sería una gran ventaja en el tratamiento para esta enfermedad, la cual consistiría en no solo vectorizar, sino dar un tratamiento específico. Estudios se basan en la utilización de receptores específicos en células cancerosas como EGFR (receptor del factor humano de crecimiento epidérmico) o HER2 (receptores de herceptina), por anticuerpos monoclonales aprobados para la terapia en cáncer, utilizando nanopartículas de oro, estabilizadas con citrato de sodio y recubiertas con anti-EGFR, para dirigirlas específicamente a células de carcinoma humano oral escamoso. De lo anterior existen numerosas investigaciones, en la mejora de la síntesis de nanomateriales a la par con sus aplicaciones (Thakor *et al.* 2011; Vigderman y Zubarev 2012; Liu *et al.* 2013).

El mejoramiento de los procesos de síntesis de nanopartículas y el control tanto de la forma, tamaño, agentes reductores y estabilizantes, son importantes en el diseño de una nanopartícula ideal; por lo que sigue siendo tema de estudio para nuevas aplicaciones.

#### **2.1.4. Toxicidad de nanopartículas de Oro**

La toxicidad de nanopartículas de oro se ha estudiado tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, evaluando la toxicidad dependiente de la dosis antes y después de la exposición con nanopartículas de oro. La toxicidad de las Np's de Au dependen tanto de la forma (esfera, nanorods, etc.), tamaño, carga superficial (positiva o negativa), agentes reductores y estabilizantes; por lo cual, cada método de síntesis requiere estudios específicos.

Los ensayos *in vivo* deben incluir parámetros que indiquen la salud de los animales de experimentación tales como el cambio de comportamiento, pérdida de peso,

porcentaje de mortalidad, el promedio de vida, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, inmunogenicidad, respuesta inflamatoria y oxidativa, así como la farmacocinética (Alkilany y Murphy 2010).

Mientras que en ensayos *in vitro*, la evaluación de la integridad de la membrana celular es una de las formas más comunes para medir la viabilidad celular y efectos citotóxico, ya que los compuestos que tienen efectos citotóxico ponen en peligro la integridad de la membrana celular. Colorantes vitales, tales como azul de tripano o yoduro de propidio evalúan la permeabilidad de la membrana celular, ya que si esta ha sido comprometida, cruzan libremente y se tiñen los componentes intracelulares. También la integridad de la membrana puede ser evaluada mediante el control de sustancias que normalmente son secuestradas en el interior de las células (Riss y Moravec 2004). Los ensayos de citotoxicidad mayormente usados son LDH, MTT, MTS, el rojo neutro.

El MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol) es una sal de tetrazolio soluble en agua, la cual, puede ser metabolizada por la enzima succinato deshidrogenasa, en la mitocondria, generando cristales de formazan púrpura insoluble por la escisión del anillo de tetrazolio. Los cristales de formazan son impermeables a las membranas celulares y por lo tanto se acumulan en las células sanas, siendo un indicativo del buen funcionamiento celular (Fotakis y Timbrell 2006).

Sin embargo, el tratamiento de las células con el compuesto citotóxico puede afectar distintas rutas de muerte celular. Las células pueden sufrir necrosis o pueden activar un programa genético de muerte celular programada (apoptosis).

El yoduro de propidio (IP) es ampliamente utilizado en conjunto con Anexina V para determinar si las células son viables, apoptóticas o necróticas a través de diferencias en la integridad de la membrana plasmática y permeabilidad. El yoduro de propidio es un colorante nuclear, mayormente utilizado, por ser económico, estable y un buen indicador de la viabilidad celular, basada en su capacidad para excluir colorante en las células vivas. La capacidad del IP para entrar en una célula depende de la permeabilidad de la membrana (Rieger et al.2011). Mientras que la anexina V es una proteína dependiente de calcio, que tiene alta afinidad por la fosfatidilserina un fosfolípido de la membrana interna celular, que al perder la asimetría se externaliza y

se une con la anexina, así como que es una señal para la fagocitosis por parte de macrófagos (Zhang *et al.* 1997).

Las cantidades de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la producción de citocinas inflamatorias son también biomarcadores de citotoxicidad (Elsabahy y Wooley 2013).

Debido al tamaño, forma y grupo de superficie, las nanopartículas pueden interactuar con varios componentes celulares (organelos, DNA, proteínas), por lo que es necesario, la realización de estudios *in vitro* para la detección de la toxicidad, aunque estos resultados podrían no garantizar los mismos efectos *in vivo*. A continuación, se citan los trabajos más relevantes sobre la toxicidad de Np's de Au evaluadas con diferentes parámetros:

- Toxicidad de nanopartículas de oro en cultivo primario y/o involucrados con el sistema inmune

Villiers y colaboradores en el 2010, observaron el efecto de nanopartículas de oro, sintetizadas por el método químico con citrato de sodio, con tamaño de 10 nm y forma esférica en el sistema inmune, evaluando parámetros de apoptosis/necrosis en relación al impacto de las nanopartículas en células dendríticas y la activación/secreción de citocinas a una concentración de 0.5 mM a 24 hr; concluyendo que las nanopartículas de oro no inducían muerte celular, ni activación de células dendríticas, pero si acumulación de nanopartículas al interior de las células, en cuanto a la producción de citocinas, solo fueron evaluadas dos: IL-6 e IL-12, obteniendo bajos niveles en relación al control.(Villiers *et al.* 2010).

Mironava y colaboradores en el 2010 evaluaron la citotoxicidad de nanopartículas de oro con citrato de sodio como agente reductor con tamaños de 13 y 45 nm, de forma esférica en un cultivo primario de fibroblastos humanos evaluando parámetros como apoptosis, mecanismos de endocitosis, morfología de las células por TEM y microscopia con focal de 3 a 6 días con diferentes concentraciones de nanopartículas (20 a 142 µg/ml) obteniendo que las Np's de Au con citrato de sodio de 45 nm resultaron más tóxicas (Mironova *et al.* 2010). En contraste con el trabajo de Villiers, se determino que partículas con tamaños más grandes presentaron mayor toxicidad.

Goodman y colaboradores en 2004, evaluaron el efecto de nanopartículas de oro con grupos de superficie cargados positivamente (amonio cuaternario) y negativamente (ácido carboxílico) con un tamaño de 2 nm y morfología esférica a 24 hr, en fibroblastos derivados de riñón de mono (COS-1), eritrocitos y *Escherichia Coli*, determinaron la viabilidad celular relativa por la técnica de MTT en COS-1, hemólisis en eritrocitos y viabilidad bacteriana en *Escherichia Coli* por el ensayo de formación de colonias en agar superior, a concentraciones de 0.38 a 3  $\mu$ M, encontraron que las nanopartículas catiónicas (+) eran más tóxicas que las aniónicas (-). Por lo que se hace evidente la necesidad de estudiar la naturaleza química y biológica de nuevos métodos de síntesis (Goodman *et al.* 2004).

Martínez y colaboradores en 2012 evaluaron la citotoxicidad de Np's de Au esféricas, sintetizadas con agentes reductores catiónicos (poliamidoamina +) y aniónicos (citrato de sodio -) con un tamaño de 7 a 20 nm en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC's) y una línea de carcinoma hepatocelular (HepG2) a 24 horas. Determinando la toxicidad por MTT, generación de ROS e internacionalización de las nanopartículas por citometría de flujo a concentraciones de 0.1 a 50  $\mu$ M encontrando que las PBMC's son menos citotóxicas que las HepG2 cuando son cultivadas con nanopartículas de oro catiónicas (Martinez *et al.* 2012). Los estudios anteriormente mencionados enfatizan el hecho de que líneas celulares normales o cultivos primarios de células normales presenten menor efecto citotóxico que las líneas celulares de cáncer puestas en contacto con nanopartículas de oro con grupos de superficie cargados positivamente.

- Toxicidad de nanopartículas de oro en líneas celulares de cáncer

Khan y colaboradores en el 2007 determinaron el efecto de las Np's de Au sintetizadas con citrato de sodio, con tamaños de 18 nm y forma esférica en una línea celular de adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa), evaluando la viabilidad celular por MTT, adicionalmente realizaron estudios de internalización por TEM y expresión de genes por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) a concentraciones de 0.2 a 2 nm a 3 y 6 hr, concluyendo que las nanopartículas no son

tóxicas, se internalizan por endocitosis si llegan a colonizar el núcleo después de las 6 hrs y no generan cambios en la expresión génica (Khanet *al.* 2007).

- Toxicidad de nanopartículas de oro con quitosano como agente reductor

Boca y colaboradores en el 2011 evaluaron la citotoxicidad de nanopartículas de oro esféricas sintetizadas con quitosano y ácido ascórbico como agentes reductores con tamaño de 18 a 20 nm a 19 hr en la línea celular de ovario de hámster chino (CHO), determinando la morfología por TEM empleando imagen de contraste de fases, concluyendo que las nanopartículas tuvieron mínimo impacto en la viabilidad y morfología de las células, lo cual sugiere buen potencial para el uso en aplicaciones biomédicas (Boca *et al.* 2011).

Estudios recientes de Boyles y colaboradores en el 2015 evaluaron la citotoxicidad de nanopartículas de oro esféricas sintetizadas con quitosano (+) de diferentes pesos moleculares y citrato de sodio (-) como agentes reductores, con tamaños de 7 a 10 nm a 4, 24 y 48 hr en una línea celular de leucemia monocítica aguda (THP-1), también determinaron la actividad mitocondrial por CellTiter-Glo (CTB) y muerte celular por LDH a concentraciones de 1 a 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Los estudios mostraron que las Np's de Au con quitosano de bajo peso molecular tuvieron mayor efecto citotóxico que las Np's de Au con citrato de sodio, las cuales no generaron efecto citotóxico, en cuanto a la producción de citocinas se evaluó a las 4 y 24 hr obteniendo una baja producción a las 4 horas, sin embargo a las 24 horas se observó un aumento en TNF, IL-1 $\beta$ , y disminución de IL-6, en contraste con las muestras tratadas con Np's de Au con citrato de sodio como agente reductor, ya que estas presentaron menor producción de todas las citocinas evaluadas (Boyles *et al.* 2015). Por lo anterior se observa que las Np's de Au con quitosano (+) son tóxicas para líneas celulares de cáncer y no para células normales.

Regiel-Futyra y colaboradores en el 2015 determinaron la toxicidad de nanocompositos de oro con quitosano (catiónico), de diferentes pesos moleculares en una línea de adenocarcinoma alveolar humano (A549) y queratinocitos humanos HaCat a 24 hr, por MTT y lactato deshidrogenasa (LDH), evaluando concentraciones de 7.1 a 714.3  $\mu\text{M}$  para las células A549 y de 125 a 1.25 mM para HaCat, obteniendo que las células A549 fueron más sensibles que las HaCat (Regiel-Futyra *et al.* 2015).

- Toxicidad de nanopartículas de oro en cultivo primario y líneas celulares de ratón

Shukla *et al.*, 2005 realizaron un estudio con nanopartículas de oro con lisina y polilisina en una línea celular leucémica de macrófagos murinos, RAW 264.7 con un tamaño de 3.5 nm no mostrando citotoxicidad en ninguno de los casos, usando concentraciones de 10 a 100  $\mu\text{M}$ . También Bastús *et al.*, 2008 realizaron estudios de nanopartículas de oro con citrato de sodio, con tamaño de 10 nm y dos péptidos de interés LPFFDNH<sub>2</sub> (péptido pequeño) y VRLPPP<sub>3</sub> (péptido más grande) en un cultivo primario de macrófagos derivados de médula ósea con concentraciones de  $10^{-3}$  a  $10^3 \mu\text{M}$ , en esta ocasión, tampoco hubo citotoxicidad.

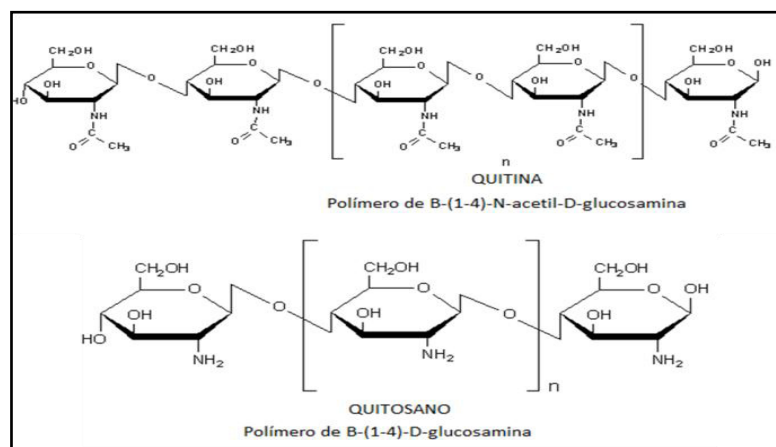
Como se puede observar existen diferencias en los resultados, la cual depende del método de síntesis utilizado y las células a evaluar, variando no solo los agentes reductores (y por tanto grupo de superficie), si no también cantidades y características particulares de estos, por lo que se hace necesaria la evaluación de la toxicidad específica del método de síntesis.

## **2.2. Síntesis de nanopartículas de oro usando quitosano**

Como ya se mencionó anteriormente, un método general para la preparación de las nanopartículas de oro, implica el tratamiento de sales de metales con un agente químico reductor (citrato de sodio, borohidruro de sodio) y un agente estabilizante (biomoléculas y bioorganismos). Estos agentes pueden, no ser amigables con el medio ambiente, por lo que se están buscando métodos menos reactivos, debido al creciente interés en la minimización o eliminación total de los residuos y la implantación de procesos sustentables (la llamada química verde)(Huang y Yang 2004).

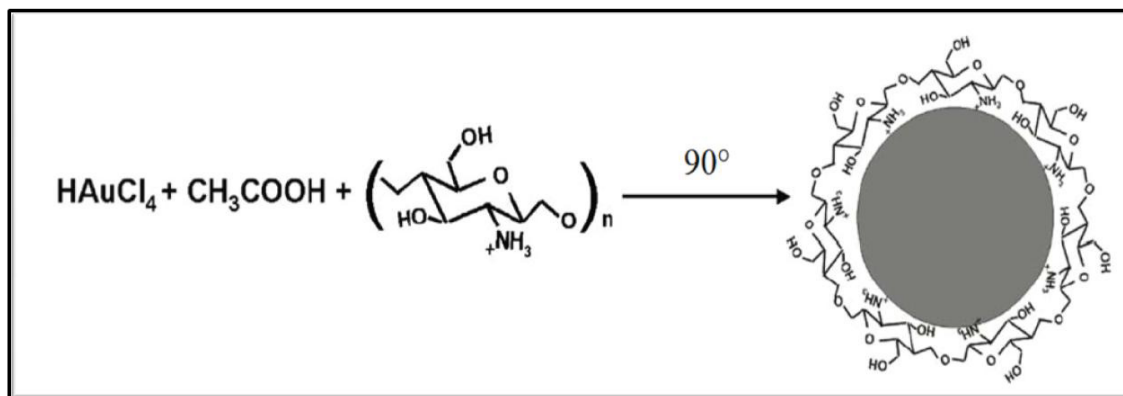
El quitosano que es un polisacárido amino, cuyas características intrínsecas excepcionales han llamado la atención, tales como, ser un polication de la glucosamina, biocompatibilidad, biodegradabilidad, sensible al pH, así como las propiedades de formación de una película (Jin *et al.* 2012). Es un polisacárido lineal obtenido por desacetilación parcial de la quitina. La quitina viene principalmente de conchas de cangrejo y camarones, pero también se encuentra en otras fuentes como insectos y

hongos, por lo que es el polímero natural más abundante de la naturaleza, solo después de la celulosa (figura 4) (Nguyen *et al.* 2013).



**Figura 5.** Estructura Química de la Quitina y Quitosano. Imagen modificada de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis/carbohydrate-analysis-ii.html>

El quitosano es soluble en medio acuoso ácido (pH <6,5) y está cargado positivamente en solución. Las aminas primarias de este, están involucradas en la quelación de iones de metal y la inmovilización de nanopartículas, es por esto que se usa para la reducción, como para la estabilización de las nanopartículas de oro y no se introduce ninguna toxicidad al medio ambiente o riesgos biológicos (figura 5) (Laudenslager *et al.* 2008).



**Figura 6.** Síntesis de Np's de Au con quitosano como agente reductor. Imagen modificada de Bhumkar, *et al.* 2009.

Debido a sus características la quitina y el quitosano se han empleado en diferentes áreas, sin embargo, la respuesta del cuerpo humano a estos biopolímeros no se ha estudiado a profundidad, a pesar de ello, el desarrollo de tratamientos y dispositivos a partir de estos materiales ha abierto nuevos campos de conocimiento, incluyendo la respuesta inmunológica producida por estos polímeros. Por ejemplo: se ha observado que desempeñan un papel activo en la inflamación, trastornos alérgicos, rechazo, y fibrosis, entre otras características de la inflamación crónica y la remodelación de tejidos (Bueter *et al.* 2013) (Lee *et al.* 2011).

### **2.2.1. Quitosano y sistema inmune**

- Quitosano como activador del sistema inmune innato

El sistema inmune se encarga de proteger a los organismos multicelulares de los agentes patógenos (antígenos) a través del reconocimiento entre lo propio y lo extraño mediante la inmunidad innata que es el mecanismo de defensa temprano e inmunidad adaptativa o tardía (Medzhitov y Janeway 2002).

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa y promueve el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. El quitosano y la quitina son blancos potenciales para el reconocimiento del sistema inmune innato por parte de los receptores de reconocimiento de patrón (PRR) (Lee *et al.* 2011). Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) se definen como moléculas específicas que pueden ser reconocidas por las células del sistema inmune, propiamente se han catalogado como patrones moleculares conservados que son esencialmente productos de la fisiología microbiana, El mejor ejemplo incluye lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram-negativas y peptidoglicanos de bacterias gram-positivas. Particularmente la quitina se encuentra en las paredes celulares de las bacterias, hongos, setas, exoesqueleto de los crustáceos, insectos y parásitos, por lo tanto contiene en su estructura moléculas que pueden ser reconocidas por células del sistema inmune como PAMPs, generando una activación del sistema inmune innato (Medzhitov y Janeway 2002).

Dependiendo de su ubicación, estructura y función, los PRR se clasifican según su expresión en membranas celulares, en el citosol o solubles. Los PRR mejor

caracterizados son los TLR (por sus siglas del inglés toll-like receptors) de los cuales se han descrito 10 funcionales en humanos (TLR-1 a TLR-10). (Medzhitov y Janeway 2002; Takeda *et al.* 2003). Hasta el día de hoy, se conoce que tanto las partículas de quitina como las de quitosano generan una respuesta inmune innata mediada por cuatro receptores: TLR-2, TLR-4 (ver tabla 1), Dectina-1 y el receptor de manosa (receptores de tipo lectina C-CLR), que reconocen carbohidratos complejos presentes en bacterias, virus y hongos; permitiendo la fagocitosis y/o la subsecuente activación de factores de transcripción (NF-kB, AP-1) responsables de la producción de citocinas pro y antiinflamatorias (Hernández y Urcuqui 2012; Bueter *et al.* 2013).

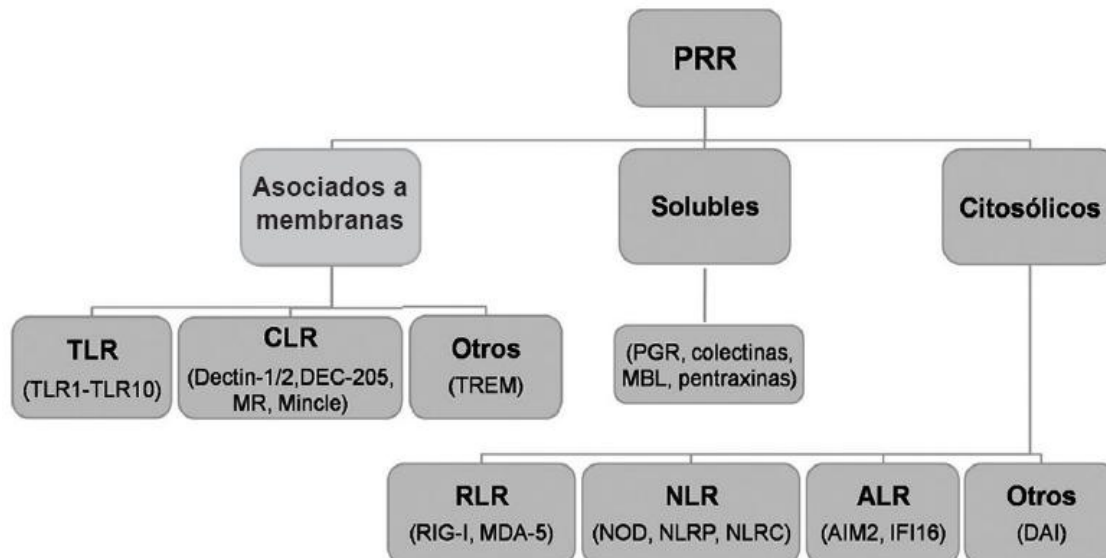
Dependiendo del peso molecular y el grado de desacetilación, el quitosano puede ser degradado por enzimas humanas como la lisozima, por medio de la hidrólisis del enlace  $\beta$  1-4 dando lugar a oligómeros, monómeros y finalmente a unidades estructurales de N-glucosaminas, las cuales son reconocidas por receptores tipo toll (Jung y Park 2014)

**Tabla 1. Receptores Toll-like y sus ligandos**

Familia TLR	Ligandos (origen)
TLR2	Lipoproteínas/lipopeptidos (una variedad de patógenos) Peptidoglicanos (bacterias Gram-positivas) Ácido Lipoteicoico (bacterias Gram-positivas) Lipoarabinomannan (micobacteria) Modulina fenol-soluble (Staphylococcus epidermidis) Glicoinositolfosfolipido (Trypanosoma Cruzi) Glicolípidos (Treponema maltophilum) Porinas (Neisseria) Zymosan (hongos) LPS atípicos (Leptospira interrogans) LPS atípico (Porphyromonas gingivalis) HSP70 (hospedador)
TLR4	LPS (Bacterias Gram-negativas) Taxol (plantas) Proteínas de fusión (RSV) Proteínas de envoltura (MMTV) HSP60 (Chlamidia pneumoniae)

	HSP60 (hospedador)
	HSP70(hospedador)
	Repetición de dominio extra de fibronectina tipo III (hospedador)
	Oligosacarido de ácido hialurónico (hospedador)
	Fragmentos de polisacáridos de heparán sulfato
	El fibrinógeno (hospedador)

En otros estudios se demostró que el quitosano tiene la capacidad de activar receptores citosólicos que reconocen una amplia variedad de componentes microbianos y productos endógenos liberados por alteraciones celulares, a estos elementos se les reconoce como receptores tipo NOD (por sus siglas en ingles, nucleotide-binding oligomerization domain containing protein-NLR). Estos receptores tipo NOD reconocen patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), e incluyen los NOD1, NOD2, los NLRP (por sus siglas en ingles, nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing protein) y NLRC (por sus siglas en ingles, nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and CARD domain containing protein) como se observa en la figura 7. Estos receptores regulan la inflamación y la apoptosis, son responsables de mediar la transducción de la señal y/o activación de caspasas inflamatorias, activando el inflamasoma y dando lugar a las formas biológicamente activas de IL-1 $\beta$  e IL-18, por lo que en altas concentraciones se ha observado que el quitosano puede activar la vía del inflamosoma NLRP3 (Hernández y Urcuqui 2012; Strowig *et al.* 2012).



**Figura 7.** Principales familias de receptores de reconocimiento de patrones. Imagen Hernández y Urcuqui 2002

- Quitosano como activador del sistema inmune adaptativo

A pesar de que la mayoría de los estudios relacionan al quitosano como un activador principalmente de elementos que componen el sistema inmune innato, algunos investigadores califican a la quitina y el quitosano como inmunoestimulantes por la activación de macrófagos, además se ha observado que la quitina inhibe la respuesta Th2, así como que el quitosano reduce la inflamación inducida por alérgenos. (chen *et al.* 2008; Lee *et al.* 2011).

La respuesta inmune adaptativa se divide en dos tipos: la inmunidad humoral y la inmunidad celular. La inmunidad humoral depende de los linfocitos B y de sus productos de secreción, los anticuerpos (Ac) y actúa en la defensa contra los patógenos extracelulares, mientras que la inmunidad celular es tarea de los linfocitos T y actúa contra los patógenos intracelulares, sin embargo, no existen reportes de si estas células se ven afectadas por nanopartículas recubiertas con quitosano (Abbas *et al.* 2012). De la misma forma, actualmente no se han reportado estudios del efecto que podría generar el contacto de nanopartículas cubiertas con quitosano en linfocitos T cooperadores (Th),

los cuales juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria e inmune a través de la liberación de citocinas.

También la interacción entre inmunidad innata y adaptativa está regulada a través de citocinas y proteínas del complemento. Como se describió en el apartado anterior el quitosano y la quitina son capaces de modificar la producción de citocinas que pueden influir en la diferenciación, la proliferación y la supervivencia de la célula involucrada en el sistema inmune. Estas moléculas pueden regular la producción y la actividad de otras citocinas, que aumentan (proinflamatorias) o disminuyen (antiinflamatorias) la respuesta inflamatoria.

Algunas citocinas pueden tener acciones pro- (Th1) o antiinflamatorias (Th2) según el microambiente en el que se encuentren. Entre las consideradas proinflamatorias, tenemos la interleucina (IL) 1, 2, 6, 7, 12 y TNF (Factor de necrosis tumoral), IFN  $\gamma$  (interferón gamma). Las antiinflamatorias son IL-4, 5, 6, 10 y 13. El equilibrio Th1/Th2 es importante para prevenir la aparición de varias enfermedades, sin embargo no toda la respuesta inmune puede ser descrita a través de la teoría Th1/Th2 (Elsabahy y Wooley 2013; Barros *et al.* 2011).

El sistema inmune puede afectarse en diferentes niveles, produciendo supresión, sobreestimulación o toxicidad en el huésped. Por lo tanto, cualquier producto nuevo ya sea químico o biológico requiere ser analizado en base a interacciones que este pueda tener con el sistema inmune. La investigación, acerca de posibles reacciones desfavorables de las nanopartículas de oro con el sistema inmune, es importante, ya que la inmunosupresión o inmunoestimulación, puede promover trastornos inflamatorios o pérdida de la tolerancia (autoinmunidad), y/o aumentar susceptibilidad a infecciones y cáncer (Kindt *et al.* 2007; Abbas *et al.* 2012; Zolnik *et al.* 2010).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los objetivos del departamento de inmunología de la FCB de la UANL, consiste en estudiar y desarrollar nuevas alternativas en el tratamiento y detección de diferentes enfermedades que se encuentren vinculadas al sistema inmune, por lo que se ha incursionado en áreas nuevas y prometedoras como la nanotecnología y en particular en tratamientos empleando nanopartículas de oro, ya que, debido a sus propiedades físico químicas, las nanopartículas de oro han sido estudiadas y aplicadas en diversas áreas como la química, electrónica y óptica.

Actualmente se ha determinado que las NP's pueden emplearse en detección, diagnóstico y tratamiento de células cancerosas con buenos resultados, sin embargo, el riesgo que presenta la inclusión de esta nueva tecnología al área de la biomedicina ha sido un tema controversial para la comunidad científica, puesto que, se ha observado que algunos métodos de síntesis producen partículas con niveles de toxicidad altos lo que impide su posible utilización terapéutica o diagnóstica.

Aunque ya existen estudios sobre la toxicidad de nanopartículas de oro, los análisis que se han realizado sobre la respuesta celular inmune, fueron realizados para tipos de nanopartículas específicas con determinados agentes reductores, y como se mencionó anteriormente, dependiendo del método de síntesis empleada para la obtención de las nanoestructuras, se pueden obtener partículas con mayor o menor toxicidad. En cuanto a estudios sobre nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano y citrato de sodio como agentes reductores también se tienen estudios con síntesis específicas y estos demuestran que pueden ser empleadas en aplicaciones biomédicas, sin embargo hasta ahora no hay estudios reportados sobre el efecto de estas nanopartículas sobre células del sistema inmune y perfil de citocinas, para profundizar así en el efecto inmunológico.

## **4. HIPÓTESIS**

Las nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano (CTS) y citrato de sodio (CS) no afectan la viabilidad y la producción de citocinas evaluadas sobre células mononucleares de sangre periférica humana.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto citotóxico de las nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano y citrato de sodio en células mononucleares de sangre periférica humana.

### **5.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

1.- Caracterizar nanopartículas de oro de 3-10 nm con quitosano (CTS) y citrato de sodio (CS).

2.- Evaluar la posible citotoxicidad de los vehículos involucrados en la síntesis de nanopartículas de oro.

3.- Determinar el efecto citotóxico de nanopartículas de oro sobre la viabilidad en células de adenocarcinoma de colon (HT-29).

4.- Determinar el efecto de nanopartículas de oro en PBMCs humanas.

5.- Determinar el efecto de las nanopartículas de oro sobre las poblaciones celulares CD3, CD19 y CD14 en PBMCs, y perfil de citocinas.

6.- Evaluar el efecto de las nanopartículas de oro sobre la viabilidad en macrófagos peritoneales de ratón, la producción de Oxido Nítrico y perfil de citocinas.

## **6. MATERIAL Y METODOLOGÍA**

### **6.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro**

#### **6.1.1. Síntesis de nanopartículas de oro con citrato de sodio (CS)**

Con base en la reducción química de Turkevich, se preparó una solución de 2 mM de  $\text{HAuCl}_4$  (sigma-Aldrich®, PM 339,79) en 50 ml de agua ultrapura (Direct-Q Water purification System, Merck millipore®); se tomaron 6 ml de la solución anterior y se agregaron 2 ml de Citrato de sodio al 1% (relación molar 1:4) (sigma-Aldrich®, PM 294. 1 g/mol). Finalmente se calentó la solución de 8 ml a 100°C (temperatura estable) por 15 min con agitación magnética, usando un baño de glicerina hasta que el cambio de color de la solución a púrpura sea evidente.

#### **6.1.2. Síntesis de nanopartículas de oro con quitosano (CTS)**

El material de vidrio a utilizar se limpió con solución crómica y se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Quitosano de peso molecular medio (400 000 g / mol) con un grado de desacetilación del 75-85% (Sigma ®) al 2 %, se preparó en una solución de ácido acético 0.4 M (debido a la mala solubilidad de este y también actúa como agente reductor) y se dejó en agitación, durante una noche.

A partir de una solución acuosa de 2 mM  $\text{HAuCl}_4$  (sigma-Aldrich®, PM 339,79) en 50 ml de agua ultrapura (Direct-Q Water purification System, Merck millipore®), se tomaron 6 ml de la solución anterior y se agregaron 2 ml de solución de quitosano 2%, (relación molar 3:1) y después, la mezcla se calentó a 95°C bajo agitación magnética, usando un baño de glicerina (temperatura estable) por 15 min hasta que se obtuvo una solución de color rojo.

#### **6.1.3. Caracterización de nanopartículas**

Se leyó la absorbancia espectrométrica de las nanopartículas de oro por medio de un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible (UV-Vis) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific®),

se usó aproximadamente 4 µl de la muestra. Tamaño y potencial Z con Zetasizer Nano ZS (Malvern®), por medio de la dispersión de luz dinámica, basado en el movimiento browniano de las partículas en una solución, y se usó diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10000. Finalmente por SEM (Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo Modelo Nova NanoSEM 200, FEI®) se evaluó las características morfológicas de las nanopartículas de oro con quitosano y citrato de sodio.

## **6.2. Mantenimiento de cultivo celular**

Las células de adenocarcinoma de colon (ATCC®-HT-29) se obtuvieron del banco de líneas celulares del LIV (Laboratorio de Inmunología y Virología). Para el mantenimiento y proliferación se usó el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) y con penicilina/estreptomicina al 1%. Las células crecieron en monocapas adherentes y se mantuvieron a 37°C en una atmosfera húmeda al 5% CO<sup>2</sup>.

Los cultivos celulares con 80% de confluencia se trataron con una solución de tripsina-EDTA al 0.05% (gibco® by Life Technologies, 1X) durante 5 min a 37°C, obteniendo una suspensión celular a la cual se realizó un conteo en cámara de Neubauer mediante el método de exclusión de azul de tripano. A cada pozo de las placas de microtitulación (de 96 pozos) y de fondo plano, se colocaron 100 µl de suspensión celular con un total de 5,000 células, las placas se incubaron durante 24 horas (hrs) antes de cualquier manipulación para permitir la adhesión de las células a la superficie del pozo.

## **6.3. Separación de células mononucleares a partir de sangre periférica humana (PBMC's) por gradiente de densidad**

Se obtuvo 30 ml de sangre periférica de donadores sanos de sexo masculino por punción venosa utilizando tubos de ensayo con citrato de sodio como anticoagulante (Vacutainer, BD®), se realizó una dilución 1:1 (30 ml de sangre y 30 ml PBS) con PBS 1X. Después de esta dilución, se colocaron en tubos de 50 ml que contenían determinados ml de ficoll (Histopaque®-1077), por cada 25 ml de sangre se utilizaron 12 ml sumando un total de 14.5 ml de ficoll y se colocó la sangre ya diluida despacio y por las paredes del tubo, después se centrifugo a 1600 rpm por 30 min sin freno y sin

aceleración. Se obtuvieron 3 fases, siendo la fase central (entre el paquete celular y el suero) con aspecto blanquecino (nube) la de interés, ya que es donde se encuentran las PBMC. Por lo que se procedió a la extracción, se lavó dos veces con PBS 1X, centrifugando a 1350 rpm por 10 min. Se observó el paquete celular y finalmente se resuspendió en medio RPMI 10% (Sigma®), suplementado con SFB y antibiótico-antimicótico 1X (gibco® by Life Technologies, 100x), y se mezclaron 20 µl de células con 20 µl de azul tripano(gibco® by Life Technologies, 0.4%), colocando 10 µl en cámara de Neubauer, para realizar conteo, tomando en cuenta solo los cuatro cuadrantes de sus extremos (4 x4), obteniendo alrededor de 8 millones por mililitro, finalmente se colocaron en placas de 24 pozos de ultra baja adherencia (Corning®, Costar®) 500,000 células, las cuales se expusieron a diferentes concentraciones de nanopartículas de oro, en un rango de 10 a 150 µM, ya sea sintetizadas con CS (1%) o CTS (2%), para realizar ensayos posteriores.

#### **6.4. Análisis de citotoxicidad de PBMC utilizando marcaje con Anexina V y Ioduro de Propidio**

Según sea el tiempo del ensayo, (24, 48 o 72 hrs) se recuperaron las células de la placa de 24 pozos en tubos eppendorf de 2 ml y se centrifugaron a 1350 rpm por 10 min, desechando el sobrenadante, se lavaron nuevamente los pozos de la placa con PBS 1X, (para asegurar despegar la mayor cantidad de células) para centrifugar nuevamente a 1350 rpm 10 min, una vez que se obtuvo el pellet de células, se preparó la mezcla de anexina V y ioduro de propidio (IP) de la siguiente manera:

Buffer de unión de anexina V (1x)	100 µl
anexina V-APC (BD®)	1 µl
IP (Life Technologies®)	0.05 µl por muestra

Se incubó por 20 min a 4 °C, para analizar por citometría de flujo (Accuri C6, BD®), utilizando los filtros correspondientes en este caso FL4 (Anexina V) y FL2 (IP).

\*Buffer de unión 10x – 0.1 M Hepes (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>

## **6.5. Poblaciones celulares**

Según sea el tiempo del ensayo, (24, 48 o 72 hrs) se recuperaron las células de la placa de 24 pozos en tubos eppendorf de 2 ml, se centrifugo a 1350 rpm por 10 min y se desechó el sobrenadante con pipeta; se lavó con PBS 1X el cual se deja en los pozos de la placa mientras que se centrifugo la primera vez, para despegar la mayor cantidad de células; y se centrifugo nuevamente a 1350 rpm 10 min, una vez teniendo el pellet de células, se resuspendió en 100 µl de buffer de unión de anexina V 1X o PBS1X y se adicionó 20 µl de cada anticuerpo monoclonal CD3-PE (por sus siglas en ingles, phycoerythrin), CD14-PerCP (por sus siglas en ingles, peridinin chlorophyll) y CD19-FITC (por sus siglas en ingles, fluorescein isothiocyanate), incubando por 20 min; para finalmente analizar por citómetro de flujo (Accuri C6, BD®), utilizando los filtros correspondientes, a concentraciones de 150 µM que fue la  $DL_{50}$  de HT-29. Analizando primero el marcaje solo de las poblaciones CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> y CD14<sup>+</sup> y después cuanto porcentaje de estas tenía anexina V<sup>+</sup>, en control y las puestas en contacto con nanopartículas de oro sinterizadas con CTS como agente reductor (tratamiento-Tx.).

## **6.6. Detección de citocinas en sobrenadante de cultivo de PBMC y macrófagos peritoneales de ratón**

En el caso de las PBMC se usó el BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokines kit II y para Macrófagos Peritoneales de ratón el BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation kit. Siguiendo las indicaciones del fabricante: Se reconstituyó el top estándar con 2 ml del diluyente, se incubó por 15 min Se etiquetó los tubos eppendorf de 2 ml para realizar la curva estándar de la siguiente forma 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256 y se colocaron 300 µl del diluyente a cada tubo, transfiriendo 300 µl del top estándar al primer tubo 1:2, continuando de esta manera, para que el ultimo (1:256), tenga un total de 600 µl, teniendo un tubo más con solo diluyente como control negativo.

Por otra parte se colocaron 10 µl de cada perla de captura por muestra en un tubo de 15 ml, se mezcló de manera vigorosa.

Se añadió 50 µl de la mezcla de las perlas de captura, 50 µl de la mezcla de la curva estándar y 50 µl de la muestra en su correspondiente tubo, para finalmente colocar 50 µl

de PE, se incubó por 2 hrs a temperatura ambiente. Después de estas 2 hrs se añade el buffer de lavado para centrifugar a 1600 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y se dejó solo un poco de muestra, finalmente se adicionó 300 µl de buffer de lavado, para leer en citómetro de flujo (Accuri C6, BD®) y analizar los resultados en el FCAP Array V3 versión 3.0.

### **6.7. Aislamiento de los macrófagos peritoneales murinos**

Se utilizaron los ratones donantes BALB/c libre de patógenos, de 6 a 8 semanas de edad, que fueron sacrificados, mediante dislocación cervical. Se retiró la piel abdominal de forma manual para exponer la pared peritoneal intacta. Se inyectó 5 ml de medio de cultivo DMEM frío en cada ratón (evitar golpear los intestinos) y se obtuvo el líquido peritoneal lentamente, en un tubo de 50 ml, estéril. Se centrifugó las células de exudado peritoneal (PEC) a 1350 rpm por 10 min, desechando el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en medio de cultivo DMEM con 10% SFB y 1% de antibiótico-antimicótico (gibco® by Life Technologies, 100x). 20 µl de la muestra con 20 µl de azul tripano (gibco® by Life Technologies, 0.4%), para colocar 10 µl en la cámara de Neubauer, para realizar el conteo, finalmente se colocaron en placas de fondo plano de 96 pozos (Thermo Scientific®) aproximadamente 50,000 células en caso de macrófagos y 5,000 células de HT-29, se dejó 24 hrs para permitir la adherencia al plástico, retirando el medio, para ponerlas así en contacto con diferentes concentraciones de nanopartículas de oro, en un rango de 10 a 300 µM, ya sea sintetizadas con citrato de sodio (1%) o quitosano (2%), para realizar ensayos posteriores.

### **6.8. Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)**

Se utilizó 0.05% tripsina-EDTA (gibco® by Life Technologies, 1X) se disociaron las células de la caja de cultivo y se resuspendieron en medio suplementado (10% de SFB y 1% de antibiótico-antimicótico).

Se utilizó cajas de 96 pozos colocando de 5,000 a 50,000 células y se incuban a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para permitir su adherencia. Se retiró el medio, para ponerlas en contacto con diferentes concentraciones de nanopartículas de oro, en un rango de 10 a 300 µM, sintetizadas con citrato de sodio (1%) o quitosano (2%). Se

incubaban a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24, 48 o 72 horas; posteriormente se descartó el medio y se colocaron 100 µl de medio DMEM con 10% de SFB y 1 % de antibiótico-antimicótico (gibco® by Life Technologies, 100X). Se añadió 10 µl de MTT (Affymetrix®, 414.32). (5 mg/ml). Se incubaron por 2 horas a 37°C para permitir la formación de cristales de formazán. Luego se eliminó el sobrenadante. Se adicionó 100 µl de DMSO (Sigma-Aldrich®). Se agito hasta que los cristales de formazán se disolvieron. La lectura es por densidad óptica (DO) y se realizó en un lector de placa (Synergy HT, Biotek®) a una longitud de onda de 540 nm. El porcentaje de viabilidad se obtiene de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO células control}} \times 100$$

Para cada ensayo es indispensable realizarlo mínimo por triplicado, usando como control células sin tratamiento (sin nanopartículas, solo con medio de cultivo, ya sea RPMI o DMEM).

### **6.9. Cuantificación de óxido nítrico (ON) en macrófagos peritoneales de ratón**

Se realizó utilizando un kit de ensayo colorimétrico de óxido nítrico (BioVision®), siguiendo las indicaciones del fabricante y se realizó una curva estándar de nitratos y nitritos. Para la curva estándar se mezcló 5 µl del estándar de nitratos y nitritos en 495 µl de buffer para generar una solución de 1 mM, y de esta se generaron estándares de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 nmol; para muestras y control se usaron 85 µl y se añadió 5 µl de nitrato reductasa y 5 µl de cofactor, se cubrió la placa de 96 pozos por 1 hora en obscuridad y posteriormente 5 µl del potenciador, para incubar nuevamente durante 10 min y se añadió 50 µl del reactivo de Gris y después de 10 min se realizó la lectura en un lector de placa (Synergy HT, Biotek®) a una longitud de onda de 540 nm. El resultado se obtiene de la siguiente forma:

$$\text{Concentración de nitratos/nitritos} = \frac{\text{abs. de la muestra} - \text{abs. del blanco}}{\text{pendiente de la curva estándar}} / (\mu\text{l de la muestra})$$

Como control negativo se usaron células sin tratamiento (sin nanopartículas, solo con medio de cultivo, ya sea RPMI o DMEM) y control positivo LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### **6.10. Análisis Estadístico**

Los resultados se presentan con su media  $\pm$  la desviación estándar de la media. Para comparación de medias se usara las pruebas t-student y ANOVA para comparar las variables cuantitativas. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas con p-valor menor de 0.05. Por medio del programa GraphPad Prism y el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS de sus siglas en ingles).

## 7. RESULTADOS

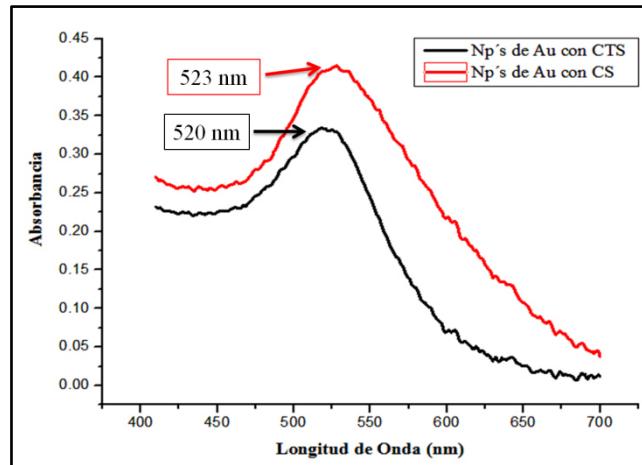
### 7.1. Caracterización de nanopartículas de oro de 5 -10 nm utilizando quitosano (CTS) y citrato de sodio (CS) como agentes reductores.

Se obtuvieron nanopartículas de oro con citrato de sodio y quitosano como agentes reductores, con los siguientes parámetros de reacción: temperatura de 100° a 95° por 15 minutos (min) y con una relación de 1 mol de  $\text{HAuCl}_4$  por cada 4 moles de CS y 3 moles de  $\text{HAuCl}_4$  por 1 mol de CTS, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 2. Síntesis de nanopartículas de oro

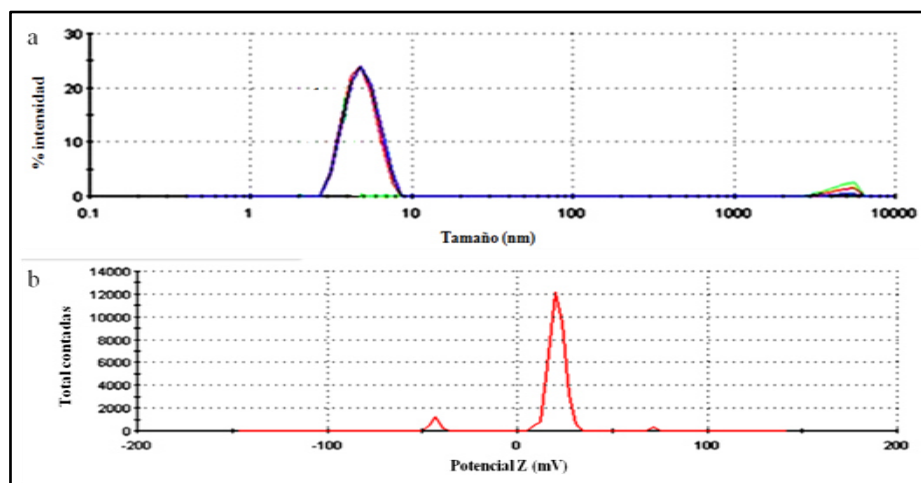
	CS	CTS
Relación molar ( $\text{HAuCl}_4$ :agentereductor)	1:4	3:1
Temperatura	100°C	95°C
Tiempo de reacción	15 min	15 min

La síntesis de nanopartículas de oro se comprobó utilizando espectroscopia de UV-Vis, midiendo la absorbancia en función de la longitud de onda, se obtuvo el plasmón de resonancia característico para Np's de Au, a los 520 nm (CTS) y 523 nm (CS) como se observa en la figura 8 (Bhumkar *et al.*2007; Huang y El-Sayed 2010; Zhao *et al.*2013). La intensidad del espectro corresponde a la concentración de las nanopartículas sintetizadas, observándose una mayor concentración empleando CS en contraste con CTS.

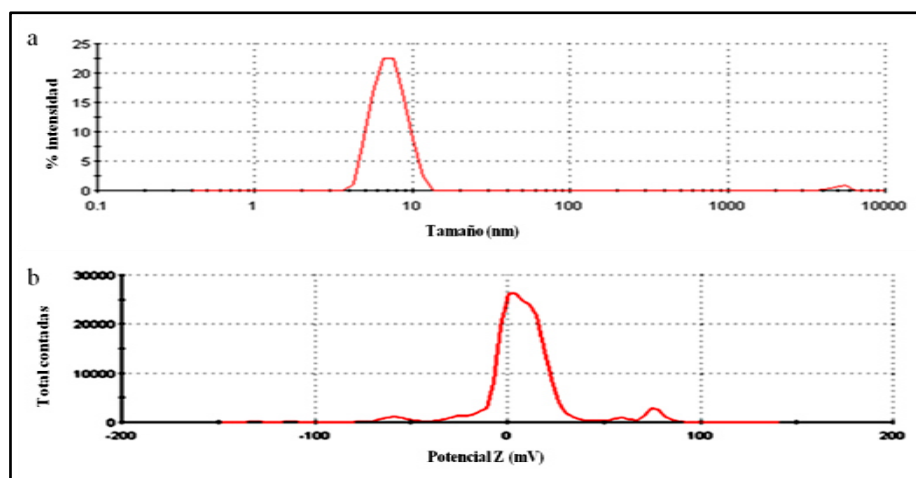


**Figura 8. Espectroscopia de UV-vis CTS y CS.** En el eje X se presenta la longitud de onda (nm), con un barrido espectral de 400 a 700 nm y en el eje Y la absorbancia, mostrando el punto máximo correspondiente a la excitación del plasmón de superficie.

El tamaño promedio de las nanopartículas de oro sintetizadas con CTS y CS es de 5 a 10 nm, con una polidispersidad de 0.3, lo cual indica un tamaño homogéneo en la población total de nanopartículas. Los valores de potencial Z obtenidos para las nanopartículas de oro sintetizadas con CTS fueron de 20.8 miliVolts (mV) y las de CS de 7.51 mV (figura 9 y 10).

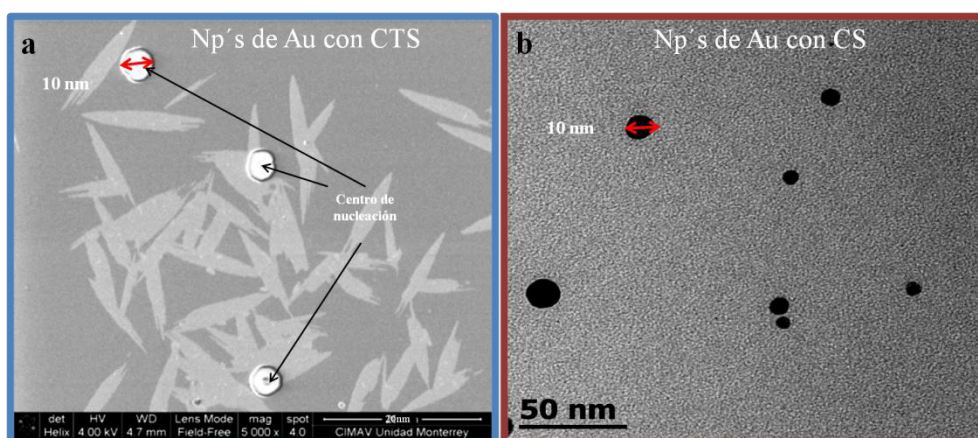


**Figura 9. Dispersión de Luz Dinámica.** a) Tamaño de nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano (CTS) como agente reductor, obteniendo tamaños de nanopartículas de 5 a 10 nm y b) potencial Z de 20.8 mV.



**Figura 10. Dispersión de Luz Dinámica.** a) Tamaño de nanopartículas de oro sintetizadas con citrato de sodio (CS) como agente reductor, obteniendo tamaños de nanopartículas de 5 a 10 nm y b) potencial Z de +7.51 mV.

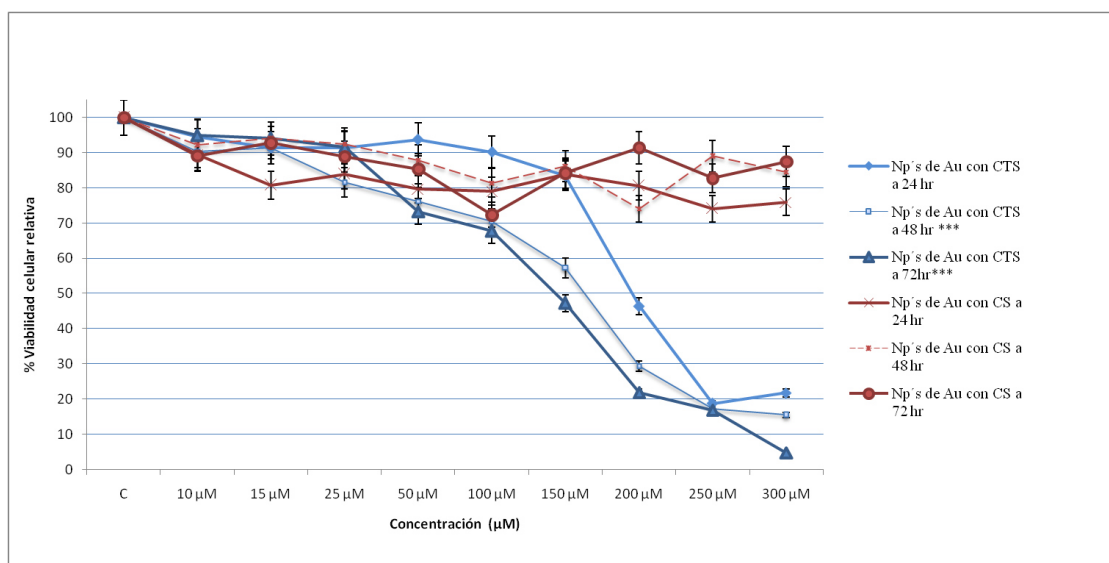
Para concluir con la caracterización, las nanopartículas de oro se analizaron por microscopía electrónica de Barrido (SEM), observándose nanopartículas esféricas con tamaños promedios de 5 a 10 nm, tanto para las sintetizadas con CTS (figura 11a) como las sintetizadas con CS (figura 11b). Particularmente en las nanopartículas sintetizadas con CTS se observan los centros de nucleación (ver flecha roja en figura 11a).



**Figura 11. SEM.** Microscopía electrónica de Barrido de Nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano (a, azul) y citrato de sodio (b, rojo) como agentes reductores.

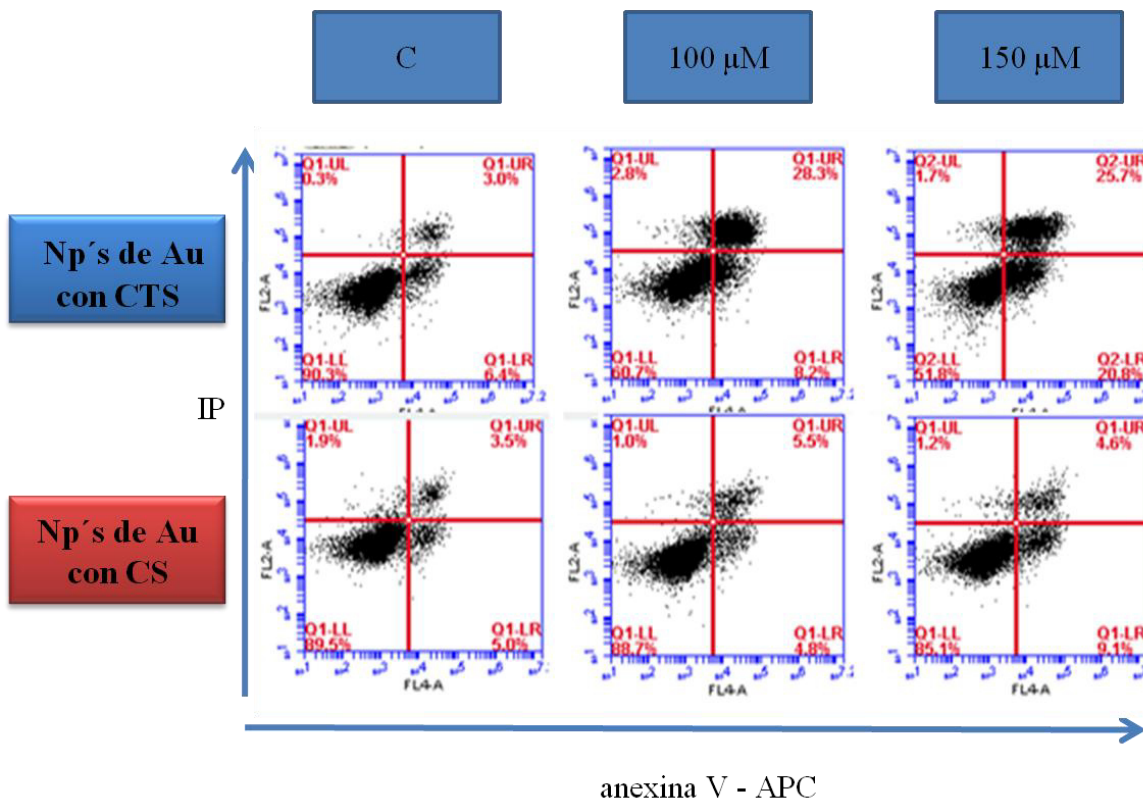
## 7.2. Efecto de nanopartículas de oro sobre la viabilidad en células de adenocarcinoma de colon (HT-29).

El tratamiento con Np's de Au con CTS afecto la viabilidad celular de HT-29 de una manera dependiente de dosis y de tiempo encontrando la  $DL_{50}$  a una dosis de 200  $\mu\text{M}$  a las 24 hrs y a las 48 y 72 hrs fue de 150  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ). El tratamiento con Np's de Au con CS no afecto la viabilidad celular de manera significativa ( $p > 0.05$ ) comparado con el control (figura 12).



**Figura 12. Efecto de nanopartículas de oro sobre la viabilidad en células de adenocarcinoma de colon (HT-29).** Se muestra en el eje X las diferentes concentraciones de nanopartículas de oro con CTS (azul) y CS (rojo) como agentes reductores y en el eje Y el porcentaje de viabilidad celular relativa, evaluadas en una línea celular HT-29. Sometidas a análisis estadístico de medias ANOVA y la prueba de Tukey, encontrando que a 24 hrs, no hay diferencia significativa  $P > 0.05$ , entre los tratamientos (CTS y CS), sin embargo a 48 y 72 si hay deferencia significativa  $P < 0.05$ .

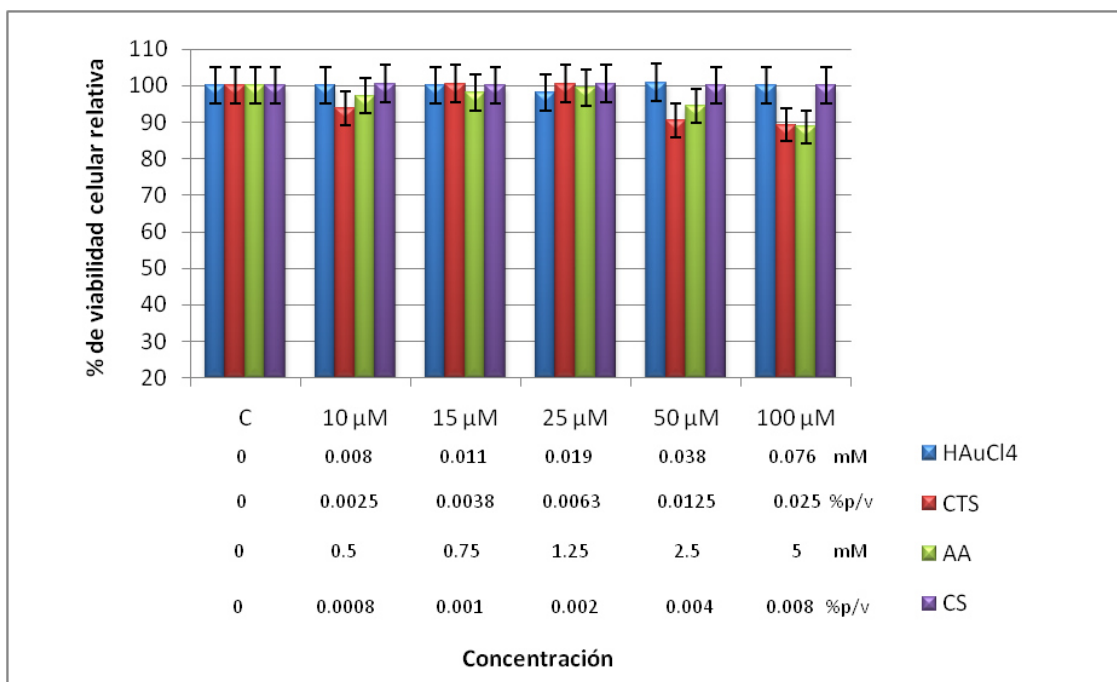
Estos resultados fueron corroborados mediante citometría de flujo empleando yoduro de propidio y anexina V encontrado datos similares (CTS 100  $\mu\text{M}$  ( $DL_{25}$  60.7 %), 150  $\mu\text{M}$  ( $DL_{50}$  51.8%) y CS 100  $\mu\text{M}$  ( $DL_{25}$  88 %), 150  $\mu\text{M}$  ( $DL_{50}$  85 %) a las 24 hrs (figura 13).



**Figura 13.** Viabilidad celular por nanopartículas de oro con quitosano (CTS, azul) y citrato de sodio (CS, rojo) en células HT29 evaluadas por citometría de flujo empleando un marcaje con anexina V/ioduro de propidio a 24 hrs.

### 7.2.1. Evaluación de la citotoxicidad de los vehículos involucrados en la síntesis de nanopartículas de oro.

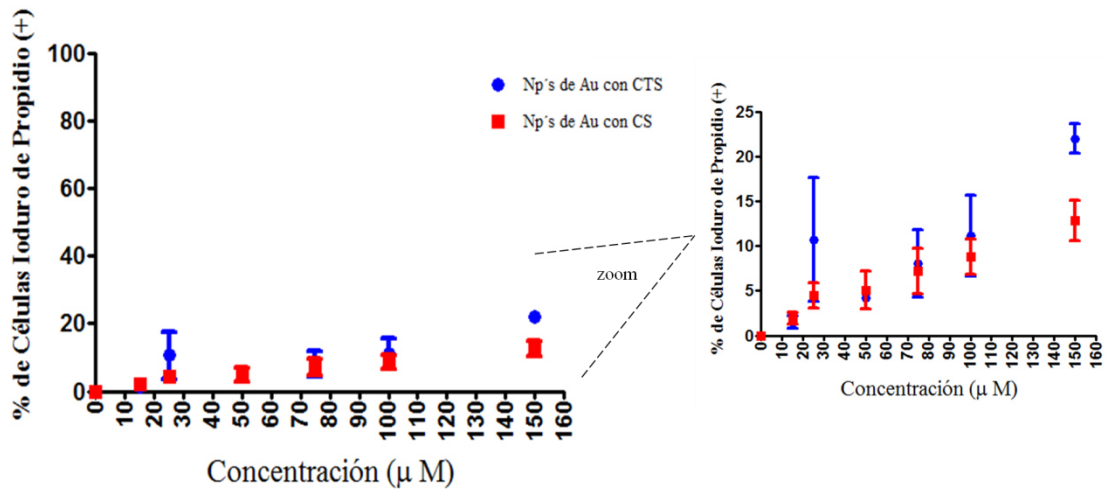
Se evaluó la viabilidad de las células HT-29 tratadas con los vehículos utilizados ácido acético (AA), CTS, CS y HAuCl<sub>4</sub>, para la síntesis de nanopartículas de oro, encontrando que no hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos y concentraciones (dosis) empleadas (figura 14).



**Figura 14. Citotoxicidad de los vehículos involucrados en la síntesis de nanopartículas de oro.** En el eje X se muestra las diferentes concentraciones micromolares ( $\mu\text{M}$ ) para  $\text{HAuCl}_4$  y AA y porcentaje peso volumen (%p/v) para CTS y CS, en el eje Y se observa el porcentaje de viabilidad celular relativa, evaluada en una línea celular de adenocarcinoma de colon (HT-29). Se realizó un análisis estadístico de medias ANOVA y la prueba de Tukey, no encontrando diferencia significativa entre las medias  $P > 0.05$ .

### 7.3. Efecto de nanopartículas de oro en la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC's)

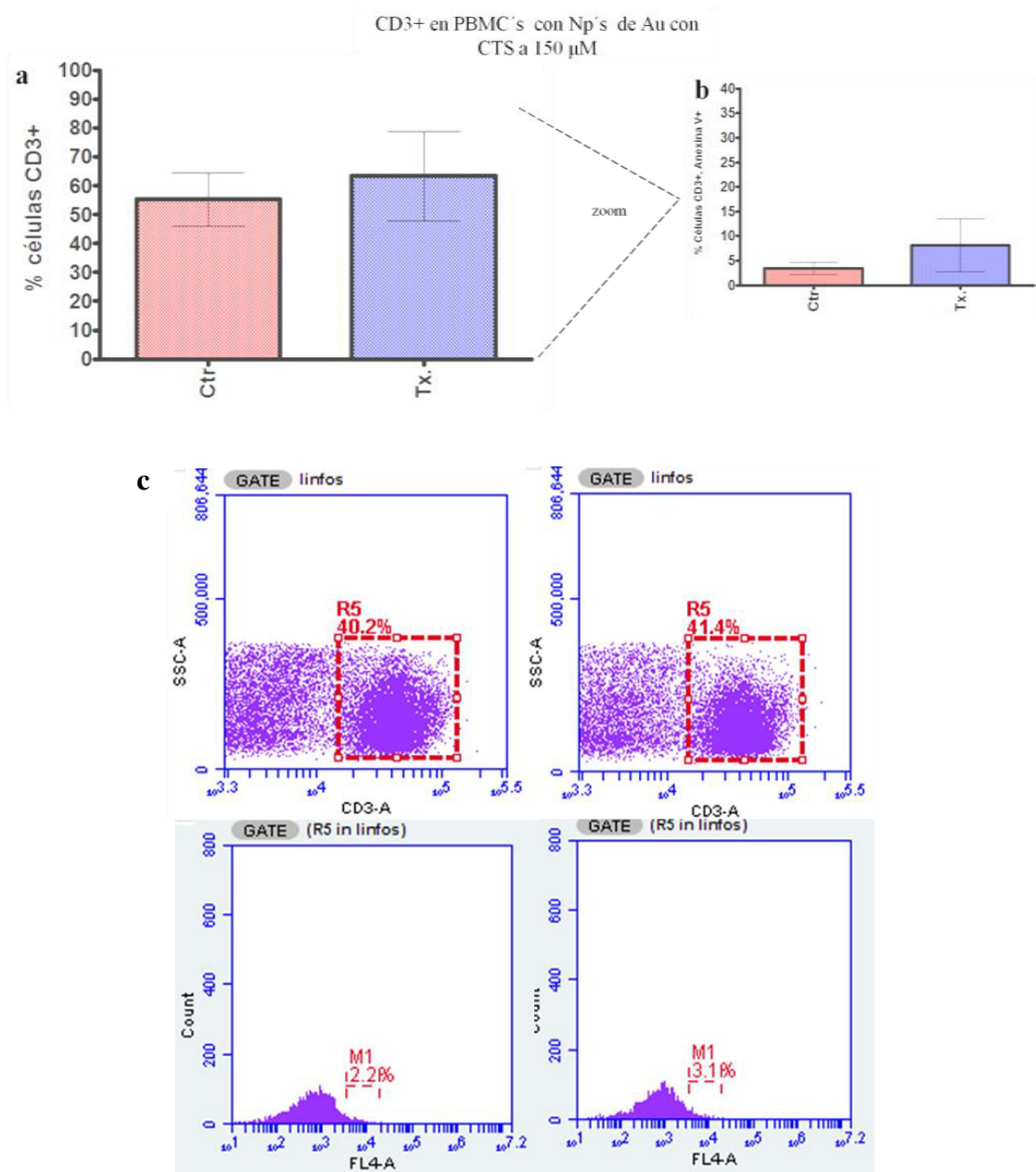
Para determinar el efecto citotóxico de las nanopartículas de oro con CTS y CS se emplearon células mononucleares de sangre periférica (PBMC's), los resultados indican que el tratamiento con Np's de Au con CS independientemente de la dosis empleada en el estudio no tuvo efecto citotóxico sobre las PBMC's ( $p < 0.5$ ) (figura 15). Tampoco el tratamiento con Np's de Au con CTS induce citotoxicidad celular ( $p > 0.05$ ) (figura 15).



**Figura 15. Efecto de nanopartículas de oro sobre las PBMC's humanas.** En el eje X se presenta un intervalo de concentraciones de nanopartículas de oro con CTS (azul) y CS (rojo) como agentes reductores y en el eje Y el porcentaje de células iódico de propidio<sup>+</sup>, sometidas a análisis estadístico de medias t-student, encontrando que no hay diferencia significativa  $P > 0.05$  en 24 hrs entre nanopartículas de oro sintetizadas con CTS y CS como agentes reductores y normalizando el control a 0.

### 7.3.1. Efecto de las nanopartículas de oro con quitosano como agente reductor sobre las poblaciones celulares CD3, CD19 y CD14 en PBMCs

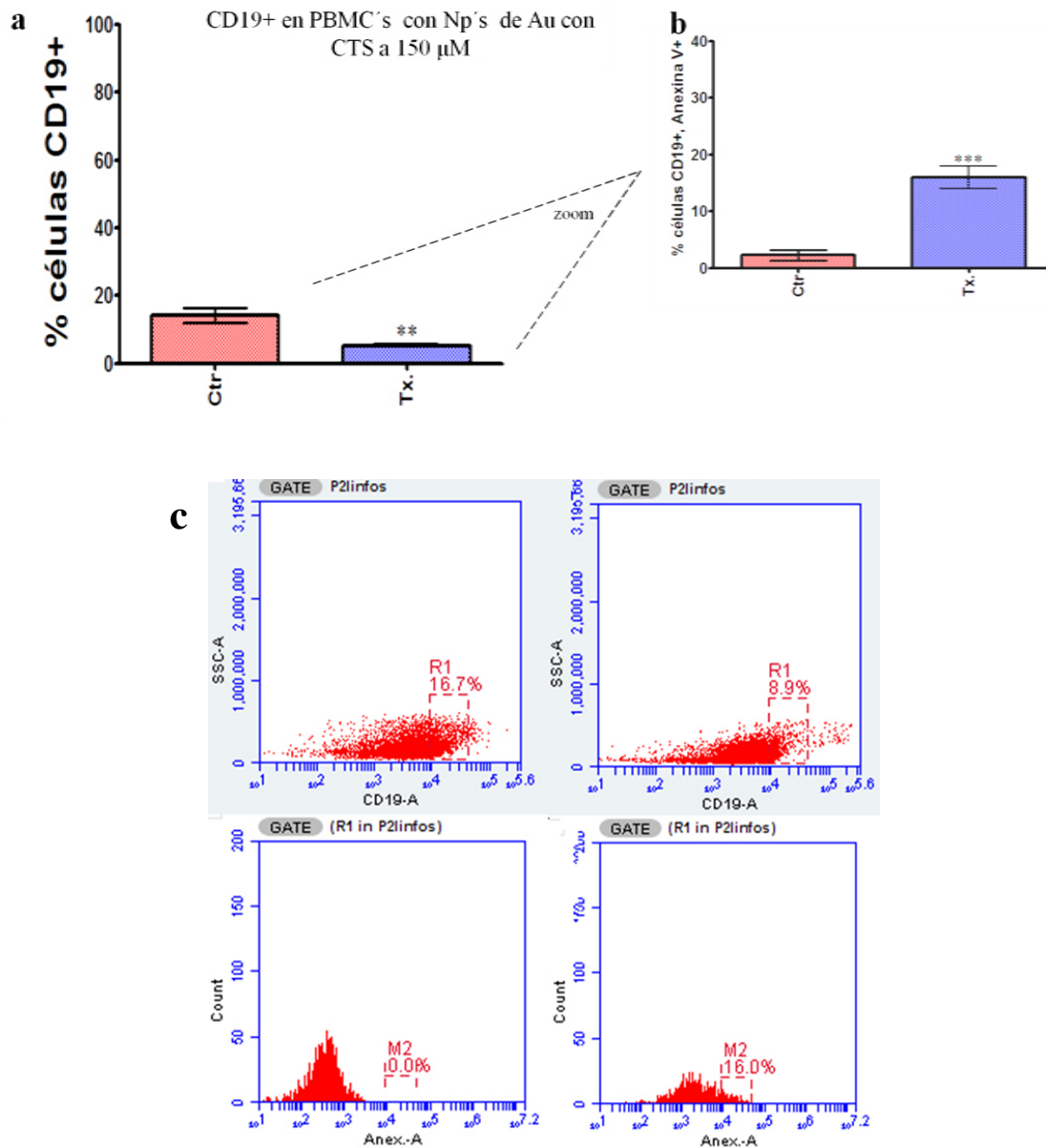
Se determinó la expresión del marcador CD3<sup>+</sup> mediante citometría de flujo después del tratamiento con 150 μM de Np's de oro con CTS (DL<sub>50</sub> de las células HT-29) (figura 16a), encontrando que el CD3<sup>+</sup> no se afecta significativamente comparado con el control ( $P > 0.05$ ) y tampoco su viabilidad (figura 16b, zoom) ( $P > 0.05$ ).



**Figura 16.** Células monucleares de sangre periférica tratadas a 24 horas con 150  $\mu$ M (DL50) de nanopartículas de oro sintetizadas con CTS como agente reductor, como control se utilizaron células sin tratamiento. **a.** porcentaje de células marcadas con CD3<sup>+</sup>, **b.** porcentaje de células positivas para el doble marcaje CD3<sup>+</sup> y anexina V. **c.** Histogramas obtenidos por citometría de flujo control (izquierda) y tratamiento (derecha) ( $p > 0.05$ ).

## CD19

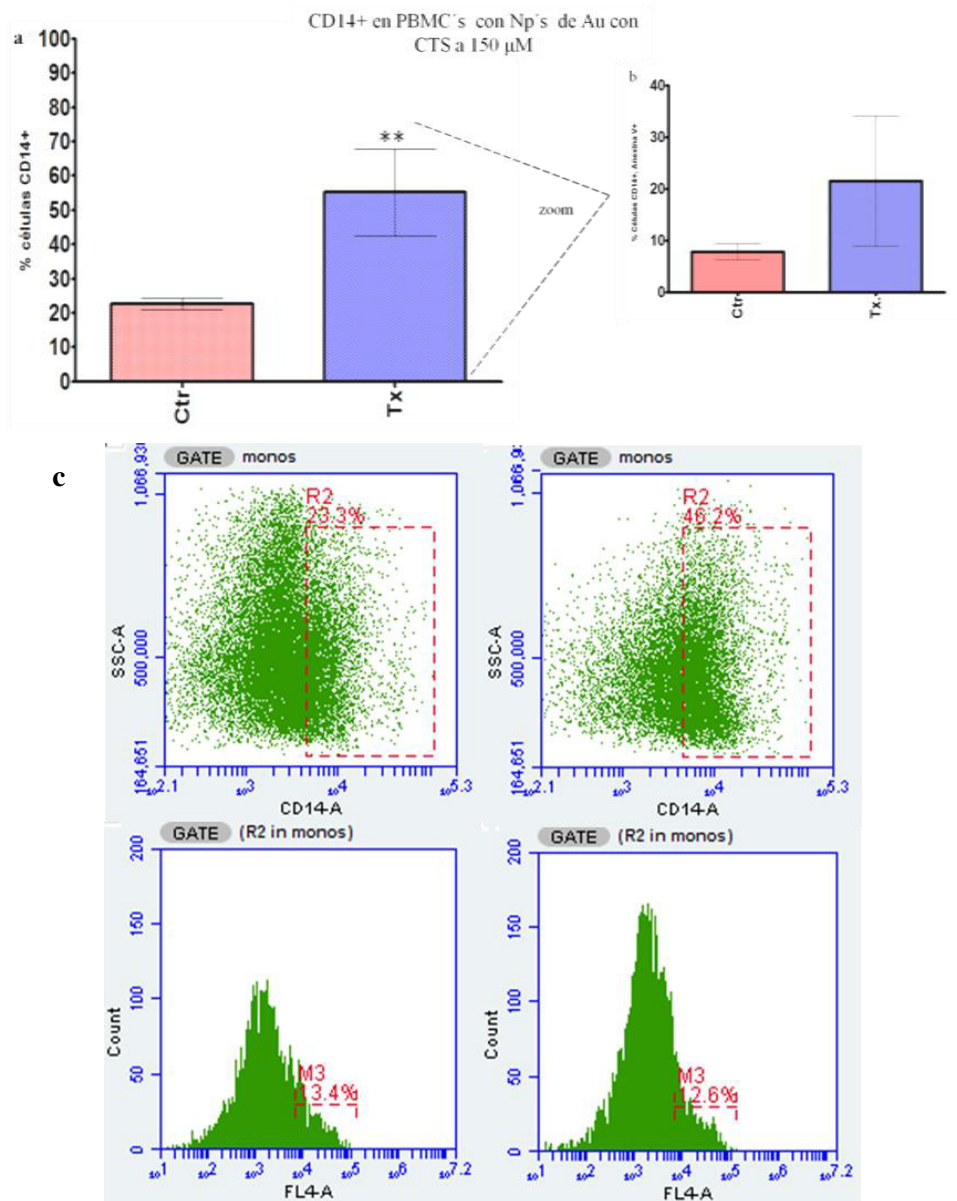
La expresión del marcador CD19<sup>+</sup> después del tratamiento con 150  $\mu$ M de Np's de oro con CTS (figura 20a) se ve disminuida de manera significativa ( $p < 0.01$ ), y también su viabilidad (figura 20b, zoom) ( $p < 0.001$ ).



**Figura 17.** Células monucleares de sangre periférica tratadas a 24 horas con 150  $\mu$ M (DL50) de nanopartículas de oro sintetizadas con CTS como agente reductor, como control se utilizaron células sin tratamiento. **a.** porcentaje de células marcadas con CD19<sup>+</sup> ( $p < 0.01$ ), **b.** porcentaje de células positivas para el doble marcaje CD19<sup>+</sup> y anexina V ( $p < 0.001$ ). **c.** Histogramas obtenidos por citometría de flujo, control (izquierda) y tratamiento (derecha).

## CD14

Se determinó la expresión del marcador CD14<sup>+</sup>, por citometría de flujo después del tratamiento con 150  $\mu$ M de Np's de oro con CTS (figura 21a) y se encontró que el CD14<sup>+</sup> aumenta con el tratamiento significativamente comparado con el control ( $P < 0.01$ ), mientras que la viabilidad no se afecta significativamente (figura 21b, zoom) ( $p > 0.05$ ).



**Figura 18.** Células monucleares de sangre periférica tratadas a 24 horas con 150  $\mu$ M (DL50) de nanopartículas de oro sintetizadas con CTS como agente reductor, como control se utilizaron células sin tratamiento. **a.** porcentaje de células marcadas con CD14<sup>+</sup> ( $P < 0.01$ ), **b.** porcentaje de células positivas

para el doble marcaje CD14<sup>+</sup> y anexina V ( $p > 0.05$ ). c. Histogramas obtenidos por citometría de flujo, control (izquierda) y tratamiento (derecha).

### 7.3.2. Producción de citocinas en PBMC's.

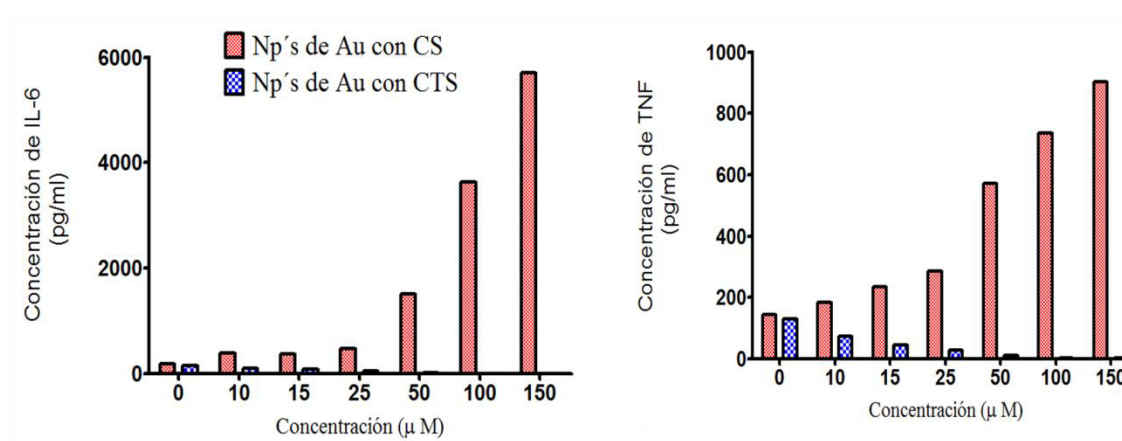
La IL-6 y TNF (proinflamatorias) se incrementaron significativamente ( $p < 0.05$ ) después del tratamiento con Np's de Au sintetizadas con CS y son dependientes de concentración (Tabla 4 y 5, figura 19a y b). Mientras que con las Np's de Au sintetizadas con CTS, también hay producción de citocinas IL-6 y TNF, sin embargo estas tienen valores mucho más bajos en comparación con las de CS.

**Tabla 3. Producción de citocinas Th1 y Th2 en sobrenadante de PBMC's a 24 hrs con nanopartículas de oro con CS como agente reductor.**

CS	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	TNF (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
0	0	145.27	1.49	186.48	0.4	0.8
10	0.15	184.23	2.14	387.8	0.16	0
15	0.06	233.99	2.29	368.07	0.11	0.48
25	0	286.31	2.73	471.69	0	0
50	0	572.69	6.35	1,518.62	0	0
100	0.12	735.06	9.4	3,626.49	0.03	0
150	0	902.96	13.21	5,704.85	0.27	0

**Tabla 4. Producción de citocinas Th1 y Th2 en sobrenadante de PBMC's a 24 hrs con nanopartículas de oro con CTS como agente reductor.**

CTS	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	TNF* (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6* (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)
0	0	131.82	0.9	149.01	0	0
10	0.12	73.27	1.04	109.5	0	0.21
15	0	47.01	0.18	82.84	0	0
25	0	29.06	0.39	50.81	0	0.37
50	0	11.95	0	24.82	0	0
100	0.23	2.36	0.31	5.1	0.19	0
150	0.32	2.18	0.5	3.32	0	1.11

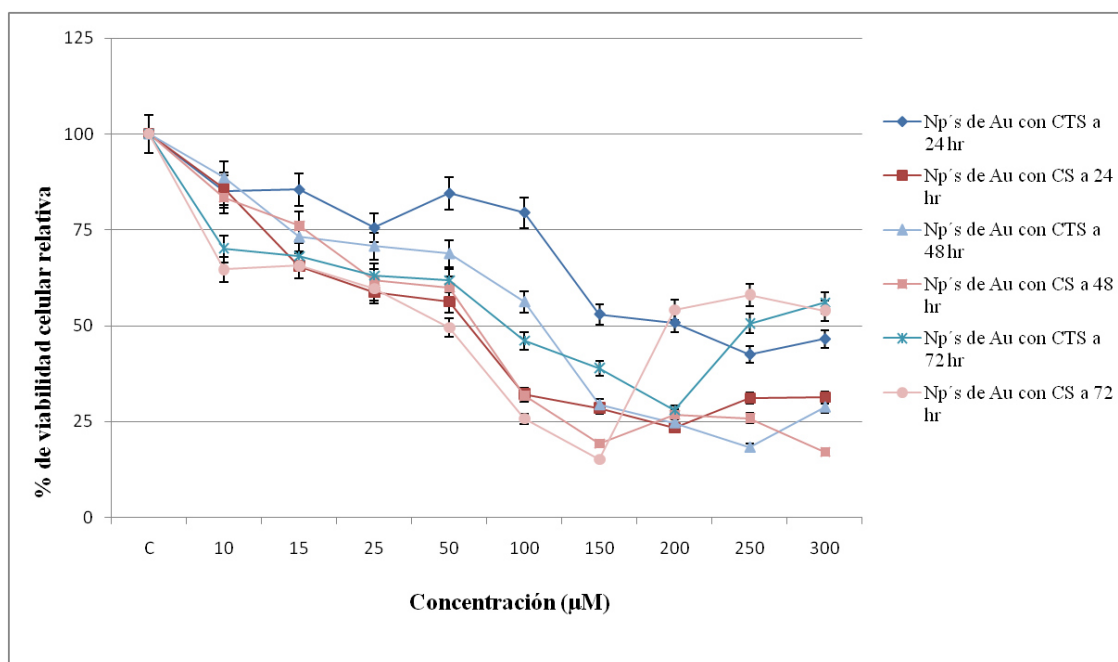


**Figura 19.** Producción de IL-6 (pg/ml) en sobrenadante de PBMC's a 24 hrs con nanopartículas de oro con CS y CTS como agentes reductores. **b.** Producción de TNF (pg/ml) en sobrenadante de PBMC's a 24 hrs con nanopartículas de oro con CS y CTS, en donde se puede observar que la producción de citocinas es dependiente de la concentración.

#### **7.4. Efecto de nanopartículas de oro sobre la viabilidad en macrófagos peritoneales de ratón.**

El tratamiento con Np's de Au con CTS y CS afectó la viabilidad de los macrófagos peritoneales de ratón de una manera dependiente de concentración y de tiempo encontrando la  $DL_{50}$  a una concentración de 150  $\mu$ M de Np's de Au con CTS (24, 48 y 72 hrs), mientras que con Np's de Au con CS es a 50  $\mu$ M sin diferencia significativa

entre tratamientos ( $p>0.05$ ) (figura 20) y similar a lo obtenido con las células HT-29 (figura 20).



**Figura 20. Viabilidad celular relativa en macrófagos peritoneales de ratón.** Diferentes concentraciones de nanopartículas de oro obtenidas empleando CTS (azul) y CS (rojo) contra el porcentaje de viabilidad celular relativa, a diferentes tiempos (24, 48 y 72 hrs), evaluadas en macrófagos peritoneales de ratón encontrando que no hay diferencia significativa  $P>0.05$  entre tratamientos (nanopartículas de oro sintetizadas con CTS y CS).

#### 7.4.1. Producción de citocinas en macrófagos peritoneales de ratón.

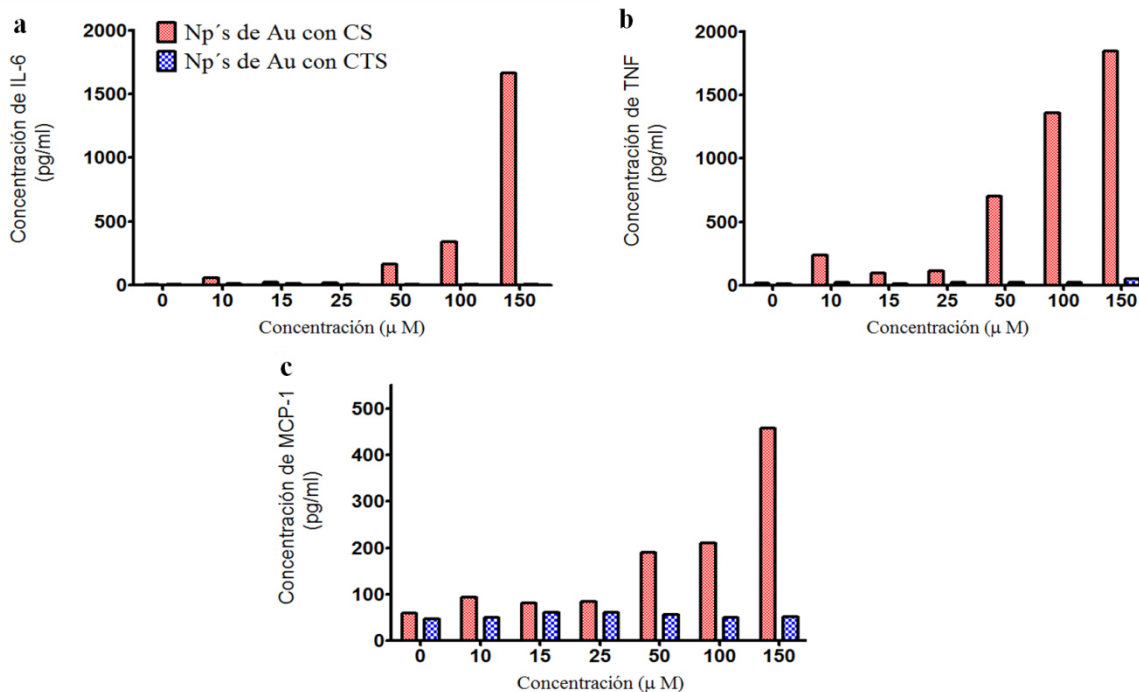
La IL-6, TNF y MCP-1 (proinflamatorias) se incrementaron significativamente ( $p<0.05$ ) después del tratamiento con Np's de Au sintetizadas con CS y son dependientes de concentración (Tabla 6 y 7 figura 21a y b). Mientras que con las Np's de Au sintetizadas con CTS, también hay producción de citocinas IL-6, TNF y MCP-1, sin embargo estas tienen valores mucho más bajos en comparación con las de CS.

**Tabla 5. Producción de citocinas inflamatorias en sobrenadante macrófagos peritoneales de ratón a 24 hrs con nanopartículas de oro con citrato de sodio.**

CS	IL-12p70 (pg/ml)	TNF (pg/ml)*	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)*	IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)*
0	3.1	16.56	0	59.15	2.76	6.13
10	3.31	238.38	0.4	93.53	4.98	55.22
15	0	97.31	0	80.44	2.91	23.91
25	0	112.48	0	83.95	1.68	19.41
50	3.1	701.77	0.75	189.98	8.29	166.38
100	0.84	1,359.94	0.66	210.74	6.85	342.98
150	1.2	1,843.84	0.91	457.43	7.21	1,662.57

**Tabla 6. Producción de citocinas inflamatorias en sobrenadante macrófagos peritoneales de ratón a 24 hrs con nanopartículas de oro con quitosano.**

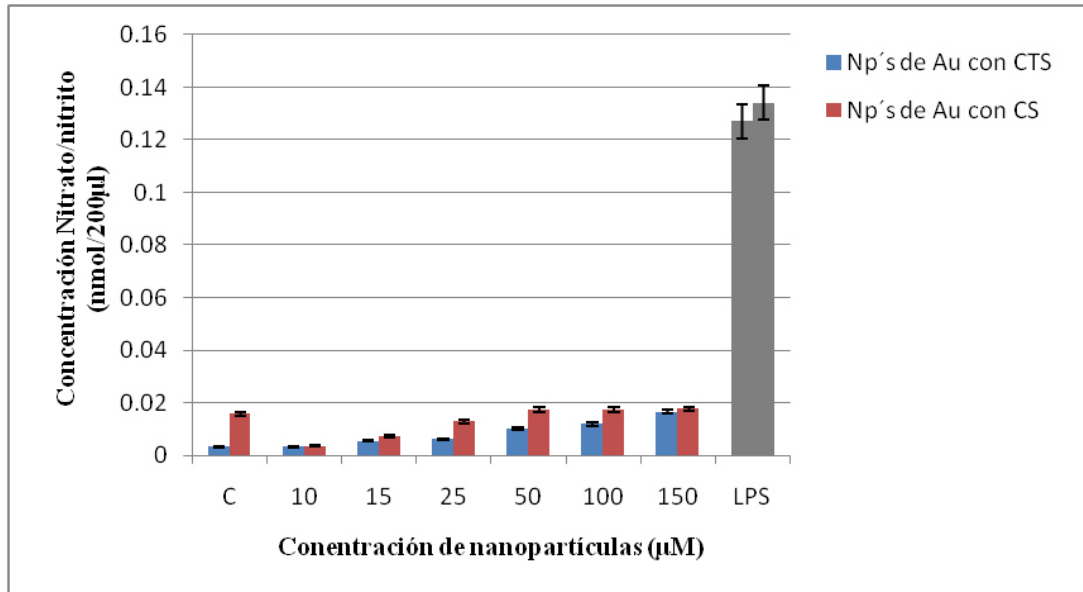
CTS	IL-12p70 (pg/ml)	TNF* (pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	MCP-1* (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6* (pg/ml)
0	0	10.51	0	46.94	4.2	4.9
10	0	21.77	0	49.6	4.6	9.6
15	0	13.09	0	61.1	3.36	13.93
25	2.47	22.91	0.69	60.46	5.62	9.13
50	0	23.17	0.47	56.51	4.86	7.08
100	1.2	21.85	0.4	50.55	4.98	8.32
150	0	52.84	0.21	51.02	0	8.52



**Figura 21. Citocinas inflamatorias en sobrenadante de macrófagos peritoneales.** a. Producción de IL-6 (pg/ml) a diferentes concentraciones de nanopartículas de oro con CS y CTS a 24 hrs. b. Producción de TNF (pg/ml) y c. Producción de MCP-1 (pg/ml). Se puede observar que la producción de citocinas es dependiente de concentración.

#### 7.4.2. Producción de Oxido Nítrico en macrófagos peritoneales de ratón

No existe diferencia significativa  $P > 0.05$  entre las cantidades de nitrato/nitrito (nmol/200  $\mu$ l) encontradas en los sobrenadantes de las células en contacto tanto con nanopartículas de oro sintetizadas con CTS y CS. Sin embargo, al utilizar LPS para la sensibilización de las células (1  $\mu$ g/ml) el resultado cambia, al aumentar significativamente  $P < 0.05$  la cantidad de nitrato/nitrito presente en el sobrenadante de las células (figura 22).



**Figura 22. Concentración de nitrato/nitrito.** En el eje X se muestra las diferentes concentraciones de nanopartículas de oro con CTS y CS y en el eje Y la concentración de nitrato/nitrito en sobrenadante de macrófagos peritoneales de ratón a 24 hrs.

## 8. DISCUSIÓN

Las nanopartículas de oro obtenidas empleando CTS y CS como agentes reductores, fueron caracterizadas por espectroscopia de UV-visible, dispersión de luz dinámica (DLS), potencial Z y microscopia electrónica de barrido (SEM).

Se ha reportado que las Np's de Au sintetizadas mediante el método físico o químico tienen un SRP característico de 520 nm de absorbancia evaluado con UV-Vis (Zhao *et al.* 2013), similar a los resultados de nuestro estudio, donde se encontró que las nanopartículas de oro sintetizadas con CTS como con CS presentaron un máximo de absorbancia a los 520 nm y 523 nm respectivamente mediante UV-Vis, con tamaños promedios de 5 a 10 nm. Adicionalmente se corroboró el tamaño de la partícula por medio de SEM y se observó una morfología esférica, que coincide con los reportes de Yen y colaboradores en el 2009; este grupo de investigación fabricó nanopartículas de oro de 5 a 7 nm, presentando RPS a los 518 a 523 nm y estructura esférica evaluada por TEM (Yen *et al.* 2009).

Según la teoría de Mie, un plasmón de resonancia es una frecuencia electromagnética que induce una oscilación de resonancia en los electrones libres ubicados en la superficie de una nanopartícula en solución, este parámetro se puede relacionar con el tamaño de la partícula y por tanto es un factor importante para evaluar la efectividad de las síntesis (Boisselier *et al.* 2009; Bhumkar *et al.* 2007; Huang y El-Sayed 2010).

El potencial Z de las nanopartículas de oro sintetizadas con CTS al 2% p/v fue de +20.8 mV y de +7.51 mV para las sintetizadas con CS al 1% p/v como agente reductor. Este parámetro indica cambios en las cargas superficiales de las partículas y por tanto en las fuerzas de repulsión, a mayor potencial Z (>30 mV) mayor fuerza de repulsión entre las partículas y menor agregación, por consecuencia, mayor estabilidad en dispersiones acuosas (Greenwood and Kendall, 1999; Hanaor *et al.* 2012). En base a esto determinamos que las Np's de Au más estables fueron las sintetizadas con quitosano (CTS) y correlaciona en parte con lo encontrado por Boyles y colaboradores

en el 2015, en donde obtuvieron valores de +23 mV para Np's de Au sintetizadas con 0.001% p/v de CTS, y -45 mV para Np's de Au sintetizadas con CS. Estas variaciones se deben a la diferencia entre las concentraciones de CS empleadas en cada síntesis ya que dicho trabajo utilizó un 0.001% p/v y nuestra síntesis se realizó con 1% p/v. El potencial Z depende de la cantidad, el pH y la densidad del agente reductor utilizado, ya que éste será quien confiera las cargas de superficie de las nanopartículas (Bhumkar *et al.* 2007). Una vez concluida con la caracterización de nuestras nanopartículas, se evaluaron los efectos de estas partículas en células sanas y cancerosas de humano y ratón.

La viabilidad de una célula que se encuentra en contacto con una partícula, está estrechamente relacionada con la superficie de la misma y sus características, como la forma, el tamaño, los radiales químicos y las cargas eléctricas. Aunque existen numerosos estudios sobre la citotoxicidad de las nanopartículas de oro en diferentes líneas celulares cancerosas y sanas (Goodman *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2005; Patra *et al.*, 2007 Villiers *et al.*, 2010), actualmente no se tienen reportes sobre el efecto de Np's de Au esféricas con CTS y CS como agentes reductores en células HT-29.

Los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron que las células HT-29 tratadas con Np's de Au sintetizadas con CTS afectaron de manera significativa la viabilidad celular al compararlas con las nanopartículas de oro sintetizadas con CS a las 48 y 72 hrs. Esto puede deberse a sus características químicas, ya que el quitosano actúa como polimerización incrementando la permeabilidad celular, aunque aún no se conoce con claridad la vía de muerte celular se ha reportado que este polisacárido es capaz de inducir citotoxicidad celular en líneas celulares de cáncer (Xu *et al.* 2010; Ta *et al.* 2008; Kim *et al.* 2011; Gibot *et al.* 2015).

Alkilany y colaboradores en el 2009 determinaron que la citotoxicidad celular de las células HT-29 inducida por los nanorods de oro sintetizados con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, agente reductor catiónico), fue atribuida a este último compuesto. Por lo que en el presente estudio decidimos evaluar los vehículos

involucrados en la síntesis de las nanopartículas de oro concluyendo que estos no afectan la viabilidad celular en las células HT29.

Regiel-Futyra y colaboradores en el 2015 también evaluaron el efecto de las Np's de Au sintetizadas con CTS en células A549 (línea celular de adenocarcinoma pulmonar) y HaCaT (línea celular de queratinocitos humanos), con un tamaño promedio de 40 nm, encontrando citotoxicidad de 35% para ambas líneas a concentraciones de 500  $\mu$ M. Sin embargo, la síntesis utilizada es diferente a la nuestra, ya que utilizan cantidades desiguales de ácido acético y quitosano, pero con peso molecular parecido, al utilizado en este estudio, para el quitosano.

Es conocido que la interacción entre las nanopartículas y células dependen del grupo de superficie y el tamaño de la partícula, pudiendo afectar el funcionamiento celular y por lo tanto tener resultados diferentes dependiendo del tipo celular, pudiendo afectar a las líneas celulares de cáncer, pero no a las sanas o a ambas.(Hslao *et al.* 2014).

El evaluar experimentalmente la actividad que ejercen diversos compuestos y materiales sobre los macrófagos es importante para poder comprender si estas sustancias tienen actividad antioxidante, antiinflamatoria o fagocítica (Abbas AK *et al.*, 2012; Kindt T *et al.*, 2006; Geissman F *et al.*, 2010). Nuestros tratamientos con Np's de Au con CTS y CS afectaron la viabilidad celular de macrófagos peritoneales de ratón. Contrario a lo reportado en estudios previos en los cuales nanopartículas de oro de diferentes tamaños, concentraciones o grupos de superficie no afectaron la viabilidad celular de la línea RAW 264.7 ni de macrófagos peritoneales murinos (Shukla *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2011; Bastús *et al.* 2008). Es de notar que estudios empleando CTS como agente reductor no se han reportado en la literatura actual.

La producción de citocinas inflamatorias y la liberación de mediadores de estrés oxidativo puede causar efectos tóxicos por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales producen daño en componentes celulares, por lo que evaluar estos parámetros nos permitiría ampliar el panorama inmunológico desencadenado por el tratamiento de los dos tipos de Np's estudiadas (Barros *et al.* 2011).

En este estudio observamos que la producción de TNF e IL-6 por PBMC's y macrófagos murinos tratados con nanopartículas de oro con CTS no varió respecto a nuestro grupo control (células sin nanopartículas). En cambio la producción de TNF e IL-6 por PBMC's y macrófagos murinos aumentó con el tratamiento de nanopartículas de oro con CS, contrario a lo observado en trabajos realizados por Shukla, Zhang y Bastús, en los que el tratamiento con nanopartículas de oro independientemente de su grupo de superficie, indujo una baja producción de estas citocinas en la línea celular RAW 264.7 y en macrófagos de cultivos primarios. Esta diferencia podría deberse a que las concentraciones de CS que emplean estos autores son 20 veces más pequeñas que las utilizadas en nuestra síntesis (Shukla *et al.* 2005; Bastús *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2011).

No hubo incremento de óxido nítrico con ninguno de los tratamientos en nuestro estudio, ni en estudios previos. Una probable explicación de esto es que nuestros tratamientos pudiesen afectar la expresión de la iNOS impidiendo que la arginina sea desdoblada a citrulina impidiendo la detección de nitritos y nitratos por nuestra prueba o que los iones positivos del citrato de sodio atraigan a los iones negativos del nitrato y del nitrito (sustratos empleados en la medición ON), lo que interfiere con la reacción del ensayo colorimétrico. (Bogdan 2001). Sin embargo para poder comprender estos resultados es necesario determinar la actividad de la enzima iNOS, en períodos cortos de estimulación y mecanismos antioxidantes.

Uno de los principales problemas de las drogas empleadas en el tratamiento del cáncer es la acción celular inespecífica, afectando células normales, por lo que se pretende buscar medicamentos con acción específica sobre las células tumorales (Mattos, 2013). Por esto uno de nuestros objetivos a evaluar fue el determinar si las nanopartículas de oro con CTS y CS afectan a las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC's). Encontrando que ningún tratamiento empleado con Np's de Au con CS o CTS afectó la viabilidad celular de las PBMC, sin embargo estas dosis tuvieron efecto sobre la viabilidad de la línea tumoral de adenocarcinoma de colon HT-

29. Nuestros resultados indican una mejora en la síntesis de Np's ya que Martínez et al. 2012; reportan que las Np's de Au empleando otros agentes reductores distintos a los de nuestro trabajo, afectan de manera significativa la viabilidad celular de las PBMCs; pero nuestros resultados concuerdan en parte con lo obtenido en la efectividad de las Np's de Au sintetizada con CTS con Boyles et al. 2012; que demuestran acción citotóxica sobre la línea celular de monocitos derivados de leucemia monocítica aguda (THP-1).

Debido a que no se observó efecto biológico relevante con las NP's de Au sintetizadas con CS, se prefirió continuar los estudios empleando Np's sintetizadas con CTS, encontrando que el tratamiento con 150  $\mu$ M de Np's de Au con CTS en PBMC no afectó el porcentaje de células CD3<sup>+</sup>, pero incrementó el porcentaje de población de CD14<sup>+</sup> y disminuyó el de CD19<sup>+</sup>. A la fecha no existen publicaciones de cómo afectan las Np's de Au con CTS a estas poblaciones celulares, sin embargo, en estudios realizados con nanotubos de carbono funcionalizados con 3 moléculas, reportan una disminución en el porcentaje de células CD19<sup>+</sup> similar a la observada en nuestros experimentos, los autores discuten que esta disminución fue independiente de la toxicidad ya que la viabilidad de estas células no se vio afectada, en contraste con los resultados de viabilidad obtenidos con las nanopartículas de oro con quitosano utilizadas en nuestro trabajo (Deloquet *al.* 2012).

El CD19 es un marcador biológico para las células B normales y neoplásicas, juega un papel crítico en el mantenimiento del equilibrio en la respuesta humoral y es activado por medio de la unión de algunos factores de transcripción como BSAP (Pax5), E2A, EBF, E47, E12, mb-1 y B29, por lo que la disminución en el porcentaje de la población CD19<sup>+</sup> encontrada en nuestros experimentos puede deberse a una probable interacción entre las nanopartículas de oro con quitosano y estos factores de transcripción, afectando el porcentaje de la población CD19<sup>+</sup>. Por otra parte, estos resultados son interesantes debido a que un incremento en este marcador está relacionado con enfermedades autoinmunes y linfomas, sugiriendo que las nanopartículas con CTS pudieran tener potencial en el tratamiento de estas

enfermedades, sin embargo más estudios al respecto son necesarios (O'Riordan y Grosschedl 1999; Mikkola *et al.* 2002; Anolik *et al.* 2004; Wang *et al.* 2012).

A una concentración de 150  $\mu$ M de Np's de Au con CTS se observó un alto porcentaje en la población de CD14, este resultado coincide con estudios realizados por Babense y Paranjpe en el 2005, los cuales mencionan que el quitosano y algunos biomateriales pueden participar en el proceso de diferenciación de macrófagos a células dendríticas por medio de la activación de receptores de membrana (TLR2 y TLR4), esta expresión puede ser similar a la generada por la estimulación con lipopolisacárido (LPS), incrementando la expresión de CD14 en macrófagos durante el estado inicial de la respuesta inflamatoria, y facilitando el contacto entre el LPS y el TLR4 (Yamamoto *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2005).

## 9. CONCLUSIONES

1.- El tamaño de las Np's de Au sintetizadas con CTS o CS en este estudio es de 5 a 10 nm con un potencial zeta de +20.8mV para las sintetizadas con CTS y +7 mV para las sintetizadas con CS.

2.- Las Np's de Au sintetizadas con CTS tuvieron efecto citotóxico en la línea celular de adenocarcinoma de colón HT-29, contrario a las sintetizadas con CS que no indujeron citotoxicidad.

3.- Los vehículos empleados en la elaboración de la síntesis de nanopartículas de oro no tienen efecto citotóxico en la línea celular HT-29.

4.- Los macrófagos peritoneales de ratón demostraron sensibilidad para ambas síntesis de nanopartículas de oro.

5.- Las nanopartículas de oro con quitosano como agente reductor no elevan la producción de citocinas proinflamatorias en PBMC's y en macrófagos peritoneales.

6.- Las nanopartículas de oro con quitosano y citrato de sodio no aumenta la producción de oxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón.

7.- Las nanopartículas de oro con quitosano o citrato de sodio no afectan la viabilidad celular de las PBMC humanas.

8.- Las nanopartículas de oro con citrato de sodio como agente reductor incrementa la producción de citocinas inflamatorias (TNF e IL-6) de una manera dependiente de dosis en las PBMC's y macrófagos peritoneales murinos.

9.- Las nanopartículas de oro sintetizadas con quitosano no afecta la población celular CD3<sup>+</sup> pero afecta las poblaciones celulares CD14<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>.

## 10. PERSPECTIVAS

- Estudiar la vía de muerte celular involucrada con estas nanopartículas de oro con quitosano para líneas celulares de cáncer.
- Estudiar el efecto de las nanopartículas de oro con quitosano en los factores de transcripción BSAP (Pax5), E2A, EBF, E47, E12, mb-1 y B29, relacionados con la activación de la expresión de CD19.
- Determinar el efecto de las nanopartículas de oro con quitosano sobre el linaje de células B evaluando marcadores como CD20, CD27, CD38 presentes a lo largo de su proceso de diferenciación a células plasmáticas, para determinar si hay una subpoblación precisa que se vea afectada.
- Determinar si las nanopartículas de oro con quitosano promueven un proceso de maduración de macrófagos, analizando marcadores de superficie

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012. Inmunología Celular y Molecular. Séptima edición. Elsevier: España, pp. 15-30.

Albrecht R, Heintz J. Making and conjugating colloidal metals. Disponible en: [http://www.ansci.wisc.edu/facstaff/Faculty/pages/albrecht/albrecht\\_web/Programs/microscopy/colloid.html](http://www.ansci.wisc.edu/facstaff/Faculty/pages/albrecht/albrecht_web/Programs/microscopy/colloid.html)

Alkilany AM, Nalaria PK, Hexel CR, Shaw TJ, Murphy CJ, Wyatt MD. 2009. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small nano journal* 6: 701-03.

Anolik JH, Bernard J, Cappione A, Pugh-Bernard AE, Felgar RE, Looney J, Sanz I. 2004. Rituximab Improves Peripheral B Cell Abnormalities Human Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 50: 3580-90.

Barros C, Kimiko R, Machado A, Gerola L, Salomao R. 2011. Citocinas y Dolor. *Revista Brasileira de Anestesiología* 61:132-42.

Bastús NG, Sánchez E, Pujals S, Ferrera , Kogan M, Giralt E, Celada A, Lloberas J, Puentes V. 2009. Peptides conjugated to gold nanoparticles induce macrophage activation. *Molecular Immunology* 46:743-748.

Bhumkar DR, Joshi HM, Sastry M, Pokharkar VB. 2007. Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. *Pharmaceutical Research* 24:1415-25.

Boca S, Potara M, Toderas F, Stephan O, Baldeck P, Astilean S. 2011. Uptake and biological effects of chitosan-capped gold nanoparticles on Chinese Hamster Ovary cells. *Materials Science and Engineering C* 31:184-89.

Boisselier E, Astruc D. 2009. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics therapies and toxicity. *Chemical Society Review* 38:1759-1762.

Bueter CL, Specht CA, Levitz SM. 2013. Innate Sensing of chitin and chitosan. *PLoS Pathog* 9: e1003080.

Boyles M, Kristl T, Andosch A, Zimmermann M, Tran N, Casals E, Himly M, Puentes V, Huber C, Meindl U, Duschl A. 2015. Chitosan functionalisation of gold nanoparticles encourages particle uptake and induces cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in phagocytic cells, as well as enhancing particle interactions with serum components. *Journal of Nanobiotechnology* 13: 1-20.

Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. 2008. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnology science and applications* 1:17-32.

Caracciolo P, Cortez P, Buffa F, Montini F, Cuadrado T, Abraham G. 2011. *FabaInforma: Pequeñas fibras, grandes aplicaciones.*

Castro C. 2006. Pruebas de Tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones ó sustancias, utilizando la prueba del MTT. Disponible en: [www.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/](http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/).

Chen C, Wang Y, Liu C, Wang J. 2008. The effect of water-soluble chitosan on macrophage activation and the attenuation of mite allergen-induced airway inflammation. *Biomaterials* 29: 2173-2182.

Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. 1998. Current Protocols in Immunology. National Institutes of Health. Greene (eds). Volumen 1. Capitulo 3 y 10.

Delogu L, Venturelli E, Manetti R, Aimé G, Carru C, Madeddu R, Murgia L, Sgarrella F, Dumortier H, Bianco A. 2012. *Ex vivo* impact of functionalized carbon nanotubes on human immune cells. *Nanomedicine* 7:231-43.

Demchenko AP. 2012. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology* 65:157-172.

Díaz D. 2006. Desarrollo de nuevas metodologías para la enumeración de células en cultivo y la cuantificación de la apoptosis. Universidad de Alcalá. Tesis: Doctorado. Disponible en: <http://www.faba.org.ar/fabainforma/464/ABCL.htm>

Elsabahy M, Wooley K. 2013. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. *Chemical Society Reviews* 42:5552-56.

Euliss L, DuPont J, Gratton S, DeSimone J. 2006. Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine. *Chemical Society Reviews* 35:1095 -1100.

Fotakis G, Timbrell JA. 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 160: 171-75.

Geissman F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656-661.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. 2010. Development of Monocytes, Macrophages and Dendritic Cells. *Science* 327: 656-58.

Gibot L, Chabaud S, Bouhout S, Bolduc S, Auger FA, Moulin VJ. 2015. Anticancer properties of chitosan on human melanoma are cell line dependent. *International Journal of Biological Macromolecules* 72:370-79.

Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. 2004. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate chemistry* 15:897-900.

Greenwood R, Kendall K. 1999. Selection of Suitable Dispersants for aqueous Suspensions of Zirconia and Titania Powders using Acoustophoresis. *Journal of European Ceramic Society* 19:479-88.

Hanaor D, Michelazzi M, Leonelli C, Sorrell CC. 2012. The effects of carboxylic acid on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of  $ZrO_2$ . *Journal of the European Ceramic Society* 32:235-44.

Hernández JC, Urcuqui S. 2012. Activación y regulación del inflammasoma NLRP3 en las enfermedades infecciosas. *Iatreia* 25:380-90.

Hsiao LI, Mareike A, Joksimovic R, Sokolowski M, Gradzielski M, Haase A. 2014. Size and Cell Type Dependent Uptake of Silica Nanoparticles. *Journal Nanomedicina Nanotechnology* 5:248-50.

Huang H, Yang X. 2004. Synthesis of Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles in the Absence/Presence of Tripolyphosphate. *Biomacromolecules* 5:2340-2346.

Huang X, El-Sayed MA. 2010. Gold nanoparticles: Optical properties and implementation in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research* 1: 13-16.

Jain S, Hirst D, O'Sullivan J. 2012. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *The British journal of radiology* 85:101-113.

Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, Huber M, Kalis C, Keck S, Galanos C, Freudenberg M Beutler B. 2005. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nature Immunology* 6:565-70.

Jin Y, Li Z, Hu L, Shi X, Guan W, Du Y. 2013. Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles by atmospheric plasma. *Carbohydrate Polymers* 91:152-156.

Jung WJ, Park RD. 2014. Bioproduction of Chitooligosaccharides: Present and Perspectives. *Marine drugs* 12:5328-56.

Kim H, Choi M, Cha S, *et al.* 2013. Earthworm extracts utilized in the green synthesis of gold nanoparticles capable of reinforcing the anticoagulant activities of heparin. *Nanoscale research letters* 8:542.

Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. 2006. Tumor-Driven Evolution of Immunosuppressive Networks during Malignant Progression. *Cancer Research* 65:55227-36.

Kimling J, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. 2006. Turkevich Method for Gold Nanoparticles Synthesis Revisited. *Journal of Physical Chemistry* 110:15700-07.

Kindt T, Goldsby R, Osborne B. 2007. *Inmunología de Kuby*. Sexta edición. MacGrawHill: China, pp. 30-40.

Khan J, Pillai B, Das T, Singh Y and Maiti S. 2007. Molecular Effects of Uptake of Gold Nanoparticles in HeLa Cells. *Journal of Chemical Biology, Synthetic- biology and biotechnology* 8:1237-40.

Kumar C. 2013. *UV-VIS and Photoluminescence Spectroscopy for Nanomaterials Characterization*. Center for Advanced Microstructures and Devices. Springer: Baton Rouge, LA, USA pp.17-20.

Laudenslager M, Schiffman J, Schauer C. 2008. Carboxymethyl Chitosan as a Matriz Material for Platinum, Gold, and Silver Nanoparticles. *Biomacromolecules* 9:2682-2685.

Lee C, Da Silva C, De la Cruz C, Ahangari F, Min-Jong B, He C, Takyar S y Elias J. 2011. Role of chitin and chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annual Review of Physiology*. 73:1-28.

Macs Miltenyl Biotec. Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation. Disponible en:  
[https://www.miltenyibiotec.com/~media/Files/Navigation/Research/Stem%20Cell/SP\\_MC\\_PB\\_density\\_gradient.ashx](https://www.miltenyibiotec.com/~media/Files/Navigation/Research/Stem%20Cell/SP_MC_PB_density_gradient.ashx)

Martinez I, Spolon V, Silva R, Gregg L, Zucolotto V. 2012. Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology Letters* 215: 119-125.

Medina D. 2006. Obtención de conjugados péptidos-Nanopartículas metálicas para el desarrollo d una nueva estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer. Universidad de Chile.

Medzhitov R, Janeway CA. 2002. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science* 296:298-300.

Mikkola I, Heavey B, Horcher M, Busslinger M. 2002. Reversion of B cell commitment upon loss of Pax 5 expression. *Science* 297:110-113.

Mironava T, Hadjiargyrou M, Simo M, Jurukovski V, Rafailovich. 2010. Gold nanoparticles celular toxicity and recovery: Effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 4:120-122.

Moreno AC, Castañas R, San Martín E. 2014. Dispersión de luz dinámica en la detección de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education* 8:4314-1-5.

Murphy CJ, Gole AM, Stone JW, *et al.* 2008. Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to celular imaging. *Accounts of chemical research* 41:1725.

Nguyen D, Kowandy C, Dupont L, Coqueret X. 2014. Radiation synthesis of chitosan stabilized gold nanoparticles comparison between e beam and  $\gamma$  irradiation. *Radiation Physic and chemistry* 94:84-87.

O'Riordan M, Grosschedl R. 1999. Coordinate Regulation of B cell Differentiation by the Transcription Factors EBF and E2A. *Immunity* 11:21-31.

Patra HK, Banerjee S, Chaudhuri U, Lahiri P, Dasgupta A. 2007. Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine* 3:111-19.

Protocolo abcam. Annexin V-FITC. Disponible en:

[http://www.abcam.com/ps/products/14/ab14085/documents/ab14085%20Annexin%20V%20FITC%20Apoptosis%20Detection%20Kit%20\(Website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/14/ab14085/documents/ab14085%20Annexin%20V%20FITC%20Apoptosis%20Detection%20Kit%20(Website).pdf)

Ramirez MA. 2010. Evaluación de la Cinética de distribución y toxicidad de las nanopartículas de plata. Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis: Maestría.

Reddy R. 2006. Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications. *Synlett* 11:1791-1792.

Regiel A, Kus M, Sebastian V, Irusta S, Arruebo M, Stochel G, Kyziol A. 2015. Development of Noncytotoxic chitosan-Gold Nanocomposites as efficient Antibacterial Materials. *American Chemical Society* 7:1087-99.

Rico A, Vilchis R, Sánchez V, Avalos M, Camacho MA. 2010. Biosíntesis de nanopartículas de oro mediante el extracto de *Opuntia ficus-indica*. Superficies y Vacío 23:94-97.

Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. 2011. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of cell Death. Journal of Visualized Experiments 50:1-4.

Riss TL, Moravec RA. 2004. Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell- Based Cytotoxicity Assays. ASSAY and Drug Development Technologies 2:51-60.

Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. 2005. Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. Langmuir 21:10644-54.

Sigma Aldrich Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrateanalysis/carbohydrate-analysis-ii.html>

Strowig T, Henao J, Elinav E, Flavell R. 2012. Inflammasomes in health and disease. Nature 481:278-85.

Sugunan A, Thanachayanont C, Dutta J, Hilborn. 2005. Heavy-metal ion sensors using chitosan-capped gold nanoparticles. Science and Technology of Advanced Materials 6: 335-340.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-Like Receptors. Annual Reviews Immunology 21: 335-76.

Thakor AS, Jokerst J, Zavaketa C, Massoud TF, Gambhir SS. 2011. Gold Nanoparticles: A Revival in Precious Metal Administration to Patients. Nano Letters 11:4029-32.

The Barerian Leture: Experimental Relations of Gold and other Metals to Light.

Thu H, Dass CR, Dunstan DE. 2008. Injectable chitosan hydrogels for localised cáncer therapy. *Journal of Controlled Release* 126:205-10.

Toshima N, Yonezawa T. 1998. Bimetallic nanoparticles-novel materials for chemica and physical applications. *New Journal of Chemistry* 22:1179-82.

Turkevich J, Cooper P, Hillier J. 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of coloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* 11:55-60.

Vigderman L, Zubarev ER. 2012. Therapeutic platforms base don gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65: 663-65.

Villiers C, Freitas H, Couderc R, Villers MB, Marche P. 2010. Analysis of the toxicity of gold nanoparticles on the immune system: efecto on dendritic cell funcions. *Journal of Nanoparticle Research* 12: 55-60.

Viudez A.2011. Síntesis, Caracterización y ensamblaje de nanoparticulas de oro protegidas por monocapas moleculares. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Tesis: Doctorado.

Wang K, Wei G, Liu D. 2012. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental Hematology and Oncology* 1:1-6.

Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. 2012. Cytometry of apoptosis. Historical Prespective and new advances. *Experimental Oncology* 34: 255-262.

Xu Y, Wen Z, Xu Z. 2010. Chitosan Nanoparticles inhibit the growth of human hepatocellular carcinoma xenografts through an antiangiogenic mechanism. *Anticancer Research* 30: 5103-10.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88- Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. *Science* 301: 640-43.

Yang J, Zhang L, Yu C, Feng X, Wang H. 2014. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research* 2:2-9.

Zapata P, Rodríguez C, Trejo L. 2007. *Introducción al cultivo celular*. Primera edición. Santillana.

Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. 2008. The Isolation and characterization of murine Macrophages. *Current Protocols in Immunology*.

Zhao P, Li N, Astruc D. 2013. State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews* 257: 638-640.

Zolnik BS, González A, Sadrieh N, Dobrovalskaia. 2010. Minireview: Nanoparticles and the Immune System. *Endocrinology* 151:458-465.

## **12. RESUMEN BIOGRÁFICO**

Lizeth Ivón Álvarez Cháirez

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunología

Título de tesis:

**EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS EMPLEANDO  
QUITOSANO Y CITRATO DE SODIO COMO AGENTES REDUCTORES, SOBRE  
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA**

Campo de estudio: Nanotecnología e Inmunología.

Datos personales: Nacido en Zacatecas, México, el 01 de noviembre de 1987.  
Hijo de Lilia Cháirez Niño y Reynaldo Álvarez Morales

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Zacatecas, grado obtenido de Químico Farmacéutico Biólogo en 2013.

Tesis de licenciatura titulada: Especificidad fina de Anticuerpos Antinucleares en patrones de fluorescencia poco frecuentes.

Experiencia profesional: Laboratorio clínico y de experimentación.