

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES INMUNOESTIMULADORAS
DE NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS A PARTIR DE
LISADO TUMORAL Y SU POTENCIAL APLICACIÓN TERAPÉUTICA
ANTITUMORAL

POR

JOSÉ RAÚL RANGEL LÓPEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2025

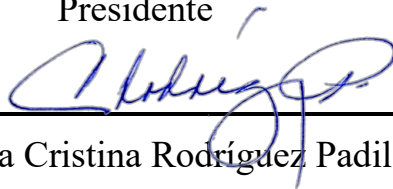
EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES INMUNOESTIMULADORAS
DE NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS A PARTIR DE
LISADO TUMORAL Y SU POTENCIAL APLICACIÓN TERAPÉUTICA
ANTITUMORAL

Comité de Tesis



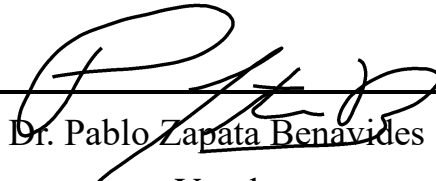
Dra. Diana Ginette Zárate Triviño

Presidente



Dra. María Cristina Rodríguez Padilla

Secretario



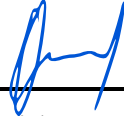
Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal

DIANA
CASAVERA

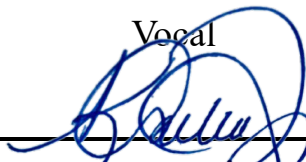
Dra. Diana Elia Caballero Hernández

Vocal



Dr. Moisés Armides Franco Molina

Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Niño

Subdirector de Posgrado



DIRECCIÓN
DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES INMUNOESTIMULADORAS
DE NANOPARTÍCULAS DE ORO SINTETIZADAS A PARTIR DE
LISADO TUMORAL Y SU POTENCIAL APLICACIÓN TERAPÉUTICA
ANTITUMORAL

Dirección de Tesis



Dra. Diana Ginette Zárate Triviño

Director

AVISO DE DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes instituciones y personas, sin su apoyo y colaboración este trabajo no habría sido posible:

A la **Facultad de Ciencias Biológicas**, por brindarme la oportunidad de formar parte de su comunidad académica, y por el conocimiento y la formación que me proporcionaron a lo largo de mi trayectoria.

Al **Laboratorio de Inmunología y Virología**, por ser un espacio adecuado en el que pude desarrollar mis habilidades de investigación y aprender de un equipo altamente comprometido y profesional.

Al **Centro de Ingeniería y Desarrollo Industrial (CIDESI)**, por su apoyo en los aspectos técnicos y logísticos, y por ofrecerme un entorno de investigación de alta calidad.

A los Doctores **Jorge Luis Menchaca Arredondo, Diana Caballero Hernández, Pablo Zapata Benavides** y a la **Dra. Cristina Rodríguez padilla**

Dra. Diana G. Zárate Triviño y **Dr. Moisés A. Franco Molina** por su orientación, paciencia y valiosas aportaciones a lo largo de este proyecto.

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)**, por el financiamiento otorgado, que hizo posible la realización de este proyecto de investigación.

Finalmente, a todas las personas que de alguna forma participaron en este proyecto, su apoyo y colaboración han sido esenciales para llevar a cabo esta tesis.

DEDICATORIA

A **mis padres** por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera formativa en el mundo de la investigación, a mis hermanos por soportar noches de desvelo ocasionadas por mi trabajando de noche, gracias por su apoyo y comprensión constante.

A **mis amigos Diana, Jennifer, Bruno, Rubén, Gustavo** por siempre escucharme, aconsejarme y soportar mis propuestas de idea de proyecto poco convencionales, ustedes forman parte clave de mi formación y aprendizaje en el ámbito de la colaboración científica.

A los **alumnos de pregrado** que contribuyeron en alguno de mis experimentos a lo largo de la maestría y doctorado.

A la **Dra. Diana G. Zárate**, mi asesora de tesis, mi jefa y mi amiga, más de 10 años de trabajar juntos, de crecer juntos, aunque fue complicado ingresar a su laboratorio este trabajo nunca se hubiera podido realizar sin su apoyo, colaboración y fe por el proyecto.

Al **Dr. Moisés Franco Molina**, por su guía a lo largo de mis 6 años de posgrado, gracias a sus comentarios y sugerencias tan asertivas este proyecto se convirtió en lo que es hoy en día, siempre le estaré agradecido y su forma de ver la ciencia ahora también forma parte de la mía.

A cualquiera que este leyendo esta tesis, recordemos que el éxito está construido de fracasos y que podrán pasar los años y los proyectos, pero nuestro compromiso con el mundo científico debe de permanecer integro, y me gustaría finalizar con dos frases que me encanta de mi científico favorito PhD Richard Feynman

"La mejor manera de aprender es enseñar."

"Estudia mucho lo que sea de interés para ti y hazlo de la forma más indisciplinada, irreverente y original posible."

RESUMEN

El presente estudio evalúa las propiedades inmunoestimuladoras de nanopartículas de oro (AuNPs) sintetizadas a partir de lisado tumoral y su potencial aplicación terapéutica antitumoral en contra de células 4T1 (cáncer de mama triple negativo murino) y B16F10 (melanoma murino). Se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica de las AuLtNps mediante espectroscopia UV-Vis, análisis de tamaño y potencial Z por dispersión de luz dinámica, identificación de grupos funcionales en la superficie por FT-IR, además del efecto sobre la concentración de proteína presente en la síntesis de Nps, con la finalidad de identificar los efectos de estos tipos de nanopartículas sobre el sistema inmune, se determinó el efecto citotóxico y la inducción en la secreción de citocinas proinflamatorias en macrófagos intraperitoneales murinos, demostrando un bajo efecto citotóxico y una alta secreción de TNF, MCP-1, IL-6 e IL-10, además se demostró que la interacción entre las AuLtNps y los macrófagos intraperitoneales se da por fagocitosis, comprobamos mediante un análisis de resistencia a la degradación enzimática que el uso de las AuLtNps promueve una alta resistencia a la degradación de proteínas como HSP70, HSP90, calreticulina, HMGB1 y presencia de proteínas oxidadas. Los resultados evidenciaron que estas nanopartículas inducen una respuesta inmune proinflamatoria, promoviendo la activación de células presentadoras de antígenos y la liberación de citocinas clave en la respuesta inmunitaria. Por último, se demostró el efecto en la inhibición de la implantación tumoral en el modelo de melanoma y de cáncer de mama, ambos implantados de manera subcutáneo. Estos hallazgos sugieren que las AuNps derivadas de lisado tumoral podrían representar una estrategia innovadora para estimular el sistema inmune en el tratamiento del cáncer, proporcionando una alternativa prometedora a las terapias convencionales.

ABSTRACT

This study evaluates the immunostimulatory properties of gold nanoparticles (AuNPs) synthesized from tumor lysate and their potential antitumor therapeutic application against 4T1 cells (murine triple-negative breast cancer) and B16F10 cells (murine melanoma). The physicochemical characterization of the AuLtNps was performed using UV-Vis spectroscopy, dynamic light scattering (DLS) to analyze size and zeta potential, and Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) to identify functional groups on the surface. Additionally, the effect on protein concentration during nanoparticle synthesis was assessed.

To determine the impact of these nanoparticles on the immune system, their cytotoxic effect and the induction of proinflammatory cytokine secretion were evaluated in murine peritoneal macrophages. The results demonstrated low cytotoxicity and high secretion of TNF, MCP-1, IL-6, and IL-10. Furthermore, it was shown that the interaction between AuLtNps and peritoneal macrophages occurs through phagocytosis. A resistance analysis to enzymatic degradation confirmed that AuLtNps promote high resistance to protein degradation, particularly for HSP70, HSP90, calreticulin, HMGB1, and the presence of oxidized proteins.

The findings revealed that these nanoparticles induce a proinflammatory immune response, promoting the activation of antigen-presenting cells and the release of key cytokines involved in the immune response. Finally, the study demonstrated their effect in inhibiting tumor implantation in both melanoma and breast cancer models, implanted subcutaneously. These results suggest that AuNPs derived from tumor lysate could represent an innovative strategy to stimulate the immune system in cancer treatment, providing a promising alternative to conventional therapies.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1- Introducción	13
2- Antecedentes	14
2.1- Nanotecnología	14
2.2- Elementos nanoestructurados	14
2.3- Nanopartículas	15
2.4- Nanopartículas de oro	15
2.5- Características fisicoquímicas de las nanopartículas de oro	16
2.5.1- Plasmón de resonancia superficial	16
2.5.3- Efecto fototérmico	16
2.5.4- Propiedades químicas	17
2.6- Síntesis biogénica de nanopartículas de oro	17
2.7- Nanopartículas de oro sintetizadas a partir de proteínas	17
2.8- Interacción AuNps-Proteínas.	18
2.9- El efecto corona de proteínas	18
2.9.1- Tamaño de nanopartículas	18
2.9.2- Química de superficie	19
2.10- Interacción células-nanopartículas	19
2.11- Desarrollos terapéuticos nanotecnológicos	19
2.12- Nanomateriales como sistemas de liberación de sustancias bioactivas	20

2.13- Nanomateriales como sistemas de liberación de fármacos	20
2.14- Nanomateriales como sistemas de liberación de péptidos y proteínas	21
2.15- Nanomateriales como sistema de liberación de antígenos	21
2.16- Sistema inmunológico	21
2.17- Células presentadoras de antígeno	22
2.18- Monocitos y macrófagos	22
2.19- Células dendríticas	23
2.20- Linfocitos T	23
2.21- Linfocitos B	24
2.22- Inmunidad adquirida	24
2.23- Sistema linfático	25
2.24- Órganos linfoides	25
2.25- Inmunoterapia potenciador de las defensas naturales.	26
2.26- Inmunoterapia: células y mecanismos involucrados	26
2.27- Inmunoterapia contra el cáncer	26
2.28- Cáncer	27
2.29- Mecanismos celulares y moleculares implicados en el cáncer	27
2.30- Tipos de cáncer de mayor relevancia clínica	27
2.31- Recidiva tumoral como principal causa de muerte por cáncer.	28
2.32- Modelos murinos de cáncer de mama (4T1) y melanoma (B16F10).	28
3- Justificación	29
4- Hipótesis	30
5- Objetivo del trabajo	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31

6- Material y métodos	32
6.1- Mantenimiento de líneas celulares	32
6.2- Síntesis de Nanopartículas de oro (citrato de sodio)	32
6.3- Síntesis de nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral	32
6.4- Caracterización de nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral AuLtNps	32
6.5- Análisis de tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z	33
6.6- Curva de cuantificación de proteína respecto al tiempo (A260/280)	33
6.7- Análisis de interacciones químicas por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)	33
6.8- Determinación de la captación y fagocitosis	33
6.9- Determinación de la resistencia antigénica a la degradación en condiciones de fagocitosis simulada	34
6.10- Inmunodetección por ELISA para determinar la presencia de alarminas y oxidación de proteínas captadas en las AuLtNps	34
6.11- Prevención de la implantación tumoral en un modelo murino	35
7- Resultados	36
7.1- Desarrollo y caracterización de las AuLT4T1Nps y AuLtB16Nps.	36
7.2- Evaluación de la citotoxicidad celular y activación de la secreción de citocinas proinflamatorias en macrófagos murinos expuestos a las AuLtNps.	39
7.3- Evaluación de la captación y determinación de la fagocitosis.	44
7.4- Resistencia antigénica a la degradación en condiciones de fagocitosis simulada.	46
7.5- Determinación de la presencia de alarminas captadas en las AuLtNps	49
7.6- Determinación de la prevención a la implantación y desarrollo tumoral por parte de las AuLtNps en un modelo murino de cáncer de mama y melanoma.	50

7- Determinación de la activación de la inmunidad humoral y celular inducida por las AuLtNps en un modelo murino de cáncer de mama y melanoma. _____	53
8- <i>Discusión</i> _____	56
<i>Conclusiones</i> _____	61
<i>Perspectivas</i> _____	62
<i>Cronograma de actividades</i> _____	63
<i>Referencias bibliográficas</i> _____	64

1- INTRODUCCIÓN

La aplicación de la nanotecnología ha experimentado un notable crecimiento en los últimos años, especialmente en el ámbito de los materiales nanoestructurados. Las nanopartículas, en particular, han logrado permear en la investigación biomédica, donde se utilizan ampliamente como sistemas de liberación controlada y como vehículos para principios activos.

Recientemente, se han empleado nanopartículas de oro como agentes transportadores de proteínas, péptidos y antígenos con el objetivo de activar las células del sistema inmunológico y desencadenar una respuesta contra los antígenos presentes en la superficie de estas partículas. Sin embargo, la relación entre los fenómenos fisicoquímicos característicos de las nanopartículas de oro y su inmunogenicidad intrínseca sigue siendo un área poco estudiada. Esto es especialmente cierto en el caso de las nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral (AuLtNps), donde surgen varias interrogantes: ¿Cuáles son las características inmunogénicas atribuibles a los fenómenos fisicoquímicos que ocurren a escala nanométrica?, ¿Cómo interactúan estas nanopartículas con las células del sistema inmunológico?, ¿Cuál es el efecto generalizado de este tipo de nanopartículas sobre el sistema inmunológico, incluyendo su interacción con células presentadoras de antígeno y linfocitos?.

Con la finalidad de responder estas cuestiones, se desarrollaron dos síntesis de nanopartículas utilizando lisados de células tumorales de las líneas B16F10, conocida como melanoma murino y 4T1 o cáncer de mama triple negativo. El objetivo es establecer las características inmunogénicas de las nanopartículas resultantes y comprender cómo se activa la respuesta inmunológica, tanto humoral como celular, en función de los antígenos e inmunostimuladores presentes en estas nanopartículas, con la finalidad de ser utilizadas como un tratamiento suplementario a la terapia convencional contra el cáncer.

2- ANTECEDENTES

2.1- Nanotecnología

La nanotecnología es una rama de la ingeniería que manipula la materia a escala atómica y molecular para resolver problemas y crear materiales con potencial aplicación en la ingeniería, informática y medicina. Su enfoque se centra en la investigación y en la fabricación de dispositivos y productos con dimensiones que oscilan entre 1 y 100 nanómetros.

El nanómetro, que equivale a la diezmilésima parte del diámetro de un cabello humano, es la unidad de medida fundamental en este campo. Al manipular la materia a esta escala, se presentan fenómenos interesantes que difieren significativamente de los comportamientos observados en átomos individuales o en materiales a gran escala. Entre las propiedades más estudiadas se encuentran las eléctricas, ópticas y fisicoquímicas, además las modificaciones estructurales que sufren los nanomateriales permiten explotarlos en aplicaciones biomédicas, entre las que destacan la creación de nuevos dispositivos de diagnóstico para enfermedades, la mejora de pruebas de resonancia magnética entre otras técnicas médicas, además son ampliamente utilizados como vehículos para la administración de fármacos de manera más efectiva. (Kumar et al., 2023).

2.2- Elementos nanoestructurados

Aunque se habló por primera vez de controlar la materia a escala atómica en 1959 no se conocía de la repercusión que tendría en la generación de materiales avanzados los cual reciben actualmente el nombre de nanoestructuras. En los últimos años han despertado gran interés debido a sus propiedades físicas, eléctricas, químicas, biológicas y optoelectrónicas. Existe una gran variedad de nanoestructuras en las que se incluyen, como nanocables, nanofibras, nanotubos, nanocápsulas, puntos cuánticos y nanopartículas, considerando sus diferentes orientaciones, morfologías y características (Nasrollahzadeh et al., 2019).

2.3- Nanopartículas

La manipulación de la materia a nivel de átomos dio como resultado la generación de una amplia gama de productos nanométricos, entre los más utilizados se encuentran las nanopartículas; las cuales deben de presentar un rango entre 1 a 100 nanómetros (nm) de tamaño las cuales pueden ser clasificadas según sus propiedades, formas o tamaños. Los grupos principales incluyen fullerenos, nanopartículas (Nps) metálicas, Np cerámicas y Nps poliméricas. El uso de estos materiales radica en gran medida en sus propiedades fisicoquímicas únicas debido a su gran superficie y tamaño a nano escala. Entre sus propiedades ópticas características es evidente la presencia de varios colores debido a la absorción en la región visible que dependen del tamaño. Su reactividad, dureza y otras propiedades también dependen de su tamaño, forma, estructura y materiales que se utilizan en la síntesis. Al presentar características únicas y manipulables son candidatas para diversas aplicaciones, que incluyen catálisis, imágenes, aplicaciones médicas, investigación y aplicaciones ambientales (Khan et al., 2019).

2.4- Nanopartículas de oro

Las nanopartículas metálicas se han explotado ampliamente en los últimos años, principalmente en aplicaciones biomédicas, entre las más utilizadas se encuentran las nanopartículas de oro (AuNps), sus características intrínsecas como la resonancia óptica, electrónica, fisicoquímica y de plasmón superficial (SPR) atraen la atención debido a que estas propiedades cambian dependiendo de las alteraciones que sufre el proceso de síntesis, combinadas con la forma, el tamaño, la relación de aspecto o el entorno. el principal atractivo por parte de estos nanomateriales es por su facilidad relativa de síntesis, y, las propiedades de funcionalización han dado lugar a diversas aplicaciones en diferentes campos de la biomedicina, como, la detección, administración dirigida de fármacos, formación de imágenes, terapia fototérmica y fotodinámica, así como la aplicación en diversas áreas relacionadas con terapias anticáncer y autoinmunes (Altammar, 2023).

2.5- Características fisicoquímicas de las nanopartículas de oro

2.5.1- Plasmón de resonancia superficial

Los plasmones se pueden describir como una nube de electrones cargada negativamente la cual es desplazada desde su posición de equilibrio alrededor de una red hecha de carga positiva. En el caso de los plasmones superficiales pueden ser excitados por ondas electromagnéticas, se observan plasmones superficiales localizados en partículas metálicas, que son excitaciones colectivas no propagantes de electrones de conducción, difiriendo de los plasmones de superficie permitidos en la superficie de metales a granel. Un aspecto importante de esta propiedad es que cuando el tamaño de las Nps es pequeño en comparación con la longitud de onda electromagnética resonante, la distribución del campo eléctrico a lo largo de la partícula es debido a la polarización uniforme de la nube de electrones en cada punto del metal. La forma más practica de identificar este fenómeno es haciendo uso de un espectrofotómetro del espectro UV-visible, para el caso específico de las nanopartículas de oro el espectro de absorción óptica característico se da alrededor de los 520 nm. El plasmón de resonancia superficial es afectado por el tamaño de partícula, el recubrimiento y condiciones fisicoquímicas del medio de difusión (Huo et al., 2023).

2.5.3- Efecto fototérmico

Una de las características peculiares del oro en estado nanométrico, más específicamente las AuNps absorben una gran cantidad de fotones convierten la energía luminosa de los electrones en energía cinética. Después del disparo de alta energía (láser) parte de la energía cinética del movimiento electrónico se transforma en energía de vibración, obtenida por la celosía finalmente se expresa en forma de calor. Este fenómeno es el denominada efecto fototérmico. Funciona debido a que los vasos sanguíneos de los tumores tienen muchos orificios en las paredes de los capilares, lo cual provoca que el tejido tumoral dentro del suministro de sangre se obstruye; por lo tanto, la capacidad de enfriamiento del tejido tumoral es peor que la del tejido normal, de esta manera el calor producido por el proceso de energía térmica se acumule dentro del tumor y su temperatura puede alcanzar fácilmente los 46° C, sumado este fenómeno a la termo sensibilidad de las células de cáncer esta característica física de las AuNps las convierten en excelentes candidatas para terapia o imagenología (Yang et al., 2021).

2.5.4- Propiedades químicas

Entre las propiedades químicas más contrastantes de las AuNPs se encuentra el fácil acoplamiento, presentando una ventaja sobre otras Nps. Pueden formar enlaces químicos estables con grupos que contienen S y N. permitiendo que se unan a una gran variedad de ligandos, polímeros orgánicos o elementos proteicos con función específica. Al pasar por esta modificación de superficie las AuNps se dotan de una excelente biocompatibilidad, focalización y son excelentes acarreadores de fármacos. La biocompatibilidad es otro de los factores que están íntimamente relacionados con la superficie de las Nps, aunque no está claro el mecanismo de eliminación de Nps se ha demostrado que las AuNps pequeñas pueden eliminarse del cuerpo a través de la bilis (Bai et al., 2020).

2.6- Síntesis biogénica de nanopartículas de oro

Denominada también como síntesis verde, este método de síntesis permite obtener Nps con una mayor biocompatibilidad y menor citotoxicidad. Para la formación de AuNps se parte de la reducción del ion Au (III) comúnmente presente en sales de oro como HAuCl_4 , después de la reducción del ion Au implica la unión del agente reductor a la superficie del átomo de oro, acompañado de más átomos oro que se van agregando hasta formar la nanopartícula. Se han generado una gran variedad de síntesis haciendo uso de diferentes microorganismos como, bacterias, hongos, algas y levaduras, todos estos usados como agente reductor que permite la obtención de nanopartículas estables con una característica común, baja toxicidad celular (Menon et al., 2017).

2.7- Nanopartículas de oro sintetizadas a partir de proteínas

En 2008 Basu y colaboradores describieron por primera vez como las varias proteínas podrían funcionar como agentes reductores para producir nanopartículas de oro a partir de sales de oro. Demostraron que tres proteínas diferentes, entre ellas albúmina de suero bovino (BSA), Rituximab y Cntuximab reducen las sales de oro a nanopartículas de oro, además observaron que solo se forman a pH 3, debido a que pH más altos entre 7 y 10 no producen la síntesis de Nps, lo cual sugiere la participación de la conformación de proteínas específicas en la formación de las Nps (Basu et al., 2008).

2.8- Interacción AuNps-Proteínas.

Aunque las Nps no integren estructuras proteicas en su síntesis, si estas están destinadas a interactuar con sistemas biológicos es muy probable que entren en contacto con múltiples de estas proteínas, a este proceso se le conoce como recubrimiento, distinto a funcionalización, esto depende de la vía de administración de las Nps, las principales son la inhalación, administración oral, la inyección intravenosa y la exposición dérmica. Una vez que las AuNps ingresan al cuerpo entran en contacto directo con varias moléculas del cuerpo incluyendo proteínas, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos. Este fenómeno es conocido como formación de corona de proteínas, la cual influye con la distribución de las AuNps a diferentes órganos y tejidos (Wang et al., 2015).

2.9- El efecto corona de proteínas

En un inicio este fenómeno fue identificado al probar que pasaba cuando las AuNps entran en contacto con el suero sanguíneo, al contener más de diez mil tipos de proteínas lo convierte en un medio hiper reactivo. Debido a que las Nps contienen alta energía superficial libre, pueden absorber muchos tipos de proteínas en la superficie de las AuNps con distintas afinidades de unión. Cuando se exponen a fluidos biológicos las AuNps pueden entrar en contacto con proteínas como la ubiquitina, albumina sérica, factor de necrosis tumoral, citocromo C, fibrinógeno o polipéptidos. La primera interacción entre las AuNps se da con las proteínas de alta abundancia las cuales se absorben en la superficie de la Np, pero posteriormente serán remplazadas por proteínas de alta afinidad para formar complejos AuNps-proteína. La corona de proteína está dividida en dos tipos; la primera es la corona dura en la cual las proteínas se unen a la superficie de forma duradera y firme. Por el contrario, la corona suave indica que las proteínas están menos unidas a la superficie, que su unión es dinámica y se intercambia con proteínas en el medio con el tiempo (Wang et al., 2015).

2.9.1- Tamaño de nanopartículas

El tamaño de las Nps es crucial en las cantidades de proteína que se pueden contener en su superficie la razón es que el tamaño de las Nps determina la curvatura las cuales tiene diferente constante de unión a proteínas, se ha demostrado que proteínas inferiores a 20 nm

presentan menor afinidad por proteínas y que mientras más grande sea la partícula mayor cantidad de proteínas puede contener en la superficie (Wang et al., 2015)

2.9.2- Química de superficie

La versatilidad de materiales con los cuales se puede recubrir la superficie de una Np permite modificar la interacción intrínseca entre la Np y las proteínas, es decir, en algunas aplicaciones como entrega de fármacos es indispensable que la proteína no sea reconocida por el sistema inmune para llegar al área de destino, el recubrimiento juega un papel crítico en este aspecto ya que se ha reportado que, Nps recubiertas con citrato de sodio pueden generar una corona de proteínas que alcanza hasta los 8 nm, a diferencia de lo ocurrido con Nps recubiertas con polietilenglicol donde existe una absorción insignificante de proteínas (Wang et al., 2015).

2.10- Interacción células-nanopartículas

La interacción está modulada por varios factores, como las propiedades físicas y químicas de los nanomateriales, en particular las propiedades de superficie, la formación de la interfaz sólido-líquido, refiriéndose a la interacción entre el nanomaterial y los fluidos biológicos. Por otro lado, tenemos la interacción entre esta interfaz y el sustrato biológico. La cadena de interacciones comienza con la membrana celular, en este punto las características fisicoquímicas de las AuNps influyen en su capacidad de interactuar con la membrana celular, si cuentan con algún recubrimiento superficial y la carga neta de la partícula también es un factor que delimita el paso a la célula. Por lo general las AuNps que entran en sistemas biológicos forman complejos AuNps-Proteína que pueden ser reconocidos por los receptores de la membrana celular y luego captados por las células. Las AuNps pueden ser internalizadas por las células de diferentes formas, entre las más comunes se encuentra la endocitosis por receptores y vías de fagocitosis. Los efectos celulares de las AuNps son las interacciones sinérgicas de varios factores, incluida la dosis, el tiempo de exposición, las propiedades de las AuNps como la química de superficie, carga neta, el tamaño, la modificación, la forma o incluso la corona de proteínas (Siddique & Chow, 2020).

2.11- Desarrollos terapéuticos nanotecnológicos

Las herramientas basadas en nanotecnología comenzaron a llamar la atención de la investigación a nivel mundial, debido a que ofrecen soluciones económicas, rápidas,

efectivas y específicas para la mayoría de los problemas médicos actuales. El área dedicada a la medicina es donde más se ha demostrado el potencial de la nanotecnología, revolucionando el diagnóstico médico, la inmunización, tratamientos e incluso productos para el cuidado de la salud. Entre las aplicaciones terapéuticas destacan, sus usos para el tratamiento de enfermedades infecciosas y no infecciosas, contra cáncer, terapia génica y con células madre en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos e implantes ortopédicos prostéticos (El-sayed & Kamel, 2020).

2.12- Nanomateriales como sistemas de liberación de sustancias bioactivas

La nanotecnología abrió la puerta para la solución de varios problemas relacionados con la salud, para el tratamiento de enfermedades crónicas utilizando de manera sitio específica medicamentos dirigidos a un blanco. Existen dos tipos principales de sistemas de nanoliberación, el sistema líquido incluye nanoemulsiones, nanopliliposomas y nanoliposomas. Mientras que los sistemas solidos incluyen a las nanopartículas poliméricas, nanocristales y nanopartículas lipídicas (Haleem et al., 2023).

2.13- Nanomateriales como sistemas de liberación de fármacos

En los últimos años se han utilizado los sistemas de liberación a base de nanomateriales como alternativa para la administración de fármacos que facilitan el proceso involucrado. Hay dos formas a través de las cuales las nanoestructuras administran los medicamentos, la pasiva y autoadministrada. En la pasiva, los fármacos se incorporan en la cavidad interna del material nano estructurado principalmente a través del efecto hidrofóbico. Cuando los materiales de la nanoestructura se dirigen a sitios particulares, la cantidad deseada de fármaco se libera debido al bajo contenido de fármacos que están encapsulado en un entorno hidrófobo. Por el contrario, en la forma autoadministrada, los fármacos destinados a la liberación se conjugan directamente con el material de la nanoestructura del portador para facilitar la administración, en este enfoque el momento de la liberación es crucial, ya que el fármaco no llegará al sitio objetivo y se disociará del portador muy rápidamente y, a la inversa, su bioactividad y eficiencia disminuirá si se libera de su sistema nano portador en el momento inadecuado (Patra et al., 2018).

2.14- Nanomateriales como sistemas de liberación de péptidos y proteínas

En los últimos años se han comenzado a utilizar proteínas y péptidos como moléculas terapéuticas, desafortunadamente las proteínas son degradadas fácilmente por diferentes tipos de enzimas, causando una respuesta atenuada del sistema inmune disminuyendo su acción terapéutica. El uso de acarreadores puede disminuir los efectos adversos indeseables y reducir la dosis necesaria para observar un efecto terapéutico. Entre los nanomateriales más utilizados se encuentran los liposomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de carbono, nanopartículas de oro y nanopartículas de plata (Pudlarz & Szemraj, 2018)

2.15- Nanomateriales como sistema de liberación de antígenos

Aunque las vacunas convencionales han progresado en gran medida claramente requieren mejoras, debido a su débil inmunogenicidad, su inestabilidad intrínseca in vivo, toxicidad y la necesidad de múltiples administraciones para su funcionamiento. Para superar estos problemas se ha incorporado el uso de nanomateriales en el desarrollo de vacunas, los sistemas de administración basados en nano-portadores ofrecen la oportunidad de mejorar las respuestas inmunitarias humorales y celulares. Estos fenómenos se atribuyen al tamaño de partícula a nano escala, que facilita la captación por las células fagocíticas, el tejido linfático asociado a mucosas, lo que conduce a una presentación y reconocimiento de antígenos eficientes. Entre los sistemas de entrega más utilizados para la administración de vacunas se encuentran los liposomas, emulsiones, sistemas a base de polímeros sintéticos, polímeros naturales y sistema a base de nanopartículas de carbono (Yau et al., 2021).

2.16- Sistema inmunológico

La defensa de un sistema biológico es uno de los mecanismos más complejos que existen en los organismos superiores, una de las funciones fundamentales para sobrevivir. La inmunidad se divide en innata y adaptativa (adquirida). La inmunidad innata es la primera barrera de defensa que existe entre el huésped y el hospedero, esta inmunidad no tiene un sistema de reconocimiento antigénico específico, otra importante diferencia entre la inmunidad innata y adaptativa es la rapidez en la reacción ante lo extraño, el sistema de defensa innato está constituido por células como, fagocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos), células Natural killer (NK) y la cascada del complemento, entre sus funciones principales se

encuentra, muerte directa a microorganismos o tumores por lisis, opsonización de microorganismos por fagocitosis, quimiotaxis y activación de leucocitos y regulación de producción de anticuerpos. por otro lado, el sistema inmune adaptativo posee un sistema de reconocimiento antígeno específico y memoria inmunológica, un ejemplo de este reconocimiento esta dado por las células B y células T, la diferencia entre estos receptores radica en que las células B reconocen antígenos no procesados, en contraste con las células T que reconocen péptidos lineales pequeños y requieren un procesamiento de antígenos por las células presentadoras de antígeno (APC) (David D. Chaplin, M.D., 2010)

2.17- Células presentadoras de antígeno

Para la generación de los péptidos pequeños a partir de los antígenos estos deben de ser inalados, comidos o inyectados, ser internalizados por una célula presentadora de antígeno especializada (APCs) y procesada por la vía de endocitosis. Las APCs pueden ser divididas en presentadoras profesionales o amateur. Las presentadoras profesionales son monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC) y células B, realizando una presentación de antígeno como parte integral de la función de generación de una respuesta inmune, otras células como endoteliales, fibroblastos, células gliales y células de la tiroides presentan antígenos solo en condiciones específicas, estas son consideradas APCs amateur (Eiz-Vesper & Schmetzer, 2020).

2.18- Monocitos y macrófagos

Los monocitos y macrófagos son responsables de la digestión del material exógeno para la presentación de epítopos antigénicos para las células inmunocompetentes. Los monocitos se encuentran en circulación sanguínea, mientras los macrófagos pueden ser encontrados en tejidos, por ejemplo, en cerebro como microglía, células de Kupffer en hígado existe una gran concentración de macrófagos en el cuerpo, estos participan en la inmunidad innata y la respuesta inmune adaptativa. Como parte de la inmunidad innata pueden ser activados por antígenos como los PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos), receptores Toll-like y receptores de manosa. En la inmunidad adaptativa los antígenos son reconocidos usando receptores o moléculas intermediarias como los anticuerpos y fragmentos del complemento (Ginhoux & Jung, 2014). Como parte de la identificación de estos tipos celulares se utilizan marcadores de membrana o CD, los monocitos a menudo carecen de

marcadores para linaje de células T, B, NK y células dendríticas como NK1.1, CD90, CD45R, y CD11c. para monocitos se pueden utilizar marcadores como CD2, CD11b, CD14, CD16, CD14 entre otros (Auffray et al., 2009).

2.19- Células dendríticas

Las DC fueron descritas por Steinman en 1973 describiéndolas como células raras de sangre periférica con dendritas similar a una neurona, estudios posteriores demostraron que las DC son células presentadoras de antígeno profesionales que se encuentran en tejidos linfoides y no linfoides, estas células tienen sus precursores en médula ósea CD35+, las cuales pueden ser diferenciadas en precursores linfoides y precursores de sangre, aunado a esto pueden diferenciarse a partir de monocitos mediante estímulos concretos. Para su identificación molecular se utilizan marcadores como CD14, CD83, CMRF44, CD11b, CD103, CD80, CD86 entre otros (Cabeza-Cabrerizo et al., 2021).

2.20- Linfocitos T

Los linfocitos T juegan un rol central en la respuesta inmune, células pluripotentes migran hasta el timo en donde ocurre la maduración de las células T, debido a condiciones intrínsecas del timo como el epitelio tímico y algunas citocinas como la interleucina 7 que presenta un papel crítico en el desarrollo de las células T. Los linfocitos T maduros presentan responsabilidades concretas como: reconocimiento antígeno específico, ayudar a las células B en el montaje de la respuesta de anticuerpos antígeno-específico, montaje de una respuesta citotóxica sobre células infectadas, estimulan una respuesta inflamatoria activada por granulocitos y macrófagos, regulan la respuesta inmune, mantienen una memoria inmunológica antígeno-específica y producen citocinas, incluyendo interleucinas y quimiocinas. Todas las células T presentan un receptor específico denominado TCR, este receptor en su forma activa o madura se encuentra en asociación con CD3 un receptor de membrana, esta combinación es esencial para la transducción de señales, este receptor solo reconoce señales antigénicas específicas, este receptor es generado por recombinación y se pueden llegar a generar hasta 2.9×10^{20} diferentes receptores celulares tipo TCR. Existen diferentes subtipos de células T, para diferenciar entre los tipos se les ha denominado como citotóxicas y cooperadoras (TH), por un lado, las citotóxicas o CD8+ requieren unirse a las células mediante MHC I, mientras que las TH expresan CD4+ y se asocian con moléculas

MHCII, otro de los subtipos más estudiados son los linfocitos T de memoria los cuales al ser CD4⁺ expresan CD45RO incluyendo la expresión de CD3⁺ para todas las células T maduras (Orakpoghenor et al., 2019)

2.21- Linfocitos B

Las células B se presentan en un 15% de las células mononucleares de sangre periférica son desarrolladas y diferenciadas en médula ósea por parte de células madre pluripotentes la función más importante de las células B es sin duda la producción de anticuerpos, reconociendo antígenos mediante su forma nativa mediante el complejo de receptor de células B (BCR), al reconocer un antígeno y generar especificidad la señal del receptor es activada generando una proliferación clonal. Las células B generan cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD, en el caso de la IgG se presentan diferentes subclases: IgG1, iGg2, IgG3 e IgG4. Por otro lado, las IgA presenta dos subtipos A1 y A2 (Ilustración 3). Las funciones más importantes de las inmunoglobulinas abarcan la neutralización de patógenos, incluyendo bacterias, hongos, virus, paracitos y toxinas, activan complemento, activan fagocitosis, activan muerte celular por medio de citotoxicidad mediada por dependencia de anticuerpos (ADCC) entre otras funciones (Alam, 1998). Para la identificación de las células B se utilizan diferentes marcadores moleculares de superficie como: CD19 para identificar el linaje de célula B, CD20, CD21, CD22, CD23 para células B maduras, mientras que CD23 se utiliza para identificar células B activadas, por otro lado, marcadores como CD34 en sangre periférica permiten identificar si se despertó una activación de las células pluripotentes para la producción de células B (Orakpoghenor et al., 2019).

2.22- Inmunidad adquirida

Cuando hablamos de inmunidad adquirida hacemos referencia a la inmunidad que permite responder a cada nuevo evento con cualquier agente externo, teniendo como base interacciones pasadas. Estos términos se conocen desde el año 431 a. C. según describe Tucídides en las guerras del Peloponeso, al describir una gran epidemia que azotaba Atenas remarco que los únicos que no contraían la enfermedad y podían atender a los afectados eran aquellos que ya habían padecido el cuadro clínico. Mientras que en el siglo XVI los turcos y chinos evitaban la aparición de la viruela al realizar pequeños injertos de costras pulverizadas

en la piel de los pobladores, de esta manera evitaban el contagio de la viruela, esto fue tomado por el reino unido. Fue hasta el siglo XVIII cuando el doctor Edward Jenner inoculó material de lesiones virales proveniente de vacas, en los brazos de un niño, semanas después, luego de que sufriera un cuadro clínico diarreico, le inoculó el virus vivo y observo que el paciente no había contraído la enfermedad. Para el siglo siguiente XIX, Luis Pasteur llevo a la práctica los trabaos de Jenner y observo que al aplicar cultivos viejos a conejos estos no enfermaban cuando eran inoculados con cultivos nuevos muy virulentos, en honor a Jenner, Pasteur denomino esta técnica Vacuna derivado de la palabra en latín vaca (Kennedy, 2010)

2.23- Sistema linfático

Es el subsistema del sistema circulatorio en el cuerpo de los vertebrados que consiste en una red compleja de vasos, tejidos y órganos. Ayuda a mantener el equilibrio de líquidos en el cuerpo al recolectar el exceso de líquido y partículas de los tejidos y depositarlos en el torrente sanguíneo. También ayuda a defender al cuerpo contra las infecciones al suministrar células que combaten enfermedades. Además de servir como una red de drenaje, el sistema linfático ayuda a proteger al cuerpo contra las infecciones al producir linfocitos, que ayudan al organismo a eliminar los microorganismos que causan enfermedades. Los órganos y tejidos del sistema linfático son los sitios principales de producción, diferenciación y proliferación de linfocitos T y B (Cueni & Detmar, 2008)

2.24- Órganos linfoides

El sistema linfático está dividido en órganos linfoides primarios los cuales son los sitios de maduración de las células B y T, y los órganos linfoides secundarios, en los que se produce la mayor diferenciación de linfocitos. En los humanos el timo y la médula ósea son los actores claves de la función inmunológica. Todos los linfocitos se derivan de células madre de la médula ósea. Las células madre destinadas a convertirse en linfocitos B permanecen en la médula ósea a medida que maduran, mientras que las posibles células T migran al timo para experimentar un mayor crecimiento. Los linfocitos B y T salen de los órganos linfoides primarios y son transportados a través del torrente a los órganos linfoides secundarios, donde se activan por contacto con materiales extraños, como partículas y agentes infecciosos, llamados antígenos (Randall, 2010).

2.25- Inmunoterapia potenciador de las defensas naturales.

El aprovechamiento del sistema inmunológico para tratar enfermedades infecciosas crónicas o cáncer es el objetivo principal de la inmunoterapia. Existen algunos impedimentos para lograr este objetivo, los cuales incluyen la incapacidad del huésped para identificar los antígenos tumorales y la tolerancia a los propios mecanismos inmuno -reguladores negativos.

Existen dos tipos de inmunoterapias, la inmunoterapia activa y la pasiva. La primera de estas se basa en la identificación apropiada de antígenos específicos de la enfermedad montando una respuesta inmune basada en la presentación de antígenos y la activación de linfocitos T. Por otro lado, la inmunoterapia pasiva hace uso de anticuerpos monoclonales (Waldmann, 2003).

2.26- Inmunoterapia: células y mecanismos involucrados

Este tipo de terapias depende totalmente de la calidad de las moléculas antigénicas que sean utilizadas para montar una respuesta inmune, el punto crítico de esta terapia radica en la primera interacción con los antígenos y células presentadoras de antígenos, esta interacción y procesamiento antigénico delimitan la activación del sistema inmune en contra del antígeno procesado. En segunda instancia es necesaria una activación de linfocitos T que entren en contacto con las APCs para la presentación del antígeno procesado, esto respuesta una activación mediada por receptores, al encontrarse un linfocito T que reconozca al antígeno presentado por moléculas MHC I, se activa una proliferación clonal por parte del linfocito T madurándolo a un linfocito T CD8⁺ o conocidos como linfocito T citotóxico, los cuales son los encargados de identificar las células que presenten el antígeno que se reconoció y lleva a la destrucción de las células con el antígeno presente (Suzuki et al., 2016).

2.27- Inmunoterapia contra el cáncer

En las últimas décadas, la inmunoterapia se ha convertido en una parte importante del tratamiento de algunos tipos de cáncer. Se basa en el reconocimiento de antígenos asociados a tumores o antígenos exclusivos de tumor por parte del sistema inmune adaptativo, el cual incluye a los linfocitos T. Actualmente existen varios tipos de inmunoterapias para tratar el cáncer, entre los que se encuentran las terapias basadas en: inhibidores de puntos de control, células T con receptor de antígeno quimérico, basado en citocinas, inmunomoduladores, vacunas contra el cáncer y anticuerpos monoclonales (Ventola, 2017).

2.28- Cáncer

Según la OMS es un término genérico que se designa un amplio grupo de enfermedades que puedan afectar a cualquier parte del organismo, una característica definitoria del cáncer es la división celular acelerada de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos. Este fenómeno se produce por la transformación de células normales en células tumorales en un proceso de varias etapas que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno.

2.29- Mecanismos celulares y moleculares implicados en el cáncer

La malignidad del cáncer se caracteriza por una invasión de células cancerosas dentro de ecosistemas locales y distales. Las siguientes son algunas de las actividades celulares asociadas a la invasión celular, en las que destacan la transición epitelial a mesenquimatosa, adhesión célula a célula homotípica y heterotípica, migración, proteólisis y exocitosis vesicular. La característica más destacada del cáncer es la división celular descontrolada, causada por la desregulación del reloj del ciclo celular. La progresión del ciclo celular es promovida externamente por factores de crecimiento e internamente por una serie de proteína quinasas que inducen la división celular de acuerdo con las necesidades de todo el organismo (Mareel & Leroy, 2003).

2.30- Tipos de cáncer de mayor relevancia clínica

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, y representó aproximadamente 10 millones de defunciones, los tipos de cáncer con mayor incidencia en el 2020 fueron: cáncer de mama con 2.26 millones, pulmón con 2.21 millones, colorrectal con 1.93 millones y de próstata con 1.41 millones, mientras que los tipos de cáncer que causaron mayor número de defunciones son: pulmón con 18.2% de mortalidad, colorrectal con 9.5%, hepático con 8.4%, estómago con 7.8% y cáncer de mama con un 6.9% (Organización Mundial de la Salud, 2022).

2.31- Recidiva tumoral como principal causa de muerte por cáncer.

Uno de los problemas de las actuales terapias contra el cáncer son los grandes porcentajes de recidiva en distintos tumores. Cuando el cáncer regresa después de los tratamientos, se denomina recidiva o cáncer recurrente. Este fenómeno de recurrencia comienza con células cancerosas que los primeros tratamientos no eliminaron ni destruyeron por completo. Por consiguiente, estas células con el tiempo se convierten en tumores. Existen varios tipos de recurrencia que dependen de donde se desarrolla. Recidiva local, significa que el cáncer está en el mismo lugar que el cáncer original, la recidiva regional significa que el tumor ha crecido hacia los ganglios linfáticos o tejidos cercanos al cáncer original, mientras que la recidiva a distancia significa que el cáncer se ha diseminado a órganos o tejidos alejados del cáncer origina (Sopik et al., 2016).

2.32- Modelos murinos de cáncer de mama (4T1) y melanoma (B16F10).

En la actualidad del cáncer de mama continúa siendo la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres de todo el mundo, a pesar de los avances en la identificación de nuevas terapias dirigidas y el desarrollo de estrategias terapéuticas. Para tratar de comprender el funcionamiento de estas nuevas terapias se hace uso de modelos murinos, estos proporcionan un enfoque esencial para examinar los mecanismos y la vía genética en la progresión del cáncer y metástasis, para desarrollar y evaluar terapias clínicas. Los modelos de ratón singénicos en los que se inyectan células cancerosas murinas, como la 4T1 en ratones inmunocompetente permiten el uso de ratones con células inmunes y sistema inmunológico normal, lo que promueve la investigación y el desarrollo de diversas terapias inmunes (Pulaski & Ostrand-Rosenberg, 2000).

El melanoma es considerado un cáncer de piel agresivo y muy metastásico, con un pronóstico precario con una mediana de supervivencia de 5,3 a 10 meses, según el estadio de la enfermedad. Se han desarrollado modelos de ratón para dilucidar los mecanismos moleculares, inmunogénicos y celulares que contribuyen a la proliferación y metástasis del melanoma. La línea celular B16F10 es un modelo de uso frecuente para estudiar la eficacia de varios tratamientos, especialmente terapias inmunes que aprovechan las células T disponibles para atacar antígenos específicos de melanoma en ratones hospederos generalmente de la cepa C57BL (Nakamura et al., 2002).

3- JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama y el melanoma son dos de los tipos de cáncer más comunes y agresivos, y la recurrencia tumoral sigue siendo un desafío clínico importante para estos tipos de neoplasias malignas. A pesar de los avances en las terapias convencionales, un gran porcentaje de pacientes experimentan una reaparición del cáncer, lo que a menudo se asocia con un peor pronóstico y una menor calidad de vida. La recurrencia tumoral se debe a mecanismos complejos como la resistencia a los fármacos, la presencia de células madre cancerosas y la metástasis. Estas limitaciones proponen la necesidad urgente de explorar nuevas alternativas terapéuticas que sean más efectivas y duraderas. En este contexto, la inmunoterapia se ha convertido en un campo prometedor para combatir el cáncer. La inmunoterapia busca activar el sistema inmune del paciente para que reconozca y destruya las células tumorales de manera más eficiente. Sin embargo, la inmunoterapia aún enfrenta desafíos, como la supresión del sistema inmune por parte del tumor y la falta de especificidad de algunas terapias. Para abordar estos desafíos, proponemos el uso de nanopartículas de oro sintetizadas a partir de lisados tumorales como una nueva estrategia de inmunoterapia. Las nanopartículas de oro tienen la capacidad de interactuar con el sistema inmune y potenciar su respuesta antitumoral. Al utilizar lisados tumorales, podemos cargar las nanopartículas con antígenos tumorales, lo que podría aumentar la especificidad de la respuesta inmune y reducir los efectos secundarios. Además, este enfoque podría ser más efectivo para combatir la recurrencia tumoral, ya que las nanopartículas podrían estimular una respuesta inmune de memoria a largo plazo.

4- HIPÓTESIS

Las nanopartículas de oro sintetizadas por lisado tumoral presentan propiedades inmunogénicas intrínsecas que activan células presentadoras de antígeno y propician la activación del sistema inmune antitumorales específico de antígenos.

5- OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo general

Evaluar el efecto inmunogénico intrínseco de las nanopartículas de oro sintetizadas a partir de lisados tumorales (AuLtNps) y su interacción con células del sistema inmune.

Objetivos específicos

- I. Desarrollar y caracterizar AuLtNps a partir de lisados tumorales de las líneas celulares 4T1 y B16F10.
- II. Determinar la fagocitosis de las AuLtNps por macrófagos intraperitoneales murinos.
- III. Evaluación de la resistencia antigénica a la degradación enzimática en condiciones de fagocitosis simulada.
- IV. Determinación de la presencia de alarminas captadas en las AuLtNps además de determinar la capacidad de activación de la inmunidad humoral y celular *in vitro*.
- V. Determinar si las AuLtNps previenen la implantación y desarrollo tumoral inducido por las líneas celulares 4T1 y B16F10 en ratones BALB/c y C57BL/6.

6- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1- Mantenimiento de líneas celulares

En condiciones de incubación de 37°C, con un 85% de humedad relativa y un 5% de CO₂, se cultivaron las células 4T1 y B16F10 en frascos de 25 cm³ con forma inclinada. Para su crecimiento, se utilizó medio DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino y un 1% de antibiótico antimicótico.

6.2- Síntesis de Nanopartículas de oro (citrato de sodio)

Para este trabajo se sintetizaron dos tipos de partículas de oro. El primer tipo fue reducido a partir de citrato de sodio. Se preparó una solución de HAuCl₄ al 2 mM y una solución de citrato de sodio al 1%. Se colocó en un vaso de precipitado un volumen de 9 mL de HAuCl₄ al 2 mM y 1 mL de citrato de sodio al 1%, se mezcló vigorosamente y se expuso a baño maría durante 15 minutos a 100°C. Al observar un cambio de color en la solución, se refrigeró para su posterior uso. Estas partículas fueron utilizadas como un control experimental.

6.3- Síntesis de nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral

Las nanopartículas de oro reducidas a partir de un lisado de células tumorales fueron obtenidas a partir de células viables. Estas células fueron lisadas por sonicación, exponiéndolas a 3 rondas de 10 minutos. La solución resultante se mezcló con una solución de HAuCl₄ a una concentración de 2 mM, la cual se agitó vigorosamente durante 2 minutos y se expuso a luz UV utilizando un Crosslinker Ultravioleta a una intensidad de 6000 µJ/cm² durante 30 minutos. Posteriormente, se dejó reposar en refrigeración y se almacenó durante al menos una semana antes de ser utilizada.

6.4- Caracterización de nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral AuLtNps

El plasmón de resonancia superficial (PRS) fue detectado mediante espectroscopia UV-Vis. Para detectar el PRS, se utilizó un Nanodrop 2000c. Se tomó una gota de la muestra y se depositó en el pedestal del equipo. Inicialmente, el equipo realizó un barrido del espectro visible (300-750 nm). Debido a que las partículas metálicas presentaban tamaños nanométricos, se observó un plasmón característico entre 510 y 550 nm.

6.5- Análisis de tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z

Para este ensayo, se realizaron tres diluciones seriadas de una muestra concentrada de AuLtNps. Estas se colocaron en celdas para espectroscopia y se introdujeron en el equipo Z sizer (Zetasizer Nano). Se llevaron a cabo tres corridas de cada muestra y se obtuvo la medición promedio. Utilizando la dispersión del haz de luz provocada por un láser en el equipo, fue posible calcular el tamaño de las partículas en solución a partir del movimiento browniano de las mismas.

Además, el mismo equipo se utilizó para medir la carga superficial neta de las partículas utilizando el potencial Z. Esto se logró al utilizar una celda especial por la cual se hizo pasar una ligera corriente eléctrica. De esta manera, el equipo arrojó el valor de la carga superficial con respecto a la solución en mV.

6.6- Curva de cuantificación de proteína respecto al tiempo (A260/280)

Para cuantificar la cantidad de proteína presente en las AuLtNps, se utilizó espectroscopia UV-VIS. Se tomaron 5 μ L de las AuLtNps y se analizó la absorbancia mediante la opción de análisis de proteína a 260/280 nm en el NanoDrop 2000c. Se observó la absorbancia máxima de las muestras y se cuantificó la concentración de proteína a partir de dicha intensidad. Este ensayo se llevó a cabo cada tercer día durante un mes.

6.7- Análisis de interacciones químicas por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Las muestras de nanopartículas se colocaron en el cristal ATR de diamante utilizando una placa superior y un brazo de presión. Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos mediante un accesorio de muestreo ATR Perkin Elmer, realizando 16 barridos a una resolución de 4 cm^{-1} . Los datos obtenidos fueron analizados con el software PERKIN ELMER spectrum 10.

6.8- Determinación de la captación y fagocitosis

Se extrajeron células intraperitoneales de un ratón sano de la cepa B16F10 de entre 8 y 10 semanas de vida, mediante lavados peritoneales con 5 mL de medio RPMI refrigerado por al menos 10 minutos a -20 grados centígrados. El exudado resultante se centrifugó durante 10 minutos a 1400 RPM. Posteriormente, se cultivaron 5×10^5 células por pozo en una placa de 24 pozos durante 3 días. Posteriormente, las células se trataron con conjugados de FITC con

LT y Nps, tanto AuLtNps como AuCsNps, para determinar la fagocitosis y/o captación después de 3 horas de exposición se marcaron las células con DAPI y se fijaron para su posterior visualización por microscopia confocal, realizando cortes en Z para identificar la presencia de los tratamientos sobre o dentro de las células.

6.9- Determinación de la resistencia antigénica a la degradación en condiciones de fagocitosis simulada

En un volumen de 5 mL de AuLtNps se agregó un coctel de enzimas, las cuales fueron: lisozima, pepsina, proteinasa K, proteasa, peptidasa y óxido nítrico, posteriormente a la solución se le fue adicionando cada 5 minutos una solución de HCl al 0.5 normal, esto hasta alcanzar 15 minutos, con la finalidad de pasar de manera progresiva de un pH de 6.8 a 3.7. Al alcanzar este pH se mantuvo la solución a 37°C durante 24 horas, en el transcurso del tiempo se tomaron muestras de la solución a los tiempos 0, 1, 3 y 24 horas, para determinar la concentración de proteína presente en la muestra con respecto al tiempo.

6.10- Inmunodetección por ELISA para determinar la presencia de alarminas y oxidación de proteínas captadas en las AuLtNps

Utilizando ambos tipos de AuLtNps, se generaron 3 reacciones por tipo de nanopartícula con la finalidad de poder realizar una ELISA de las muestras al haber pasado 1 y 30 días posteriores a la síntesis y su almacenaje en refrigeración, las proteínas a detectar fueron: calreticulina, HSP90, HSP70, HMGB1. Además, se cuantificó la y oxidación de proteínas usando el Kit Protein Carbonyl Assay. Para esto lo primero que se realizó fue depositar alrededor de 80 microgramos de proteína de cada síntesis de nanopartículas para el día 1 y día 15 posteriores a la síntesis en una microplaca de 96 pocillos, los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente ser la base de la inmunodetección, para lo cual se utilizaron anticuerpos primarios en contra de las proteínas antes mencionadas, las cuales se incubaron durante toda la noche utilizando una dilución 1:1000. Después del periodo de incubación se lavó cuidadosamente cada pocillo y se colocó una solución de bloqueo por 1 hora, posteriormente se retiró y se lavó de nuevo la placa y se colocó una solución que contenía un anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugada con HRP, la cual se dejó incubar por 3 horas. Por último, se retiró esta solución, se lavó la placa y se adicionaron 50 uL de TMB y se dejó reaccionar por 30 minutos, pasado este tiempo se adicionó una solución

de H₂SO₄ para detener la reacción y se prosiguió a leer la placa con un lector de microplacas a una longitud de onda de 450nm.

6.11- Prevención de la implantación tumoral en un modelo murino

Antes de comenzar con el experimento de la inducción tumoral, se realizó un ensayo de dosificación de las AuLtNps, con la finalidad de identificar la dosis terapéutica que conllevaba a una activación de células presentadoras de antígeno y linfocitos T, estos análisis se realizaron con la sangre completa de cada grupo experimental utilizado.

Con la finalidad de identificar si las AuLtNps pueden activar el sistema inmune antitumoral se realizaron 4 grupos experimentales de ratones BALB/c y ratones C57BL/6 respectivamente, de entre 8 y 12 semanas de edad con 5 réplicas por grupo: ratones control sin tratamiento, ratones tratados con AuCsNps, tratados con LT y tratados con las AuLtNps, el proceso de inmunización fue el mismo para todos los grupos, cada semana se inyectaba 100 uL de las soluciones en la pata izquierda de los ratones, esto por 3 semanas, finalmente se dejó una semana de descanso y se prosiguió a inocular las células viables tanto 4T1 en los ratones BALB/c mientras que en los C57BL/6 se inocularon las células B16F10, inoculando 500,000 células en 50uL de solución inyectable, para posteriormente seguir la evolución del desarrollo tumoral a lo largo de 21 días, concluyendo con la obtención de los tumores para determinar el volumen tumoral final y la presencia de metástasis en ganglios y órganos periféricos, además en el último día de seguimiento de cada grupo experimental se obtuvo la sangre de cada ratón por punción cardíaca terminal con la finalidad de realizar una biometría hemática de cada grupo experimental, este protocolo fue registrado ante comité de ética de investigación y bienestar animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL bajo en número de registro CEIBA-FCB-03/2024.

7- RESULTADOS

7.1- Desarrollo y caracterización de las AuLT4T1Nps y AuLTB16Nps.

Después de realizar la síntesis de las AuLT4T1Nps y AuLTB16Nps se analizó el plasmon de resonancia superficial (PRS) de ambas síntesis, midiendo al día 1, 3, 7 y 15 respectivamente. Para las AuLT4T1Nps se observó una banda máxima de absorción entre los 530 y 540nm, al igual que con las AuLTB16Nps, una característica apreciable en los patrones de bandeo a los diferentes días fue la disminución en la intensidad de la absorbancia con forme pasaban los días, para ambos tipos de síntesis (Figura 1 a y b).

Al analizar el tamaño de partícula de las AuLT4T1Nps se identificó que al día 1 de síntesis presenta un tamaño de 63.13 y al pasar 15 días alcanza su tamaño final de 70.90, adames su carga superficial aumenta de -24 a -28.7 mv. Por otro lado, al analizar la concentración de proteína presente en la solución fue evidente una disminución conforme transcurren los días, comenzando con 1.992 mg/mL y finalizando a los 15 días con 1.638 mg/mL (Figura 1c). En el caso de las AuLTB16Nps se identificó un tamaño inicial de 33.88 y alcanzaron un tamaño final de 96.40 nanómetros al final de 15 días. Mientras que su carga superficial aumento de -25.7 a -29.7, por último, al cuantificar la concentración de proteína en solución se observó una mayor cantidad de proteína al inicio de la reacción siendo de 2.018 y finalizó con 1.86 al termino de 15 días posteriores a la síntesis (Figura 1d).

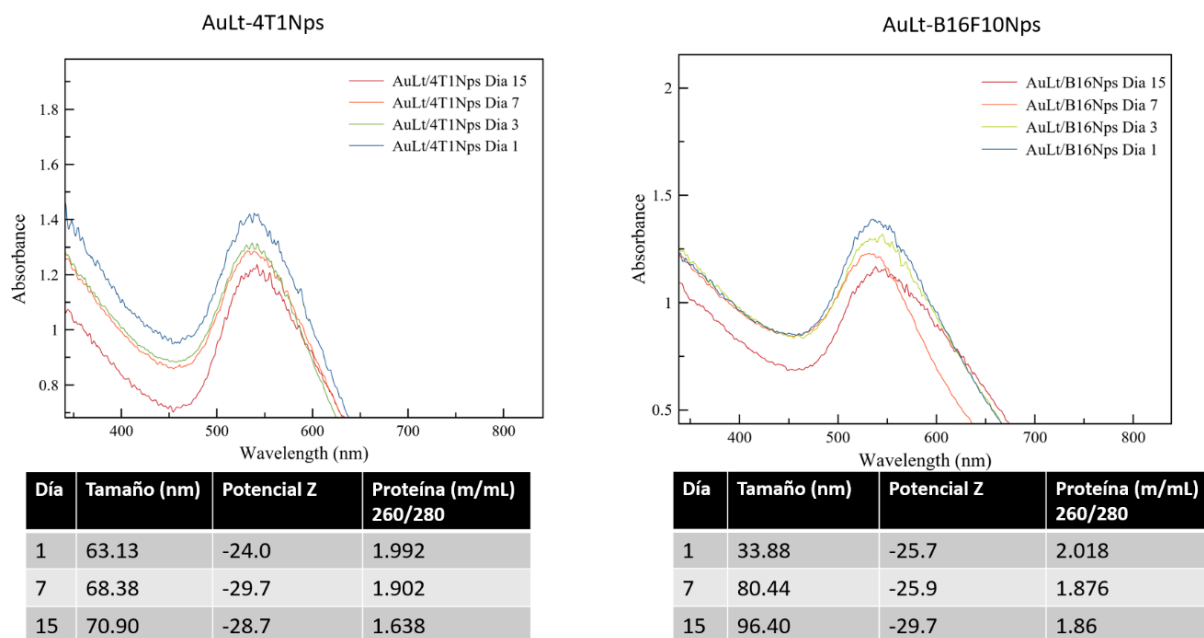
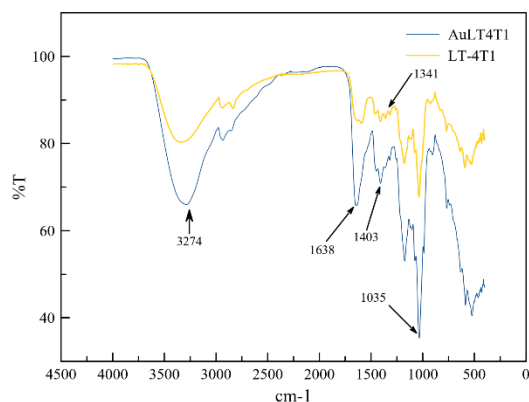
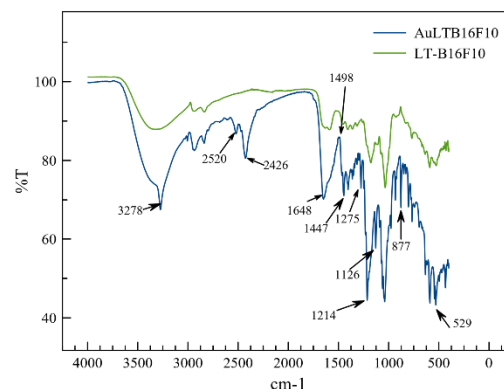


Figura 1. Análisis de diferencias plasmónicas representativas de AuLt-4T1 y AuLt-B16 hasta los 15 días posteriores a la síntesis. En la parte inferior de cada grafica se agrega una tabla representativa con las mediciones de tamaño de partícula, potencial Z y determinación de proteína por 260/280.

Con la finalidad de identificar el tipo de interacción entre los lisados celulares generados y el HAuCl_4 después de hacer la síntesis de nanopartículas, fue evidente como existían más interacciones o modificaciones de grupos funcionales en la síntesis en donde se utiliza el lisado celular de B16F10, identificando modificaciones en los grupos alquinos, alquenos, nitrocompuestos, alcanos, alquil-eter y alcoholes secundarios, mientras que para la síntesis con lisados de células 4T1 se identificaron los grupos correspondientes aminas secundarias, alquenos, aminas aromáticas y sulfoxidos (Figura 2).



cm-1	Grupo funcional
3274	Amina secundaria N-H
1638	Alqueno C=C
1403	Sulfatos S=O
1341	Amina aromática C-N
1035	Sulfóxido S=O



cm-1	Grupo funcional
3278	Alquino C-H
1648	Alqueno C=C
1498	Nitrocompuesto N-O
1447	Alcano C-H
1275	Alquil aril éter C-O
1126	Alcohol secundario C-O

Figura 2. Representación gráfica del análisis por FT-IR a las síntesis de AuLtNps, comparadas de manera directa contra su agente reductor, del lado izquierdo encontramos desplazamientos y aparición de grupos funcionales para las AuLt-4T1 Nps (a) y por el lado derecho encontramos las AuLt-B16 (b), además en la parte inferior de ambos gráficos se agrega una tabla de identificación de grupos funcionales encontrados en el análisis.

Para identificar la forma y comprobar el tamaño de las nanopartículas de oro a partir de lisado tumoral se realizó un análisis por SEM-EDX la cual permite ver cómo es una muestra a nivel microscópico y qué contiene químicamente en zonas específicas. Entre los elementos encontrados para ambos tipos de partículas fueron el oro, oxígeno, carbono, sodio, cloro, potasio, es decir, en su mayoría compuestos orgánicos presentes en los lisados de células tumorales utilizados (Figura 3c). Posteriormente se realizó un SEM para ambos tipos de partículas con la finalidad de identificar el tamaño promedio a los días 1 y 30 posteriores a su síntesis, con el cual se observó que las AuLt4T1Nps presentan un tamaño inicial alrededor de 30 nanómetros y terminan alcanzando al paso de 30 días un tamaño de 60 nanómetros aproximadamente. Por otro lado, las AuLtB16Nps presentaron un tamaño alrededor de los 33 nanómetros y pasados 30 días posteriores a su síntesis se observó un tamaño de 96 nanómetros aproximadamente (Figura 3b).

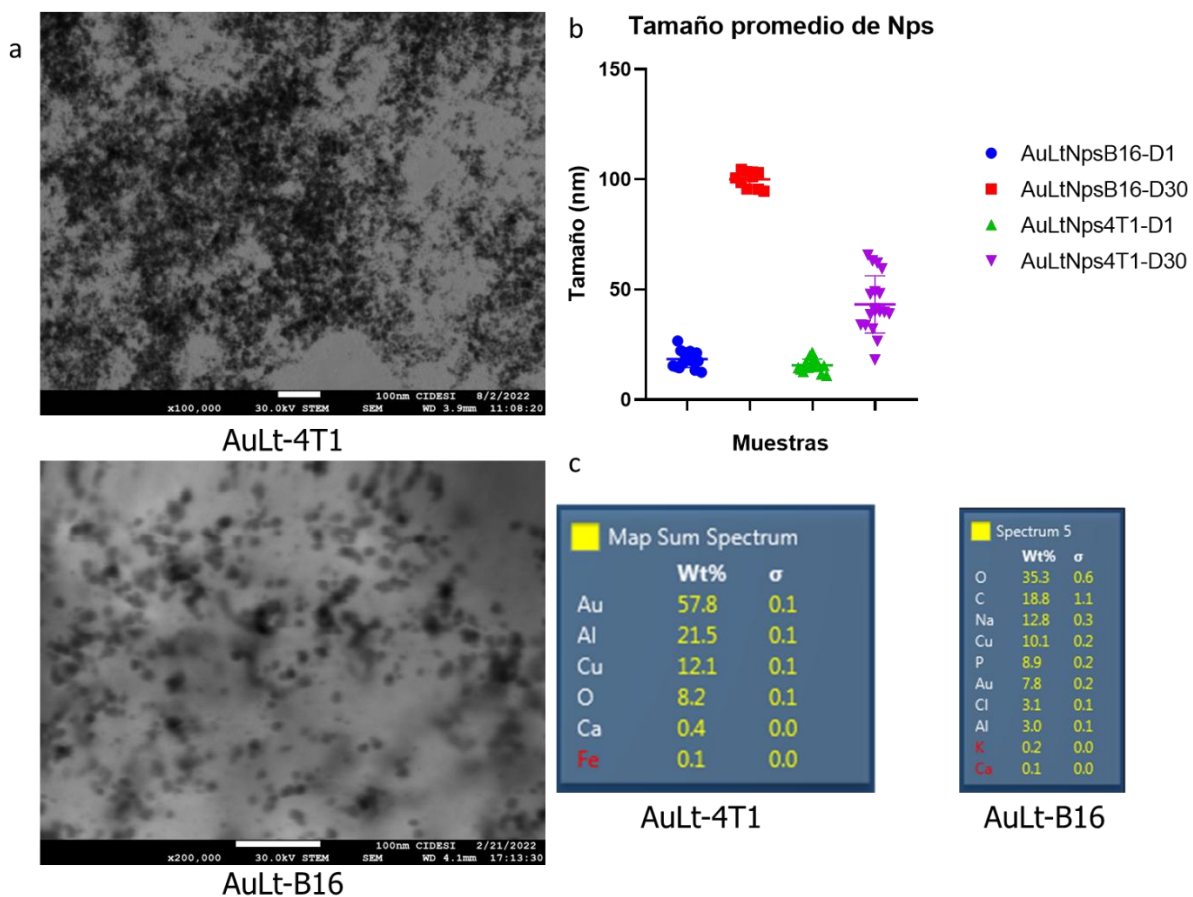


Figura 3. Análisis por SEM-EDX para ambos tipos de nanopartículas, en la cual se muestra una imagen representativa de la dispersión de las AuLt-4T1 (parte superior), AuLt-B16 (parte inferior), las cuales fueron utilizadas para crear una gráfica de tamaño promedio de partículas al analizar muestras al día 1 y 30 posterior a la síntesis (b). Además, se muestran las tablas del análisis espectral de los átomos encontrados para ambas síntesis (c).

7.2- Evaluación de la citotoxicidad celular y activación de la secreción de citocinas proinflamatorias en macrófagos murinos expuestos a las AuLtNps.

Después de exponer las AuLt4T1Nps y AuLtB16Nps por 24 horas a macrófagos intraperitoneales murinos, se observó que incluso dosis de hasta 1 milimolar no producía un efecto citotóxico superior al 50%, sin embargo, la dosis que se seleccionó para los análisis posteriores fue la de 0.250 mM, esto, debido a que, ninguno de los tratamientos presento un decremento en su viabilidad celular a esta concentración, por lo tanto puede ser utilizada

como una dosis segura para trabajar con macrófagos intraperitoneales murinos de ratón (Figura 4)

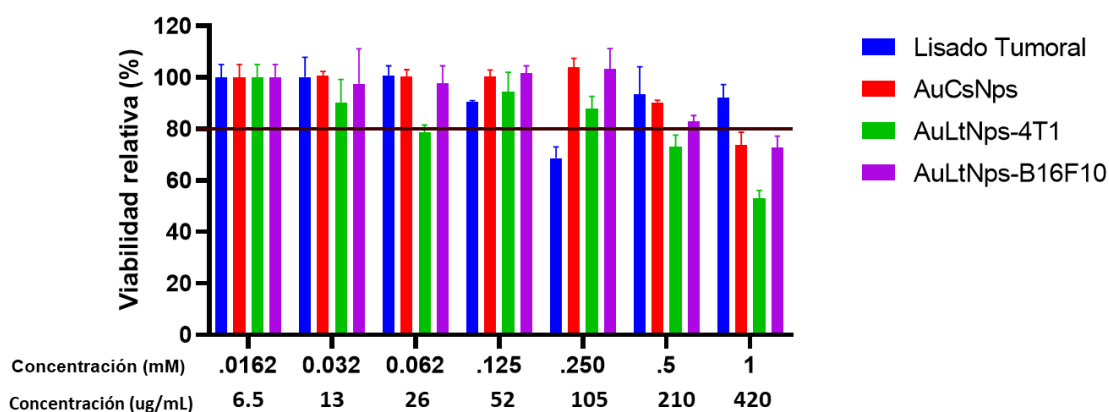


Figura 4. Curva dosis-respuesta de macrófagos intraperitoneales de ratón, expuestos a lisado tumoral, AuCsNps, AuLt-4T1 y AuLt-B16F10. Se observa como al usar las dosis superiores a 0.5 mM en la mayoría de los tratamientos disminuye la viabilidad celular por debajo del 80%, mientras que al utilizar concentraciones de entre 6.5 y 420 $\mu\text{g/mL}$ no se observa citotoxicidad superior al 10%.

Con la finalidad de identificar la mejor concentración de tratamiento que promoviera un incremento en citocinas proinflamatorias se realizó una curva dosis respuesta que incluyera concentraciones de 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.062 mM y 0.016 mM, además se compararon las dosis correspondientes al solo usar lisado tumoral a una concentración de 420 $\mu\text{g/mL}$, 210 $\mu\text{g/mL}$, 105 $\mu\text{g/mL}$, 26 $\mu\text{g/mL}$ y 6.5 $\mu\text{g/mL}$. El análisis de citocinas proinflamatorias demostró que en el caso de las células tratadas con el lisado tumoral de 4T1 de forma soluble a 105 $\mu\text{g/mL}$ solo mostro un incremento en la IL-12p70, TNF e interferón- γ al compararse con un control sin tratar, mientras que, en el caso de las AuLtNps-4T1 a concentraciones de 0.250 mM y 0.062 mostraron un incremento significativo al compararse con todas las dosis utilizadas y el control sin tratamiento, además, se observó que en el caso de TNF se mostró un incremento 10 veces superior al comprar la misma concentración de proteína utilizada en el lisado de forma soluble (105 $\mu\text{g/mL}$) comparada con las AuLtNps-4T1 (Figura 5). Al comparar la secreción diferencial al utilizar el lisado de forma soluble de B16F10 solo se observó diferencia significativa entre el lisado y el control en la secreción de TNF e IL-12p70, mientras que al utilizar las AuLtNps-B16 se observó diferencia significativa al comparar el lisado soluble y el control contra las concentraciones de 0.25 mM y 0.062 mM (Figura 6).

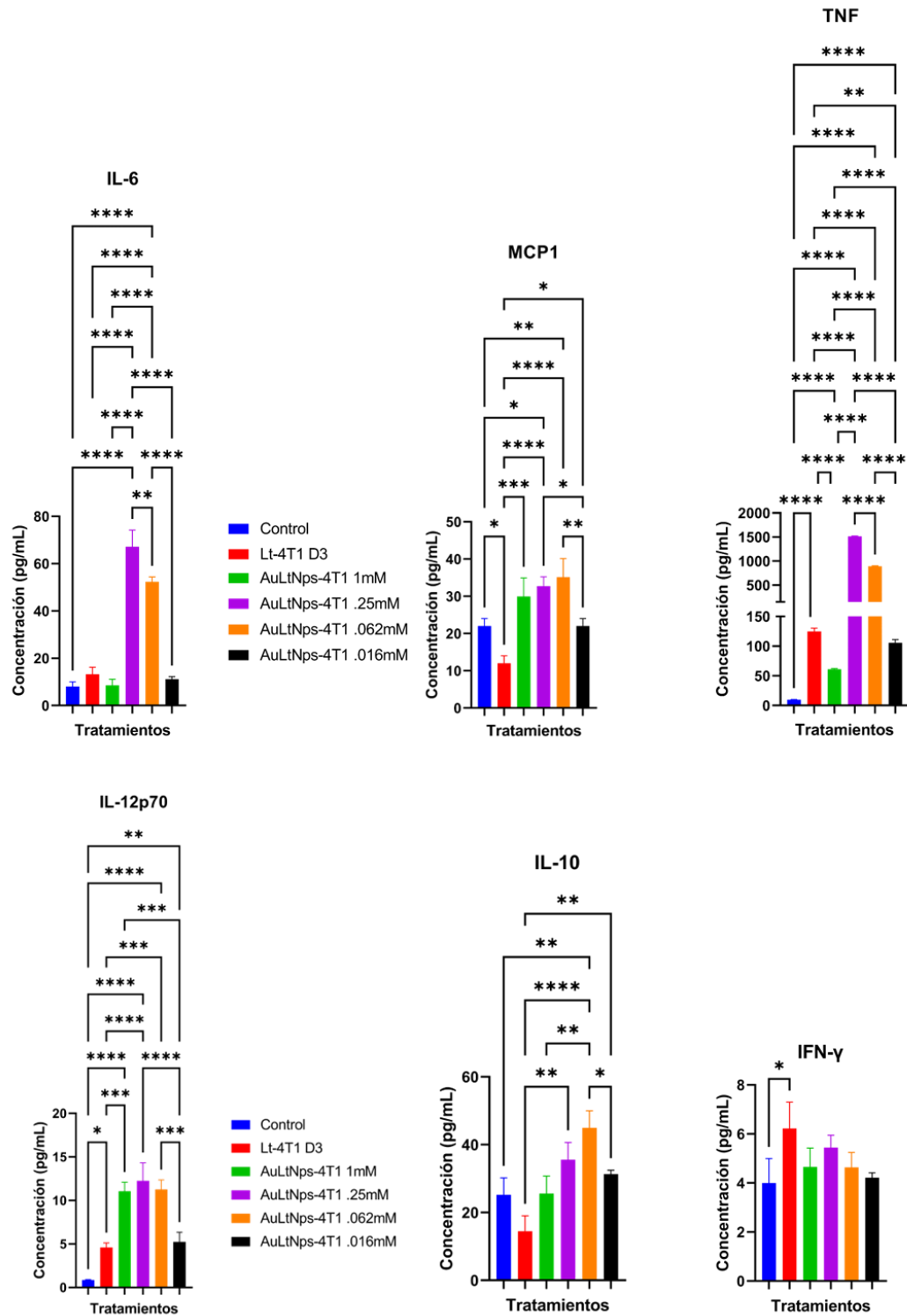


Figura 5. Análisis de selección de concentración de tratamientos para evaluaciones *in vitro* de la estimulación del sistema inmune, se muestran de manera gráfica los resultados obtenidos en los análisis de secreción de citocinas en macrófagos intraperitoneales murinos después de 24 horas de exposición a diferentes dosis de lisado soluble de la línea 4T1 y de AuLtNps-4T1. Se realizó una comparación múltiple de variación entre los tratamientos por cada citocina detectada (Lt-4T1 D3 representa la dosis con mejor patrón de secreción).

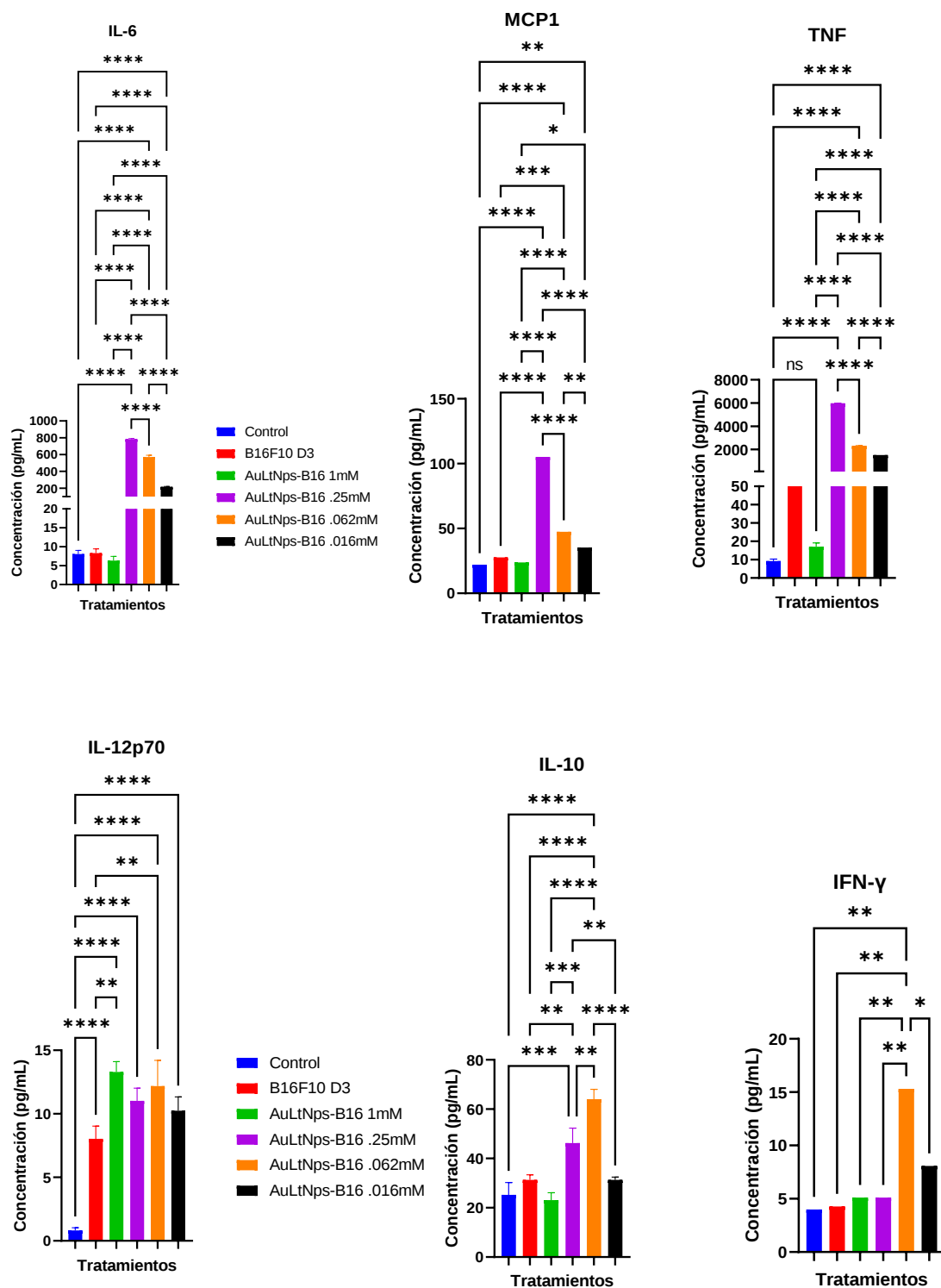


Figura 6. Análisis de selección de concentración de tratamientos para evaluaciones in vitro de la estimulación del sistema inmune, se muestran de manera gráfica los resultados obtenidos en los análisis de secreción de citocinas en macrófagos intraperitoneales murinos después de 24 horas de exposición a diferentes dosis de lisado soluble de la línea B16F10 y de AuLtNps-B16. Se realizó una comparación múltiple de variación entre los tratamientos por cada citocina detectada (Lt-B16F10 D3 representa la dosis con mejor patrón de secreción).

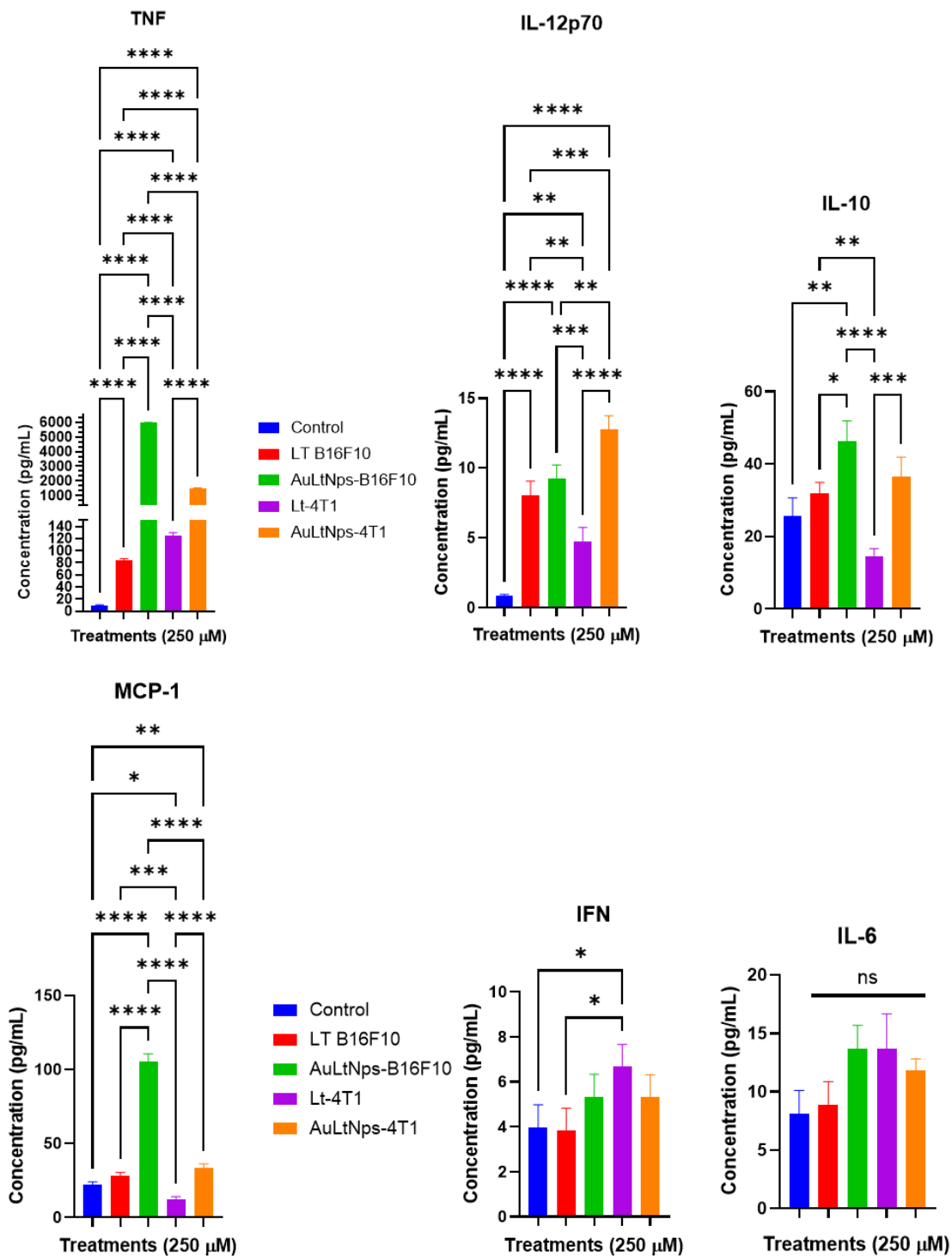


Figura 7. Análisis de selección de concentración de tratamientos para evaluaciones *in vitro* de la estimulación del sistema inmune, se muestran de manera grafica los resultados obtenidos en los análisis de secreción de citocinas en macrófagos intraperitoneales murinos después de 24 horas de exposición a diferentes dosis de lisado soluble de la línea B16F10, 4T1, además de la forma en nanopartícula AuLtNps-B16 y AuLtNps-4T1 a una concentración de proteína de 52 $\mu\text{g/mL}$ y una concentración de 250 μM de HAuCl₄.

Se confirmó la estimulación ocasionada por los tratamientos de AuLtNps-B16/4T1 al utilizar la dosis de 250 uM, además se compara su efecto con su contraparte de lisado libre a una concentración de 105 micro molar, en el caso de la secreción de TNF se observó una diferencia altamente significativa al comparar el lisado libre de ambas líneas celulares, en comparación con su versión nano particulada (AuLtNps-B16/4T1), esto fue observado de igual forma en las interleucinas 12p70, IL-10 y en MCP-1, mientras que en la IL-6 no se observa ningún cambio en la secreción al compararse entre los tratamientos y el control (Figura 7).

7.3- Evaluación de la captación y determinación de la fagocitosis.

Se determinó la captación de los tratamientos de AuLtNps-B16 y AuLtNps-4T1 al entrar en contacto con macrófagos intraperitoneales murinos, usando tinción por fluorescencia directa por microscopia de fluorescencia confocal, localizando la presencia de las nanopartículas en el interior de los macrófagos intraperitoneales murinos, esto al realizar el traslape fluorescente entre el núcleo celular en azul y las nanopartículas marcadas con FITC en color verde, además se realizó un acercamiento a 40X para lograr captar células individuales y realizar cortes en Z (Figura 8), con la finalidad de obtener una mayor resolución de imagen y poder discernir si las nanopartículas marcadas se encontraban dentro o fuera de los macrófagos, identificando que la presencia de las AuLtNps, tanto B16 como de 4T1 se encontraban en el interior de los macrófagos, además se demostró que el procesamiento de estas nanopartículas se llevaba a cabo por medio de la fagocitosis, debido a que, en el momento de colocar un inhibidor de la movilidad de membrana como el clodronato de sodio y mantener por 30 minutos a 4 grados a los macrófagos, su capacidad para fagocitar ambos tipos de nanopartículas se vio altamente afectada, pasando de captar un 100% de las células a menos del 10% en el caso de las AuLtNps-B16, mientras que para las AuLtNps-4T1 se pasó de un 80% de captura por las células a un 15% aproximadamente, lo cual demuestra que el proceso de fagocitosis es esencial para la entrada de ambos tipos de nanopartículas, siendo mayormente fagocitadas las AuLtNps-B16 (Figura 9).

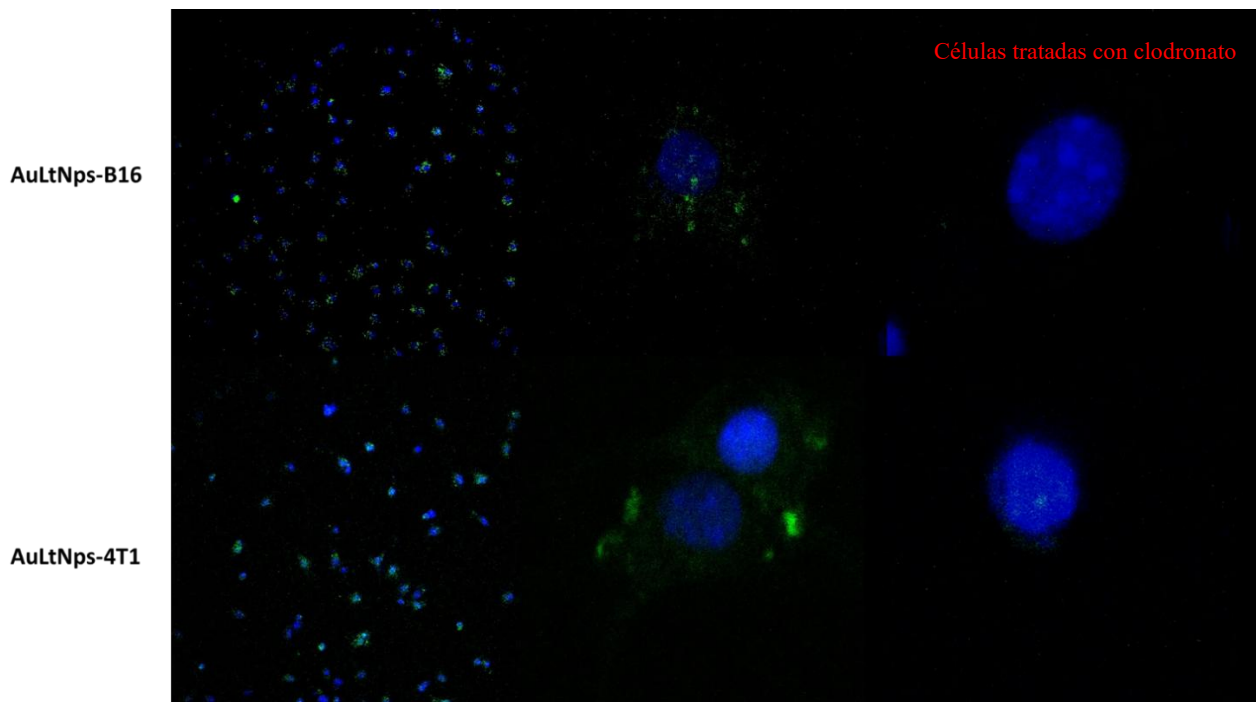


Figura 8. Imágenes representativas obtenidas por microscopia confocal multifotónico, en el cual se comparan macrófagos intraperitoneales murinos expuestos a AuLtNps-B16 y AuLtNps-4T1, en la parte central de la imagen se aprecia la interacción de las AuLtNps con una sola célula, además las AuLtNps fueron marcadas con FITC para poder identificar su presencia en las células, además se realizaron capturas sobre el eje Z, demostrando la distribución de las AuLtNps por toda la célula, en las imágenes de la derecha se muestra como baja la interacción de las AuLtNps marcadas al utilizar un inhibidor de la fagocitos (clodronato).

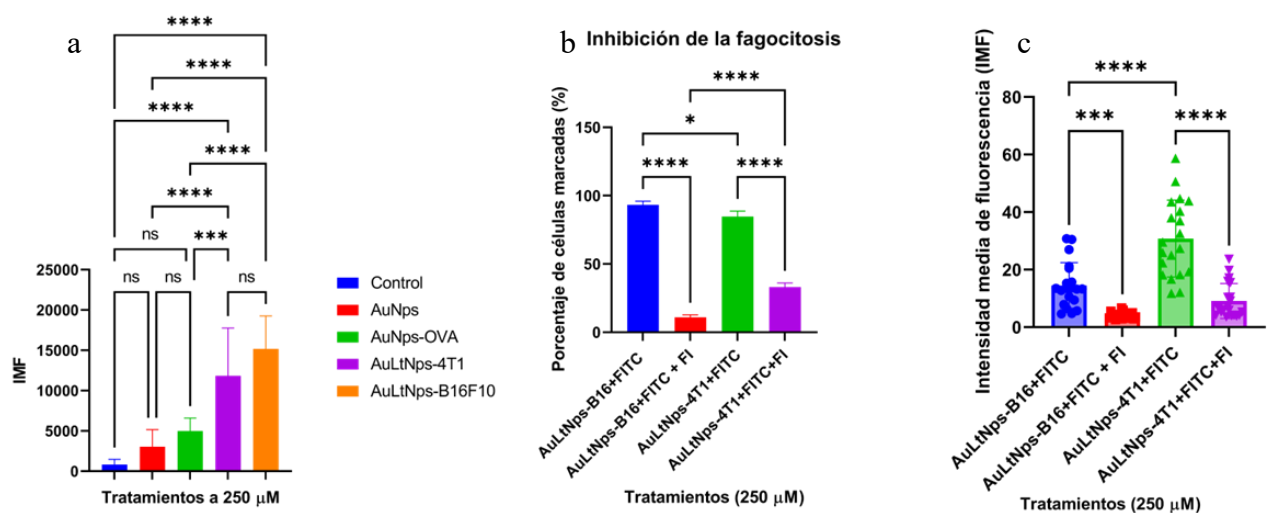


Figura 9. Análisis de imagen del ensayo de fagocitosis y su inhibición por clodronato de sodio. (a) intensidad media de fluorescencia al exponer a los macrófagos intraperitoneales de ratón a los diversos tratamientos. (b) se muestra el porcentaje de células marcadas como positivas a la presencia de AuLt-B16 y AuLtNps-4T, comparada con el porcentaje de células marcadas posterior a su exposición con clodronato y previo a la interacción con las AuLtNps. (c) se muestra la intensidad media de fluorescencia captada antes y después de exponer a los macrófagos intraperitoneales al inhibidor de fagocitosis.

7.4- Resistencia antigénica a la degradación en condiciones de fagocitosis simulada.

De manera general se observó que el lisado de células B16F10 presentó una mayor resistencia a la degradación, mientras que el lisado de células 4T1 presentó una menor resistencia no soportando más de 3 horas de exposición a las diferentes enzimas utilizadas, perdiendo casi el 80% del total de sus proteínas detectables. Mientras que para la forma nano particulada de ambos lisados se observó un aumento significativo en su resistencia a la degradación enzimática, de tal manera que, incluso después de 24 horas de exposición a las enzimas aun fue detectable concentración de proteína en estas muestras (Figura 10). Al analizar estadísticamente las diferencias en la concentración de proteínas presentes en los tratamientos de lisado soluble y en forma nano-particuladas, se observaron diferencias altamente significativas al comparar la concentración de proteína entre el lisado soluble de la línea 4T1 y las AuLtNps-4T1, esto sucedió de la misma manera al comparar el lisado de B16F10 en contra de las AuLtNps-B16, al evaluarlo a 1, 3 y 24 horas (Figura 10).

Las AuLt-4T1Nps y AuLtB16Nps se colocaron en una solución que simulaba las condiciones de fagocitosis se observó que, las AuLT-4T1Nps pasada 3 horas de exposición a las enzimas, fue evidente una degradación proporcional a un 39.13% comparado con su contraparte de lisado libre en la cual se degradó un 74.68%, incluso después de 24 horas de exposición se observó una pérdida de 84.20% para las AuLt-4T1Nps, mientras que para el lisado libre fue de 100% (Figura 11). Por otro lado, al evaluar la resistencia antigénica a la degradación para las AuLtB16Nps, se observó que, pasadas 3 horas de exposición a las enzimas las AuB16Nps presentaban una degradación del 31%, comparada con el 47.70% de la forma libre del lisado tumoral, incluso 24 horas posteriores a la exposición las AuLtNps-B16N aun conservaban cerca del 50% de proteína, a comparación de la forma de lisado libre que ya no presentaba fragmentos proteicos detectables (Figura 11).

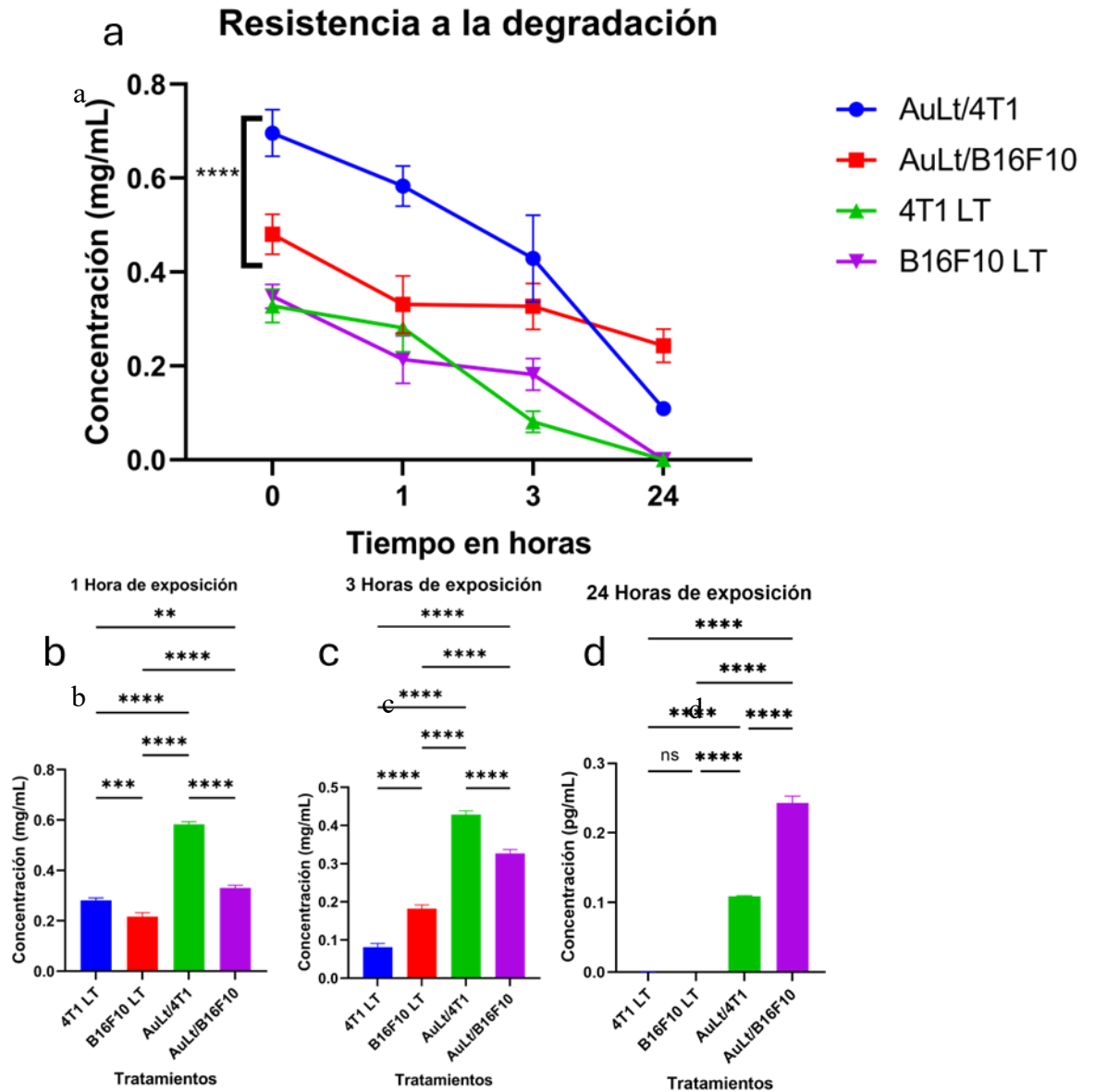


Figura 10. Análisis de la resistencia a la degradación enzimática, (a) determinación de la concentración de proteína total en las muestras de AuLT-4T1 y B16, en comparación con su contraparte soluble. (b) efecto enzimático y de pH sobre las proteínas en los tratamientos a 1 hora, (c) efecto enzimático y de pH sobre las proteínas en los tratamientos a 3 horas, (d) efecto enzimático y de pH sobre las proteínas en los tratamientos a 24 horas.

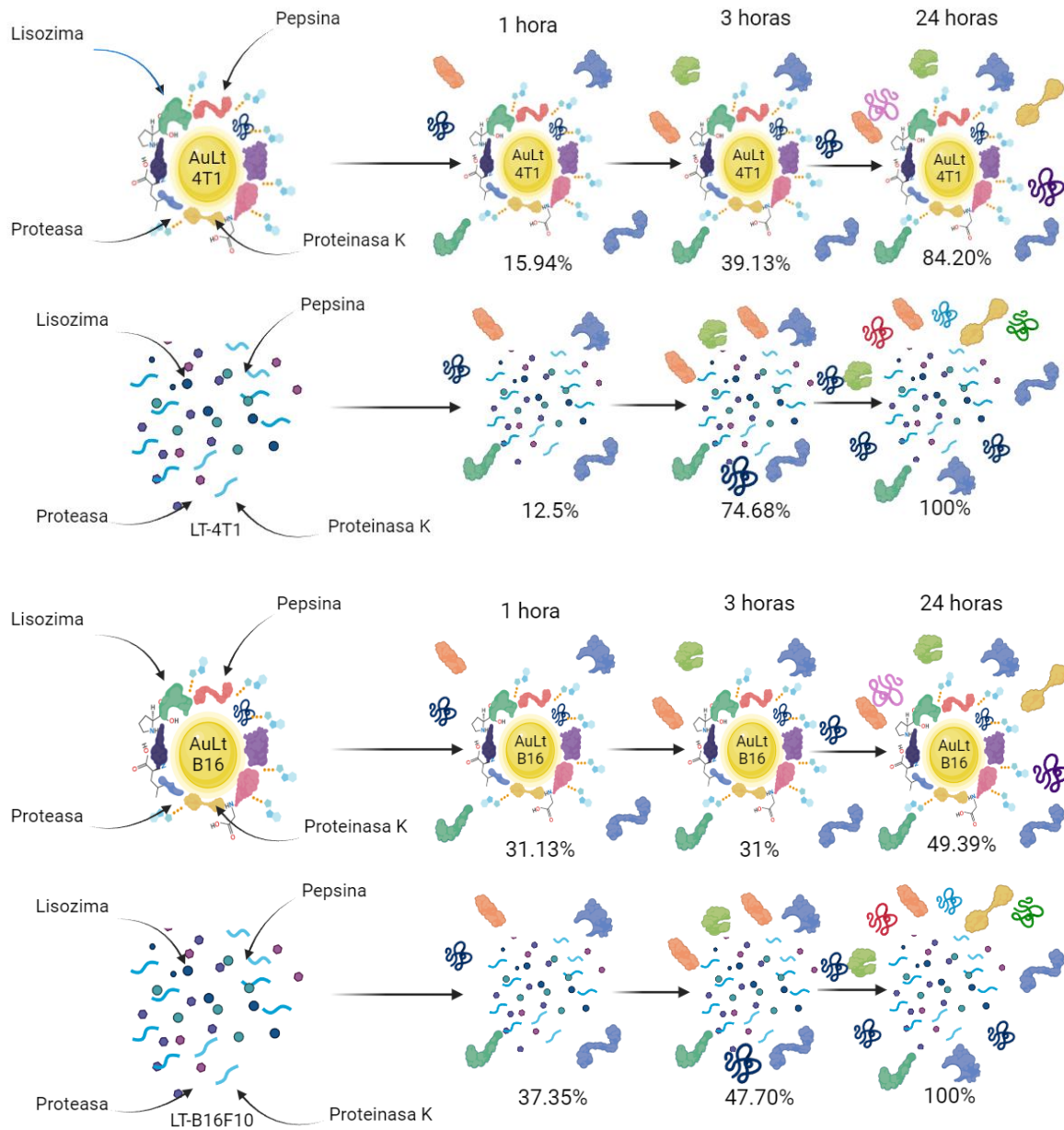


Figura 11. Análisis de porcentaje de proteína degradada en el ensayo de resistencia antigénica a la degradación. Se muestra la comparativa entre utilizar el lisado soluble y en los nano complejos AuLtNps, demostrando el efecto sobre la degradación con respecto al tiempo.

7.5- Determinación de la presencia de alarminas captadas en las AuLtNps

Después de analizar por ELISA las muestras de AuLtNps y sus contrapartes de lisado libre, tanto para las líneas 4T1 y B16F10, se determinó que, al comparar la presencia de alarminas en el lisado soluble al día 1 y 30 de almacenado en refrigeración, se observó la disminución en la detección de HSP70, HMGB1, calreticulina y la presencia de oxidación de proteínas al comparar el día 1 en contraste con el día 30, mientras que en el caso de las AuLtNps-4T1 y AuLtNps-B16 este fenómeno no fue observado. Al comparar los lisados de 4T1 en contra de las AuLtNps-4T1 se observaron diferencias altamente significativas en la detección de las alarminas HSP70, HSP90, HMGB1, calreticulina, y la presencia de proteínas oxidadas (Figura 12). Al comparar el lisado de las células B16F10 en contra de las AuLtNps-B16 se observó una diferencia altamente significativa en la detección de las alarminas HSP70, HSP90, HMGB1, calreticulina, y la presencia de proteínas oxidadas (Figura 13)

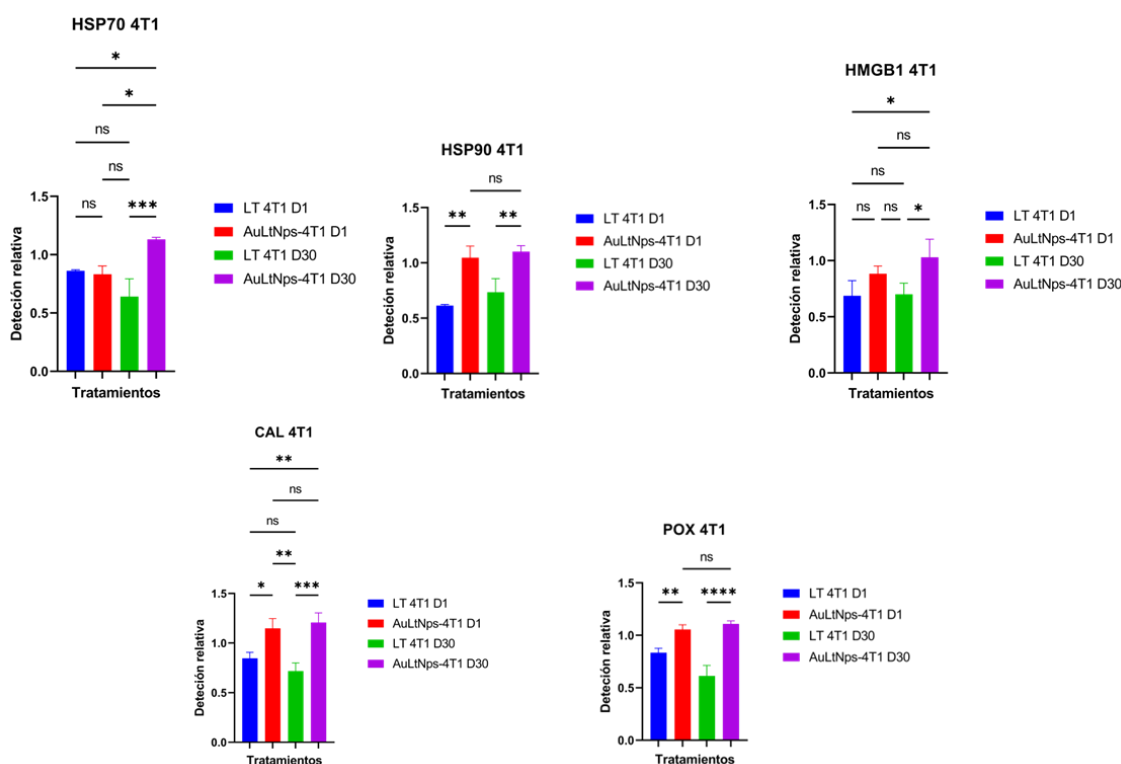


Figura 12. Análisis de detección de alarminas por ELISA, se representa la detección relativa comparativa entre los tratamientos de Lisado tumoral soluble y AuLt usando los lisados de células 4T1, contrastando la detección entre el día 1 y 30, después de haberse mantenido en condiciones de refrigeración.

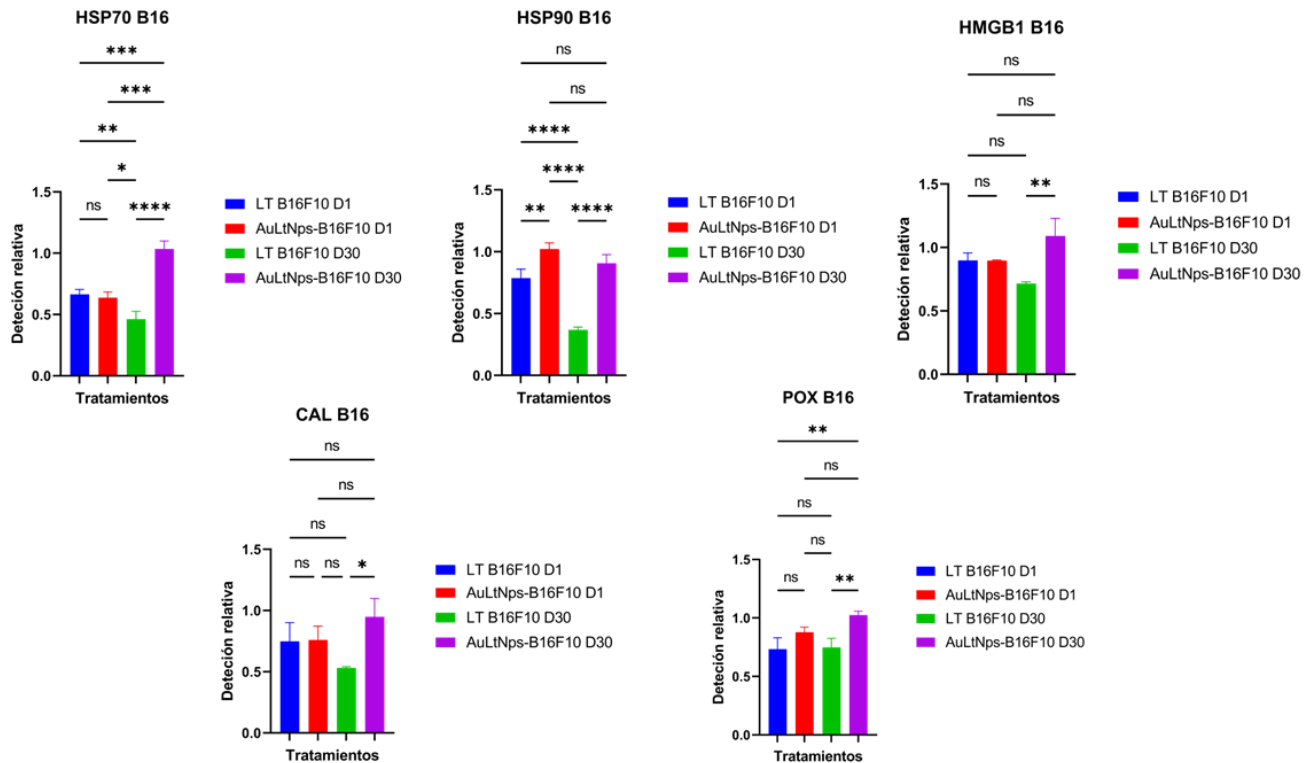


Figura 13. Análisis de detección de alarminas por ELISA, se representa la detección relativa comparativa entre los tratamientos de Lisado tumoral soluble y AuLt usando los lisados de células B16F10, contrastando la detección entre el día 1 y 30, después de haberse mantenido en condiciones de refrigeración.

7.6- Determinación de la prevención a la implantación y desarrollo tumoral por parte de las AuLtNps en un modelo murino de cáncer de mama y melanoma.

Se determinó el peso corporal de los cuatro grupos experimentales para los ratones BALB/c retados con la línea 4T1 (cáncer de mama triple negativo murino), y C57BL/6 retados en contra de B16F10 (melanoma murino), para ambos grupos se tomó como día 1 el primer día de inmunización de todos los tratamientos, y se continuó midiendo su peso en gramos hasta finalizar el reto de implantación tumoral de manera subcutánea para ambos modelos, se observó que en ambos grupos de ratones tratados y el control, no existió una diferencia significativa entre los pesos de los grupos experimentales durante el proceso de inmunización ni durante el proceso de implantación y desarrollo tumoral (Figura 14).

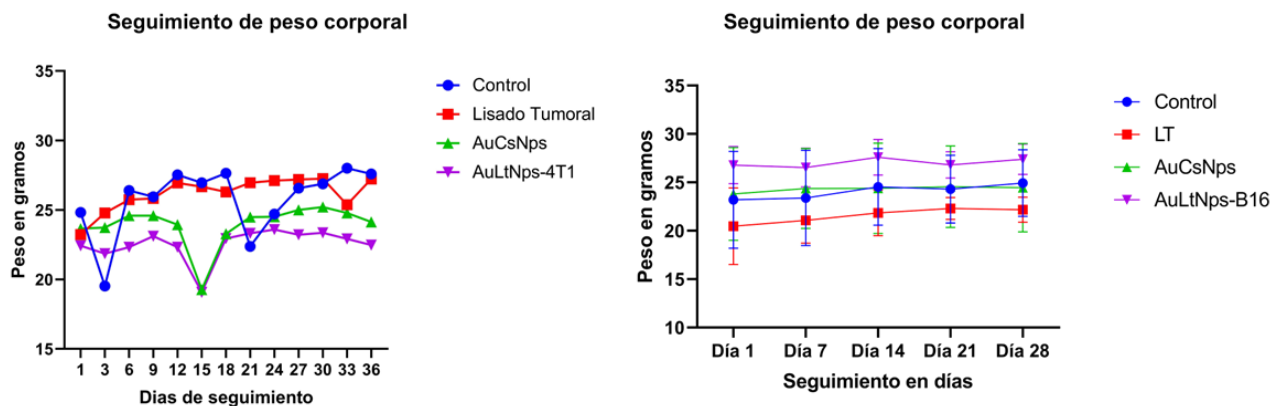


Figura 14. Seguimiento del peso corporal durante el periodo de inmunización el cual incluyó 3 semanas de inmunización, 1 dosis por semana, y una semana de descanso antes de la inoculación de las células viables. Del lado izquierdo se observa el seguimiento del peso para los ratones BALB/c mientras que, del lado derecho se encuentra el seguimiento para los ratones C57L6.

Midiendo cada 3 días el volumen tumoral de los grupos de ratones implantados con las células viables de 4T1 se observó una correcta implantación en todos los grupos experimentales, en el caso del grupo control se alcanzó el máximo volumen tumoral permitido por la NOM-062-ZOO-1999 al día 18 de seguimiento, de igual forma para el grupo de las AuCsNps, mientras que en el caso del grupo de lisado tumoral se mantuvo hasta el día 21 de seguimiento, en el caso del grupo tratado con AuLtNps-4T1 se observó una disminución en el volumen tumoral a partir del día 12, presentando una diferencia altamente significativa al comparar los volúmenes tumorales al día 21 posterior a la implantación, fue notable como el uso de lisado tumoral disminuyó el ritmo de crecimiento tumoral al compararse con el grupo control y el tratado con AuCsNps (Figura 15a). Al analizar el crecimiento del volumen tumoral de la línea B16F10 se observó un crecimiento a partir del día 6 posterior a la inoculación de las células, incrementando gradualmente en todos los tratamientos, exceptuando el grupo tratado con AuLtNps-B16 el cual comenzó a disminuir el volumen tumoral a partir del día 9, mientras que el grupo de ratones tratados con LT alcanzó su máximo de mm^2 al día 16, al igual que el resto de los tratamientos, debido al tamaño de tumor alcanzado a este día, presentando el menor volumen tumoral las AuLtNps-B16, seguidas por las AuCsNps (Figura 15b). Al analizar el volumen del tumor ya extraído de los ratones inoculados con la línea celular 4T1 se encontró una diferencia altamente significativo entre los tumores de los ratones tratados con LT y sin tratamiento en contra de los ratones tratados con AuLtNps-4T1, mientras que, entre el grupo control y LT no se

encontró una diferencia significativa, además se encontró crecimiento en los ganglios en los grupos de ratones tratados con LT y control, a comparación con el grupo tratado con las AuLtNps-4T1 (Figura 16a). Al analizar el volumen de los tumores extraídos de los ratones C57BL/6 se observó una alta diferencia significativa entre los volúmenes de los grupos control, LT y AuCsNps en contra del grupo tratado con AuLtNps-B16, mientras que, entre los grupos Control y LT no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, por otro lado, al analizar el tamaño de los ganglios se encontró una diferencia altamente significativa entre el volumen de los ganglios del grupo control comparado con el grupo tratado con las AuLtNps-B16 (Figura 16b).

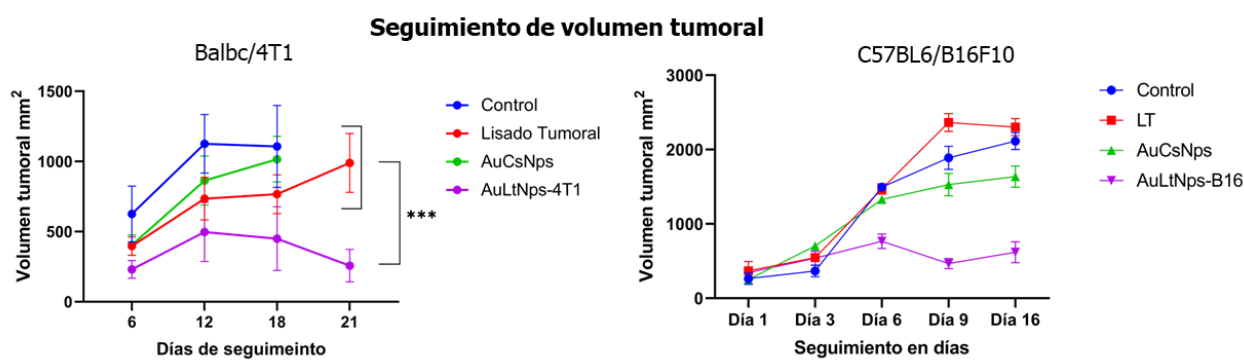


Figura 15. Seguimiento del volumen tumoral en mm². La gráfica del lado izquierdo representa el seguimiento del volumen tumoral de las células 4T1 en los ratones BALB/c. Del lado derecho se muestra el seguimiento del volumen tumoral de las células B16F10 en los ratones C57BL/6.

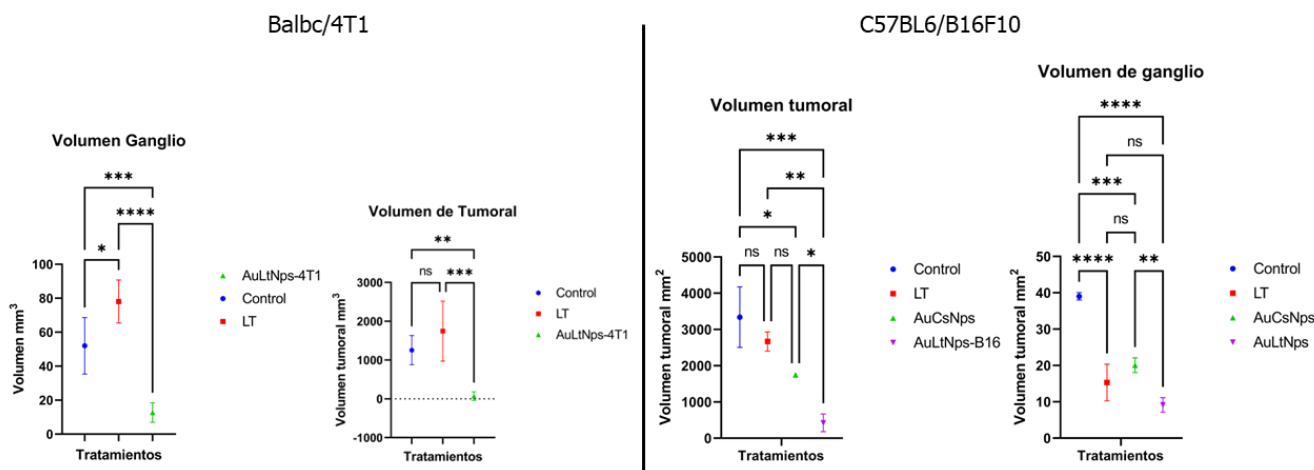


Figura 16. Análisis del volumen tumoral y volumen de ganglio linfático. Las gráficas del lado izquierdo representan los volúmenes de tumor y de ganglios linfáticos en ratones BALB/c inmunizados con los tratamientos de Lisado tumoral y AuLtNps-4t1. Las gráficas del lado derecho representan los volúmenes de tumor y de ganglios linfáticos en ratones C57BL/6 inmunizados con los tratamientos de Lisado tumoral, AuCsNps y AuLtNps-B16

7- Determinación de la activación de la inmunidad humoral y celular inducida por las AuLtNps en un modelo murino de cáncer de mama y melanoma.

Con la finalidad de identificar la dosis terapéutica a utilizar en los modelos murinos de cáncer de mama (BALB/c) y melanoma (C57BL/6), se llevó a cabo una dosificación basada en la concentración de HauCl_4 presente en la síntesis de las AuLtNps, usando dosis de 1.5 mM como máxima y 0.250 mM como dosis mínima. La presencia de los marcadores celulares CD80, 11b, 14, 3, 4, 8 y MHC II fueron evaluados como indicadores de una correcta estimulación del sistema inmune humoral y celular. Posterior al periodo de inmunización de 3 semanas de las diferentes dosis, se identificó que la concentración de 1.250 mM proporciono la mayor inducción de células CD11b, MHC II, CD14, CD3, CD4 y CD8 positivas, al ser analizadas las diferencias significativamente entre tratamientos, siendo CD86 el único marcador que no presento un aumento significativo a la dosis de 1.250 mM, pero si lo presento a la dosis de 1.5 mM, por lo cual se decidió en utilizar la dosis de 1.250 mM como dosis terapéutica para ambos modelos tumorales (Figura 17).

Por último se evaluó por biometría hemática el porcentaje de hemoglobina (HGB), plaquetas (PLT), neutrófilos (NEUT), linfocitos (LYMPH), monocitos (MONO) y eosinófilos (EO), en ratones inmunizados y posteriormente inoculados con las células tumorales de 4T1 y B16F10 de manera independiente, los gráficos de la figura 18 reflejan los valores promedio de ambos grupos experimentales, se observó en ambos modelos una modulación muy parecida, mostrando una disminución significativa en el porcentaje de plaquetas de los grupos inoculados con tumor, los cuales disminuyeron aún más cuando fueron tratados con AuCsNps y LT, mientras que al ser tratados los ratones con las AuLtNps se mostró un ligero incremento. Al analizar el porcentaje de linfocitos presentes en los ratones se observó una disminución altamente significativa en los ratones inoculados con tumor y no tratados, al compararse con el control sin tratamiento ni tumor, mientras que, al compararse este mismo grupo contra el de ratones inoculados con tumor y tratados con las AuLtNps se observó un incremento significativo en el porcentaje de linfocitos, lo cual no ocurrió en los grupos tratados con AuCsNps y LT (Figura 18). La diferencia en la proporción de linfocitos se ve relacionado con el aumento antes visto de CD3, CD4 y CD8 en los ratones tratados con las AuLtNps.

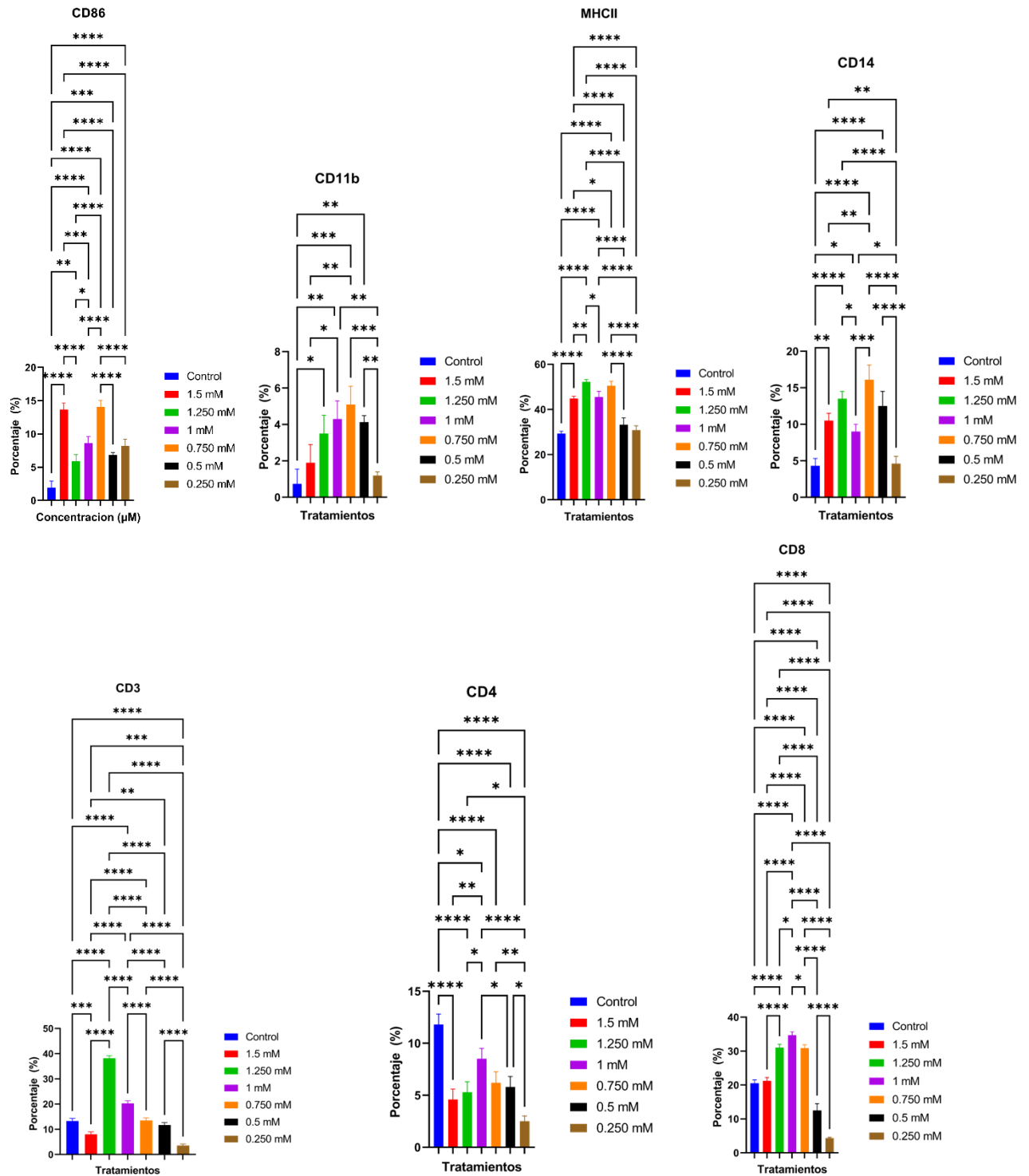


Figura 17. Análisis de marcadores celulares relacionados con la presentación de antígeno y la activación del sistema inmune celular. Representación gráfica de la elección de dosis terapéutica para utilizar en los análisis in vivo, comenzando con una dosis de 0.250 mM hasta 1.5 mM para los tratamientos de AuLtNps.

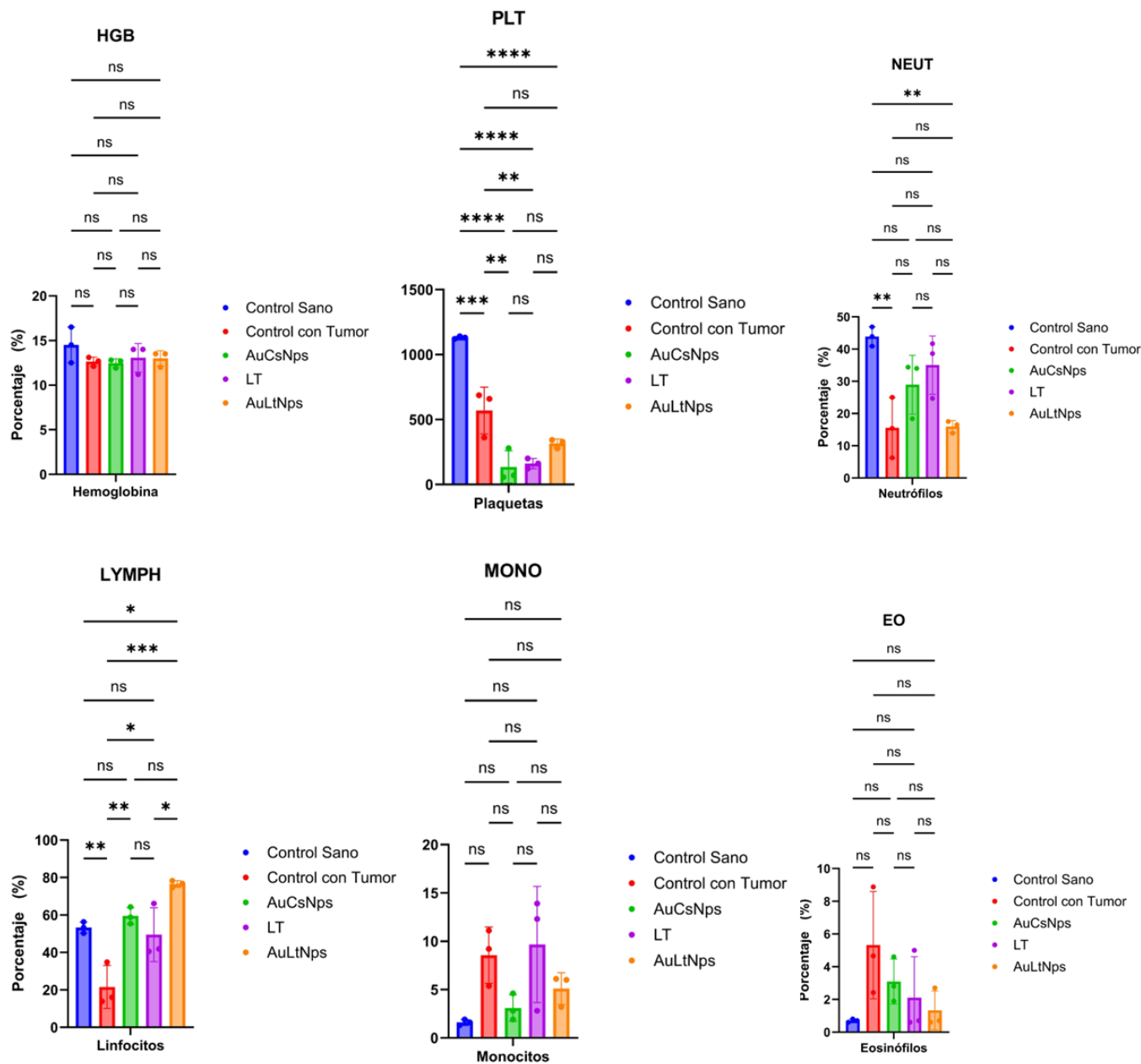


Figura 18. Análisis de biometría hemática realizada al final del reto tumoral en ratones BALB/c y C57BL/6. Se muestran las diferencias en las proporciones de Hemoglobina globular media (HGB), Recuento de plaquetas (PLT), Neutrófilos (NEUT), Linfocitos (LYMPH), Monocitos (MONO) y Eosinófilos (EO).

8- DISCUSIÓN

En la actualidad, el uso de lisados tumorales autólogos para inducir inmunidad antitumoral representa una de las estrategias de inmunoterapia más efectivas. Sin embargo, su alto nivel de personalización también las convierte en las más costosas en términos de recursos metodológicos y personal calificado necesarios para llevar a cabo estos procedimientos. Esto, lamentablemente, limita su alcance a un sector reducido de la población mundial, aunque estas terapias son altamente prometedoras, es fundamental continuar investigando y desarrollando alternativas más asequibles para beneficiar a un mayor número de pacientes. En los últimos años la nanotecnología, principalmente la enfocada en el área biomédica, ha incursionado en modificar, potenciar y desarrollar estrategias terapéuticas, y dentro de las más abordadas se encuentra el cáncer. En este trabajo se utilizaron lisados tumorales murinos de las líneas 4T1 y B16F10 como agentes reductores para obtener nanopartículas de oro, con lo cual se busca activar al sistema inmune antitumoral, en contra del tipo de tumor con el cual se realizó la síntesis de las nanopartículas, cabe reiterar que estas nanopartículas no juegan un papel citotóxico contra las células tumorales, su principal función es interaccionar con células presentadoras de antígeno y facilitar este proceso para estimular eficazmente el sistema inmune antitumoral de manera autóloga, sin necesidad de procedimientos complicados y altamente costosos, funcionando como una vacuna convencional sin el uso de un adyuvante. Al caracterizar las AuLtNps por PRS fue evidente una longitud de onda máxima entre los 530 y 540, al igual que con las AuLtB16Nps, lo cual corresponde con un plasmon de resonancia de nanopartículas de oro, y, aunque, el PRS convencional para las nanopartículas de oro es de 520nm (Ferreira de Macedo et al., 2017) este corrimiento se explica debido a la presencia de materia orgánica en la superficie de la nanopartícula, principalmente proteínas, lípidos y carbohidratos presentes en los restos de lisados tumorales acoplados a estas nanopartículas, además se observó una constante baja en la absorbancia con respecto a los días, es decir que mientras más días pasaban más bajo era su punto máximo de absorbancia, esto para ambas síntesis, en un inicio se podría pensar que la solución se precipita o perdemos puntos de nucleación, sin embargo, se descubrió que, en realidad lo que genera esta baja en el punto máximo es la cantidad de proteínas que se van agregando a la superficie, lo cual también genera un efecto en el tamaño de las mismas, este fenómeno fue más evidente en la síntesis de AuLtB16Nps, lo cual tiene sentido ya que su tamaño comienza

en 33.8 nm y termina en 96.40nm lo cual indica una gran carga de proteínas en la superficie de la nanopartícula, por lo cual el estado vibracional de las nanopartículas se veía reducido y por consecuencia su PRS era menor al detectado inicialmente, este fenómeno es conocido como corona de proteínas, además un indicativo de la nula pérdida de la estabilidad en la síntesis conforme pasan los días es el potencial Z, el cual en ambas síntesis de nanopartículas permaneció por arriba de los -24 mV, este aumento continuo hasta estabilizarse en -29mV, lo cual indica un aumento en la carga superficial de ambas síntesis derivadas de la formación de la corona dura y blanda de proteínas (Tukova et al., 2023). Otro indicador de estabilidad de la reacción es la aparición de grupos funcionales al realizar la síntesis usando los lisados de células 4T1 y B16F10, entre los enlaces formados se encuentran aminas, alquenos, sulfatos, alquinos y alcoholes secundarios, siendo la síntesis de AuLtB16Nps en la cual se detectaron más interacciones al realizar la síntesis de las Nps, esta modificación en los enlaces presentes en el lisado libre demuestran la fuerte unión que puede existir entre el núcleo metálico y las coronas de proteínas (Akhavan et al., 2010). Finalmente identificamos la presencia de Oro y compuestos orgánicos como carbono, oxígeno, sodio, fósforo, cloro y calcio, esto al hacer un análisis por SEM-EDX para la identificación de elementos presentes en las AuLtNps, además se corroboró el aumento de tamaño de ambas síntesis de nanopartículas al capturar microscopias al día 1 y 30, para ambas síntesis. Una técnica adicional de caracterización realizada fue un corrimiento en gel de agarosa al 0.6%, en el cual solo si las nanopartículas contaban con una corona dura de proteínas hubiera sido posible visualizarlas en bandas en el gel, esto debido a la presencia de partículas de oro de tamaños homogéneas cargadas con proteínas en su superficie, que incluso después de exponerlas a un corrimiento electroforético no se desprendieron de la superficie de las nanopartículas (Kim et al., 2010). Al exponer las AuLtNps-B16 por tres horas a macrófagos intraperitoneales murinos fue evidente un aumento diferencial en la secreción de TNF, IFN, MCP-1, IL-10 e IL-6 con respecto al control de lisado libre de células B16F10, lo cual también se observó para las AuLtNps-4T1, este perfil de secreción de citocinas y quimiocinas en un macrófago es observable en una estimulación del sistema inmune suscitada por una presentación de antígeno (Sosa & Forsthuber, 2011). Además se confirmó que la vía de entrada de las AuLtNps a los macrófagos es por fagocitos, esto después de exponer a los macrófagos a clodronato de sodio el cual los imposibilita para seguir con el proceso de fagocitos

(McCloskey et al., 2021), por lo cual al momento de exponer las AuLtNps marcadas con FITC no fueron captadas por estos macrófagos, dando valores casi indetectables de fluorescencia a diferencia de los macrófagos que no fueron tratados con el clodronato de sodio, demostrando así que la alta captación de los macrófagos hacia las AuLtNps es medida por fagocitosis lo cual depende totalmente del recubrimiento de la nanopartícula y no del hecho de ser un núcleo metálico de oro, además que se han asociado nanopartículas con carga superficial negativa a los procesos relacionados con la captación celular realizada por macrófagos (Srijampa et al., 2019). Otra de las características que promueven la activación específica del sistema inmune al usar las AuLtNps es la resistencia antigénica a la degradación que presentan al estar de manera nanoestructurada, esto al comparar los lisados solubles con sus contrapartes nanoestructuradas, en las cuales fue evidente que después de tres horas de exposición a las enzimas que comúnmente se encuentran en los fagolisosomas como lisozima, pepsina, proteasas y proteinasa K además de los cambios de pH correspondientes, por lo cual hipotetizamos que la mejora en la presentación de antígeno es debido a que los macrófagos en este punto están funcionando como células presentadoras profesionales, al reducir la eficiencia de sus enzimas líticas las cuales los convierten en remodeladoras celulares y no presentadoras profesionales (Ferenbach & Hughes, 2008; Savina & Amigorena, 2007). En conjunto con la evidencia que demuestra que al conjugar proteínas o péptidos con nanopartículas se aumentan sus propiedades y se disminuye la degradación enzimática en sistemas biológicos (Chanana et al., 2024; Couto et al., 2017; Maraming et al., 2021). Este efecto de resistencia a la degradación se vio reflejado al analizar la presencia de DAMPS en muestras de lisado libre refrigerado por 30 días y AuLtNps, en donde fue evidente la presencia de HMGB1, HSP70, HSP90 y calreticulina aun en muestras de AuLtNps refrigeradas por 30 días, mientras que, la detección de estas mismas proteínas en las muestras de lisado libre fue mucho menor, por lo tanto podríamos inferir que parte del efecto potenciador de las AuLtNps es debido a la presencia de los DAMPS al momento de la inmunización promoviendo el reclutamiento de células presentadoras de antígeno (Garg et al., 2013). Otro factor observado fue la presencia de proteínas oxidadas las cuales favorecen el procesamiento y detección de antígeno por parte de las APCs (Biedroń et al., 2015).

Durante el periodo de inmunización de 3 semanas previas a la implantación tumoral no se observó un deterioro relacionado al peso corporal de manera general, excepto por los días 3 y 15 de seguimiento en los cuales ocurrieron incidentes relacionados con los bebederos de los grupos experimentales: control, AuCsNps y AuLtNps-4T1, mientras que en los ratones C57BL/6 no se observó modificación en el peso durante el proceso de inmunización, lo cual demuestra la seguridad en cuanto a la nula existencia de pérdida de apetito o una disminución en la ingesta de agua relacionada a alguno de los tratamientos utilizados. Al analizar la dinámica del crecimiento tumoral de los ratones del modelo de cáncer de mama y melanoma, se observó que entre el día 6 y 18 para 4T1 y, 3 y 9 para el modelo de B16F10 una aparente implantación de tumor para los ratones tratados con las AuLtNps, sin embargo, el crecimiento fue disminuyendo conforme pasaban los días de seguimiento en ambos modelos, regresando en ambos casos a un tamaño normal de la extremidad en donde se realizó la implantación, esto podría indicar un proceso inflamatorio en la zona de inoculación dada por la identificación por parte de células del sistema inmune que detectan como extrañas las células 4T1 y B16F10, dando inicio a un proceso de inflamación local, encabezada por los linfocitos T, macrófagos, células presentadoras de antígeno, células NK y linfocitos innatos (Jiang & Shapiro, 2014). Otro de los fenómenos que se observaron en ambos modelos tumorales fue que los ratones tratados con LT presentaron los volúmenes tumorales con mayor desarrollo, incluso superando al grupo control, esto se debe probablemente a la generación de macrófagos inmunosupresores y células tolerogénicas, se ha demostrado que, el uso de lisados tumorales regulan a la alta la expresión de CD69 en esplenocitos de ratón, además de un aumento del porcentaje de células T reguladoras, en un estudio realizado por Dong y colaboradores en el 2014, identificaron que un lisado de células tumorales presenta factor inmunosupresor, inductores de apoptosis, ligandos FAS y factor de crecimiento transformante beta, los cuales están asociados con la aparición de células inmunosupresoras y la apoptosis de esplenocitos (Dong et al., 2014) Estos resultados se relacionan directamente con lo observado en las biometrías hemáticas, debido a que al término del modelo tumoral se presentó una baja en la población de linfocitos para los ratones tratados con LT. Otro de los fenómenos observado en el grupo de ratones tratados con LT fue la presencia de metástasis en ganglio inguinales laterales, la cual se presentó solo en el modelo de 4T1, al identificar la existencia de diferencia significativa al comparar los volúmenes de los ganglios

entre el grupo control y el grupo tratado con LT, este fenómeno ya se ha reportado con anterioridad en este tipo de tumor metastásico, en el cual a partir de la infiltración de células del sistema inmune como los macrófagos asociados a tumor, células supresoras de origen mieloide y linfocitos T reguladores, favorecen el crecimiento tumoral, además de la invasión y angiogénesis (Smith & Kang, 2013), además este efecto se ve potenciado con inmunógenos de baja eficiencia, los cuales estimulan parcialmente el sistema inmune generando agotamiento linfocitario, activación de citocinas inmunosupresoras y linfocitos T reguladores (Radoja & Frey, 2000). A diferencia del lisado tumoral soluble las AuLtNps tanto 4T1 como B16 promovieron una maduración de células presentadoras de antígeno, activando MHC II, CD14, CD11b y CD86, lo cual se vio reflejado en el aumento de linfocitos CD3, CD8 positivos, mientras que en los CD4⁺ se observó una modulación en el porcentaje de este subtipo celular, relacionando directamente el aumento en linfocitos maduros en circulación con linfocitos T citotóxicos (Rainone et al., 2016). Por último se observó cómo el proceso de inmunización con AuLtNps promovió una disminución de neutrófilos después el proceso de inmunización e implantación de tumor, además de un aumento en la proporción de monocitos, y un aumento significativo en la población de linfocitos totales, contrastante altamente con lo observado en el grupo de ratones no tratados y con desarrollo tumoral, en el caso del grupo de ratones no tratados y con implantación de tumor se observó una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos totales, además de un aumento de monocitos y eosinófilos, debido al deterioro inmunológico que presenta la implantación y desarrollo del tumor (Bita Divsalar, 2021; Zitvogel et al., 2008).

CONCLUSIONES

Se desarrollaron y caracterizaron dos síntesis de nanopartículas de oro usando lisados de células tumorales 4T1 y B16F10 como agentes reductores de síntesis, obteniendo partículas de carga superficial negativa y con tamaños de 70 y 93 nanómetros respectivamente.

Determinamos que la entrada de las AuLtNps a macrófagos intraperitoneales de ratón es mediada por fagocitosis y que el uso de las AuLtNps-4T1/B16 inducen una mayor captación por parte de estas células, al compararse con sus contrapartes de lisado soluble.

Se determinó que las AuLtNps presentan una resistencia a la degradación intrínseca de su método de síntesis y sistema de estabilización de autoensamblaje nanoestructurado, permitiendo la presencia de proteínas por más tiempo, al igual que la obtención de posibles péptidos antigénicos más grandes.

Se observó la presencia de alarminas por hasta 30 días en muestras de AuLtNps, las cuales al compararlas con su contraparte de lisado libre presentaron una mayor presencia de las proteínas HMGB1, HSP70, HSP90, calreticulina y la presencia de proteínas oxidadas las cuales aumentan la inmunogenicidad de las proteínas cargadas en las nanopartículas.

Se determinó la eficiencia en la activación del sistema inmune antitumoral en contra de las células 4T1 y B16F10 al usar las AuLtNps-4T1 y AuLtNps-B16 respectivamente, aumentando el porcentaje de APCs después de inmunizar a los ratones y aumentando la población de linfocitos CD3, CD8 positivos previniendo así la implantación de tumor y la diseminación de este a órganos periféricos.

Demostrando que el efecto de la inmunogenicidad inducido por las AuLtNps es intrínseco a las nanopartículas sintetizadas al utilizar ambos tipos de lisados tumorales tanto las células 4T1 y las B16F10 y no es un efecto individual ni combinado del uso de nanopartículas de oro y lisados tumorales solubles, permitiendo aplicar este tipo de terapias como suplemento autólogo para la activación del sistema inmune antitumoral posterior a una resección quirúrgica del tumor.

PERSPECTIVAS

Determinar la presencia de anticuerpos específicos contra proteínas expresadas en las líneas celulares 4T1 y B16F10, en ratones inmunizados con las AuLtNps, tras un esquema de inmunización de una y tres dosis.

Analizar histológicamente la infiltración tumoral por células inmunes, como macrófagos, células presentadoras de antígenos (APCs) y linfocitos, en tumores extirpados de ratones tratados con AuLtNps.

A partir de los resultados obtenidos, se plantea ampliar la síntesis, caracterización y evaluación de nanopartículas de oro reducidas a partir de otros tumores sólidos de relevancia clínica, como cáncer de próstata, pulmón, colon y osteosarcoma, con el objetivo de demostrar que el método de síntesis genera efectos inmunomoduladores similares en distintos tipos de cáncer.

Validar, a nivel preclínico, la eficacia de la activación del sistema inmune antitumoral mediante el uso de AuLtNps en perros diagnosticados con cáncer de mama y en proceso de tratamiento.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Febrero-julio 2022	Julio-Enero 2022-2023	Febrero- Enero 2024/2025
Diseño y redacción de anteproyecto			
Desarrollar y caracterizar nanopartículas de oro reducidas a partir de lisados tumorales de las líneas celulares 4T1 y B16F10.			
Determinar la captación y fagocitosis de las nanopartículas de oro por macrófagos intraperitoneales murinos y APCs derivadas de médula ósea.			
Caracterización de patrones inmunogénicos presentes en las nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral			
Evaluar el seguimiento celular in vivo de las nanopartículas de oro y su posible presencia en órganos linfoides.			
Evaluar la activación de la inmunidad humoral y celular específica de antígeno producida por 1 y 3 dosis de nanopartículas de oro reducidas a partir de lisado tumoral.			
Redacción de Tesis			

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhavan, A., Kalhor, H. R., Kassaei, M. Z., Sheikh, N., & Hassanlou, M. (2010). Radiation synthesis and characterization of protein stabilized gold nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 159(1–3), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.02.010>
- Altammar, K. A. (2023). A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 14(April), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155622>
- Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 669–692. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>
- Bai, X., Wang, Y., Song, Z., Feng, Y., Chen, Y., Zhang, D., & Feng, L. (2020). The basic properties of gold nanoparticles and their applications in tumor diagnosis and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072480>
- Basu, N., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2008). Protein-mediated autoreduction of gold salts to gold nanoparticles. *Biomedical Materials*, 3(3), 034105. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/3/3/034105>
- Biedron, R., Konopiński, M. K., Marcinkiewicz, J., & Józefowski, S. (2015). Oxidation by Neutrophils-Derived HOCl Increases Immunogenicity of Proteins by Converting Them into Ligands of Several Endocytic Receptors Involved in Antigen Uptake by Dendritic Cells and Macrophages. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0123293>
- Bitadze, P. H. G. H. G. T. (2021). Hematological Parameters Changes in Patients with Breast Cancer. *Clinic Lab*, 67–75.
- Cabeza-Cabrero, M., Cardoso, A., Minutti, C. M., Pereira Da Costa, M., & Reis E Sousa, C. (2021). Dendritic Cells Revisited. *Annual Review of Immunology*, 39(Volume 39, 2021), 131–166. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-061020-053707/1>

- Chanana, M., Rivera-Gil, P., Correa-Duarte, M. A., Liz-Marzán, L. M., & Parak, W. J. (2024). Physicochemical Properties of Protein-Coated Gold Nanoparticles in Biological Fluids and Cells before and after Proteolytic Digestion. *Bio-Nano Interfaces*, 1005–1017. <https://doi.org/10.1201/9781003306498-39>
- Couto, C., Vitorino, R., & Daniel-da-Silva, A. L. (2017). Gold nanoparticles and bioconjugation: a pathway for proteomic applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 238–250. <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1141392>
- Cueni, L. N., & Detmar, M. (2008). The Lymphatic System in Health and Disease. *Lymphatic Research and Biology*, 6(3–4), 109. <https://doi.org/10.1089/LRB.2008.1008>
- David D. Chaplin, M.D., Ph. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S345. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.01.002>
- Dong, B., Dai, G., Xu, L., Zhang, Y., Ling, L., Sun, L., & Lv, J. (2014). Tumor cell lysate induces the immunosuppression and apoptosis of mouse immunocytes. *Molecular Medicine Reports*, 10(6), 2827–2834. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2606>
- Eiz-Vesper, B., & Schmetzer, H. M. (2020). Antigen-presenting cells: Potential of proven und new players in immune therapies. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 47(6), 429–431. <https://doi.org/10.1159/000512729>
- El-sayed, A., & Kamel, M. (2020). *Advances in nanomedical applications : diagnostic , therapeutic , immunization , and vaccine production*. 19200–19213.
- Ferenbach, D., & Hughes, J. (2008). Macrophages and dendritic cells: What is the difference? *Kidney International*, 74(1), 5–7. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.189>
- Ferreira de Macedo, E., Ducatti Formaggio, D. M., Salles Santos, N., & Batista Tada, D. (2017). Gold Nanoparticles Used as Protein Scavengers Enhance Surface Plasmon Resonance Signal. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 17(12). <https://doi.org/10.3390/s17122765>
- Garg, A. D., Dudek, A. M., & Agostinis, P. (2013). Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: What, when, and how? *BioFactors*, 39(4), 355–367. <https://doi.org/10.1002/BIOF.1125>

- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 2014 14:6, 14(6), 392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
- Haleem, A., Javaid, M., Singh, R. P., Rab, S., & Suman, R. (2023). Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global Health Journal*, 7(2), 70–77. <https://doi.org/10.1016/J.GLOHJ.2023.02.008>
- Huo, Z., Li, Y., Chen, B., Zhang, W., Yang, X., & Yang, X. (2023). Recent advances in surface plasmon resonance imaging and biological applications. *Talanta*, 255, 124213. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2022.124213>
- Jiang, X., & Shapiro, D. J. (2014). The immune system and inflammation in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 673–682. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2013.06.003>
- Kennedy, M. A. (2010). A Brief Review of the Basics of Immunology: The Innate and Adaptive Response. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 40(3), 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.01.003>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Kim, Y. P., Daniel, W. L., Xia, Z., Xie, H., Mirkin, C. A., & Rao, J. (2010). Bioluminescent nanosensors for protease detection based upon gold nanoparticle-luciferase conjugates. *Chemical Communications*, 46(1), 76–78. <https://doi.org/10.1039/b915612g>
- Kumar, R., Kumar, M., & Luthra, G. (2023). Fundamental approaches and applications of nanotechnology: A mini review. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2022.12.172>
- Maraming, P., Daduang, J., & Kah, J. C. Y. (2021). Conjugation with gold nanoparticles improves the stability of the KT2 peptide and maintains its anticancer properties. *RSC Advances*, 12(1), 319–325. <https://doi.org/10.1039/d1ra05980g>
- Mareel, M., & Leroy, A. (2003). Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiological Reviews*, 83(2), 337–376.

<https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00024.2002/ASSET/IMAGES/LARGE/9J0230239012.JPEG>

- McCloskey, E., Paterson, A. H., Powles, T., & Kanis, J. A. (2021). Clodronate. *Bone*, 143, 115715. <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2020.115715>
- Menon, S., S., R., & S., V. K. (2017). A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 516–527. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.08.002>
- Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., & Kunitomo, M. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*, 70(7), 791–798. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01454-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01454-0)
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Sajjadi, M., & Issaabadi, Z. (2019). An Introduction to Nanotechnology. *Interface Science and Technology*, 28, 1–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8>
- Orakpoghenor, O., Avazi, D. O., Markus, T. P., & Olaolu, O. S. (2019). Lymphocytes: A Brief Review. *Scientific Journal of Immunology & Immunotherapy*, 3(1), 4–8.
- Organización Mundial de la Salud. (2022). *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Vangelie, E., Campos, R., Rodriguez, P., Susana, L., Torres, A., Armando, L., Torres, D., & Grillo, R. (2018). Nano based drug delivery systems : recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
- Pudlarz, A., & Szemraj, J. (2018). *Nanoparticles as carriers of proteins , peptides and other therapeutic molecules*. 285–298.
- Pulaski, B. A., & Ostrand-Rosenberg, S. (2000). Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*, 39(1), 20.2.1-20.2.16. <https://doi.org/10.1002/0471142735.IM2002S39>

- Radoja, S., & Frey, A. B. (2000). *Cancer-induced Defective Cytotoxic T Lymphocyte Effector Function: Another Mechanism How Antigenic Tumors Escape Immune-mediated Killing*.
- Rainone, V., Martelli, C., Ottobrini, L., Biasin, M., Borelli, M., Lucignani, G., Trabattoni, D., & Clerici, M. (2016). Immunological characterization of whole tumour lysate-loaded dendritic cells for cancer immunotherapy. *PLoS ONE*, *11*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146622>
- Randall, T. D. (2010). Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (BALT). Structure and function. *Advances in Immunology*, *107*(C), 187–241. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381300-8.00007-1>
- Savina, A., & Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological Reviews*, *219*(1), 143–156. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2007.00552.X>
- Siddique, S., & Chow, J. C. L. (2020). Gold nanoparticles for drug delivery and cancer therapy. *Applied Sciences (Switzerland)*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/app10113824>
- Smith, H. A., & Kang, Y. (2013). The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. In *Journal of Molecular Medicine* (Vol. 91, Issue 4, pp. 411–429). <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1021-5>
- Sopik, V., Nofech-Mozes, S., Sun, P., & Narod, S. A. (2016). The relationship between local recurrence and death in early-stage breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *155*(1), 175–185. <https://doi.org/10.1007/S10549-015-3666-Y>
- Sosa, R. A., & Forsthuber, T. G. (2011). The critical role of antigen-presentation-induced cytokine crosstalk in the central nervous system in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, *31*(10), 753–768. <https://doi.org/10.1089/jir.2011.0052>
- Srijampa, S., Buddhisa, S., Ngernpimai, S., Sangiamdee, D., Chompoosor, A., & Tippayawat, P. (2019). Effects of Gold Nanoparticles with Different Surface Charges on Cellular Internalization and Cytokine Responses in Monocytes. *BioNanoScience*, *9*(3), 580–586. <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00638-8>

- Suzuki, S., Ishida, T., Yoshikawa, K., & Ueda, R. (2016). Current status of immunotherapy. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 46(January), 191–203. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyv201>
- Tukova, A., Nie, Y., Tavakkoli Yarak, M., Tran, N. T., Wang, J., Rodger, A., Gu, Y., & Wang, Y. (2023). Shape dependent protein-induced stabilization of gold nanoparticles: From a protein corona perspective: Special Collection: Distinguished Australian Researchers. *Aggregate*, 4(4). <https://doi.org/10.1002/agt2.323>
- Ventola, C. L. (2017). Cancer Immunotherapy , Part 1 : Current Strategies and Agents. *P&T*, 42(6), 375–383.
- Waldmann, T. A. (2003). Immunotherapy : past , present and future. *Natur*, 9(3), 269–277.
- Wang, P., Wang, X., Wang, L., Hou, X., Liu, W., & Chen, C. (2015). Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(3), 34610. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/3/034610>
- Yang, W., Xia, B., Wang, L., Ma, S., Liang, H., Wang, D., & Huang, J. (2021). Shape effects of gold nanoparticles in photothermal cancer therapy. *Materials Today Sustainability*, 13, 100078. <https://doi.org/10.1016/J.MTSUST.2021.100078>
- Yau, A., Lee, J., & Chen, Y. (2021). Nanomaterials for protein delivery in anticancer applications. *Pharmaceutics*, 13(2), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020155>
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., André, F., Tesniere, A., & Kroemer, G. (2008). The anticancer immune response: Indispensable for therapeutic success? In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 118, Issue 6, pp. 1991–2001). <https://doi.org/10.1172/JCI35180>