

Centro de Investigación de Materiales Avanzados S.C.

Subsede Monterrey

Maestría en Ciencia de Materiales



**CONAHCYT**  
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



**UANL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

---

## Desarrollo y evaluación de nanopartículas de oro funcionalizadas con aptámero anti- HER2 (NS+HeA2\_3) como terapia dirigida contra células de cáncer HER2 positiva

---

*Presenta:*

Ing. Jessica Victoria MARTÍNEZ SARÁOZ

*Asesor:*

Dra. Margarita SÁNCHEZ DOMÍNGUEZ

*Co-asesor:*

Dr. Hugo Leonid GALLARDO BLANCO

Apodaca, Nuevo León

Marzo del 2025

# Resumen

Las nanopartículas de oro conjugado con polímero y aptámeros se han comenzado a investigar como vectores farmacéuticos capaces de interactuar con células de cáncer para dar un tratamiento puntual y más personalizado. Por lo que en este proyecto se sintetizaron nanopartículas de oro empleando un copolímero innovador a base de goma de mezquite y polietilenimina, con el objetivo de desarrollar un sistema altamente eficaz para el tratamiento del cáncer. El nanosistema funcionalizado con un aptámero HER2, demostró una notable capacidad para reducir la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de mama con sobreexpresión de HER2, un biomarcador tumoral ampliamente reconocido.

Los resultados obtenidos indican que el nanosistema desarrollado presenta una excelente biocompatibilidad y hemocompatibilidad, sin causar daño significativo a las células sanas. A concentraciones de 1 y 0.5 ppm, las nanopartículas lograron inhibir hasta un 80% del crecimiento de las células cancerígenas, evidenciando un potencial como tratamiento alternativo. El proyecto presenta nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias más eficientes y personalizadas para la terapia oncológica.

# Agradecimientos

Mi más profundo agradecimiento a Dios, fuente de inspiración y fortaleza en este camino hacia un nuevo logro académico. A mis padres, Ezequiel y Rafaelita, cuyo amor, esfuerzo y paciencia hicieron posible este sueño. Su apoyo incondicional ha sido mi mayor motivación y su ejemplo de perseverancia y dedicación me impulsó en cada paso. A mis hermanos, Carolina y David, que han estado presentes durante esta travesía. Su cariño y aliento fueron un apoyo invaluable.

Deseo expresar mi profunda gratitud a la Dra. Margarita Sánchez, cuya guía experta y apoyo incondicional fueron fundamentales en esta etapa de mi maestría. Su dedicación a mi desarrollo académico ha sido invaluable. Agradezco también al CIMAV Monterrey por abrirme las puertas de esta institución de excelencia, donde he podido crecer como estudiante y como persona. Mi reconocimiento a SECIHTI por su generoso apoyo económico, que me permitió concentrarme en mis estudios y alcanzar mis metas.

Finalmente, quiero agradecer a mi grupo de investigación y amigos, cuyo compañerismo, apoyo académico y amistad incondicional hicieron de esta experiencia un camino enriquecedor. Su conocimiento compartido y aliento constante fueron pilares fundamentales en mi formación.

# Contenido

Resumen .....	2
Agradecimientos .....	3
1. Introducción .....	12
1.1 Planteamiento del Problema .....	13
1.2 Justificación.....	14
1.3 Hipótesis .....	14
1.4 Objetivos .....	14
1.4.1 Objetivo General .....	14
1.4.2 Objetivos Específicos .....	14
2. Antecedentes.....	16
2.1 Cáncer .....	16
2.2 Cáncer de mama .....	17
2.2 Tratamientos actuales.....	19
2.2.1 Nanopartículas de oro como tratamientos alternos .....	19
2.2.2 Polietilenimina ramificada como recubrimiento polimérico de nanopartículas de oro.....	20
2.2.3 Copolímero polietilenimina ramificada modificada con goma de mezquite como recubrimiento de nanopartículas de oro .....	23
2.2.4 Aptámero HER2 como ligando de nanopartículas de oro recubiertas de polímeros.....	24
3. Metodología.....	26
3.1 Copolímero goma de mezquite carboximetilada conjugada con polietilenimina .....	26
3.1.1 Purificación de la goma de mezquite .....	26
3.1.2 Síntesis de goma de mezquite carboximetilada.....	26
3.1.3 Modificación de la goma carboximetilada con la polietilenimina .....	27
3.1.4 Capacidad de amortiguamiento de protones (buffering) .....	28
3.2 Síntesis de nanopartículas de oro recubiertas de polietilenimina ramificada modificada con goma de mezquite .....	28
3.3 Conjugación de las NS@GM-CBX-PEI con el conjugado 4-arm-PEG-Maleimida-aptámero- HER2 .....	32

3.3.1 Reducción y purificación del aptámero HER2 .....	32
3.3.2 Conjugación del aptámero HER2 purificado con el 4-arm-PEG-maleimida .....	33
3.3.4 Incorporación del conjugado 4-arm PEG Maleimida-aptámero HER2 a las NS@GM-CBX-PEI .....	35
3.4 Ensayos biológicos .....	35
3.4.1 Ensayo de hemólisis .....	35
3.4.2 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT .....	36
3.4.3 Internalización del nanosistema en células mediante ICP .....	37
4. Resultados y discusión .....	40
4.1 Copolímero goma de mezquite y polietilenimina ramificada .....	40
4.1.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) .....	40
4.1.2 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) .....	47
4.1.3 Potencial zeta .....	51
4.1.4 Capacidad amortiguadora de protones (buffering) .....	52
4.2 Síntesis de NS .....	53
4.2.1 Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis) .....	55
4.2.2 Estabilidad de NS .....	56
4.2.3 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) .....	57
4.2.4 Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta .....	60
4.3 Conjugado Aptámero HER2/4-arm-PEG-maleimida .....	61
4.3.1 Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis) mediante Nanodrop .....	61
4.3.2 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) .....	63
4.3.3 Electroforesis .....	65
4.3 NS+HeA2_3 .....	66
4.3.1 Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta .....	66
4.3.2 Espectroscopia ultravioleta visible (UV Vis) mediante Nanodrop .....	67
4.3.3 Estabilidad del NS+HeA2_3 .....	69
4.3.4 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) .....	70
4.3.5 Microscopia de transmisión electrónica (TEM) .....	71
4.4 Ensayos biológicos .....	73

4.4.1 Ensayo de hemólisis .....	73
4.4.2 Viabilidad celular mediante MTT .....	78
4.4.3 Internalización del nanosistema .....	81
5. Conclusiones .....	84
6. Referencias .....	86
7. Anexos.....	98
A. Evaluación de la densidad celular optima para ensayos de viabilidad celular mediante MTT	98
B. Optimización de metodologías para el ensayo de viabilidad celular MTT .....	100
C. Conceptos básicos .....	103

# Índice de figuras

Figura 1. Tasa de defunciones por tumores malignos en México [12]. .....	16
Figura 2. Efecto esponja de protones. Modificado de [32]. .....	22
Figura 3. Mecanismo de reacción de la modificación de la b-PEI con goma de mezquite. Modificado de [38]. .....	24
Figura 5. Esquema de la metodología de internalización del nanosistema en líneas celulares. ....	39
Figura 5. FTIR de goma de mezquite. ....	41
Figura 6. FTIR de goma de mezquite carboximetilada. ....	42
Figura 7. FT-IR polietilenimina ramificada. ....	43
Figura 8. FT-IR copolímero GM-CBX-b-PEI. ....	44
Figura 9. Espectro de IR de GM, GM-CBX y GM-CBX-b-PEI. ....	47
Figura 10. Espectros XPS C 1s polímeros. ....	48
Figura 11. Espectros XPS O 1s polímeros. ....	50
Figura 12. Espectros XPS N 1s polímeros. ....	51
Figura 13. Capacidad de amortiguamiento del copolímero y sus precursores. ....	53
Figura 14. Diagrama esquemático de la formación de nanopartículas de oro a partir del copolímero. ....	54
Figura 15. Mecanismo de reacción de la unión entre el oro metálico de la superficie de las nanopartículas y el grupo amino del copolímero. ....	55
Figura 16. Espectroscopia de nanopartículas de oro recubiertas del copolímero GM-CBX-b-PEI y sus precursores. ....	55
Figura 17. Estabilidad coloidal de NS. ....	56
Figura 18. Espectros XPS de NS. ....	58
Figura 19. Espectros XPS de GM-CBX-b-PEI. ....	60
Figura 20. Espectroscopia ultravioleta visible del conjugado aptámero HER2-4-arm-PEG- Maleimida. ....	62
Figura 21. Mecanismo de reacción del enlace tiol-maleimida. ....	63
Figura 22. Esquema del conjugado Aptámero HER2/4-arm-PEG-maleimida. ....	63

Figura 23. Espectros XPS del conjugado aptámero HER2-4-arm-PEG-Maleimida. ....	64
Figura 24. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del aptámero HER2 y su conjugado con PEG.....	66
Figura 25. Espectroscopia ultravioleta visible de NS y NS+HeA2_3. ....	67
Figura 26. Representación esquemática de la interacción electrostática NS-aptámero-PEG.....	68
Figura 27. Estabilidad coloidal del NS+HeA2_3.....	69
Figura 28. Espectros XPS del NS+HeA2_3. ....	71
Figura 29. Micrografías de TEM del NS+HeA2_3 en escala de 10 y 50 nm. ....	72
Figura 30. Hemólisis de polímeros a 0.03 ppm. ....	75
Figura 31. Hemólisis de polímeros a 0.1 ppm. ....	75
Figura 32. Hemólisis de polímeros a 0.3 ppm. ....	76
Figura 33. Hemólisis de NS y NS+HeA2_3. ....	77
Figura 34. Evaluación de la citotoxicidad inducida por NS y nanosistemas completos en la línea celular de cáncer de mama HCC1954, cuantificada mediante el ensayo colorimétrico MTT.....	79
Figura 35. Evaluación de la citotoxicidad inducida por NS y nanosistemas completos en la línea celular sana VERO CCL-81 CCL-81, cuantificada mediante el ensayo colorimétrico MTT.....	80
Figura 36. Densidad celular VERO CCL-81 CCL-81.....	99
Figura 37. Densidad celular HCC1954. ....	99
Figura 38. Placa de 96 pocillos para metodologías experimentales realizadas en el ensayo MTT.	102
Figura 39. Viabilidad celular mediante distintas metodologías de MTT. ....	103
Figura 40. Polietilenimina ramificada (b-PEI) [116].....	106
Figura 41. Estructura química de la goma de mezquite [41]. ....	106
Figura 42. Comparación entre la estructura del ADN y ARN. Modificada de [119]. ....	107
Figura 43. Reducción de sal de tetrazolio a cristales de formazán [124]. ....	108
Figura 44. Metabolismo de MTT por células viables.....	108



# Índice de tablas

Tabla 1. Subtipos de cáncer de mama [16], [18].	18
Tabla 2. Tratamientos convencionales utilizados en el cáncer de mama [19].	19
Tabla 3. Aptámero como biomarcador y agente terapéutico para la disminución de viabilidad celular en células cancerosas.	25
Tabla 4. Diseño experimental para NS con copolímero GM-CBX-b-PEI 0.7%.	29
Tabla 5. Diseño experimental para NS con copolímero GM-CBX-b-PEI 0.8%.	30
Tabla 6. Diseño experimental para NS con copolímero GM-CBX-b-PEI 0.9%.	31
Tabla 7. Diseño experimental para NS con copolímero GM-CBX-b-PEI 1% y 1.5%.	31
Tabla 8. Condiciones para la síntesis de nanopartículas de oro.	32
Tabla 9. Condiciones experimentales utilizadas para realizar la electroforesis en gel.	34
Tabla 10. Polímeros, NS y NS+HeA2_3 analizados mediante hemólisis.	36
Tabla 11. Ajuste de concentraciones para pruebas de viabilidad celular mediante MTT.	37
Tabla 12. Ajuste de concentraciones para pruebas de internalización.	38
Tabla 13. Asignación de bandas para la goma de mezquite.	41
Tabla 14. Asignación de bandas para la goma de mezquite carboximetilada.	42
Tabla 15. Asignación de bandas para la polietilenimina ramificada.	43
Tabla 16. Asignación de bandas para el copolímero GM-CBX-b-PEI.	46
Tabla 17. Asignación de bandas de XPS de C 1s de los polímeros.	49
Tabla 18. Asignación de bandas de XPS de O 1s de los polímeros.	50
Tabla 19. Asignación de bandas de XPS de N 1s de los polímeros.	51
Tabla 20. Potencial zeta del copolímero GM-CBX-b-PEI a distintos pH.	52
Tabla 21. Asignación de bandas de XPS de NS.	58
Tabla 22. Asignación de bandas de XPS de GM-CBX-b-PEI.	59
Tabla 23. Tamaño y carga superficial de NS GM-CBX-b-PEI.	61
Tabla 24. Asignación de bandas de XPS del conjugado aptámero HER2-4-arm-PEG-Maleimida.	65
Tabla 25. Tamaño y carga superficial del NS+HeA2_3.	67
Tabla 26. Asignación de bandas de XPS del NS+HeA2_3.	70

Tabla 27. Clasificación del grado de hemólisis según el índice hemolítico .....	73
Tabla 28. Parámetros para la medición de la internalización del NS+HeA2_3 en líneas celulares. 81	
Tabla 29. Variaciones del protocolo del ensayo de MTT. ....	101

# Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Cálculo de porcentaje de hemólisis. ....	36
Ecuación 2. Cálculo de porcentaje de viabilidad. ....	37
Ecuación 3. Concentración de Au con relación a la cantidad de células recuperadas. ....	81
Ecuación 4. Porcentaje de internalización del nanosistema en células. ....	82

# 1. Introducción

El cáncer es una enfermedad que provoca que las células normales del organismo evolucionen a tumorales y es la enfermedad que causa más defunciones en el mundo, según reporta la Organización Mundial de la Salud (OMS) [1]. El cáncer de mama es un grave problema de salud pública que afecta a millones de mujeres en todo el mundo. En México, la situación es aún más alarmante, ya que se posiciona como la tercera causa de muerte por cáncer en este grupo poblacional. [2].

En la actualidad, a pesar de los avances en los tratamientos para el cáncer, se sigue utilizando en un porcentaje alto la quimioterapia, hormonoterapia y radioterapia, la cual es efectiva, sin embargo, esta puede causar toxicidad, afectación ósea y otros efectos secundarios [3]. La creciente resistencia a los tratamientos convencionales ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Los sistemas nanopartícula-aptámero representan una alternativa prometedora en este sentido, ya que, al combinar la alta especificidad de los aptámeros con las propiedades de las nanopartículas, se pueden diseñar terapias personalizadas para cada paciente[4].

Las nanopartículas de oro han sido estudiadas ampliamente, debido a que poseen características favorables para enfermedades oncológicas como son su tamaño y forma controladas, la versatilidad para lograr diversos tipos de funcionalización superficial, y el desencadenamiento de la quimiosensibilidad.[5].

La conjugación de polímeros con nanopartículas se utiliza en aplicaciones médicas debido a su asequibilidad, bioseguridad, biodegradabilidad y aprobación regulatoria generalizada, así como su baja o nula toxicidad. Estas propiedades dependen del tipo de polímero y su procedencia, es decir natural o sintética, ya que los polímeros naturales resultan ser menos tóxicos que los sintéticos, mientras que los sintéticos promueven la estabilidad y funcionalización con otras moléculas [6]. De modo que, las nanopartículas metálicas conjugadas con polímeros representan un vector de transferencia eficiente para ácidos nucleicos, fármacos y tratamientos para el cáncer.

En los últimos años, los tratamientos contra el cáncer se han enfocado a ser más puntuales al utilizar agentes farmacológicos que son capaces de inhibir el crecimiento, disminuir la viabilidad celular y restringen la metástasis del cáncer. Por lo que, las terapias dirigidas contra el cáncer buscan interferir con proteínas específicas relacionadas con la carcinogénesis [7]. Para lograr una mayor especificidad en el tratamiento, se emplean ligandos capaces de dirigir los nanosistemas hacia las células tumorales, dentro de los cuales se destacan los aptámeros por su alta selectividad. Esta estrategia permite una disminución de la viabilidad celular en células cancerosas, minimizando los efectos adversos en tejidos sanos [8].

La viabilidad celular está influenciada en gran manera por la internalización del tratamiento, debido a que se busca que la dosis del mismo sea lo más puntual posible con el fin de no causar efectos secundarios al paciente. La internalización depende del tamaño de nanopartícula, las características superficiales de la nanopartícula y la ruta que sigue el nanosistema al introducirse a las células cancerosas [9].

En este estudio, se diseñó un nanosistema (NS+HeA2) para el tratamiento de cáncer de mama HER2 positiva. Este sistema consiste en nanopartículas de oro recubiertas con un copolímero biocompatible y funcionalizadas con un aptámero específico para el receptor HER2 (HeA2\_3) [10]. Se demostró que este nanosistema disminuye la viabilidad celular en células cancerosas de mama HER2-positivas (HCC1954) sin afectar significativamente a células sanas (VERO CCL-81). Además, se cuantificó la internalización del nanosistema en las células y se estableció una correlación con la disminución de la viabilidad celular.

## **1.1 Planteamiento del Problema**

Los tratamientos basados en nanosistemas han ganado relevancia en los últimos años. Sin embargo, es fundamental optimizar la dosis para garantizar su eficacia y biocompatibilidad. La internalización celular de los nanosistemas es un factor crítico que influye en su efectividad, y está directamente relacionada con características como tamaño, carga superficial y funcionalización. Este estudio busca establecer una relación dosis-respuesta para determinar la cantidad óptima de

nanopartículas que debe internalizarse en las células para lograr una máxima reducción de la viabilidad celular.

## **1.2 Justificación**

Las nanopartículas de oro han emergido como prometedores vehículos para la entrega de fármacos en tratamientos oncológicos. Su versatilidad para ser funcionalizadas con diversas moléculas bioactivas las convierte en una plataforma ideal para desarrollar terapias altamente específicas. Los resultados preliminares obtenidos en nuestro grupo de investigación con las NS+HeA2\_3 demostró una disminución en la viabilidad celular de células de cáncer de próstata en la línea celular LNCaP con baja expresión de HER2. Sin embargo, es necesario profundizar en la optimización de este nanosistema y evaluar su eficacia y seguridad en modelos celulares in vitro que sobreexpresen en mayor medida el receptor HER2. El objetivo principal de este estudio es determinar la dosis óptima de las NS+HeA2\_3, así como evaluar su impacto en la viabilidad celular, la hemólisis y la biocompatibilidad. Los resultados de esta investigación contribuirán al desarrollo de nuevas terapias más efectivas, específicas y con menores efectos adversos para pacientes con cáncer de mama.

## **1.3 Hipótesis**

El nanosistema NS+HeA2\_3 exhibirá una reducción significativa en la viabilidad de células cancerosas que sobreexpresan HER2, en comparación con las nanopartículas de oro sin el aptámero HER2 (NS). Esta hipótesis se basa en que la unión específica del aptámero HER2 a su receptor en las células cancerosas aumentará la internalización del NS+HeA2\_3, lo que a su vez potenciará su efecto citotóxico y disminuirá la viabilidad celular.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

Obtener una reducción estadísticamente significativa en la viabilidad celular a partir de la internalización del nanosistema NS+HeA2\_3 en la línea celular de cáncer de mama (HCC1954).

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Sintetizar el nanosistema compuesto de NS recubiertas de PEI modificado con goma de mezquite conjugadas con el aptámero HeA2\_3.

- Caracterizar el nanosistema mediante espectroscopias ópticas, XPS, TEM y FTIR.
- Cuantificar el efecto de diferentes concentraciones de nanosistemas sobre la hemocompatibilidad y la viabilidad celular.
- Cuantificar la internalización del nanosistema en células mediante ICP-OES.
- Correlacionar la cantidad de oro con las nanopartículas internalizadas y su efecto en el porcentaje de viabilidad celular.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Cáncer

El cáncer es la causa global de muerte de 10 millones de personas al año, en la cual el cáncer de pulmón, próstata, colorrectal, estómago y riñón son los más comunes en hombres mientras que el de mama, colorrectal, pulmón, cervical y tiroideo son los más frecuentes en mujeres [11]. En México, según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en el 2022 se registró un 10.6% de defunciones por tumores malignos, en la cual Ciudad de México, Sonora, Veracruz, Colima, Morelos y Chihuahua fueron las entidades federativas que presentaron las tasas altas de defunción más altas en el país. En la **Figura 1** se observa el incremento de la tasa de mortalidad por cáncer en México a lo largo de los años [12].

Del mismo modo, en el Foro Cáncer, Desafíos en México y América Latina que se llevó a cabo en el Centro Médico Nacional Siglo XXI según reporta la Secretaría de Salud de México, se menciona que el cáncer es la tercera causa de muerte en el país y los tipos de cáncer más frecuentes son el de mama, en segundo lugar, el de próstata y cervicouterino y finalmente el de colon y pulmón [13].

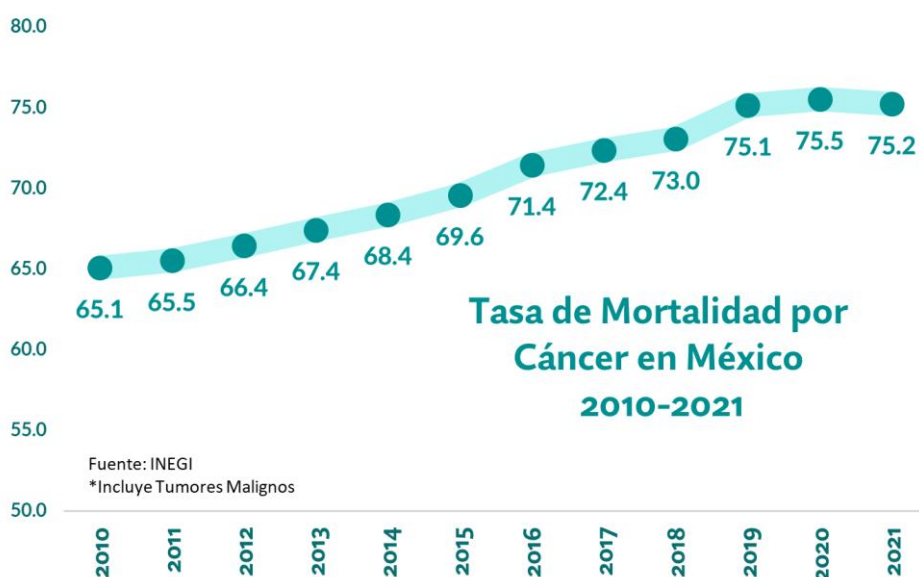


Figura 1. Tasa de defunciones por tumores malignos en México [12].



## 2.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama afecta en mayor medida a la población del sexo femenino presente mientras que el riesgo para el sexo masculino es mínimo. Los factores que influyen en esta enfermedad son principalmente la edad, historial familiar, obesidad, historial reproductivo, así como exposición a radiación [14]. En México, en el 2022 la INEGI reportó una incidencia de 27.64 casos por cada 100 mil habitantes de cáncer de mama y únicamente un 20.2% de las mujeres de 40-69 años se realizaron una mastografía [15].

El cáncer de mama se puede dividir en subtipos dependiendo del origen anatómico, receptividad de hormonas e inmunohistoquímica, que hace referencia a la amplificación o detección de un antígeno en específico en tejidos y células, la **Tabla 1** resume como se clasifica el cáncer de mama según las características mencionadas [16]. Aproximadamente, de un 15 a un 20% de los tumores de cáncer de mama presentan una sobreexpresión de HER2, por lo cual es relevante estudiar los tratamientos para este subtipo de cáncer ya que se promueve el crecimiento de las células cancerosas de manera rápida, provocando una respuesta pobre o nula a los tratamientos convencionales contra este antígeno [17].

Tabla 1. Subtipos de cáncer de mama [16], [18].

Subtipo	Definición	Prognosis	Inmunohistoquímica	Particularidades
<b>Luminal A</b>	Los tumores desarrollados son de grado bajo y tiene una excelente prognosis. Sus receptores de progesterona y estrógeno (PR/ER) son positivos, lo cual retrasa la metástasis y es susceptible a la terapia de hormonas. También se presenta una baja expresión de genes de proliferación.	Bueno	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER positivo</li> <li>• PR positivo</li> <li>• HER2 negativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es el subtipo más común</li> <li>• Tumores de bajo grado</li> <li>• Normalmente se diagnostica en etapas tempranas</li> <li>• Respuesta positiva a terapias hormonales</li> <li>• Tasa más baja de recurrencia</li> </ul>
<b>Luminal B</b>	Los tumores son de grado más alto que los del subtipo A y tiene prognosis regular, más bajo que el luminal A. En este caso, los receptores de progesterona son negativos y/o los de HER2 positivos. Se presenta una alta expresión de genes de proliferación.	Regular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER positivo</li> <li>• PR negativo</li> <li>• HER2 positivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los tumores tienden a ser de mayor grado</li> <li>• Tiende a recurrir más frecuentemente que el luminal A</li> </ul>
<b>HER2 positivo</b>	Los cánceres asociados con el HER2 derivan de la sobreexpresión de esta proteína y tienen una peor prognosis que los subtipos luminales.	Pobre	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER negativo</li> <li>• PR negativo</li> <li>• HER2 positivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Algunos tumores pueden ser susceptibles a los anticuerpos monoclonales anti-HER-2, es decir terapias dirigidas a la proteína HER2</li> <li>• En la mayoría de los pacientes se desarrolla resistencia a los anticuerpos monoclonales anti-HER-2 (particularmente trastuzumab, el fármaco más utilizado contra cáncer de mama)</li> </ul>
<b>Triple negativo (Basal)</b>	Es un cáncer agresivo de tipo molecular, tienen una prognosis muy pobre y también tienen una mayor probabilidad de recaída/recurrencia en aquellos pacientes en los que no se logró la respuesta al fármaco.	Pobre	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ER negativo</li> <li>• PR negativo</li> <li>• HER2 negativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La edad de diagnóstico suele ser más joven que otros subtipos.</li> <li>• No es susceptible a la terapia hormonal o terapia HER2.</li> <li>• Tiende a ser agresivo con altas tasas de recurrencia.</li> </ul>

## 2.2 Tratamientos actuales

La prognosis y tratamiento para el cáncer de mama se basan principalmente en la diseminación linfovascular que hace referencia a la propagación de las células tumorales, grado histológico, estado del receptor hormonal, sobreexpresión HER2, comorbilidades (trastornos o enfermedades adicionales que padece el paciente), estado menopáusico y edad de la paciente [19]. Existen distintas terapias que son utilizadas para dar tratamiento a esta enfermedad como se listan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Tratamientos convencionales utilizados en el cáncer de mama [19].

Tipo de terapia	Medicamentos	Tratamiento
Quimioterapia	Doxorubicin Paclitaxel Epirubicin	Administración de medicamentos mediante vía intravenosa cada 7 a 21 días por 4 a 6 ciclos cada intervención.
Endocrino	Anastrozol Letrozol Tamoxifen	Tabletas orales de 2 a 5 años en apoyo con otros medicamentos.
Dirigido a tejidos	Trastuzumab	Intravenosa en conjunto con quimioterapia y posteriormente cada uno o tres semanas para completar un año.

Dentro de los tratamientos más utilizados en los últimos años, son el uso del fármaco trastuzumab, que es un anticuerpo que es capaz de unirse al HER2 y provocar la apoptosis, así como evitar la proliferación celular. A pesar de ser el tratamiento estándar para el factor 2 de crecimiento epidérmico humano receptor este ha demostrado una citotoxicidad potencial y resistencia al tratamiento por lo que es necesario seguir con la búsqueda de otras alternativas para estos padecimientos y se ha buscado dar solución en el área de la nanomedicina [20].

### 2.2.1 Nanopartículas de oro como tratamientos alternos

Las nanopartículas de oro son vehículos para tratamientos alternativos que se han estado utilizando en los últimos años debido a la versatilidad para lograr controlar su tamaño, forma y funcionalización superficial. De igual manera, las propiedades de las nanopartículas de oro pueden promover por sí mismas la muerte celular mediante el desencadenamiento de la quimiosensibilidad, cuya propiedad hace referencia a la susceptibilidad de las células cancerígenas a los efectos de los fármacos que están conjugados con el nanosistema [5]. Esto se debe a su capacidad para conjugarse

eficientemente con oligonucleótidos y su afinidad por las células, gracias a la utilización de polímeros como la polietilenimina (PEI) [21].

A partir de los estudios realizados durante los últimos años acerca del efecto de la forma de la nanopartícula en relación a cómo afecta a la célula se ha encontrado que la forma más eficiente para el área biomédica son las nanoesferas debido a que estas causan una toxicidad baja o casi nula al momento de interactuar con las células. A comparación de otras morfologías que presentan anisotropía, estas pueden causar toxicidad en las células en caso de no tener un recubrimiento polimérico. Además, se ha confirmado que al tener una morfología esférica o semiesférica se obtiene una mejor captación e internalización celular [22], [23]. Asimismo, se han reportado trabajos en los que se aplican las nanopartículas de oro conjugadas con diversos polímeros con el fin de optimizar su biodegradabilidad, citotoxicidad y especificidad para aplicarlas en células cancerígenas.

Los recubrimientos poliméricos confieren a las nanopartículas de oro una mayor estabilidad en medios biológicos y una amplia gama de propiedades superficiales, lo que las convierte en herramientas versátiles para diversas aplicaciones biomédicas. [24]. Los polímeros ofrecen una gran variedad de grupos funcionales que pueden ser utilizados para conjugar diversas moléculas, como fármacos, anticuerpos, péptidos, ácidos nucleicos y aptámeros. A partir de esto, se han utilizado distintos tipos de polímero que se dividen principalmente en dos grupos principales, naturales tales como proteínas, péptidos y polisacáridos y sintéticos como la polietilenimina (PEI), dendrímeros, y polifosfoésteres [25].

### **2.2.2 Polietilenimina ramificada como recubrimiento polimérico de nanopartículas de oro**

La polietilenimina ramificada (b-PEI) ha sido utilizado en gran manera en conjunto con vehículos tales como nanopartículas, vectores virales y no virales para tratamientos del área oncológica [26], [27]. La PEI se presenta en dos configuraciones principales, lineal (L-PEI) y ramificada (b-PEI). La estructura ramificada de la b-PEI le confiere una mayor densidad de grupos amino, incluyendo primarios, secundarios y terciarios, en comparación con la L-PEI que solo posee grupos secundarios. Esta diversidad de grupos funcionales en la b-PEI facilita la formación de

complejos estables con ácidos nucleicos, como los aptámeros. Además, la estructura ramificada de la b-PEI promueve un mayor efecto de esponja de protones, lo que facilita el escape endosomal y la liberación del material genético en el citoplasma. Como resultado, la b-PEI es ampliamente utilizada en aplicaciones de entrega de fármacos y genes, ya que su alta densidad de cargas positivas le permite unirse a las cargas negativas de los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos, promoviendo la liberación intracelular, por lo cual el efecto de esponja de protones es fundamental [28].

En comparación con otros polímeros, la polietilenimina ofrece la ventaja de una alta eficiencia de transfección. Su carga positiva le permite interactuar fuertemente con las membranas celulares aniónicas, facilitando la entrada del material genético al interior de la célula [29]. De igual manera, una singularidad de este polímero es su excelente capacidad amortiguadora de protones (buffering) ya que ésta induce el escape endosomal del ácido nucleico (por ejemplo un aptámero), es decir, este atributo provoca el aumento de la presión osmótica en la célula, lo que induce a la ruptura de la membrana endosomal y permite la liberación del ácido nucleico en el citoplasma, por lo que esto favorece a los nanosistemas en los que se busca una liberación de ácidos nucleicos como tratamiento a células malignas, especialmente a las cancerígenas [30]. Sin embargo, una de las mayores preocupaciones sobre el uso de la b-PEI son los reportes de toxicidad hacia las células y el porcentaje de hemólisis que puede causar, de modo que se ha optado por su conjugación con diversos biopolímeros, entre ellos las gomas naturales [29].

La investigación en el campo de los copolímeros basados en PEI y gomas naturales ha cobrado gran relevancia en los últimos años. Entre los estudios más destacados se encuentra el realizado por Pinilla y colaboradores, quienes exploraron las propiedades de un copolímero de goma de mezquite y PEI ramificada. La versatilidad de este material, evidenciada por su capacidad de amortiguar protones y unirse a ácidos nucleicos, sugiere un amplio rango de aplicaciones. En particular, su potencial biomédico es notable, ya que podría emplearse en la liberación controlada de fármacos en células tumorales, gracias a su mecanismo de acción basado en el efecto de la esponja de protones [31].

### 2.2.2.1 Efecto de la esponja de protones

La hipótesis de la esponja de protones menciona que es un proceso inducido por ósmosis, el cual es desencadenado por la capacidad de amortiguación de protones de los poliplejos, que son sistemas poliméricos que contienen genes o ARN unidos a través de interacciones electrostáticas, como se muestra en la **Figura 2**. Esto se da cuando los poliplejos que contienen grupos aminos protonables entran a la célula mediante endocitosis para colocarse en las vesículas endosomales. Posteriormente, las bombas de protones V-ATPasa unidas a la membrana producen protones hacia el lumen endosomal. Debido a que el polímero utilizado, idealmente tiene una alta capacidad de buffering, el pH no cambia significativamente. A causa de que el polímero tiene múltiples grupos aminos disponibles, estos se comienzan a protonar y se continúan produciendo protones hacia el lumen debido a que el mecanismo de la célula busca disminuir el pH. Consecutivamente, a esta producción de protones es acompañada por la adición de iones cloruro con el fin de mantener la osmolaridad del sistema, lo que origina el hinchamiento de la endosoma y del polímero, para finalmente provocar la ruptura endosomal y liberar el contenido del sistema en el citosol de la célula [32].

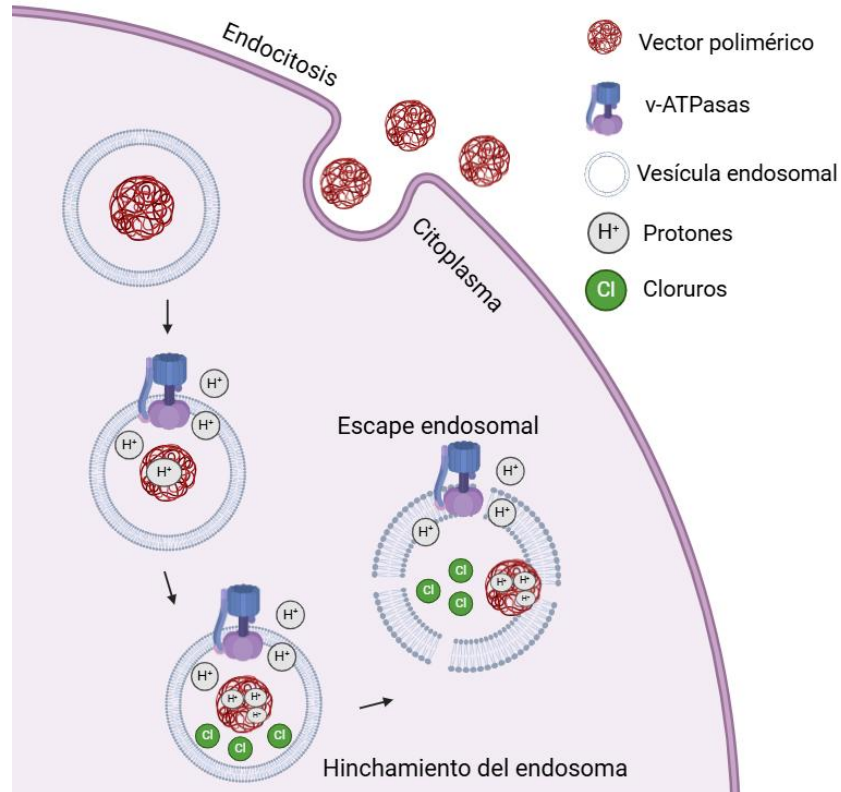


Figura 2. Efecto esponja de protones. Modificado de [32].

### 2.2.3 Copolímero polietilenimina ramificada modificada con goma de mezquite como recubrimiento de nanopartículas de oro

En la síntesis de nanopartículas, las gomas naturales desempeñan un papel crucial como agentes reductores y estabilizantes, ofreciendo una alternativa sostenible y biocompatible a los agentes químicos convencionales [33].

La goma de mezquite sobresale entre otras gomas naturales, como lo es la goma guar, goma gellan y goma arábica, ya que no requiere calentamiento para su uso y disolución, además presenta una menor viscosidad y mayor capacidad de emulsificación debido a su contenido proteico, por lo que la conjugación de la goma de mezquite con la b-PEI ha mostrado mejores resultados que su combinación con otras gomas naturales [34].

La conjugación de una goma natural con un polímero sintético se da mediante la reacción entre sus grupos funcionales, lo cual da lugar a un copolímero con propiedades de ambos, lo cual mejora su funcionalidad. Para que se produzca dicha conjugación, es necesario proveer las condiciones y parámetros de reacción adecuados para activar los grupos funcionales correctos. En el caso de la goma de mezquite, se busca carboximetilar este polímero mediante la sustitución de sus grupos alcohol por grupos carboxilos como se observa en la Figura 3. Esta reacción permite la posterior formación del copolímero, mediante su conjugación con polietilenimina mediada por los agentes de acoplamiento. Los agentes de acoplamiento aumentan la eficiencia y favorecen la reacción del enlace de carbodiimida, con el propósito de activar los grupos carboxilos ( $\text{—COOH}$ ) para su conjugación con aminas primarias ( $\text{—NH}_2$ ), que en el caso de la conjugación entre la goma de mezquite carboximetilada y la polietilenimina es ideal debido a los grupos activos que posee, el esquema de esta conjugación se muestra en la **Figura 3** [35], [36], [37]. Por otra parte, los sistemas de tratamiento oncológico basados en nanopartículas requieren, además de vehículos y copolímeros biocompatibles, moléculas capaces de reconocer y atacar específicamente a las células cancerígenas. Los aptámeros, ácidos nucleicos diseñados para unirse a blancos moleculares específicos con alta afinidad, se destacan como herramientas ideales para esta función, ofreciendo una terapia altamente dirigida. Esta combinación única de propiedades biocompatibles de un

polímero natural y las características de un polímero sintético, como la amortiguación y la afinidad por ácidos nucleicos, hace de este copolímero un candidato ideal para aplicaciones en oncología.

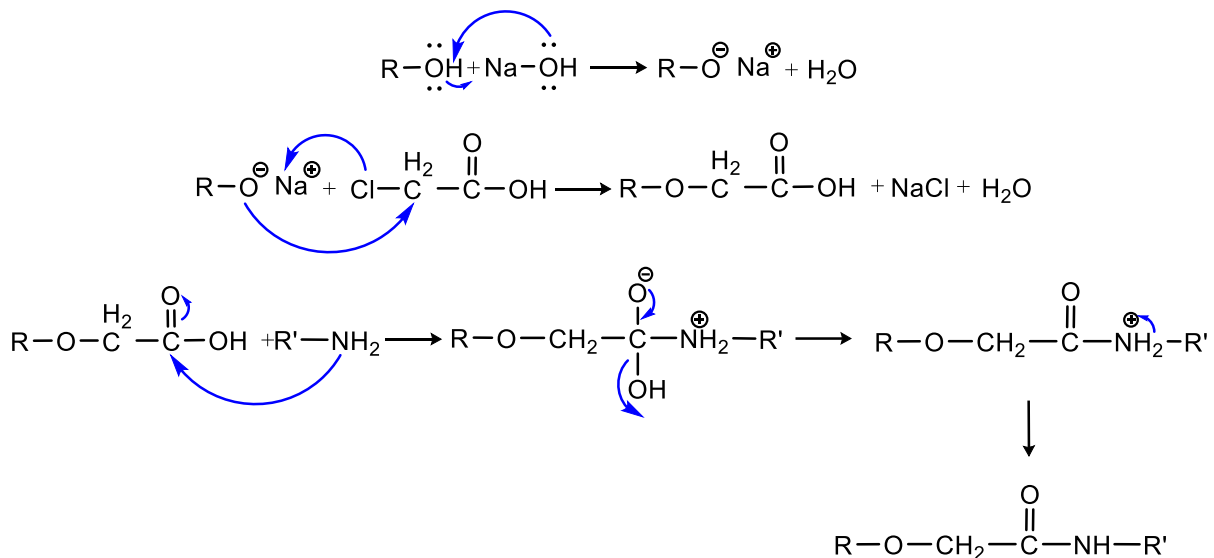


Figura 3. Mecanismo de reacción de la modificación de la b-PEI con goma de mezquite. Modificado de [38].

#### 2.2.4 Aptámero HER2 como ligando de nanopartículas de oro recubiertas de polímeros.

La familia ErbB o HER es uno de los receptores más comunes para las terapias dirigidas. En particular, la sobreexpresión de HER2 (ErbB2) es encontrado en 20-30% de cáncer de mama, por lo que el uso del aptámero HER2 como biomarcador contra el cáncer ha sido utilizado últimamente [39]. Además de ser un excelente biomarcador, los aptámeros han comenzado a desarrollarse como portadores de tratamientos como fármacos o ácidos nucleicos, sin embargo, en algunos estudios se ha demostrado que el aptámero sin ninguna carga farmacéutica ha sido capaz de disminuir la viabilidad celular en diversas líneas celulares como se muestra en la **Tabla 3** [10], [40].



Tabla 3. Aptámero como biomarcador y agente terapéutico para la disminución de viabilidad celular en células cancerosas.

Referencia	Aptámero utilizado	Tipo de nanopartícula	Línea celular en la que se aplica el aptámero	Viabilidad celular con aptámero	Viabilidad celular con aptámero y fármaco
[10]	HeA2_1 y HeA2_3 (Aptámeros cortos de ADN específicos de HER2 de alrededor de 40 nucleótidos)	N/A	SKBR3, línea celular de cáncer de mama	HeA2_1 y HeA2_3 presentaron una viabilidad celular de 82.2% y 80%, respectivamente.	N/A
[40]	Aptámero Anti-HER2	Nanoestrellas de oro		El aptámero Anti-HER2 se evaluó a 24, 48 y 72 horas y se obtuvieron porcentajes de viabilidad de 59%, 48%, 38%, respectivamente.	
[38]	Aptámero HER2	Nanopartículas de oro recubiertas de b-PEI modificadas (NS@b-PEI-GM) con goma de mezquite.	LNCaP, células de cáncer de próstata	Las NS@b-PEI-GM-aptamero-HER2 se evaluaron a tres concentraciones, 4.6 y 0.46 ng/ $\mu$ L, y se obtuvieron porcentajes de viabilidad de 55% y 62%, respectivamente.	Al nanosistema NS@b-PEI-GM-aptamero-HER2 se añadió un plásmido (pEGFP-TRAIL) como tratamiento y a las mismas concentraciones se obtuvo una viabilidad de 63% y 78%, respectivamente.

### 3. Metodología

La metodología empleada en este trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Materiales Avanzados (CIMAV), S.C., Subsede Monterrey, Nuevo León y en la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), en el laboratorio de nanomedicina de la Facultad de Medicina. El proyecto se basó en el nanosistema siguiendo el protocolo descrito por Pinilla en su tesis doctoral, el cual se optimizó y se evaluó en una línea celular que sobreexpresa HER2 para finalmente cuantificar la internalización del nanosistema.

#### 3.1 Copolímero goma de mezquite carboximetilada conjugada con polietilenimina

##### 3.1.1 Purificación de la goma de mezquite

Para la purificación de la goma de mezquite, se tomaron perlas de goma de mezquite obtenidos de la agropecuaria y servicios las mieles de sonora S.C. de R.L. de C.V., de Hermosillo Sonora, México. Para la selección de las perlas, se utilizaron únicamente las que no contenían residuos con coloración oscura provenientes del mismo árbol de mezquite. Una vez separadas, se limpiaron y se pulverizaron 10 g de goma de mezquite utilizando un mortero. La goma de mezquite se hidrato durante 24 horas utilizando agua desionizada y posteriormente se filtró mediante vacío utilizando un papel filtro Whatman No. 2. Finalmente, la muestra se congeló durante 24 horas y se liofilizó por 24 horas para obtener un polvo.

##### 3.1.2 Síntesis de goma de mezquite carboximetilada

A la goma de mezquite purificada se le realizó una reacción de carboximetilación de los grupos hidroxilo. Se pesaron 10 g de GM y se disolvieron en 140 mL de agua desionizada. Por otro lado, se pesaron 12 g de hidróxido de sodio (NaOH) y se disolvieron en 60 mL de una solución acuosa de etanol (80% v/v). Ambas soluciones fueron añadidas a un matraz de tres bocas al cual se le ha implementado un reflujo. Posteriormente, se mezclaron bajo agitación constante a temperatura ambiente (25 °C) durante 15 min. Consecutivamente, se adicionaron 16 g de ácido cloroacético a la mezcla anterior bajo condiciones de agitación, y se ajustó la temperatura a 70 °C durante 60 minutos. A continuación, se detuvo el calentamiento y la agitación, y se añadieron 200 mL de etanol frío. La dispersión obtenida fue inicialmente lavada con etanol y centrifugada en un equipo Eppendorf 5810 R (4500 rpm, 20 minutos), y un segundo lavado se realizó a las mismas condiciones

decantando el sobrenadante. Después, se ajustó el pH de la solución a 7 usando ácido acético glacial. Finalmente, se realizó un tercer lavado con una solución acuosa de etanol (80% v/v) y con agua desionizada. Para secar el sólido, se congeló y posteriormente se liofilizó durante 24 horas, para proceder a su almacenamiento a temperatura ambiente y su posterior caracterización y conjugación con la b-PEI (25 kDa).

### **3.1.3 Modificación de la goma carboximetilada con la polietilenimina**

Una vez obtenida la goma de mezquite carboximetilada (GM-CBX), se procedió a realizar su conjugación con el polímero b-PEI. A la GM-CBX se le realizó una activación de grupos carboxilos de la GM-CBX sintetizada, utilizando como agentes de acoplamiento la 1-etil-3-(3 dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinamida (NHS). Se pesaron 3 g de GM-CBX y se disolvieron en 50 mL de buffer MES (0.1 M, pH 6.5), para después colocarlo en un matraz de tres bocas y añadir los agentes de acoplamiento EDC y NHS a una relación molar 1:4:4 (GM-CBX:EDC:NHS). Para el cálculo de la relación molar, se utilizó el peso molecular de 368000 g/mol para la GM-CBX [41]. Los pesos correspondientes a la relación molar 1:4:4 correspondieron a 3 g: 5.06 mg: 3.75 mg.

Dicha mezcla se mantuvo bajo agitación (300 rpm) y a temperatura ambiente (25 °C) durante 24 horas, una vez finalizado este tiempo, se añadieron 100 mL de una solución acuosa de b-PEI 1% (25 kDa) p/V y se ajustó el pH a 6.5 utilizando HCl 1M. Finalmente, la reacción continuó durante 48 horas a 40 °C y bajo agitación constante (400 rpm), para posteriormente ajustar el pH nuevamente a 6.5 y continuar la reacción durante otras 48 horas a 40 °C y bajo agitación constante (400 rpm).

Para la purificación del producto de la reacción anterior, se realizó la diálisis usando membranas de 33 mm y agua destilada durante 24 horas. La preparación de las membranas se realizó siguiendo la metodología establecida por la compañía Sigma Aldrich para las membranas D9652 100FT. Primeramente, la membrana fue lavada con agua corriente durante 3 horas para la eliminación del glicerol. Para retirar los compuestos de azufre se lavó la membrana con una disolución de sulfuro de sodio al 0.3% (p/v) a 80 °C durante 1 minuto. Posteriormente, se procedió a realizar un lavado con agua caliente (60 °C) durante 2 minutos, seguido de una acidificación con

una disolución al 0.2% (v/v) de ácido sulfúrico durante 2 minutos. Luego se enjuagaron las membranas con agua caliente (60 °C) para eliminar el ácido. Finalmente, las membranas se llenaron con la muestra de goma de mezquite y se procedió a realizar la diálisis, cambiando el agua de la diálisis cada 4 horas. Una vez terminadas las 24 horas, el producto fue congelado y después liofilizado durante 72 horas para su posterior caracterización y almacenamiento a temperatura ambiente.

#### 3.1.4 Capacidad de amortiguamiento de protones (buffering)

Para realizar la evaluación de la capacidad amortiguadora del copolímero y sus precursores, se utilizó el protocolo establecido por Pinilla *et al.* [34]. Se prepararon soluciones de GM, GM-CBX, GM-CBX-b-PEI y b-PEI (25 kDa) a una concentración 0.2 mg/mL, donde se disolvieron 6 mg del polímero correspondiente en 30 mL de agua desionizada. Posteriormente, se ajustó el pH a 10.0 utilizando NaOH 0.1 M, una vez el pH se encontraba a 10.0, se adicionaron 25 µL de HCl 0.1 M y se realizó la medición del pH, se repitió este paso hasta alcanzar un pH de 3. El control negativo de esta evaluación fue agua desionizada.

### 3.2 Síntesis de nanopartículas de oro recubiertas de polietilenimina ramificada modificada con goma de mezquite

Para realizar la síntesis de las NS utilizando GM-CBX-PEI como agente reductor y estabilizante, se realizaron distintas combinaciones con los diferentes copolímeros de acuerdo con las relaciones  $W_{Au}:W_{GM-CBX-PEI}$  establecidas, las **Tablas 4-7** muestran los experimentos que se realizaron con el fin de obtener las nanopartículas con mayor estabilidad coloidal y de un tamaño pequeño. Para todos los casos, se preparó una solución acuosa de  $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$  de concentración 1 mM, y se añadió al copolímero según lo establecido en la relación  $W_{Au}:W_{GM-CBX-PEI}$ , adicionalmente, se utilizaron distintos copolímeros en los que se varió la cantidad de polietilenimina contenida en el copolímero. Esta mezcla se homogenizó en el vórtex hasta que el copolímero se solubilizó por completo, y posteriormente la muestra se sometió a un baño de temperatura. Se hicieron distintas combinaciones de las variables con el fin de obtener en primera instancia, el color de nanopartículas adecuado, debido a que se busca un tamaño de nanopartícula pequeño, por lo que se espera una coloración morado rojizo ya que se sabe que la coloración está relacionada con el tamaño de la nanopartícula.

Tabla 4. Diseño experimental para NS con copolímero GM-CBX-b-PEI 0.7%.

Relación <i>W<sub>Au</sub>:W<sub>GM-CBC-PEI</sub></i>	Cantidad de solución de HAuCl <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O (mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Agitación (rpm)	Comentario
1:5	5	70	180	500	Se utilizaron las condiciones que se proponen en el trabajo realizado por Pinilla y colaboradores [38].
1:25			60	450	Se aumentó la cantidad de copolímero y se disminuyó el tiempo ya que se notó una disminución de estabilidad a mayor tiempo.
				300	Se varió la agitación para una mayor estabilidad.
1:10			180	500	Se disminuyó la cantidad de copolímero y se aumentaron los tiempos de reacción.
			120		
1:5		80	1	n/a	Se utilizó la relación de oro y copolímero original, pero se aumentó la temperatura, se disminuyó el tiempo y no se aplicó agitación. En donde se observó que al eliminar la agitación aumento la estabilidad
		90			
1:10	3		3	n/a	Se disminuyó el volumen de la reacción y se aumentó el tiempo de reacción.

Tabla 5. Diseño experimental para NS con copolímero GM-CBX-b-PEI 0.8%.

Relación $W_{Au}:W_{GM-CBC-PEI}$	Cantidad de solución de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Agitación (rpm)	Comentario
1:10	5	80	30	500	Se realizó el cambio de copolímero a un mayor porcentaje de b-PEI, se partió de una temperatura mayor a la original ya que se determinó que una mayor temperatura daba una mayor estabilidad y se aplicó agitación.
1:20					Se aumentó la cantidad de polímero.
1:10	1	90	0.5	n/a	Se utilizó la relación 1:10 debido a que estaba presentando una mejor coloración, pero se disminuyó el volumen de la reacción, se aumentó la temperatura y se probó a tiempos menores ya que se observó que la reacción ocurría en los primeros 30 segundos.
			1		
			2		
			3		
			4		
1:60			1		Se aumentó la cantidad de copolímero para determinar si este aumento proporcionaba la coloración rojiza.
			2		
			3		
			4		
			5		

Tabla 6. Diseño experimental para NS con copolímero GM-CBX-b-PEI 0.9%.

Relación $W_{Au}: W_{GM-CBC-PEI}$	Cantidad de solución de HAuCl <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O (mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Agitación (rpm)	Comentario
1:10	1	60	5	n/a	Se realizaron variaciones en las temperaturas y en los tiempos de reacción para el copolímero con mayor porcentaje de b-PEI que el anterior. Se decidió continuar con tiempos de reacción menor.
		70	5		
			10		
			30		
			60		
		80	1		
			5		
			10		
		90	1		
			5		
			10		
1:20		90	1		Se aumentó la cantidad de copolímero.
			5		
			10		

Tabla 7. Diseño experimental para NS con copolímero GM-CBX-b-PEI 1% y 1.5%.

Relación $W_{Au}: W_{GM-CBC-PEI}$	Cantidad de solución de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Agitación (rpm)	Comentario	
1:5  1:10  1:20	1	90	1	n/a	Se varió la cantidad de copolímero a tres relaciones distintas debido a que se busca una cantidad de copolímero que no cause citotoxicidad, por lo que se mantiene la menor relación que sea capaz de reducir el oro. Se sintetizó a 90 grados debido a que se notó que a esta temperatura la coloración era más rojiza.	
			2			
			5			
			15			
			20			
1:20		70	30			A partir de los resultados de tamaño de partícula por DLS de los experimentos previos, se modificó la temperatura y el tiempo con el fin de aumentar la estabilidad.
			90			
			180			

Para las nanopartículas finales utilizadas en el proyecto, se pesaron 19.69 mg de copolímero y se adicionaron 5 mL de la solución de precursor de oro. Esta mezcla se homogenizó en el vórtex hasta que el copolímero se solubilizó por completo, y posteriormente la muestra se sometió a un baño de temperatura a 70 °C, con agitación únicamente en el baño de temperatura durante 30

minutos, para obtener finalmente una dispersión coloidalmente estable de nanopartículas de color morado rojiza. La **Tabla 8** muestra el resumen de las condiciones para el método de síntesis utilizado.

Tabla 8. Condiciones para la síntesis de nanopartículas de oro.

Relación <i>WAu:WGM-CBC-PEI</i>	Cantidad de solución de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Agitación (rpm)
1:20	5	70	30	Únicamente en el baño de temperatura a 400 rpm (no en la mezcla de reacción)

Por último, la dispersión de NS obtenida se colocó en tubos Vivaspin 6 de la marca Sartorius y se centrifugaron en un equipo Eppendorf 5810 R (3000 rpm, 15 minutos), realizando cuatro lavados con agua desionizada, y un último lavado con agua desionizada a 4000 rpm durante 15 minutos. Esto, con el fin de eliminar los residuos que no forman parte de las nanopartículas, tales como el copolímero no unido a las nanopartículas y residuos de cloruro, esto para posteriormente conjugadas con el aptámero HER2.

### 3.3 Conjugación de las NS@GM-CBX-PEI con el conjugado 4-arm-PEG-Maleimida-aptámero-HER2

#### 3.3.1 Reducción y purificación del aptámero HER2

El aptámero utilizado en el presente trabajo se sintetizó por la compañía IDT DNA Technologies y se purificó por HPLC, a la secuencia de ADN se le agregó modificaciones funcionales al diseño; en el extremo 5' terminal un grupo tiol, y en el extremo 3' el fluoróforo Cy5.

Para la reducción del aptámero, se preparó una solución del mismo a 100  $\mu\text{M}$ , en la cual se pesaron 0.0011 g de aptámero y se suspendió en 852  $\mu\text{L}$  de buffer TE pH 7.4 (Tris-EDTA) grado biomolecular. Después, se preparó una solución de Ditiotreitól (DTT) de concentración 0.5 M a partir de una solución 1 M. Posteriormente, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de aptámero (100  $\mu\text{M}$ ) y a este volumen se adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de DTT 0.5 M. Finalmente, la solución resultante se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad.



Para realizar el proceso de purificación se utilizó un Spin-X 10,000 MWCO, la cual se preparó lavando la columna con 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  grado biología molecular, la cual se centrifugó en la centrifuga eppendorf 1564C a 11,000 rpm por 7 minutos y se descartó el líquido filtrado.

Posteriormente, se realizó un segundo lavado con 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% grado biología molecular y se centrifugó a 11,000 rpm por 10 minutos y se descartó el líquido filtrado. Seguido de eso, se realizó un segundo centrifugado a las mismas condiciones y se recuperó un segundo volumen del volumen inicial. Después se decantó el líquido restante en la membrana y se dejaron secar las columnas en una gradilla a temperatura ambiente dentro de campana estéril por 20 minutos.

Se procedió a ultrafiltrar los aptámeros tratados con DTT, donde se agregó 100  $\mu\text{L}$  de aptámeros (100  $\mu\text{M}$ ) tratados con el DTT 0.5 M y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de TE 1X pH 7.4. Se centrifugaron por 10 minutos a 11,000 rpm. Se realizaron 2 recuperaciones adicionales, en donde en cada recuperación se agregaban 50  $\mu\text{L}$  de TE 1X pH 7.4. Finalmente, después de la ultrafiltración se recuperaron 50  $\mu\text{L}$  de aptámero y se procedió a cuantificar en el Nanodrop NP1000, donde se obtuvo una concentración final de 88.5  $\mu\text{M}$ .

### **3.3.2 Conjugación del aptámero HER2 purificado con el 4-arm-PEG-maleimida**

Se preparó una dilución de PEG en donde se agregó 1 mg de 4-arm-PEG-maleimida, P.M. 10,000 de la marca Creative PEGWorks en 25 mL de Tris-EDTA Buffer 1X (pH 7.4) de la marca Boston BioProducts. Una vez obtenida la solución de 4-arm-PEG-maleimida a 40  $\mu\text{M}$ , se homogenizó por ultrasonido durante 20 minutos a 28  $^{\circ}\text{C}$  y se esterilizó con un filtro de membrana de celulosa con un poro de diámetro de 0.45  $\mu\text{m}$  de la marca Corning®. Finalmente se guardó en un tubo eppendorff estéril de 50 mL y se almacenó a -20  $^{\circ}\text{C}$ .

Para el conjugado se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de aptámero reducido a 88.5  $\mu\text{M}$  y se añadieron 18  $\mu\text{L}$  de 4-arm-PEG-maleimida a 40  $\mu\text{M}$  con el fin de tener una relación 1:6 por molécula, es decir, se busca tener seis moléculas de aptámeros por cada molécula de 4-arm-PEG-maleimida.

Posteriormente, se dejó incubar la solución durante 2 horas en la oscuridad y finalmente se caracterizó mediante Nanodrop y electroforesis.

### 3.3.2.1 Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 2.5%, en el cual se pesaron 1.25 g de agarosa y se disolvieron en 50 mL de buffer TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). Esta solución se calentó hasta que la agarosa esté disuelta, transparente y sin burbujas. Se dejó enfriar durante 5 minutos y se vertió el gel en la placa de electroforesis y se colocó un peine de 8 carriles, para posteriormente dejar secar el gel a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez pasado el tiempo, se retiró el peine y se añadió buffer TBE 1X a temperatura de 4 °C a la cámara de electroforesis hasta cubrir el gel previamente colocado y se coloca la cámara con el gel durante 1 hora a 4 °C.

Posteriormente, se colocaron las muestras en los carriles correspondientes como se muestran a continuación:

Tabla 9. Condiciones experimentales utilizadas para realizar la electroforesis en gel.

Carril	Muestra	Volumen de la muestra (μL)	Volumen de tinte de gel de ADN (Evagreen 20X) (μL)	Volumen de buffer de carga 5X (μL)	Volumen de TBE 1X (μL)
1	Marcador de peso molecular (25 pb)	5	3	2	0
2	Aptámero HER2 40 μM	4			1
3	Conjugado aptámero HER2/4-arm-PEG-Maleimida 40 μM				
4	Marcador de peso molecular (25 pb)	10			0
5	Conjugado aptámero HER2/4-arm-PEG-Maleimida 40 μM	4			2
6	Marcador de peso molecular (100 pb)	5			0

Después de colocar las muestras, el equipo de electroforesis se conectó a una fuente de corriente continua directa a un voltaje de 85 V durante 10 minutos y luego se aumentó el voltaje a 100 V durante 1 hora y 30 minutos. Finalmente, se colocó el gel en un dispositivo de captura de imágenes UVP Bioimaging Systems EpiChemi 3 Gel Imaging System.

### **3.3.4 Incorporación del conjugado 4-arm PEG Maleimida-aptámero HER2 a las NS@GM-CBX-PEI**

Se adicionaron 6.5  $\mu\text{L}$  del conjugado de aptámero HER2/4-arm-PEG-maleimida a una concentración de 76.6 M a un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de NS(88.5 ppm de Au). Después se colocó la solución bajo agitación y temperatura en el Thermomixer a 300 rpm y 37 °C, durante una hora. Posteriormente, se colocaron 50  $\mu\text{L}$  del nanosistema y 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O grado biológico molecular en una columna Spin-X 100,000 MWCO para eliminar excedente del conjugado a 4000 rpm durante 15 minutos. Finalmente, se caracterizó mediante Nanodrop.

## **3.4 Ensayos biológicos**

### **3.4.1 Ensayo de hemólisis**

#### **3.4.1.1 Lavado de eritrocitos**

Se realizó una toma de muestra de sangre venosa de un donador sano en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, anticoagulante), la cual se centrifugó a 3000 rpm por tres min. El plasma se descartó, se añadió PBS 1X y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones, estos pasos se repitieron 3 veces para obtener el paquete globular. Después, se preparó una dilución 1:99 de eritrocitos, en el cual se agregaron 9800  $\mu\text{L}$  de PBS 1X y 100  $\mu\text{L}$  de eritrocitos lavados previamente.

#### **3.4.1.2 Tratamientos**

Se prepararon las diluciones para los tratamientos en el cual se mezclaron 16  $\mu\text{L}$  de cada tratamiento y 4  $\mu\text{L}$  de la dilución 1:99 de eritrocitos lavados. Posteriormente, se incubaron por 30 minutos a 37 °C en un Thermomixer a 300 rpm, para después centrifugar a 14,000 rpm por 3

minutos. Finalmente, se leyó la absorbancia de hemoglobina del sobrenadante en el NanoDrop a 415 nm. La **Tabla 10** indica las muestras y concentraciones que se analizaron en este ensayo.

Tabla 10. Polímeros, NS y NS+HeA2\_3 analizados mediante hemólisis.

Muestra	Concentración (µg/mL)
Goma de mezquite (GM)	0.03, 0.1 y 0.3
Goma de mezquite carboximetilada (GM-CBX)	
Polietilenimina ramificada (b-PEI)	
Copolímero GM-CBX-PEI	
NS	4, 2.5, 1, 0.5 y 0.1
NS+HeA2_3	

### 3.4.1.3 Cálculo de porcentaje de hemólisis

Para realizar el cálculo del porcentaje de hemólisis, se utilizó la siguiente fórmula. Donde se utilizó como control negativo PBS 1X y como control positivo agua destilada.

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{control negativo}}}{A_{\text{control positivo}} - A_{\text{control negativo}}}$$

Ecuación 1. Cálculo de porcentaje de hemólisis.

Donde, *A* es la absorbancia a 415 nm.

### 3.4.2 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT

Para realizar el ensayo de viabilidad celular, se sembraron 8,000 células por pocillo de dos líneas celulares, VERO CCL-81 CCL-81 y HCC1954, en una placa de 96 pocillos en un volumen de 100 µL de medio celular, DMEM y RPMI, respectivamente. Estas se dejaron en la incubadora en condiciones estándar (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>) durante 24 horas. Se sembraron tres pocillos por cada muestra para obtener triplicados de los resultados.

Se prepararon los tratamientos de NS y del NS+HeA2\_3, en el cual se colocaron 95 µL de medio según la línea celular y 5 µL del tratamiento, por lo que las concentraciones del tratamiento se ajustaron con la relación medio:tratamiento (v/v). En la **Tabla 11** se muestran los ajustes de las concentraciones, con el fin de tener la concentración final adecuada después de su dilución con el medio.

Tabla 11. Ajuste de concentraciones para pruebas de viabilidad celular mediante MTT.

Muestra	Concentración ajustada (ppm)	Concentración final (ppm)
NS y NS+HeA2_3	80	4
	50	2.5
	20	1
	10	0.5
	2	0.1

Al tener los tratamientos a las concentraciones ajustadas, se retiró el medio de las células que se sembraron anteriormente y se colocaron 100 µL de la solución medio-nanosistema y se procedió a incubar la placa nuevamente, en condiciones estándar de incubadora durante 24 horas. Asimismo, se sembraron controles en los que solamente se añadió medio sin nanosistema. Después de las 24 horas, se preparó una solución de medio-MTT suficiente para todos los pocillos (10 µL de MTT por cada 100 µL de medio). Se retiró el medio-nanosistema de los pocillos y se colocaron 100 µL de la solución medio-MTT y se incubó en condiciones estándar de incubadora durante 3 horas.

Una vez terminado el tiempo de incubación, se añadieron 100 µL de isopropanol acidificado a pH 3 y se homogenizó la solución con el fin de disolver los cristales de formazán. Finalmente se midió la absorbancia de cada pocillo en el lector de microplacas a 570 nm y a 651 nm y de las absorbancias obtenidas se realizó la resta de la absorbancia obtenida a 570 nm menos la obtenida a 651 nm. Esa absorbancia se utilizó en la siguiente fórmula.

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{A_{\text{Problema}} * 100}{A_{\text{Control}}}, \text{ donde } A \text{ es la absorbancia}$$

Ecuación 2. Cálculo de porcentaje de viabilidad.

### 3.4.3 Internalización del nanosistema en células mediante ICP

Para realizar el ensayo de internalización, se sembraron 320,000 células VERO CCL-81 CCL-81 y HCC1954 por pocillo en una placa de 6 pocillos en un volumen de 4000 µL (3 pocillos por cada línea celular). Para asegurar la comparabilidad con los resultados del ensayo de viabilidad, se mantuvo la misma densidad celular que en la prueba de viabilidad celular. Tras un periodo de

incubación de 24 horas en condiciones estándar, se procedió a aplicar el tratamiento. Con el objetivo de evaluar el efecto de las concentraciones óptimas, se seleccionaron únicamente aquellas que mostraron mejores resultados en los ensayos de hemólisis y viabilidad celular (1 y 0.5 ppm).

Al igual que en el ensayo de viabilidad celular, se colocaron 3800  $\mu$ L de medio según la línea celular y 200  $\mu$ L del tratamiento, por lo que las concentraciones del tratamiento se ajustaron con la relación medio:tratamiento (v/v). En la **Tabla 12** se muestran los ajustes de las concentraciones, con el fin de tener la concentración final adecuada después de su dilución con el medio.

Tabla 12. Ajuste de concentraciones para pruebas de internalización.

Muestra	Concentración ajustada (ppm)	Concentración final (ppm)
NS+HeA2_3	20	1
	10	0.5

Una vez ajustadas las concentraciones de los tratamientos, se procedió a la remoción del medio de cultivo y adición de 4000  $\mu$ L de la solución medio-nanosistema. Tras 24 horas de incubación en condiciones estándar, se realizaron dos lavados con 2 mL de PBS 1X y se emplearon 2 mL de tripsina para el desprendimiento celular y se dejó en la incubador en condiciones estándares durante 10 minutos con el fin de dejar reaccionar la tripsina. Después de este tiempo, se neutralizó la tripsina con 2 mL de medio fresco y el sobrenadante celular se recolectó y se neutralizó con medio fresco, para posteriormente centrifugar la solución a 1000 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante, para después agregar 1 mL de medio y resuspender.

Con el fin de lograr una relación entre las células y la concentración del tratamiento inicial con las células recuperadas y determinar la concentración esperada, se realizó un conteo de las células mediante una cámara de Neubauer, este procedimiento se realizó para cada tratamiento y concentración evaluada. Finalmente, a la solución final se le realizó una digestión con ácido nítrico y se realizó el conteo de ppm de Au que se encontraba en cada muestra mediante un espectrómetro de emisión de plasma acoplado inductivamente iCAP 6500 DUO Marca Thermo Electron Corporation.

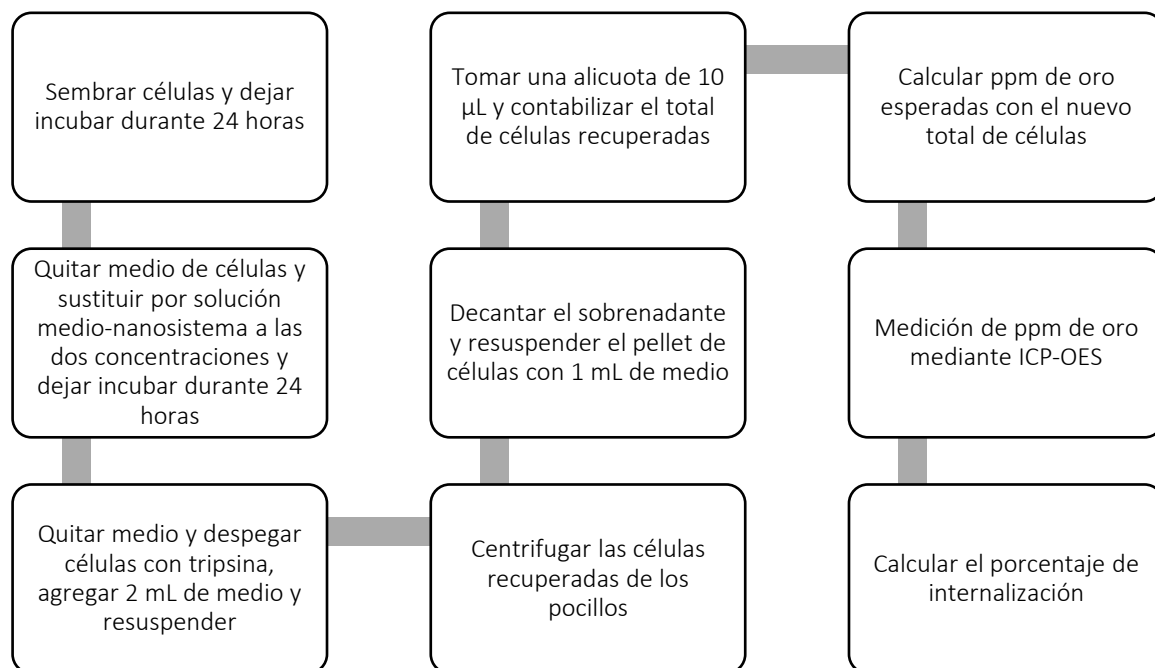


Figura 4. Esquema de la metodología de internalización del nanosistema en líneas celulares.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Copolímero goma de mezquite y polietilenimina ramificada

Los copolímeros se caracterizaron mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT IR), potencial zeta, espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS). También se determinó la capacidad de buffering (amortiguación o “esponja” de protones).

#### 4.1.1 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Se realizó un análisis cualitativo mediante la técnica de espectroscopia FTIR con el fin de determinar la carboximetilación de la goma de mezquite (GM-CBX) y su conjugación con la polietilenimina ramificada (b-PEI).

El FTIR realizado para la goma de mezquite nos indica los grupos funcionales propios del polímero, el cual está compuesto principalmente de grupos alcoholes (OH) y carbonos (CH) en las bandas  $3272.7$  y  $2926.0\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Asimismo, en la **Figura 5** se observa el enlace C-O en  $1008.1\text{ cm}^{-1}$  y las flexiones de las bandas anteriores. Esto es posible confirmarlo con la estructura química de la goma de mezquite el cual es una cadena larga de unidades repetitivas las cuales están conformadas principalmente de alcoholes y éteres, la asignación de bandas de estos grupos funcionales se muestra en la **Tabla 13**. De igual manera, estos grupos funcionales contenidos en la goma de mezquite son confirmados por autores como Pinilla *et al.* y Moreno-Trejo *et al.* donde se observan picos similares a los obtenidos pertenecientes al grupo alcohol y éter en números de onda similar [34], [42].



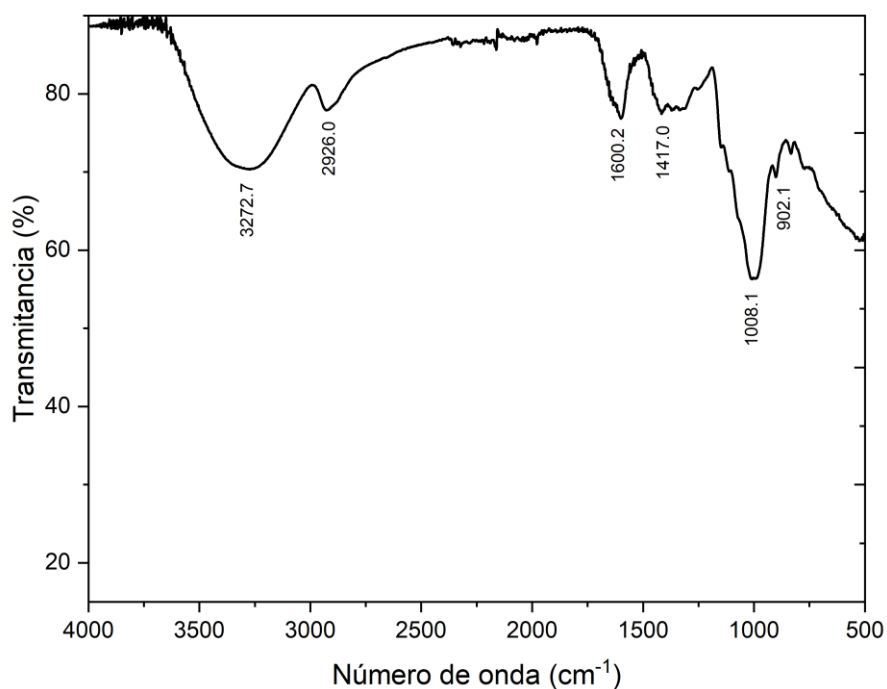


Figura 5. FTIR de goma de mezquite.

Tabla 13. Asignación de bandas para la goma de mezquite.

Numero de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3272.7	Estiramiento O-H
2926.0	Estiramiento C-H
1600.2	Flexión O-H
1417.0	Flexión C-H
1008.1	Estiramiento C-O
902.1	Huella digital

Del mismo modo, mediante los resultados mostrados en la **Tabla 14** y **Figura 6** es posible confirmar la carboximetilación de la goma de mezquite, ya que aparece una banda adicional al espectro de la misma, la cual se le atribuye al enlace C=O que aparece en  $1593.422\text{ cm}^{-1}$ . Lo cual nos indica que el grupo -CHOH de goma de mezquite original, se transformó en -CHOCH<sub>2</sub>COOH, es decir, la carboximetilación del polímero fue exitoso [34], [43]. La comparación del espectro obtenido en este estudio con los de trabajos previos del grupo de investigación, como Pinilla *et al.* y Moreno-Trejo *et al.*, confirma cambios significativos en las intensidades de las bandas,

especialmente las de O-H y C=O. Esto valida la carboximetilación exitosa de la goma de mezquite [34], [44].

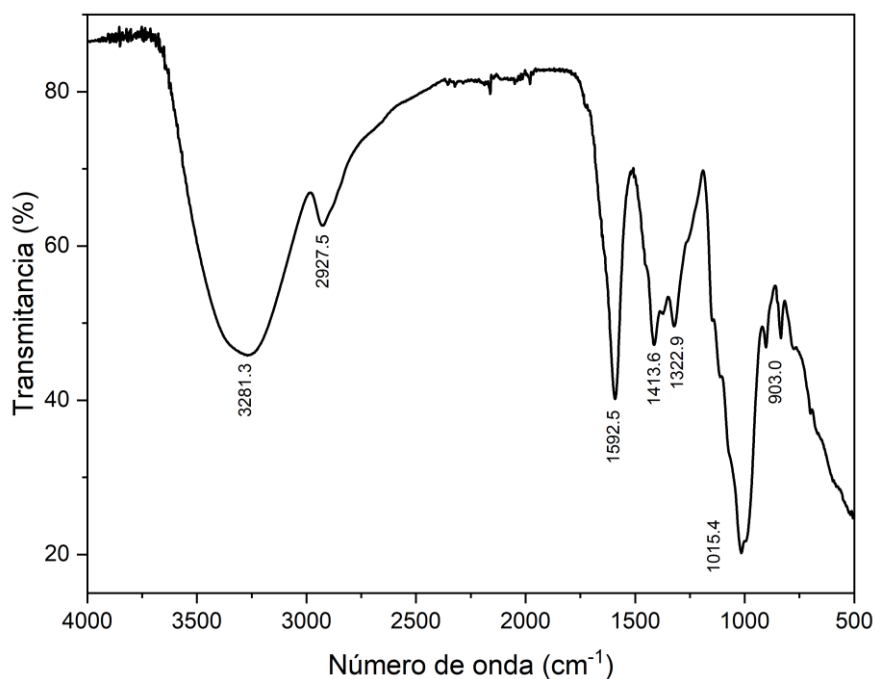


Figura 6. FTIR de goma de mezquite carboximetilada.

Tabla 14. Asignación de bandas para la goma de mezquite carboximetilada.

Numero de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3281.3	Estiramiento O-H
2927.5	Estiramiento C-H
1592.5	Estiramiento C=O
1413.6	Flexión O-H
1322.9	Estiramiento C-O
1015.4	Flexión O-H
903.0	Huella digital

En la **Figura 7** y **Tabla 15** se muestra el espectro perteneciente a la polietilenimina ramificada donde se aprecian los picos típicos de este polímero pertenecientes a las aminas -NH<sub>2</sub> que conforman la estructura química, así como los estiramientos y flexiones del enlace -CH. Esto se puede confirmar en el trabajo realizado por Zhao *et al.* donde se analiza el espectro de FT-IR de la polietilenimina ramificada con un peso molecular de 25kDa, mismo peso de la b-PEI utilizada en

este trabajo, donde se observar un espectro sumamente parecido con el obtenido en el análisis de la b-PEI utilizada en el proyecto [45].

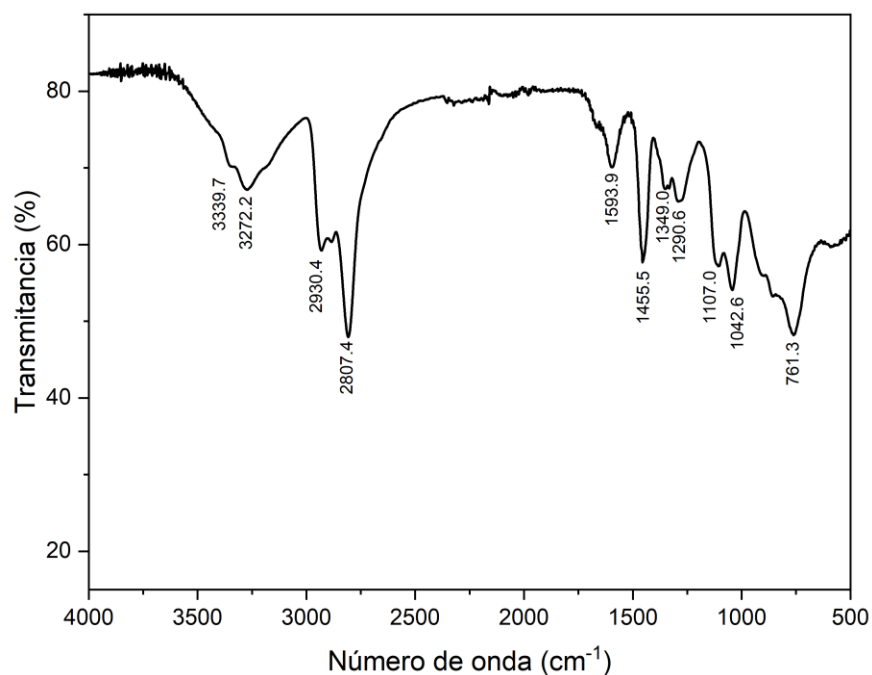


Figura 7. FT-IR polietilenimina ramificada.

Tabla 15. Asignación de bandas para la polietilenimina ramificada.

Numero de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3339.7	Estiramiento N-H
3272.2	
2930.4	Estiramiento C-H
2807.4	
1593.9	Flexión N-H
1455.5	Flexión C-H
1349.0	Estiramiento C-N
1290.6	
1107.0	
1042.6	Torsión N-H
761.3	Balanceo N-H

En las **Figura 8** y en la **Tabla 16** se puede observar los resultados de espectroscopia de infrarrojo donde se evidencia la conjugación de la GM-CBX con la b-PEI mediante los agentes de

acoplamiento EDC y NHS. Es posible destacar la aparición de las bandas entre 3400 y 3200  $\text{cm}^{-1}$  para el enlace N-H así como el cambio en la forma del espectro de la b-PEI sola y el copolímero, lo cual es indicativo de la formación de la amida, así como aproximadamente en las bandas de 1400  $\text{cm}^{-1}$  se encuentra el enlace C-N. Adicionalmente, las bandas entre 3000 y 2800  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al C-H y en 1600  $\text{cm}^{-1}$  a C=O, los cuales corresponden a la estructura esperada que se determinó mediante el mecanismo de reacción. Debido a esto, es posible afirmar la formación de la amida en la conjugación del copolímero, esto se puede confirmar mediante el trabajo realizado por Pinilla *et al.*, donde se observa un espectro similar y la aparición del grupo amida en el copolímero realizado por dichos autores [34]. La observación de una señal de moderada intensidad correspondiente al grupo amida en el espectro sugiere la ocurrencia de conjugación entre GM-CBX y b-PEI. Con el fin de optimizar el proceso de conjugación, se recomienda determinar cuantitativamente el porcentaje de conjugación alcanzado. Este análisis permitirá evaluar la eficiencia de la metodología empleada y establecer las condiciones óptimas para lograr un porcentaje de conjugación ideal. Dicho porcentaje deberá ser lo suficientemente alto para asegurar una reducción eficiente del oro durante la síntesis de nanopartículas, pero a su vez, lo suficientemente bajo para evitar efectos citotóxicos significativos.

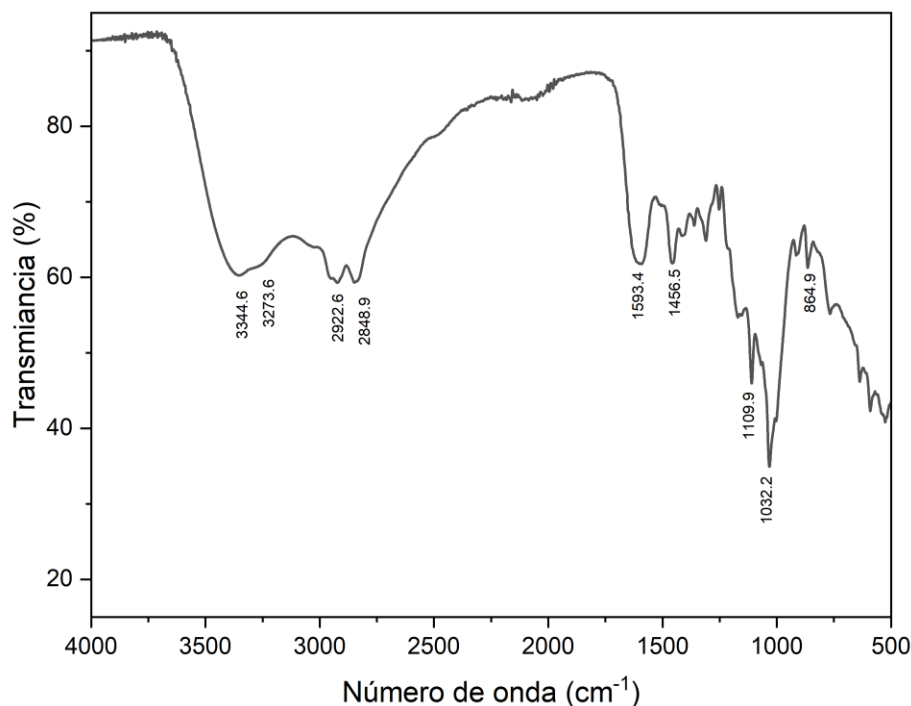


Figura 8. FT-IR copolímero GM-CBX-b-PEI.



Tabla 16. Asignación de bandas para el copolímero GM-CBX-b-PEI.

Numero de onda (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
3344.6	Estiramiento N-H
3273.6	Estiramiento N-H
2922.6	Estiramiento C-H
2848.9	Estiramiento C-H
1593.4	Estiramiento C=O
1456.5	Estiramiento C-N
1109.9	Estiramiento C-O
1032.2	Flexión O-H
864.9	Huella digital

La **Figura 9** presenta los espectros infrarrojos de la goma de mezquite (GM), su derivado carboximetilado (GM-CBX) y el copolímero resultante (GM-CBX-b-PEI). Se observa que la carboximetilación induce cambios significativos en la región de 3281.3, 1592.5 y 1322 cm<sup>-1</sup>, atribuibles a cambios en los enlaces O-H, C=O y C-O. Estos cambios confirman la exitosa modificación química de la GM. Posteriormente, la adición de polietilenimina ramificada (b-PEI) genera nuevas bandas en el espectro del copolímero, indicando la unión entre ambos polímeros. La aparición de un hombro alrededor de 3344.6 y 3273.6 cm<sup>-1</sup> sugiere la presencia de la formación de grupos amida confirmando la presencia de la b-PEI en el copolímero, así como la adición de las bandas a 2922.6 y 2948.9 cm<sup>-1</sup>, correspondientes a C-H y H-C-H.

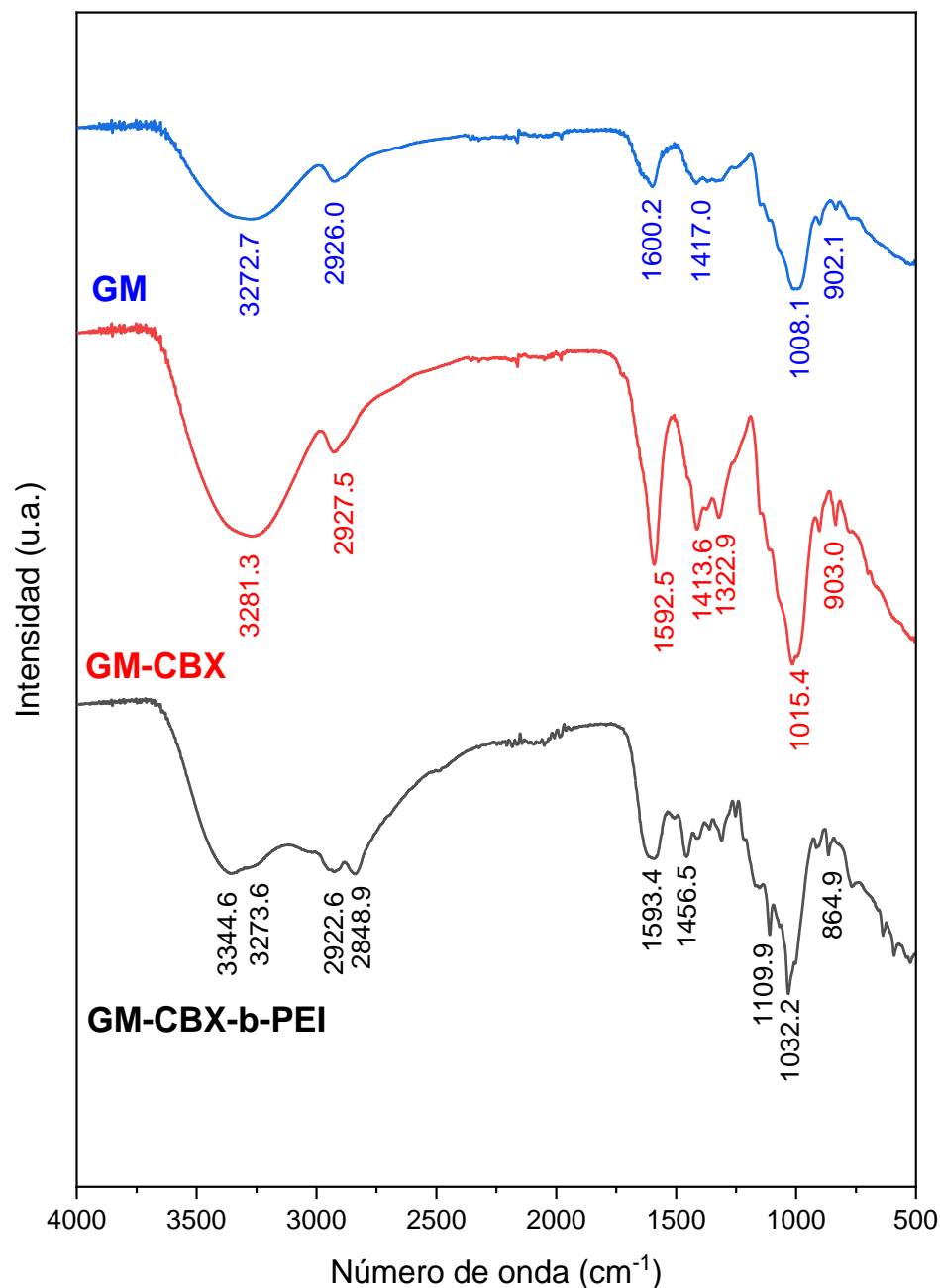


Figura 9. Espectro de IR de GM, GM-CBX y GM-CBX-b-PEI.

#### 4.1.2 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

Se llevó a cabo un análisis XPS para caracterizar la composición elemental y los enlaces químicos de los polímeros, con el objetivo de confirmar la formación del copolímero GM-CBX-b-PEI y la presencia de los grupos funcionales esperados. Se analizaron las regiones de energía correspondientes a C 1s, O 1s y N 1s. Los espectros de C 1s (**Figura 10**) muestran la presencia de los diferentes tipos de enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo característicos de cada

polímero. La asignación detallada de los picos se presenta en la **Tabla 17**, lo cual permite confirmar la estructura química propuesta para el copolímero.

Los espectros de carbono revelan la presencia del enlace C-C en los cuatro polímeros analizados. Además, tres de ellos (excepto la b-PEI) exhiben la característica señal del enlace éter (286.5 eV), atribuible a la composición predominante de la goma de mezquite. Los espectros de oxígeno confirman la presencia del enlace C-O en estos mismos tres polímeros (**Figura 11** y **Tabla 18**). Se observa también una señal a 287.3 eV, correspondiente a un carbono adventicio, producto de la interacción de las especies hidrocarbonadas de los polímeros con el oxígeno, el CO<sub>2</sub> y el agua atmosféricos. Esta señal es ausente en la GM-CBX-b-PEI [46].

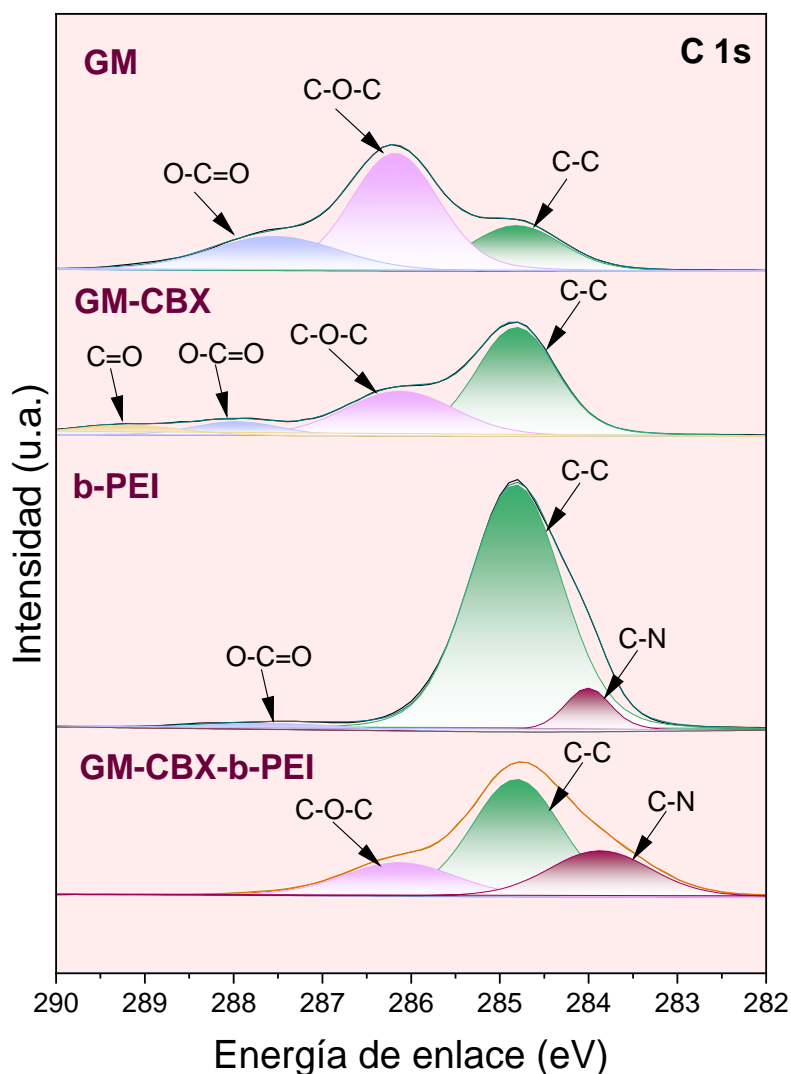


Figura 10. Espectros XPS C 1s polímeros.



Los espectros de carbono de la GM-CBX revelan la presencia de un enlace carbonilo (289 eV), lo cual es una evidencia clara de la carboximetilación de la goma de mezquite. Este resultado indica la exitosa sustitución de los grupos alcohol de la goma por grupos carboxilo. Los espectros de oxígeno confirman esta modificación química, mostrando un nuevo pico correspondiente al enlace O=C-O (532.8 eV). La presencia de los cuatro grupos funcionales identificados en el espectro XPS de la goma carboximetilada es consistente con los resultados obtenidos en estudios previos sobre carboximetilación de polímeros con alto contenido de ácidos carboxílicos. La similitud de los espectros XPS confirma la carboximetilación exitosa de la goma [34], [47].

La b-PEI presenta enlaces carbono-nitrógeno característicos de las iminas (398.4 eV), confirmando la estructura principal del polímero, dicha señal es exclusiva del copolímero, lo que indica una exitosa conjugación entre la GM-CBX y la b-PEI. Además, aparece una nueva señal a 399.7 eV, correspondiente a las amidas (N-C=O), tal como se esperaba debido a la reacción entre la polietilenimina y la goma carboximetilada. Estos resultados se corroboran en los espectros de XPS de N 1s (**Figura 12**). En concordancia con nuestros hallazgos, el trabajo de Kehrer *et al.* demuestra la formación exitosa de grupos amida a partir de la reacción de un polímero con alta densidad de grupos amino (poli(alilamina)) y un compuesto con abundantes grupos carboxilo. El análisis de sus espectros de N 1s revela la aparición de señales correspondientes a grupos imina y amida en energías de enlace similares a las observadas en el presente estudio, lo que refuerza la confirmación de la formación de enlaces amida [48].

Tabla 17. Asignación de bandas de XPS de C 1s de los polímeros.

C 1s		
Energía de enlace (eV)	Asignación	Polímero
283.7	C-N	b-PEI y GM-CBX-b-PEI
284.8	C-C	GM, GM-CBX, b-PEI y GM-CBX-b-PEI
286.5	C-O-C	GM, GM-CBX y GM-CBX-b-PEI
287.3	C-O=C	GM, GM-CBX y b-PEI
289	C=O	GM-CBX

Tabla 18. Asignación de bandas de XPS de O 1s de los polímeros.

O 1s		
Energía de enlace (eV)	Asignación	Polímero
533	C-O	GM, GM-CBX y GM-CBX-b-PEI
532.8	O=C-O	GM-CBX y b-PEI
531.5	C=O	GM-CBX-b-PEI
530.5	H <sub>2</sub> O/O <sub>2</sub>	GM, b-PEI y GM-CBX-b-PEI

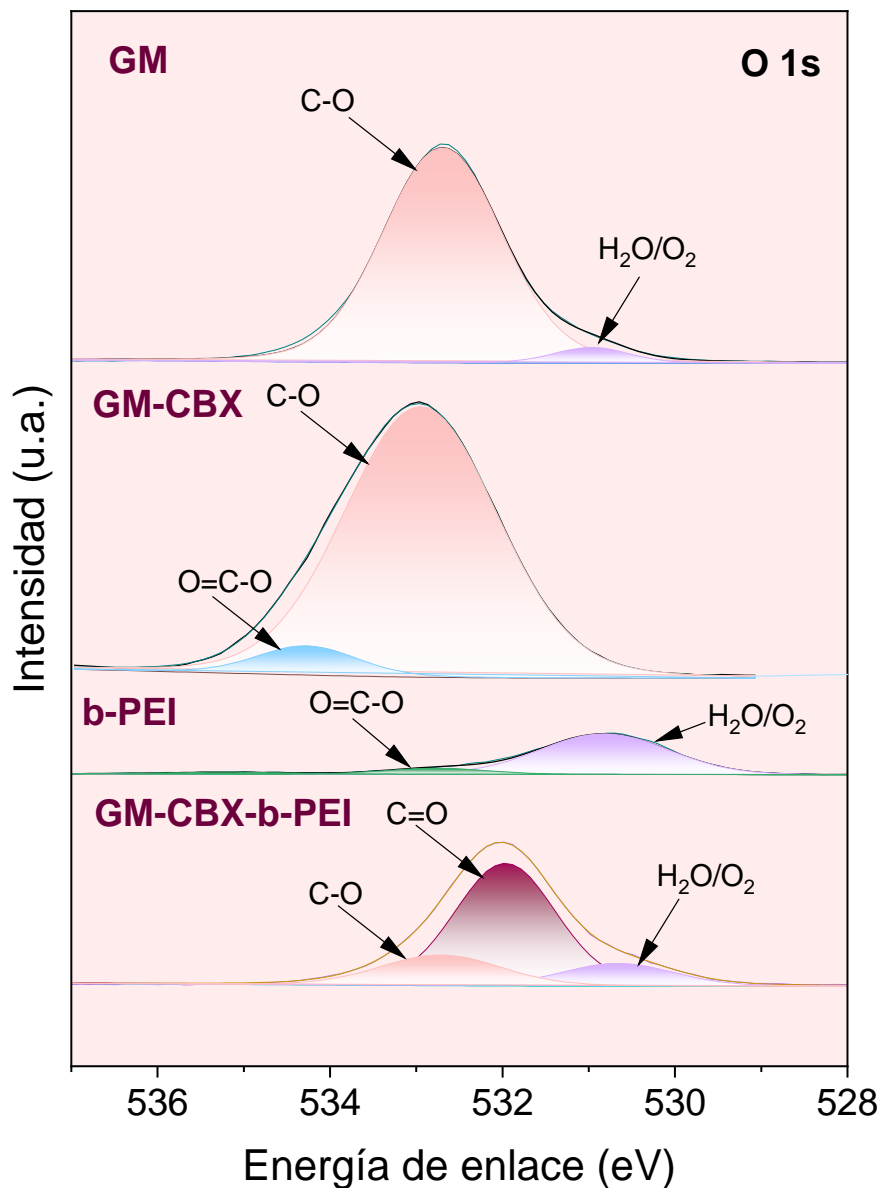


Figura 11. Espectros XPS O 1s polímeros.

Tabla 19. Asignación de bandas de XPS de N 1s de los polímeros.

N 1s		
Energía de enlace (eV)	Asignación	Polímero
533	C=N-C	b-PEI y GM-CBX-b-PEI
532.8	N-C=O	GM-CBX-b-PEI

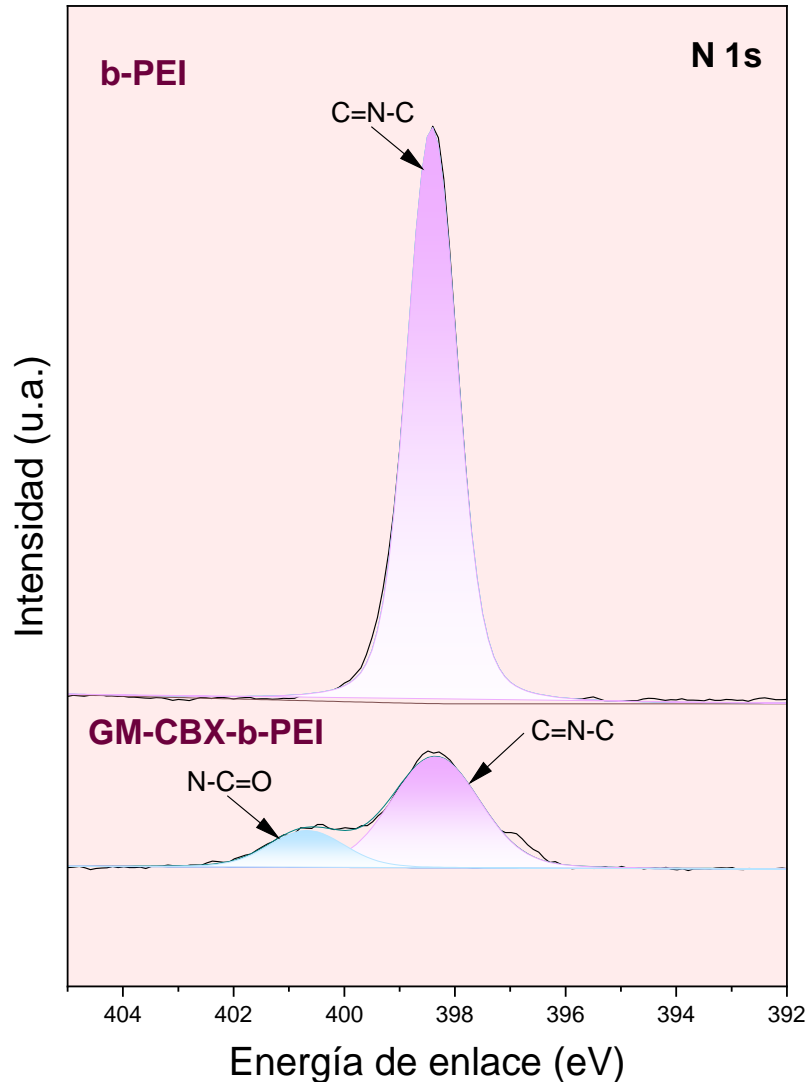


Figura 12. Espectros XPS N 1s polímeros.

#### 4.1.3 Potencial zeta

La determinación de la carga superficial del copolímero GM-CBX-b-PEI obtenida por potencial zeta, demostró que el copolímero cuenta con un potencial positivo debido a la naturaleza catiónica de la b-PEI. Los resultados mostraron una dependencia del pH, en medio ácido, el potencial zeta fue mayor debido a la protonación de los grupos amino de la PEI, mientras

que a pH más alto disminuyó por la menor cantidad de iones positivos. La tendencia observada en nuestro estudio es similar a la reportada en la literatura. Tal como, Pinilla *et al.* encontraron un rango de potencial zeta positivo entre 45 y 31 mV en su investigación. De manera similar, Jana *et al.* conjugaron goma guar carboximetilada con polietilenimina ramificada de bajo peso molecular (800 Da) y obtuvieron valores de potencial zeta positivos que oscilaron entre 0.345 y 15.9 mV. Estos hallazgos sugieren que la b-PEI es capaz de conferir una carga superficial positiva al copolímero resultante, aunque la magnitud de dicho potencial zeta parece estar influenciada por el peso molecular de la polietilenimina utilizada. [34], [49].

Estos hallazgos corroboran la conjugación exitosa de la b-PEI con la GM-CBX, que posee un potencial zeta negativo ( $-49 \pm 3.9$  mV). La variación del potencial zeta en función del pH indica una interacción efectiva entre ambos polímeros y sugiere la formación de un enlace amida entre ellos.

Tabla 20. Potencial zeta del copolímero GM-CBX-b-PEI a distintos pH.

pH	Potencial zeta (mV)
4	$+23.8 \pm 0.4$
6.5	$+16.8 \pm 0.7$
8	$+14.5 \pm 0.4$

#### 4.1.4 Capacidad amortiguadora de protones (buffering)

La capacidad amortiguadora de protones es una característica importante para la liberación puntual del tratamiento hacia las células, por lo que mantener la alta capacidad de buffering que posee la b-PEI es primordial. Según estudios realizados, la b-PEI, específicamente la de 25 kDa, es capaz de mantener una alta capacidad de amortiguamiento, protegiendo el ADN y transportándolo hasta la célula [50]. Para verificar la conservación de la excelente capacidad amortiguadora de protones de la b-PEI en el copolímero, se evaluó esta propiedad tanto en éste, como en los polímeros individuales y en los blancos. Se puede observar en la **Figura 13** el comportamiento del agua, goma de mezquite, goma de mezquite carboximetilada, goma de mezquite carboximetilada conjugada con b-PEI y b-PEI, en la cual se evidencia que la capacidad de buffering de la GM y GM-CBX son menores a la b-PEI debido a que no están conjugadas con ésta, y en el caso de la muestra GM-CBX-b-PEI, se demostró una capacidad de amortiguamiento

muy similar al de la b-PEI, por lo que esto nos sugiere que la conjugación se está realizando de manera efectiva sin perder las propiedades de ambos polímeros [34].

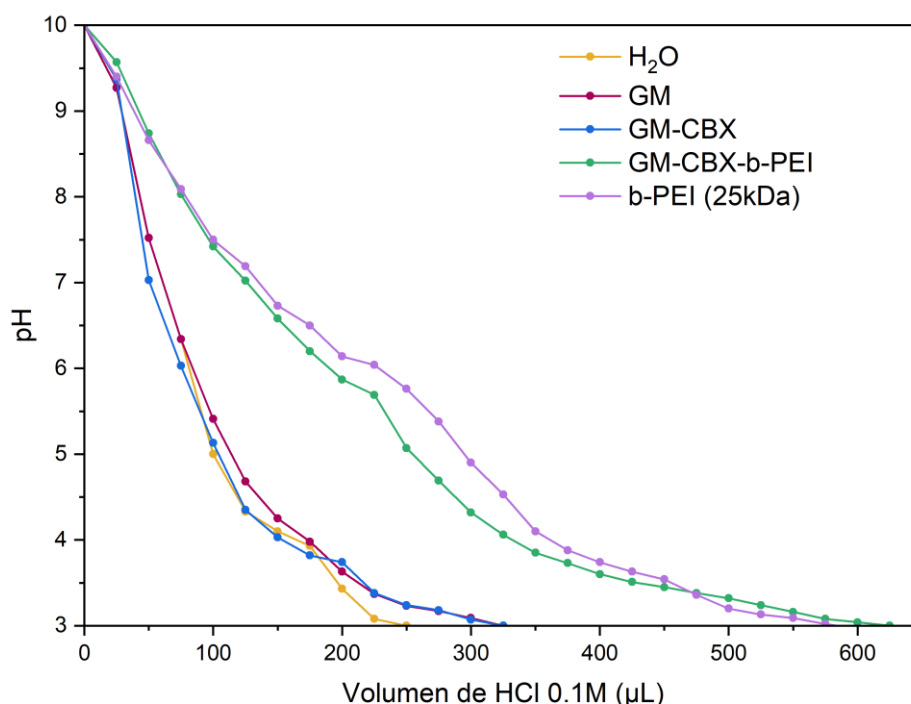


Figura 13. Capacidad de amortiguamiento del copolímero y sus precursores.

## 4.2 Síntesis de NS

Existen distintos métodos para la síntesis de nanopartículas, tales como, físicos, químicos y biológicos. La síntesis verde incluye recursos biológicos, son de fácil obtención, bajo costo, no requiere de temperaturas y presiones altas. El uso de materiales tóxicos no es necesario, así como tampoco se requiere el uso de ligandos sintéticos, agentes de protección o estabilizantes para la biosíntesis de nanopartículas [51], [52].

Naturalmente, las gomas de fuente vegetal son excelentes agentes reductores y estabilizantes para sales metálicas, asimismo, se ha reportado que los grupos amino que posee la polietilenimina ramificada también tiene estas características reductoras. En este caso, la goma de mezquite en conjunto con la polietilenimina ramificada, forman un copolímero que puede ser utilizado como agente reductor del ácido tetracloroáurico trihidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ). Esto debido a que el copolímero contiene grupos amino que se encuentran protonados, mientras que el complejo  $\text{AuCl}_4^-$  que se disocia de la sal metálica se encuentra cargada negativamente, lo que

propicia el intercambio de los iones de cloro con los grupos amino, generando el complejo  $\text{Au}(\text{N}(\text{R}-\text{H}_2))_4$ . Posteriormente, la reducción del oro es propiciada por acción del incremento de temperatura, con el fin de que el biopolímero se expanda y sea más accesible para los iones de oro interactuar con los grupos funcionales disponibles [53], [54].

La hipótesis con respecto a la formación de nanopartículas de oro a partir del copolímero y la sal de oro se puede representar en la **Figura 14** y en el mecanismo de reacción propuesto (**Figura 15**). El complejo  $\text{Au}^{+3}\text{Cl}_4^-$  se disocia de la sal metálica, en donde el oro se encuentra en estado de oxidación  $\text{Au}^{+3}$ , estos iones se reducen a partir de la transferencia de electrones del grupo amino y resulta en la formación de oro metálico ( $\text{Au}^0$ ) [55], [56].

Esta reacción da lugar al inicio del proceso de nucleación y crecimiento provocando que estos átomos de oro formen en primera instancia núcleos o clusters y posteriormente las nanopartículas, la estabilidad de las mismas está dada por acción de los polisacáridos presentes en el copolímero. Finalmente, se obtiene como resultado la formación de nanopartículas de oro estabilizadas de manera estérica mediante las cadenas del copolímero formado por goma de mezquite y polietilenimina ramificada [53], [57], [58].

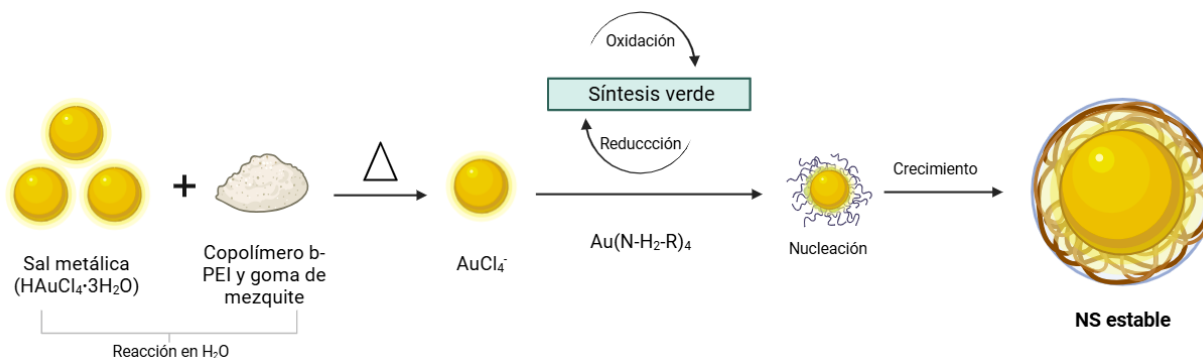


Figura 14. Diagrama esquemático de la formación de nanopartículas de oro a partir del copolímero.

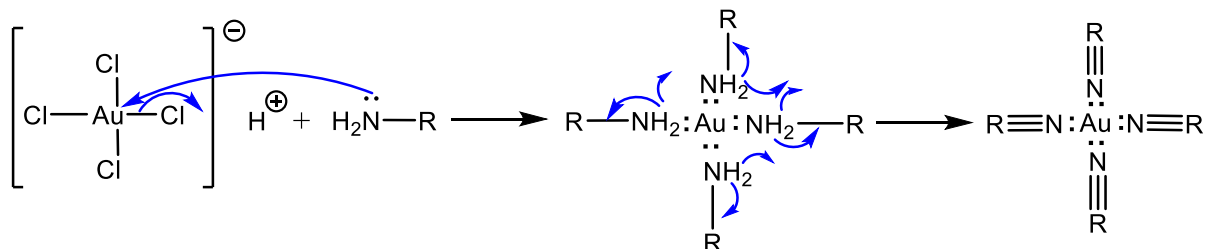


Figura 15. Mecanismo de reacción de la unión entre el oro metálico de la superficie de las nanopartículas y el grupo amino del copolímero.

#### 4.2.1 Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis)

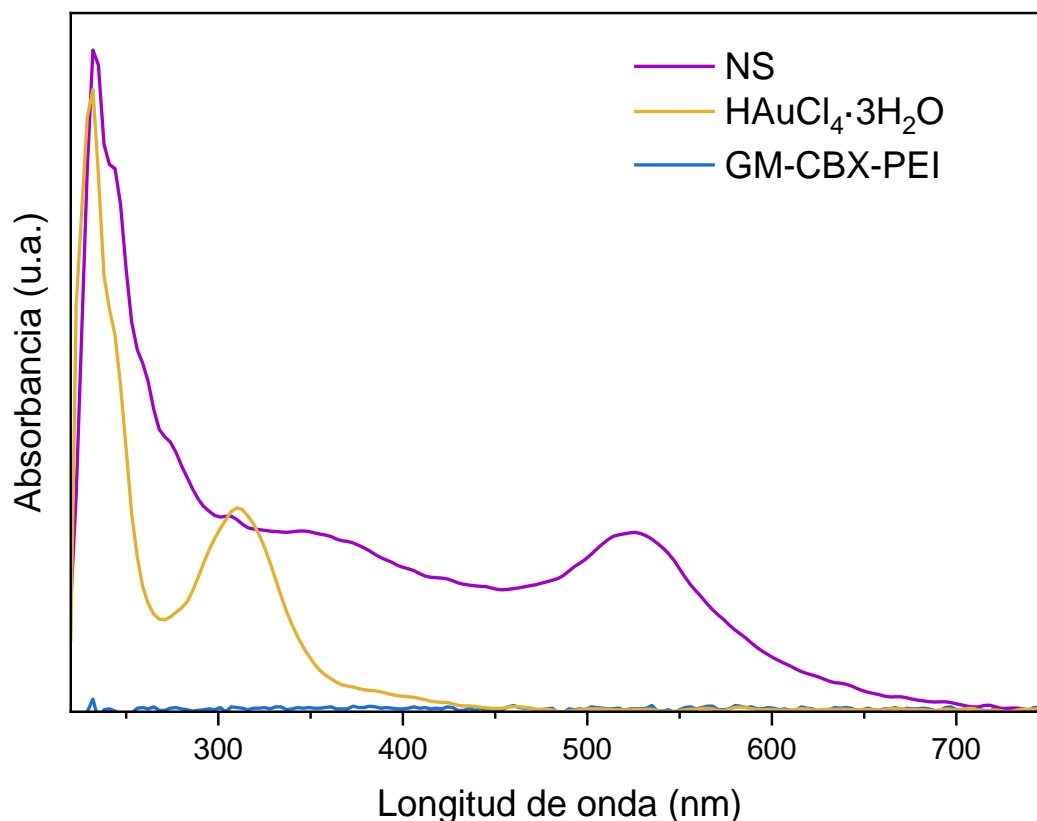


Figura 16. Espectroscopia de nanopartículas de oro recubiertas del copolímero GM-CBX-b-PEI y sus precursores.

La formación de nanopartículas de oro a partir de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  se confirmó mediante espectroscopia UV-Vis (**Figura 16**). Inicialmente, el espectro mostró un pico característico a 320 nm, correspondiente al ion  $\text{AuCl}_4^-$ . Tras la reducción catalizada por el copolímero GM-CBX-b-PEI, este pico desapareció y emergió una nueva banda de absorción a 520 nm, atribuible a la resonancia plasmónica de superficie de las NS recién formadas. La desaparición del pico a 320 nm indica la disminución de la concentración de iones  $\text{AuCl}_4^-$ . Esto se debe a que el copolímero GM-CBX-b-PEI actúa como agente reductor, transformando los iones de oro ( $\text{Au}^{3+}$ ) en átomos de oro ( $\text{Au}^0$ ), los átomos de oro reducidos se enlazan y forman nanopartículas de oro. Estas nanopartículas presentan una resonancia plasmónica de superficie (SPR) que se manifiesta como una banda de absorción intensa en la región visible del espectro. En este caso, el máximo de absorción se encuentra a 520 nm, lo cual es típico para nanopartículas de oro de tamaño y forma

específicos [59], [60], [61]. Estos resultados experimentales corroboran la formación de nanopartículas de oro a partir de la sal de oro y el copolímero GM-CBX-b-PEI como agente reductor y estabilizante.

#### 4.2.2 Estabilidad de NS

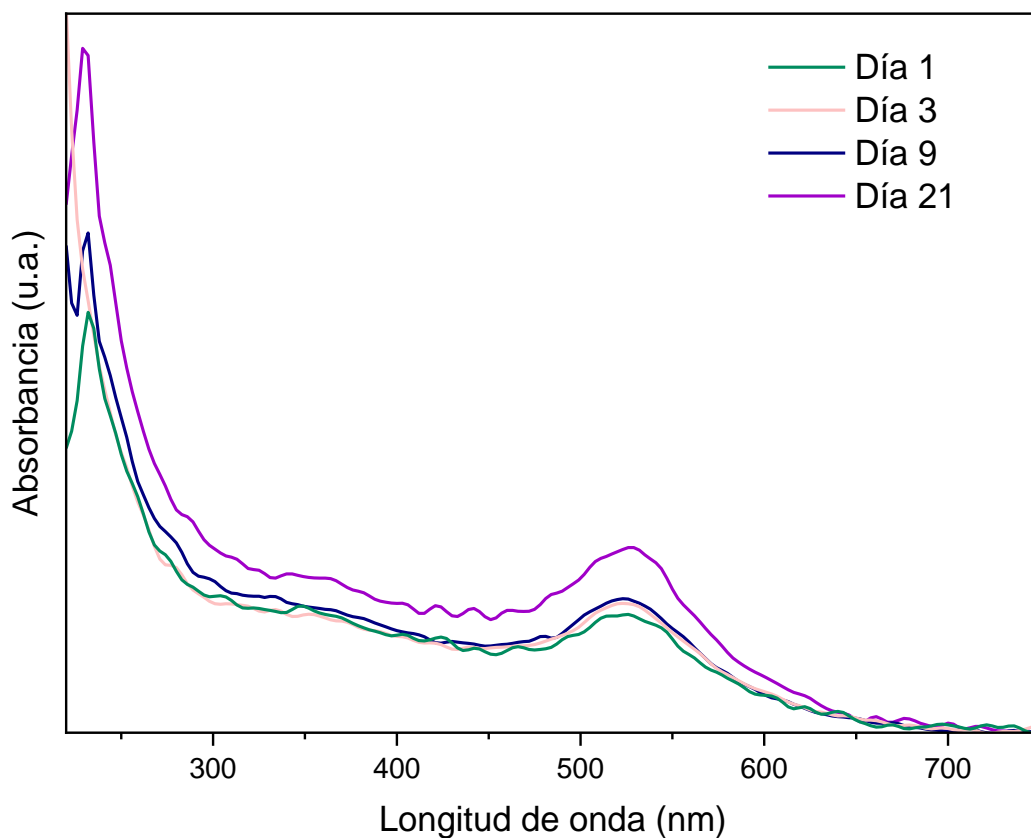


Figura 17. Estabilidad coloidal de NS.

Posterior a la síntesis, se monitoreó la estabilidad coloidal de la suspensión mediante mediciones de absorbancia a intervalos de tiempo definidos (**Figura 17**). Los espectros obtenidos entre el día 1 y 9 revelaron un pico de absorción característico, estrecho y agudo, indicando la presencia de nanopartículas de oro coloidalmente estables. La estabilidad de estas nanopartículas se mantuvo al almacenar la suspensión a 4 °C hasta 21 días, lo que indica una alta estabilidad y una tendencia a mantenerse de esa manera durante un periodo más largo. Adicionalmente, la estabilidad de estas nanopartículas de oro es comparable con trabajos donde se ha mostrado la estabilidad de nanopartículas hasta 40 días, por lo que se puede concluir que las nanopartículas



son relativamente estables y es necesario continuar con estudios de estabilidad para conocer el tiempo en el que se comienza a perder dicha estabilidad. [62], [63].

#### 4.2.3 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

Los espectros XPS confirman la formación de nanopartículas de oro mediante la reducción del precursor  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en presencia del copolímero GM-CBX-b-PEI. En la **Figura 18**, los dobletes característicos de Au 4f revelan la presencia de oro metálico ( $\text{Au}^0$ ), resultado de la reducción térmica. Adicionalmente, se observa un desplazamiento en la energía de enlace asociado a la formación de enlaces Au-N, lo que evidencia la interacción entre el grupo amino del copolímero y las nanopartículas de oro. La interacción entre el nitrógeno del copolímero y el oro metálico se evidencia adicionalmente en los espectros de N 1s. En el espectro del copolímero puro, se observa un pico principal correspondiente al nitrógeno del grupo amida a 399.7 eV. Sin embargo, en el espectro de las NS, este pico disminuye en intensidad y aparece un nuevo pico a 399.3 eV, correspondiente al nitrógeno involucrado en enlaces N-Au. Este desplazamiento en la energía de enlace y el cambio en la intensidad de los picos confirman la formación de enlaces covalentes entre el nitrógeno del copolímero y las NS. La confirmación de la formación del enlace entre el oro de las nanopartículas y el copolímero se basa en la comparación de nuestros espectros con los obtenidos por Devia *et al.* en su estudio de películas de nitruro de oro. Al igual que en nuestro caso, Devia *et al.* observaron señales características de oro metálico y la formación de enlaces Au-N en sus espectros de Au 4f, con energías de enlace notablemente similares. Adicionalmente, la detección del enlace C-N en nuestros espectros de C 1s, a energías de enlace consistentes con las reportadas en el estudio, refuerza la evidencia de una conjugación exitosa. [64].

Tabla 21. Asignación de bandas de XPS de NS.

NS							
Au 4f		C 1s		N 1s		O 1s	
Energía de enlace (eV)	Asignación	Energía de enlace (eV)	Asignación	Energía de enlace (eV)	Asignación	Energía de enlace (eV)	Asignación
84	Au 4f <sub>7/2</sub>	283.7	C-N	398.5	C=N-C	531.5	C=O
85.4	Au 4f <sub>7/2</sub> (Au-N)	284.8	C-C	399.3	N-Au	533	C-O
87.7	Au 4f <sub>5/2</sub>	286.7	C-O-C	399.7	N-C=O	-	-
89.1	Au 4f <sub>5/2</sub> (Au-N)	-	-	-	-	-	-

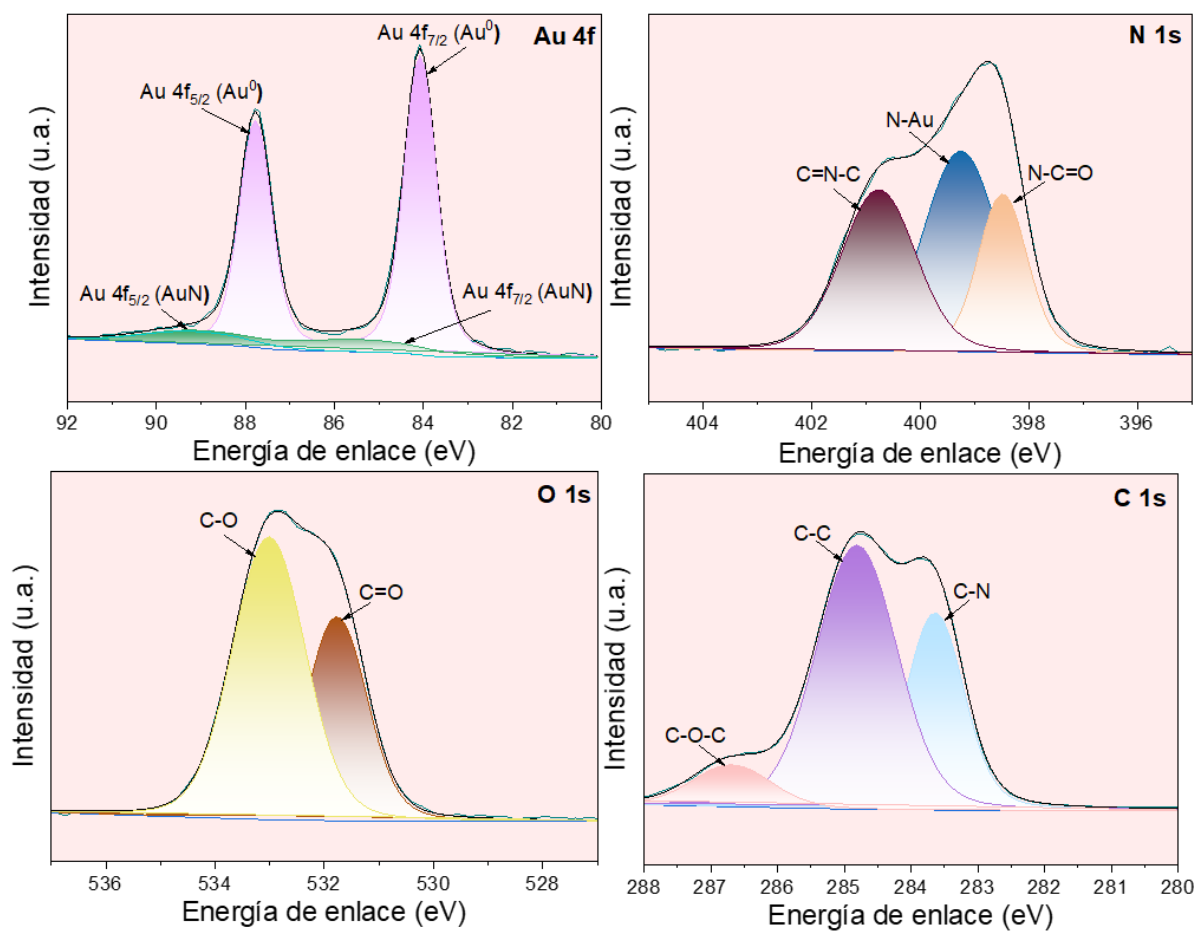


Figura 18. Espectros XPS de NS.

Al analizar los espectros de C 1s y O 1s (**Figura 19**), se observan cambios en las intensidades relativas de los picos correspondientes a los enlaces C-N y C-O en comparación con el copolímero puro. Estos cambios se atribuyen a los procesos de síntesis y purificación de las NS. Los lavados realizados para eliminar el exceso de copolímero no conjugado pueden provocar una pérdida parcial de este componente de la superficie de las NS, lo que se manifiesta en las variaciones observadas en los espectros XPS.

Tabla 22. Asignación de bandas de XPS de GM-CBX-b-PEI.

GM-CBX-b-PEI					
C 1s		N 1s		O 1s	
Energía de enlace (eV)	Asignación	Energía de enlace (eV)	Asignación	Energía de enlace (eV)	Asignación
283.7	C-N	398.5	C=N-C	531.5	C=O
284.8	C-C	399.7	N-C=O	533	C-O
286.5	C-O-C	-	-	-	-

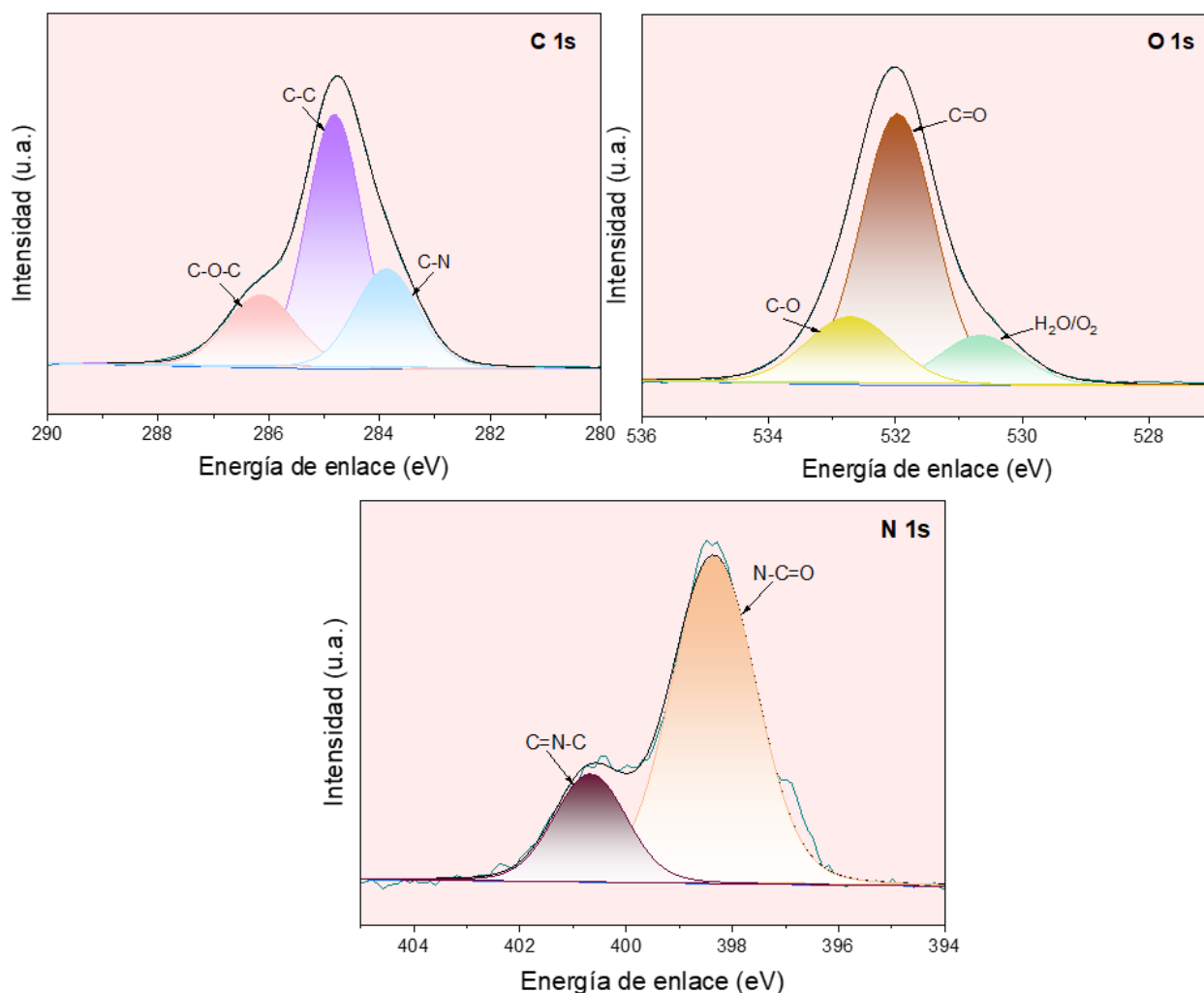


Figura 19. Espectros XPS de GM-CBX-b-PEI.

#### 4.2.4 Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta

El tamaño de las nanopartículas fue determinado mediante dispersión dinámica de luz (DLS) empleando un Zetasizer Nano ZS (Malvern). En esta metodología las muestras se dispersan en agua y se analizan a 25 °C, utilizando un índice de refracción de 0.83 para el cálculo del diámetro hidrodinámico promedio. Este procedimiento se hace por triplicado con el propósito de validar el resultado.

La **Tabla 23** revela un diámetro hidrodinámico promedio en las nanopartículas de aproximadamente 12 nm, con una distribución de tamaño muy estrecha (98.9%). La alta homogeneidad indica un exitoso control sobre el proceso de síntesis. Considerando las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas de oro, este tamaño se encuentra dentro del rango

óptimo reportado para una mayor vida media en el torrente sanguíneo y una mayor facilidad de internalización celular. Además, al funcionalizar estas nanopartículas con el conjugado aptámero HER2-PEG, se espera un ligero aumento en el tamaño, posicionándolas en el rango ideal (30-60 nm) para una citotoxicidad efectiva en células cancerígenas, según lo reportado por *Zhang et al* [65], [66].

Con relación al potencial zeta, se observa un valor positivo debido a la protonación de los grupos amino de la PEI, mostrando una consistencia con el comportamiento del copolímero por sí solo. La magnitud superior a 30 mV de este potencial, indica una fuerte repulsión electrostática entre las nanopartículas de oro, garantizando la estabilidad y homogeneidad de la dispersión coloidal, tal como lo sugieren los estudios de Mekhamer [38], [67].

Tabla 23. Tamaño y carga superficial de NS GM-CBX-b-PEI.

Muestra	Concentración Au	Diámetro hidrodinámico promedio (nm) $\pm$ desviación estándar (% Volumen)			Potencial zeta
		Pico 1	Pico 2	Pico 3	
NS GM-CBX-b-PEI	100 ppm	12.1 $\pm$ 3.6 (98.9%)	4240.3 $\pm$ 172.4 (1.1%)	-	+30.8 $\pm$ 1.3

### 4.3 Conjugado Aptámero HER2/4-arm-PEG-maleimida

#### 4.3.1 Espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis) mediante Nanodrop

Los espectros de absorbancia presentados en la **Figura 20** confirmaron la exitosa conjugación entre el aptámero HER2 y el 4-arm-PEG-maleimida. Si bien, el espectro del 4-arm-PEG-maleimida presentó una absorción débil debido a su baja concentración, los cambios observados en el espectro del aptámero son altamente significativos. Los picos característicos del aptámero a 275 nm (absorción de bases nucleotídicas) y 665 nm (emisión del fluoróforo Cy5) experimentaron modificaciones tras la conjugación, evidenciando la formación del enlace tiol-maleimida entre el grupo tiol del aptámero y el grupo maleimida del PEG. Este desplazamiento y aumento en la intensidad de los picos son consistentes con los reportes de Yang *et al.* y Pinilla *et al.*, y corroboran la formación del conjugado aptámero-PEG. [38], [68], [69]. La similitud entre el espectro obtenido en este estudio y el reportado por Carrión-García *et al.* para el mismo aptámero es notable. En ambos espectros se identifican bandas correspondientes a las bases nucleotídicas

y al fluoróforo en las mismas longitudes de onda. Esta concordancia espectral confirma que la conjugación entre el aptámero y el PEG-Maleimida se llevó a cabo de manera exitosa [70].

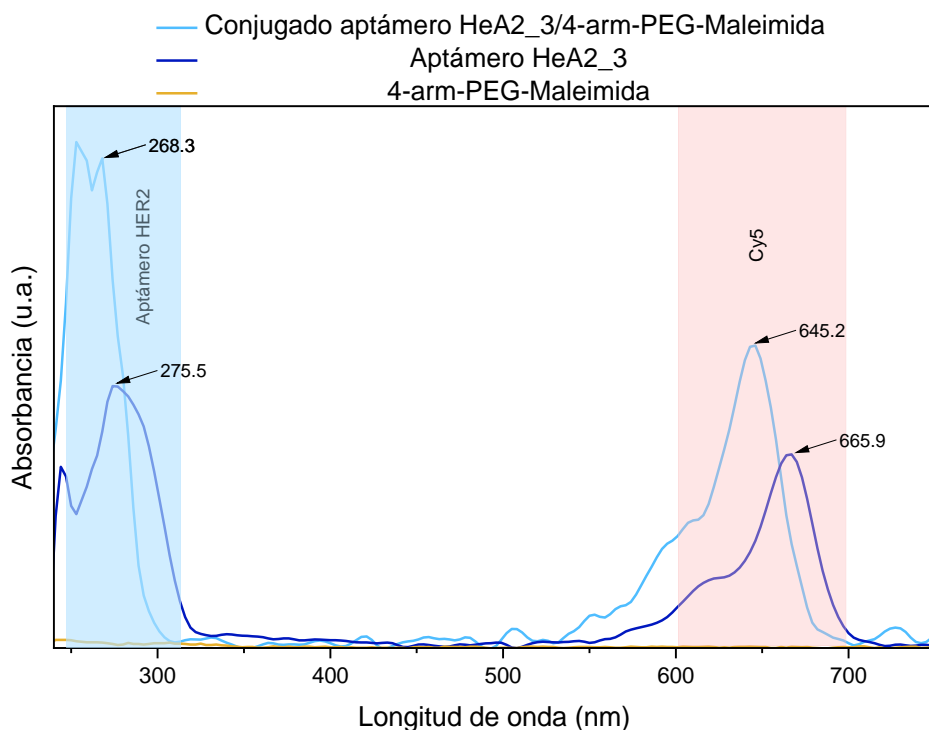


Figura 20. Espectroscopia ultravioleta visible del conjugado aptámero HER2-4-arm-PEG-Maleimida.

La formación del enlace tiol-maleimida se produce a través de una adición de Michael nucleofílica. El grupo tiol del aptámero, ionizado a tiolato en el medio acuoso de TE 1X pH 7.4, actúa como nucleófilo atacando al carbono  $\beta$  del anillo de maleimida, un electrófilo altamente reactivo, el esquema de esta reacción se observa en la **Figura 22**. La ruptura del doble enlace carbono-carbono del anillo de maleimida y la formación de un nuevo enlace carbono-azufre conducen a la formación del enlace tiol-maleimida. La estabilidad y quimioselectividad de esta reacción en este rango de pH se deben a la mayor nucleofilidad del ion tiolato y a la menor reactividad de otros grupos funcionales presentes en el aptámero [70], [71], [72]. La **Figura 21** muestra el mecanismo de reacción planteado de la unión entre el 4-arm-PEG-Maleimida y el aptámero.

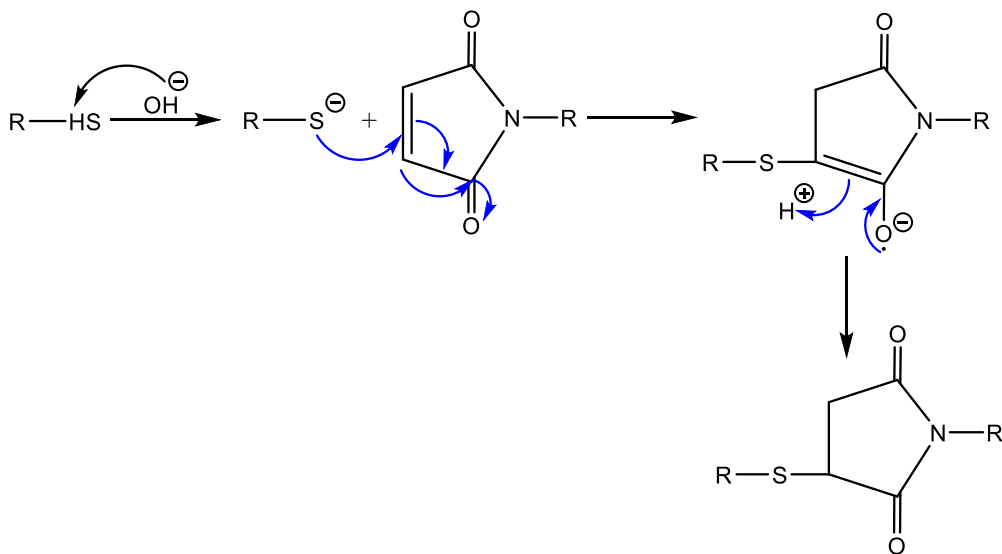


Figura 21. Mecanismo de reacción del enlace tiol-maleimida.

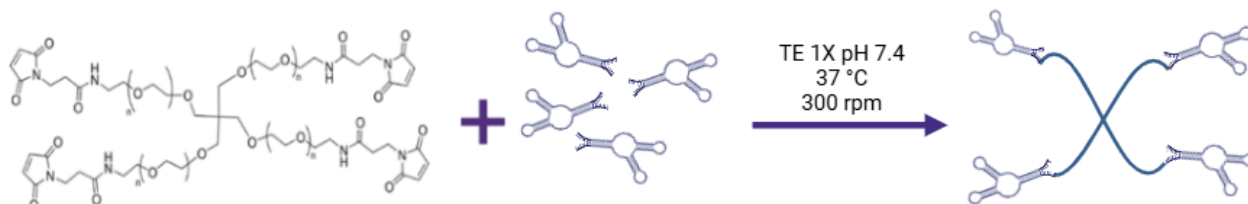


Figura 22. Esquema del conjugado Aptámero HER2/4-arm-PEG-maleimida

#### 4.3.2 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

En los espectros XPS se demuestra el enlace tiol-maleimida que se propone para la conjugación entre el aptámero HER2 y el 4-arm-PEG-Maleimida. En los espectros de C 1s se pueden observar los enlaces C-C que están relacionados al PEG-maleimida, C-N asociados a ambas partes del conjugado y el enlace C-S está relacionado a la unión entre el PEG-maleimida y el aptámero, ya que este enlace se da a partir del azufre del aptámero y el carbono perteneciente al anillo imina del PEG-maleimida. Esto se puede confirmar adicionalmente en el espectro S 2p donde se observa el doblete perteneciente al enlace S-C y un enlace S-O que está relacionado al grupo tiol oxidado, adicionalmente se puede decir que no fue una conjugación del 100% debido a las diferencias de las intensidades relativas de los dobletes que aparecen en el espectro. Estudios previos (Shanthi *et al.*; Järvinen *et al.*) han encontrado enlaces S-O y S-C similares a los observados en este proyecto en moléculas analizadas con grupos tiol conformando dicha estructura. Estos hallazgos respaldan nuestros resultados. No obstante, la literatura científica revela una escasez de

investigaciones sobre el análisis de aptámeros mediante XPS, lo que sugiere una prometedora área de oportunidad para futuras investigaciones. [73], [74].

Los espectros de O 1s y N 1s (**Figura 23** y **Tabla 24**) confirman la presencia de los grupos funcionales característicos del PEG-maleimida. Los picos observados corresponden con los enlaces carbono-oxígeno (C-O) de los grupos éter y, en menor medida, con los enlaces carbono-nitrógeno (C-N) debido a grupos terminales. Esta información espectroscópica respalda la composición química del PEG-maleimida y su papel en la formación del enlace tiol-maleimida [75].

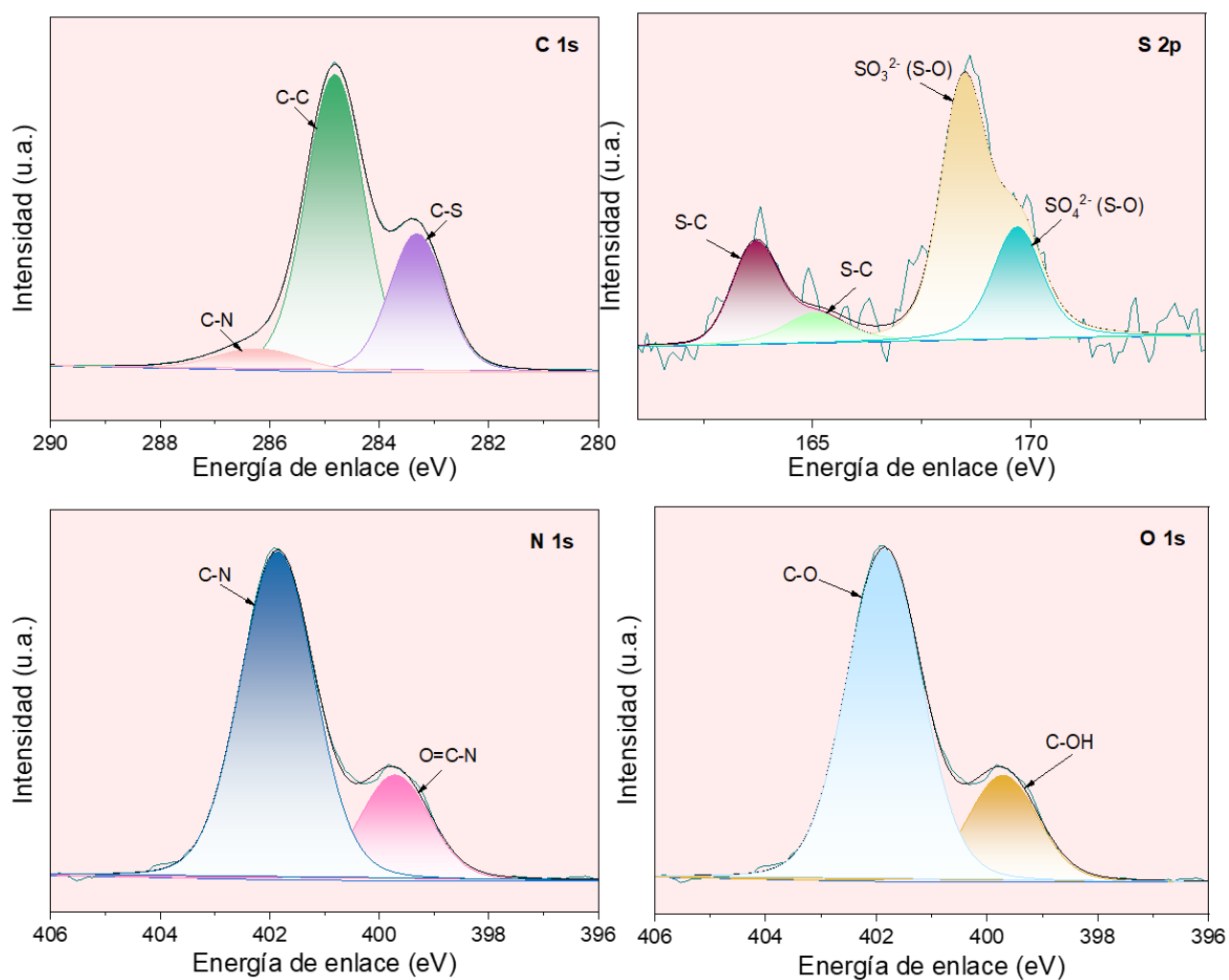


Figura 23. Espectros XPS del conjugado aptámero HER2-4-arm-PEG-Maleimida.



Tabla 24. Asignación de bandas de XPS del conjugado aptámero HER2-4-arm-PEG-Maleimida.

Conjugado aptámero HER2-4-arm-PEG-Maleimida							
S 2p		C 1s		N 1s		O 1s	
Energía de enlace (eV)	Asignación	Energía de enlace (eV)	Asignación	Energía de enlace (eV)	Asignación	Energía de enlace (eV)	Asignación
163.2	S-C	283.2	C-N	399.7	N-C=O	531.7	C=O
165	S-C	284.8	C-C	401.8	C-NH <sub>2</sub>	533	O=C-O
168.8	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (S-O)	286.1	C-S	-	-	-	-
169.2	SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (S-O)	-	-	-	-	-	-

#### 4.3.3 Electroforesis

El análisis de electroforesis en gel de agarosa indicó una resolución incompleta en el marcador de peso molecular de 25 pares de bases (pb), particularmente entre 175 y 50 pb, donde se observó una difusión significativa de las bandas. Este fenómeno podría atribuirse a la degradación del marcador de peso molecular debido a contaminación o un incorrecto almacenamiento. El marcador de 100 pb actuó como control positivo, evidenciando en la **Figura 24** una resolución adecuada del gel y validando así los resultados obtenidos para el aptámero HER2 y su conjugado.

El aptámero HER2 migró a una posición correspondiente a aproximadamente 39 pb, valor teórico reportado por Pinilla *et al.* y Gijs *et al.* Tras la conjugación con 4-arm-PEG-Maleimida, se observó un claro desplazamiento del fragmento hacia tamaños moleculares mayores, como se evidencia en los carriles 3 y 5 del gel. Este resultado, consistente con los hallazgos de Taghdisi *et al.* en aptámeros anti-PSMA, confirma la exitosa conjugación del 4-arm-PEG-Maleimida al aptámero anti-HER2 [10], [38], [76].

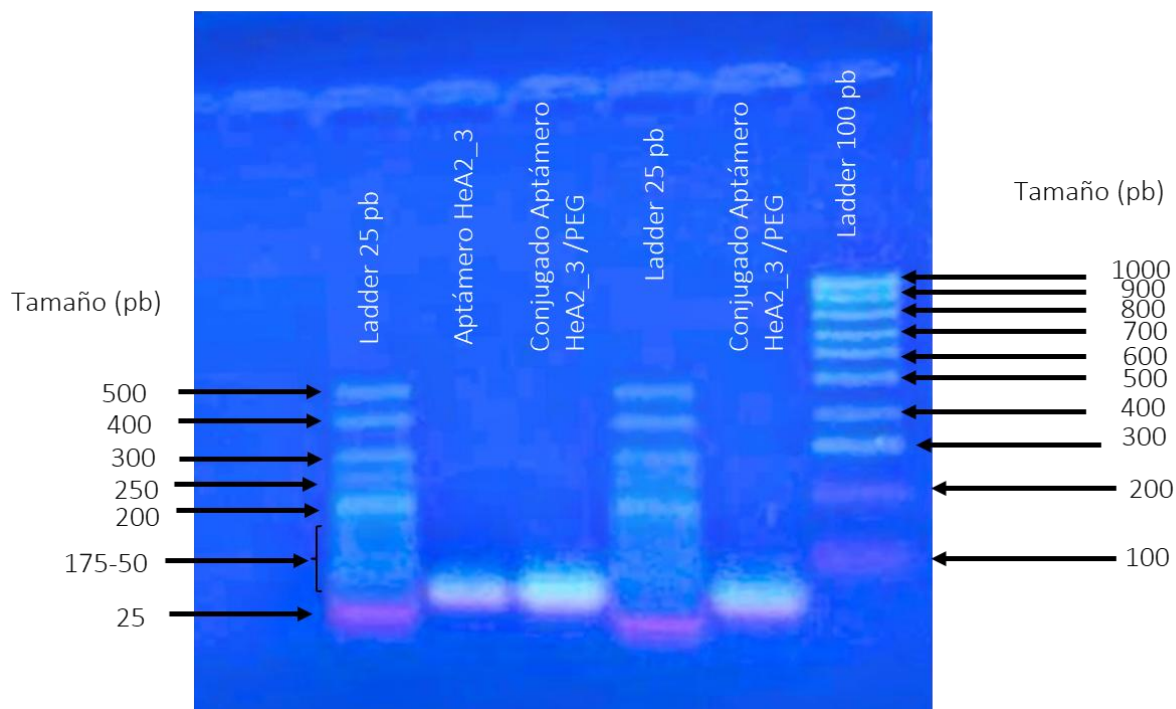


Figura 24. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del aptámero HER2 y su conjugado con PEG.

### 4.3 NS+HeA2\_3

#### 4.3.1 Dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta

La unión de las NS con el conjugado Aptámero-PEG produjo un aumento significativo en el diámetro del nanosistema, alcanzando los 19 nm, lo que representa un incremento del 60% respecto a su tamaño original. Este crecimiento sugiere una exitosa conjugación del aptámero a las NS, corroborando hallazgos similares en estudios previos [38], [77].

Respecto al potencial zeta, se observó una disminución en su magnitud, atribuible a la neutralización parcial de las cargas positivas de las NS por parte de las cargas negativas del aptámero. Este resultado es coherente con lo reportado en trabajos precedentes y confirma la formación del complejo AuNP-Aptámero-PEG. Se logró la síntesis de una nanopartícula de oro funcionalizada con aptámero-PEG-Maleimida que supera a las reportadas por Pinilla et al. y Carrion-Garcia et al. en cuanto a su tamaño. Este nuevo nanosistema, al tener un tamaño inferior a 20 nm, facilita su internalización celular, lo que representa una ventaja significativa para el desarrollo de terapias y diagnósticos más eficientes. [38], [78].

Tabla 25. Tamaño y carga superficial del NS+HeA2\_3.

Muestra	Concentración Au	Diámetro hidrodinámico promedio (nm) $\pm$ desviación estándar (% Volumen)			Potencial zeta
		Pico 1	Pico 2	Pico 3	
NS+HeA2_3	100 ppm	19.4 $\pm$ 0.8 (85.2%)	3076 $\pm$ 15.0 (14.8%)	-	+12.6 $\pm$ 1.4

#### 4.3.2 Espectroscopia ultravioleta visible (UV Vis) mediante Nanodrop

Los espectros de UV-vis mostraron un pico de absorción a 520 nm, característico de la resonancia plasmónica de superficie de las NS. Al formar el NS+HeA2\_3, se observó un aumento en la absorción en la región de 245-260 nm, correspondiente a las bandas de absorción de las bases nucleotídicas del aptámero. Este corrimiento batocrómico y ensanchamiento de la banda sugieren una interacción electrónica entre las NS y las bases nucleotídicas, posiblemente debido a efectos de transferencia de carga. Además, la aparición de un pico a 650 nm, correspondiente a la emisión del fluoróforo Cy5, confirmó la exitosa conjugación del aptámero al nanosistema. Estos resultados son comparables con estudios previos y demuestran la formación de un sistema híbrido estable con propiedades biomédicas [38].

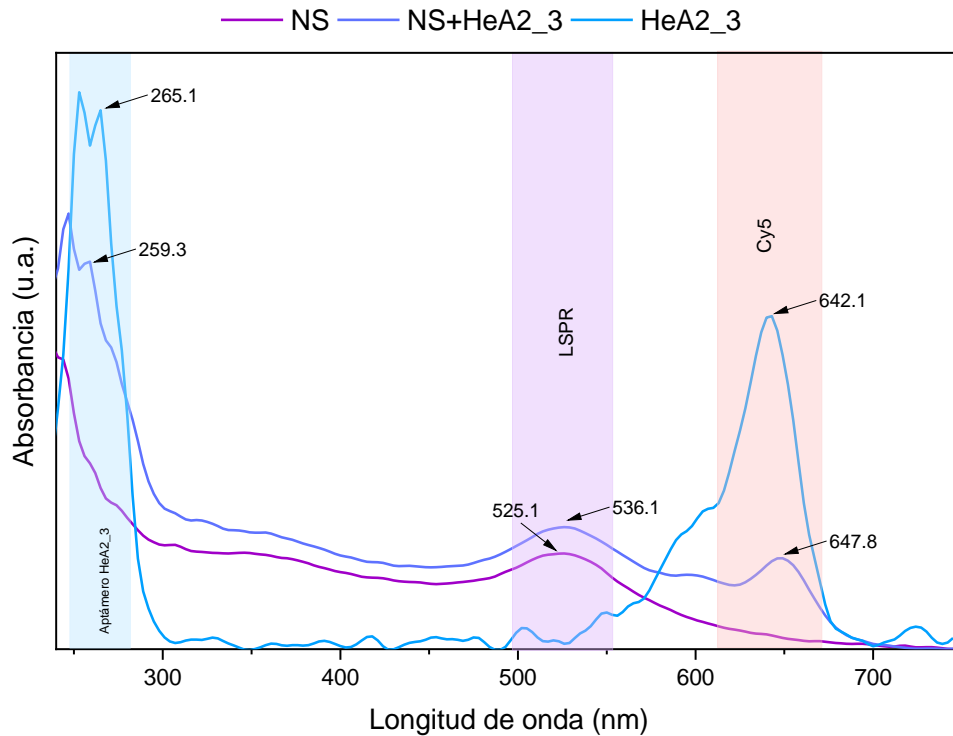


Figura 25. Espectroscopia ultravioleta visible de NS y NS+HeA2\_3.

Se propone que la unión entre las NS y el conjugado Aptámero-PEG se establece principalmente a través de interacciones electrostáticas (**Figura 26**). La carga negativa del aptámero y la carga positiva de las NS, favorecen esta interacción. Esta hipótesis se ve respaldada por la disminución del potencial zeta observada en la **Tabla 25**, lo cual indica una reducción de la carga superficial del nanosistema tras la conjugación. Estos resultados son consistentes con estudios previos que reportan la formación de enlaces electrostáticos entre aptámeros cargados negativamente y moléculas como la PEI [78].

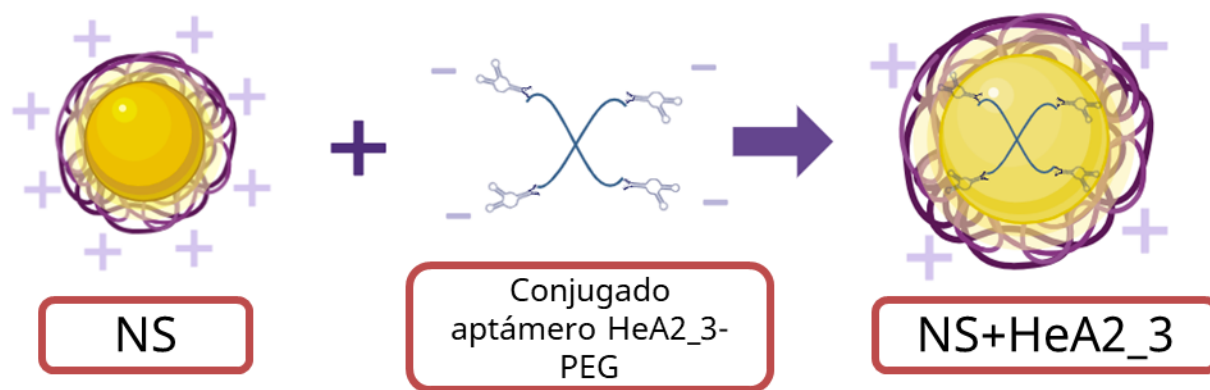


Figura 26. Representación esquemática de la interacción electrostática NS-aptámero-PEG.

#### 4.3.3 Estabilidad del NS+HeA2\_3

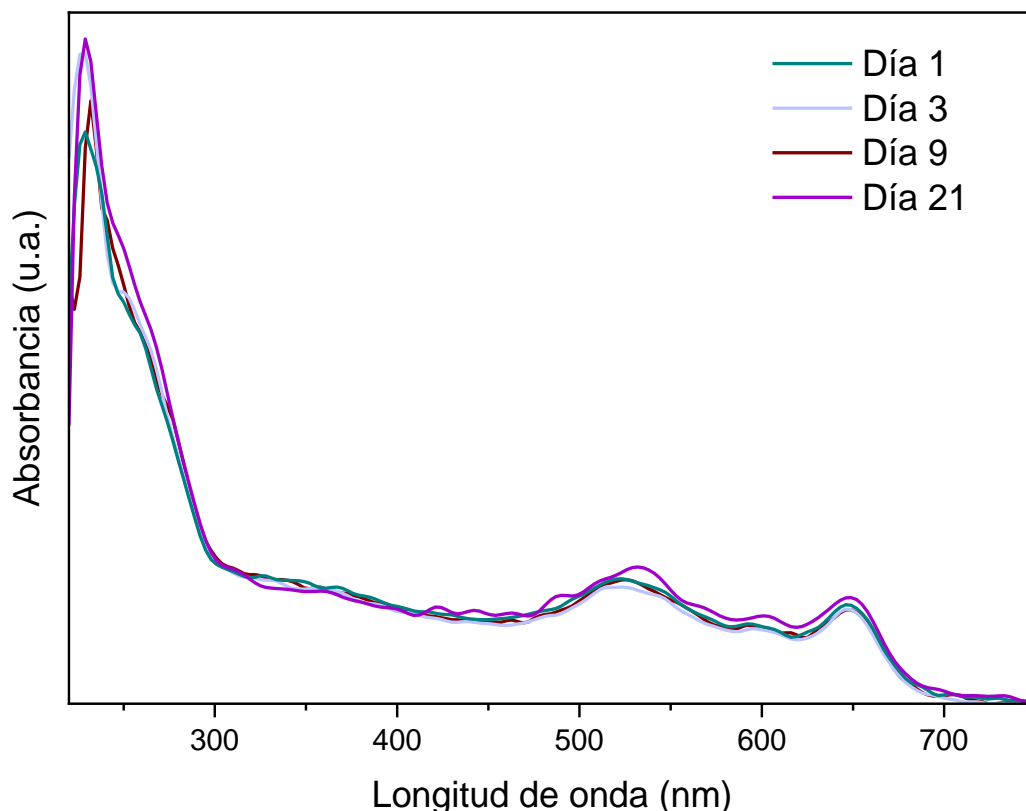


Figura 27. Estabilidad coloidal del NS+HeA2\_3.

Al evaluar la estabilidad coloidal del NS+HeA2\_3, que incluye tanto las nanopartículas de oro como los conjugados de aptámero anti-HER2 y 4-arm-PEG-Maleimida, se observó un comportamiento similar al de las NS aisladas, este comportamiento se observa en la **Figura 27**. Los espectros de absorción, monitoreados desde el día 1 hasta el día 21 y obtenidos a una temperatura de 4 °C, mostraron variaciones mínimas en la intensidad y posición del pico de plasmón superficial. Estos resultados indican que la conjugación del aptámero y el PEG no comprometió significativamente la estabilidad coloidal del sistema, el cual se mantuvo relativamente estable durante el período de estudio. La presencia de ambos conjugados parece conferir al nanosistema una mayor resistencia a la agregación y sedimentación, lo que es fundamental para su potencial aplicación en sistemas biológicos [79]. Un aspecto destacado de este nanosistema es su notable estabilidad coloidal, superior a la observada en investigaciones previas del grupo. La incorporación del copolímero y el PEG no solo optimiza la biocompatibilidad y funcionalidad, sino que también confiere una estabilidad excepcional al sistema, manteniéndolo intacto durante al menos 21 días.

Se recomienda profundizar en el estudio de esta estabilidad para determinar su vida útil y comprender los mecanismos que la regulan.

#### 4.3.4 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

Los espectros XPS de la **Figura 28** evidencian la exitosa conjugación entre el aptámero-PEG y las NS. El incremento en la intensidad de los enlaces C-S en los espectros C 1s y S 2p, junto con la aparición del pico C-NH<sub>2</sub> en el espectro N 1s, sugiere una interacción electrostática entre ambos componentes, posiblemente involucrando interacciones S-N. A pesar de que XPS es una técnica poderosa para analizar la composición superficial, la detección directa de interacciones electrostáticas débiles puede ser desafiante. Sin embargo, el aumento de la intensidad relativa del enlace N-Au en N 1s y la disminución de picos en S 2p, comparado con el aptámero-PEG puro podría atribuirse a la limpieza del conjugado mediante una columna Spin-X 100K MWCO, que elimina el exceso de reactivos y podría favorecer la interacción entre las especies conjugadas [80], [81], [82].

Para complementar esta interpretación y obtener una caracterización más completa del sistema, se emplearon técnicas analíticas adicionales. TEM, DLS y UV-vis. Estas técnicas proporcionaron evidencia adicional de la conjugación y permitieron una mejor comprensión de la naturaleza de las interacciones entre los componentes del nanosistema.

Tabla 26. Asignación de bandas de XPS del NS+HeA2\_3.

NS+HeA2_3									
S 2p		C 1s		N 1s		O 1s		Au 4f	
Energía de enlace (eV)	Asignación	Energía de enlace (eV)	Asignación	Energía de enlace (eV)	Asignación	Energía de enlace (eV)	Asignación	Energía de enlace (eV)	Asignación
163	S 2p <sub>3/2</sub>	283.3	C-N	399.3	N-Au	531.5	C=O	84	Au 4f <sub>7/2</sub>
164.1	S-C	284.8	C-C	399.7	N-C=O	532.8	C-OH	84.8	Au 4f <sub>7/2</sub> (Au-N)
-	-	286.1	C-S	401.8	C-NH <sub>2</sub>	-	-	87.7	Au 4f <sub>5/2</sub>
-	-	-	-	-	-	-	-	88.4	Au 4f <sub>5/2</sub> (Au-N)

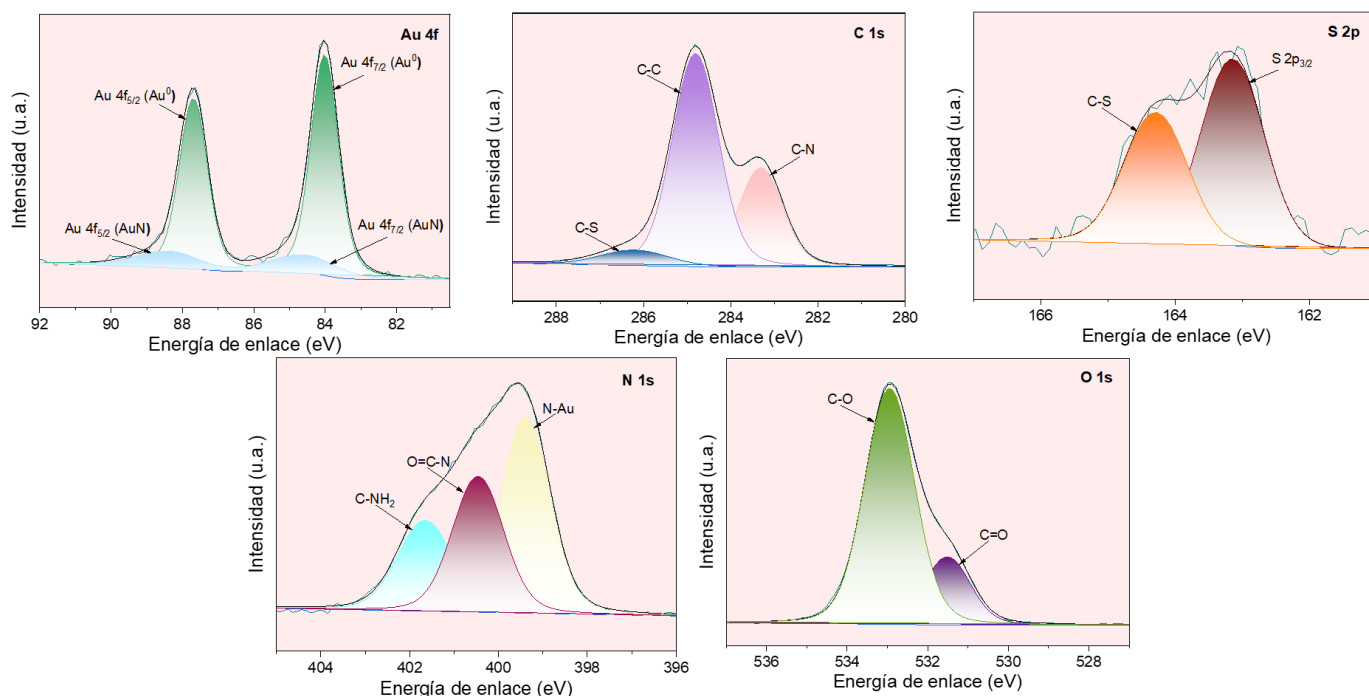


Figura 28. Espectros XPS del NS+HeA2\_3.

#### 4.3.5 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Con el fin de determinar el tamaño y la morfología del NS+HeA2\_3, se obtuvieron micrografías mediante TEM (**Figura 29**), las cuales revelaron nanopartículas con un diámetro promedio de  $10.8 \pm 1.9$  nm, ligeramente inferior al radio hidrodinámico determinado por DLS ( $19.4 \pm 0.8$ ). Esta discrepancia es atribuible al hecho de que DLS mide el tamaño aparente de la partícula, incluyendo la capa de solvatación y la doble capa eléctrica, mientras que a través de TEM no es posible observar el recubrimiento polimérico del nanosistema y solo proporciona una medida más directa del tamaño del núcleo de la partícula. Las imágenes TEM mostraron una morfología predominantemente esférica y semiesférica, lo cual es altamente deseable para aplicaciones biomédicas, ya que facilita la internalización celular y reduce la probabilidad de activación de respuestas inmunes [22], [83]. Al comparar el método de síntesis utilizado, se destaca la influencia significativa de la temperatura en el tamaño de las nanopartículas. Investigaciones previas, como las de Liu et al., han demostrado que a  $70^\circ\text{C}$  se obtienen nanopartículas esféricas con un tamaño aproximado de 10 nm. La presencia de polímeros en el

recubrimiento no solo estabiliza la dispersión coloidal, previniendo la aglomeración, sino que también podría influir en el control del tamaño y la forma de las nanopartículas [84].

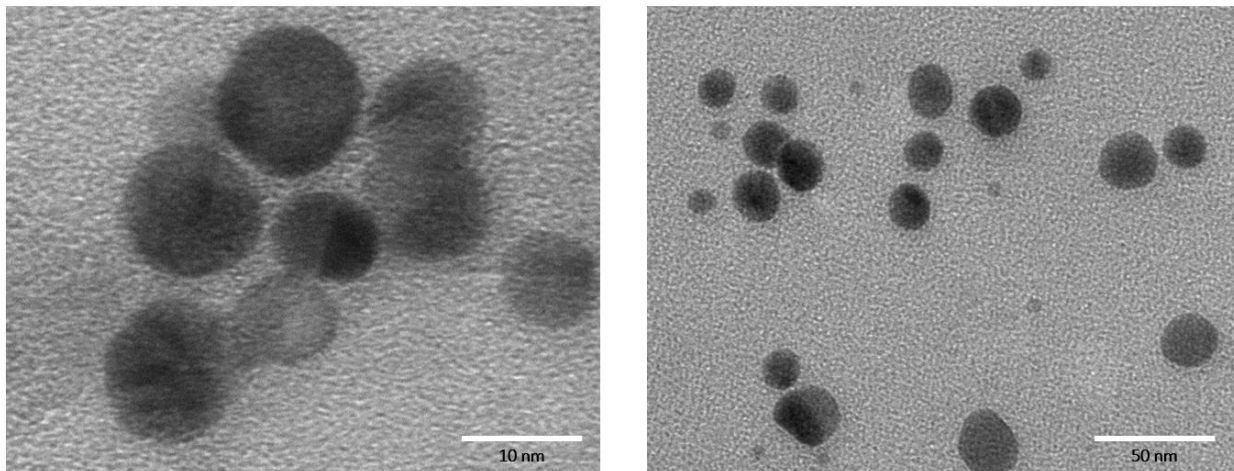


Figura 29. Micrografías de TEM del NS+HeA2\_3 en escala de 10 y 50 nm.



## 4.4 Ensayos biológicos

### 4.4.1 Ensayo de hemólisis

Según la norma ISO 10993-4:2017: Evaluación biológica de equipos médicos, Parte 4: Selección de pruebas para interacciones con la sangre y ASTM F756-17: Práctica estándar para la evaluación de propiedades hemolíticas de materiales, para clasificar el grado de hemólisis de un material se utiliza la siguiente tabla. Asimismo, se establece que para un tratamiento nuevo los rangos aceptables son porcentajes de 5% o menor, es decir ligeramente hemolítico y no hemolítico [85].

Tabla 27. Clasificación del grado de hemólisis según el índice hemolítico

Índice hemolítico por encima del control negativo (%)	Grado hemolítico
0-2	No hemolítico
2-5	Ligeramente hemolítico
>5	Hemolítico

Se realizaron ensayos de hemólisis para los polímeros y copolímero, a tres concentraciones diferentes (0.3, 0.1 y 0.03  $\mu\text{g/mL}$ ). Los resultados de dichos ensayos se pueden observar en las **Figura 30, Figura 31 y Figura 32**, donde la línea roja indica el 5% del índice hemolítico mientras que la amarilla representa el 2%. En el caso de la goma de mezquite, se puede notar que el porcentaje de hemólisis es mayor al 5% en dos de las concentraciones, lo cual se categoriza en hemolítico, a diferencia de la literatura reportada, en la que se reporta que la goma de mezquite a diferentes concentraciones demuestra un comportamiento no hemolítico [34], [86]. Se plantea que esta discrepancia podría atribuirse a la presencia de impurezas en las muestras de goma, a pesar de los rigurosos procesos de selección y purificación. La naturaleza del producto, obtenido a partir de dulces naturales de mezquite, podría favorecer la presencia de contaminantes no detectables a simple vista [87].

Se ha demostrado que el peso molecular de un copolímero influye directamente en su citotoxicidad, observándose una correlación positiva entre ambos parámetros. Dada la variabilidad en los pesos moleculares reportados para la goma de mezquite, es comprensible que existan discrepancias en los resultados de citotoxicidad [88]. Debido a esto, es importante

continuar con la investigación de las propiedades de la goma de mezquite, con el fin conocer más de cómo influye este polímero en la salud. Sin embargo, al carboximetilar la goma de mezquite, se puede observar claramente la disminución de la hemólisis, a las tres diferentes concentraciones, por lo que se intuye que, al realizar este proceso de síntesis y lavados de la goma de mezquite, las impurezas que puede contener la goma de mezquite se eliminan y se obtiene un resultado viable para la prueba con eritrocitos.

De igual manera, cabe destacar los resultados de b-PEI en la cual a concentraciones de  $0.3\mu\text{g/mL}$  y  $0.1\mu\text{g/mL}$  resultan ser hemolíticos, lo cual es consistente con el mecanismo de acción de los policationes, que interactúan con los fosfolípidos de la membrana eritrocitaria, induciendo su lisis. Sin embargo, a una concentración de  $0.03\mu\text{g/mL}$ , la b-PEI no resultó hemolítica, sugiriendo un umbral por debajo del cual la interacción con la membrana es insuficiente para causar daño [89].

Si bien el copolímero mostró una leve hemólisis a ciertas concentraciones, es importante destacar que, al conjugarse con nanopartículas de oro y aptámeros, esta citotoxicidad se redujo significativamente. Estos resultados sugieren que la formación del nanoconjugado mitiga los efectos adversos del copolímero sobre los eritrocitos.

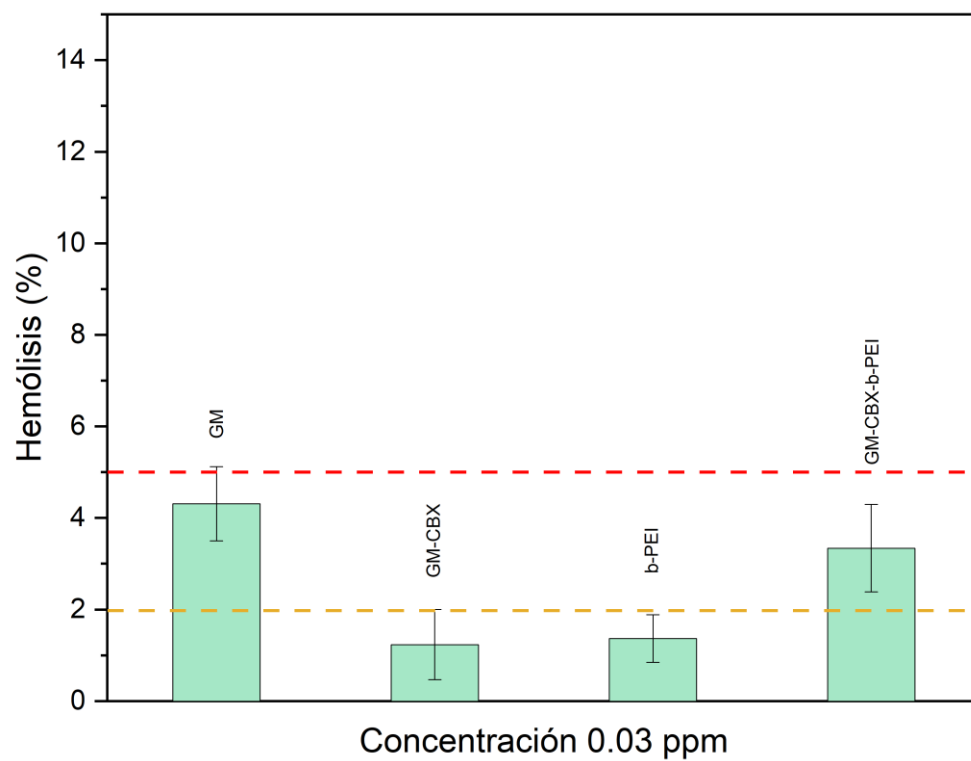


Figura 30. Hemólisis de polímeros a 0.03 ppm.

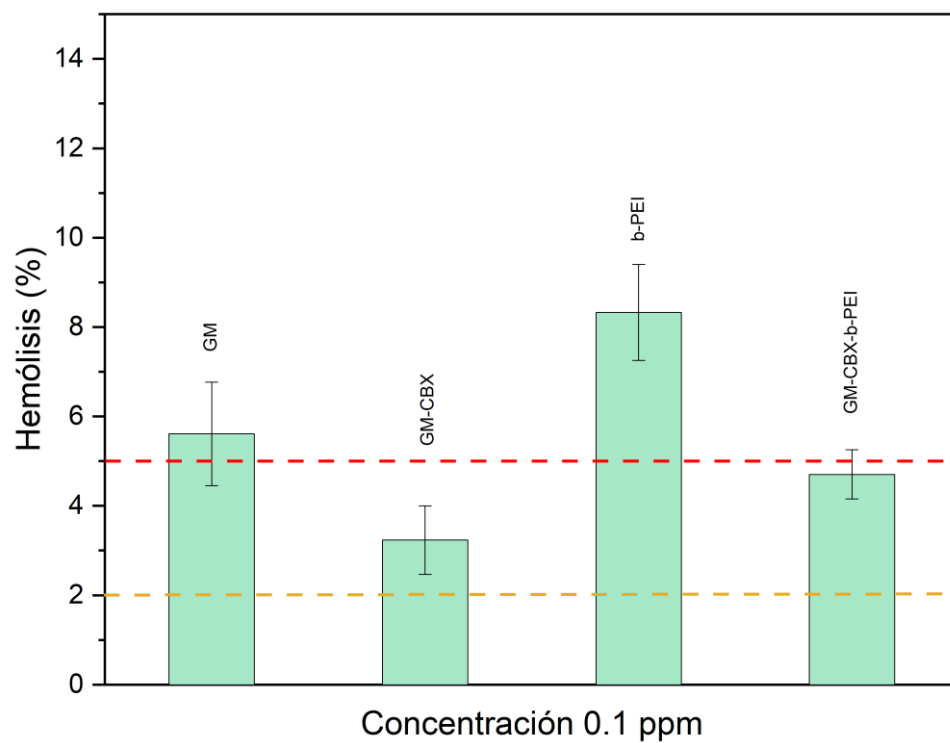


Figura 31. Hemólisis de polímeros a 0.1 ppm.

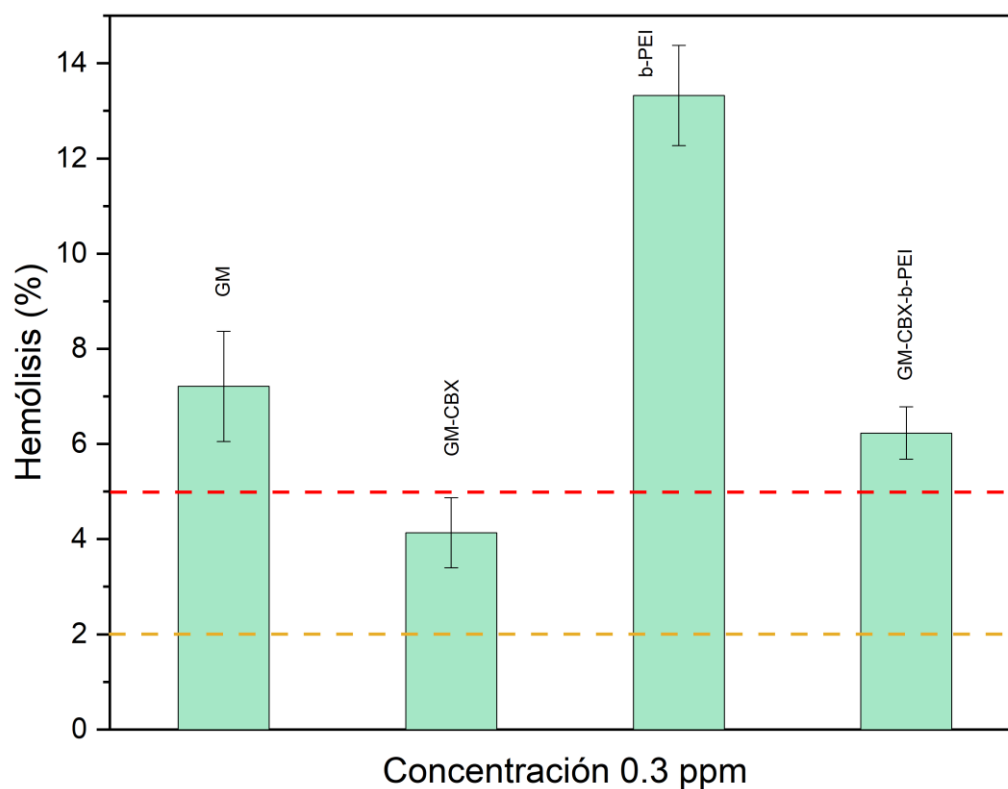


Figura 32. Hemólisis de polímeros a 0.3 ppm.

Los resultados de hemólisis para las NS mostraron un comportamiento hemolítico o ligeramente hemolítico a todas las concentraciones evaluadas. Esta citotoxicidad puede atribuirse a la carga superficial positiva de las nanopartículas, como lo evidencian los valores de potencial zeta. La interacción electrostática entre los grupos amino protonados de las NS y los fosfolípidos cargados negativamente de la membrana eritrocitaria induce la formación de poros y la subsiguiente lisis celular. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos sobre la interacción de polímeros catiónicos con eritrocitos en la cual se menciona que debajo de concentraciones de 10 ppm indican un índice ligeramente hemolítico, sin embargo, esto depende en gran manera del tamaño, polímero y métodos de síntesis propios de las nanopartículas [38], [90].

La conjugación de las NS con aptámero HER2 y PEG resultó en una disminución significativa de la hemólisis (**Figura 33**). El PEG, al formar una capa hidrofílica alrededor de las nanopartículas, reduce la interacción con componentes sanguíneos, como las proteínas y los eritrocitos. Estos resultados indican que el nanosistema diseñado presenta un perfil de biocompatibilidad

adecuado, lo que lo convierte en un candidato prometedor para aplicaciones biomédicas. La mayoría de las concentraciones evaluadas no indujeron hemólisis, lo que subraya la eficacia de esta estrategia para mejorar la biocompatibilidad de las nanopartículas [38], [90], [91].

La carga de la superficie del NS puede influir en la interacción con las membranas celulares cargadas negativamente, incluidos los eritrocitos (RBCs), debido a que la hemólisis se refiere a la ruptura de las membranas de los eritrocitos. Las nanopartículas cargadas positivamente interactúan con los fosfolípidos de las membranas de los eritrocitos y debido a que la superficie del NS con alta carga superficial pueden perturbar la bicapa lipídica de los eritrocitos, provocando hemólisis. Por el contrario, el nanosistema que posee un potencial zeta menor tiende a reducir la hemólisis, por la repulsión de cargas entre las nanopartículas y eritrocitos, reduciendo el contacto con las membranas celulares. Esta disminución puede ser debido al recubrimiento con aptámero y 4-arm-PEG-Maleimida redujo el potencial Z y por ende una disminución significativa de hemólisis [92].

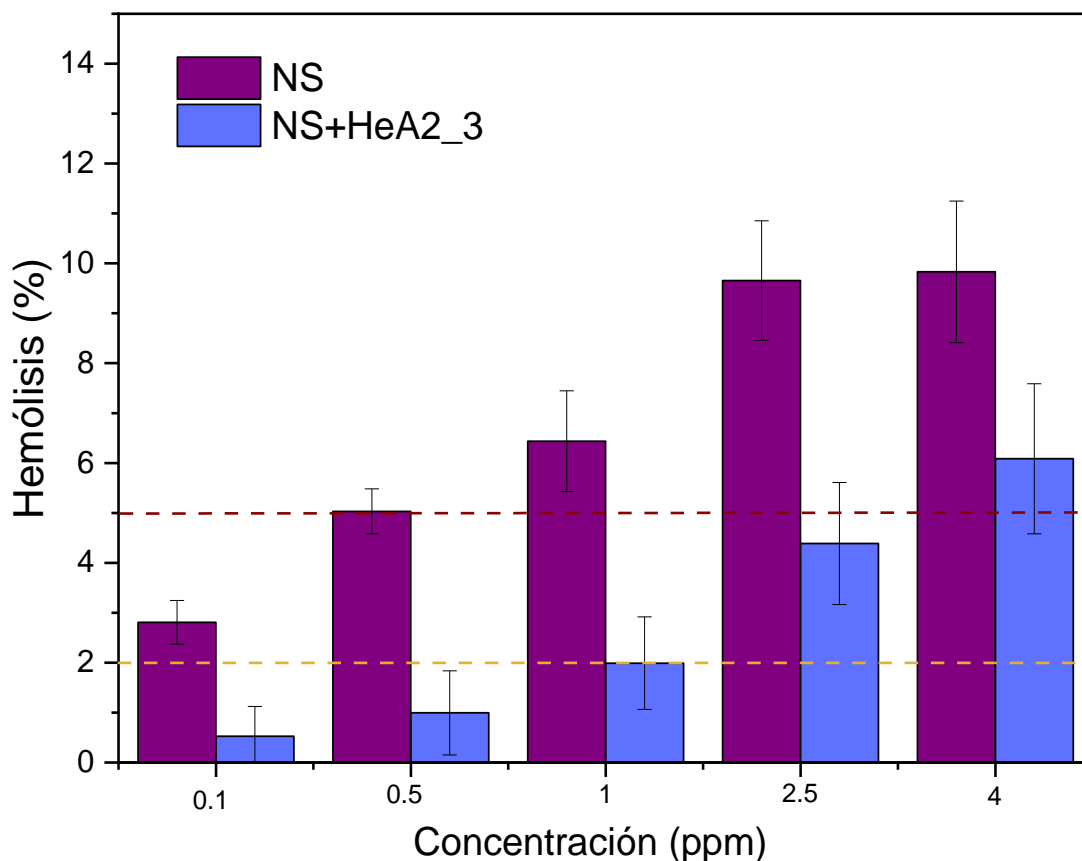


Figura 33. Hemólisis de NS y NS+HeA2\_3.

#### 4.4.2 Viabilidad celular mediante MTT

Según la ISO 10993-5: Evaluación biológica de dispositivos médicos- Parte 5: Pruebas de citotoxicidad in vitro menciona que la reducción de la viabilidad celular en más del 30% se considera un efecto citotóxico. Por lo que se busca que los tratamientos tengan una viabilidad celular mayor al 70% [93].

Los resultados del análisis de viabilidad celular en células de cáncer que sobreexpresan HER2 son prometedores. Se observó una citotoxicidad significativa en cuatro de las cinco concentraciones evaluadas del nanosistema, evidenciando una viabilidad celular inferior al 70%. Esta citotoxicidad selectiva se atribuye a la presencia del aptámero anti-HER2 en el nanosistema, el cual se une específicamente a las células que sobreexpresan esta proteína.

La mayor eficacia del nanosistema en comparación con las NS solas corrobora la importancia del aptámero en la internalización celular y la inducción de la muerte celular. Estos resultados concuerdan con estudios previos de Gijs *et al* y Pinilla *et al*, donde aptámeros similares dirigidos contra HER2 demostraron una reducción en la viabilidad celular en líneas celulares con baja y moderada expresión de este receptor. Sin embargo, el nanosistema desarrollado en este proyecto presenta una citotoxicidad aún mayor al ser evaluadas en líneas celulares con alta expresión del receptor HER2, lo que sugiere una optimización en su diseño y síntesis [10], [38].

La alta expresión de HER2 en la línea celular utilizada en este estudio facilita la unión del aptámero y la posterior internalización del nanosistema, potenciando su efecto citotóxico. Estos hallazgos posicionan a este nanosistema como un prometedor candidato para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer HER2 positivo.

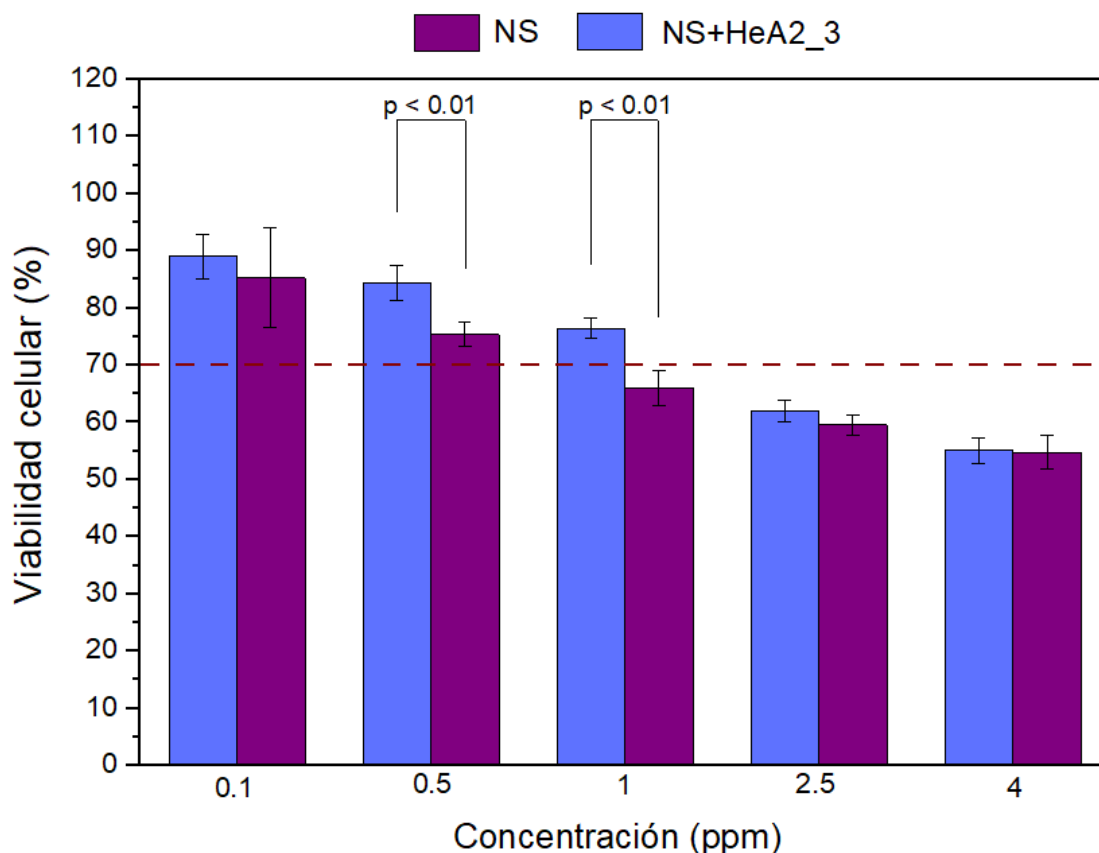


Figura 34. Evaluación de la citotoxicidad inducida por NS y nanosistemas completos en la línea celular de cáncer de mama HCC1954, cuantificada mediante el ensayo colorimétrico MTT.

Los resultados de la evaluación de viabilidad celular en células sanas (VERO CCL-81 CCL-81) mostraron que dos concentraciones de nanopartículas de oro (NS) y tres del nanosistema no presentaron citotoxicidad. Esta ausencia de toxicidad en células sanas y la alta citotoxicidad observada en células cancerosas se atribuye a la expresión diferencial del Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (HER2). Mientras que en células sanas HER2 desempeña un papel fisiológico en el crecimiento celular y activa vías de señalización intracelular, expresando esta proteína de manera moderada, en algunos tipos de cáncer este receptor se sobreexpresa significativamente. Dado que el nanosistema incorpora un aptámero específico contra HER2, su efecto se concentra en células con sobreexpresión de este receptor, minimizando el daño a células sanas. Los resultados de hemólisis y viabilidad celular sugieren que las concentraciones de 1 y 0.5 ppm son las más adecuadas para este tipo de tratamiento [94], [95], [96]. En conjunto, estos hallazgos evidencian el potencial del nanosistema como una prometedora alternativa terapéutica

debido a que la línea celular evaluada (HCC1954) sobreexpresa HER2 y son resistentes al fármaco Trastuzumab (tratamiento contra cáncer que sobreexpresa HER2), demostrando que el tratamiento es sensible al aptámero por lo que se demuestra ser un potencial tratamiento eficaz a líneas celular resistentes al Trastuzumab. Adicionalmente, presentan una toxicidad reducida en células sanas las cuales presentan baja afinidad al aptámero y a Trastuzumab, por lo que el tratamiento representa un avance significativo en la investigación de nanosistemas dirigidos a HER2 [97].

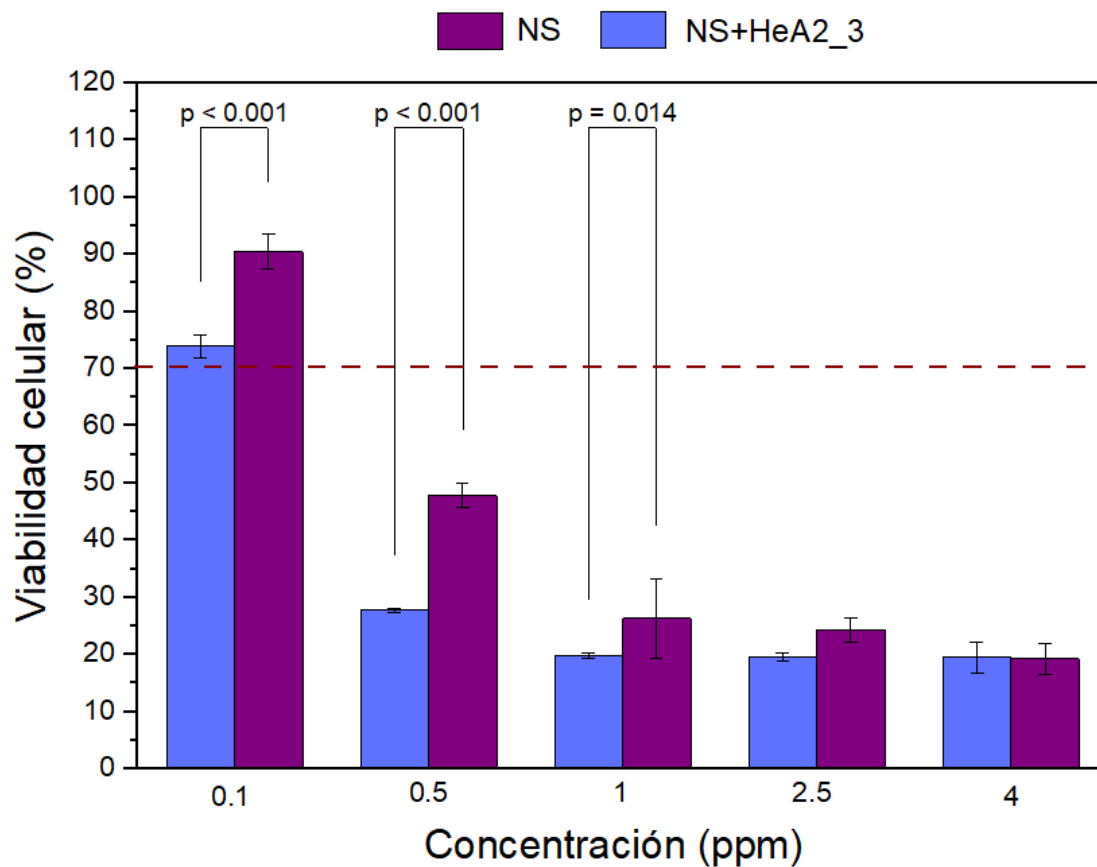


Figura 35. Evaluación de la citotoxicidad inducida por NS y nanosistemas completos en la línea celular sana VERO CCL-81 CCL-81, cuantificada mediante el ensayo colorimétrico MTT.

Los resultados se analizaron con un análisis de varianza y una prueba de Fisher, con un intervalo de confianza del 95% para determinar diferencias significativas entre el grupo de NS y NS+HeA2\_3.



#### 4.4.3 Internalización del nanosistema

El análisis de internalización NS+HeA2\_3 se resume en la **Tabla 28**, detallando la línea celular empleada, el recuento celular inicial y final, así como la concentración inicial y recuperada de oro (en ppm), estos datos permitieron calcular el porcentaje de internalización, proporcionando una estimación cuantitativa de la captación celular de los nanosistemas.

Tabla 28. Parámetros para la medición de la internalización del NS+HeA2\_3 en líneas celulares.

Línea celular	Numero de células inicial	Numero de células final	Concentración de Au inicial (ppm)	Concentración de Au final (ppm)	Porcentaje de internalización (%)
VERO CCL-81	320,000	305,000	0.5	0.45	94.5
		287,000	1	0.70	78.7
HCC1954		303,000	0.5	0.47	99.3
		283,000	1	0.76	85.9

La recuperación celular post-tratamiento fue inferior al 100%, dado que, de las 320,000 células sembradas inicialmente, se lograron recuperar de 305,000 a 283,000 células. Para obtener resultados más precisos, se ajustó la concentración de oro en función del número de células vivas y muertas recuperadas, esta última población, si bien no contribuye a la viabilidad del cultivo, puede contener nanopartículas internalizadas que influyen en las mediciones por ICP. Es decir, se determinó la nueva concentración que representaría el 100% de las ppm de Au con relación a la cantidad de células recuperadas como se observa en la **Ecuación 3**. Este ajuste permitió calcular un porcentaje de internalización más realista, basado en los datos obtenidos por ICP como se observa en la **Ecuación 4**.

$$C_n = \frac{(nC_f)(C_i)}{nC_i}$$

Ecuación 3. Concentración de Au con relación a la cantidad de células recuperadas.

Donde:

$C_n$ -Nueva concentración de Au con relación a la cantidad de células recuperadas

$nC_f$ -Numero de células finales

$C_i$ -Concentración de Au inicial

$nC_i$ -Numero de células inicial

$$\% \text{ de internalización} = \frac{(C_f)(100\%)}{C_n}$$

Ecuación 4. Porcentaje de internalización del nanosistema en células.

Donde:

$C_n$ -Nueva concentración de Au con relación a la cantidad de células recuperadas

$C_f$ -Concentración final de Au medida mediante ICP

Los resultados de internalización indican que el nanosistema es capaz de penetrar tanto en células sanas como cancerosas, sin mostrar una preferencia significativa por un tipo de célula sobre otro. Además, se observó una tendencia hacia una mayor internalización a una concentración de 0.5 ppm en comparación con 1 ppm. Sin embargo, se sugiere que esta aparente diferencia podría deberse a una mayor recuperación celular, más que a una mayor eficiencia de internalización [98], [99].

El elevado porcentaje de internalización observado puede atribuirse a la cuidadosa selección de los componentes del nanosistema. La goma de mezquite y el 4-arm-PEG-maleimida confieren al sistema una excelente biocompatibilidad y estabilidad en el medio celular, facilitando su interacción con las membranas celulares. Por otro lado, la b-PEI, al actuar como un eficiente agente de transporte, facilita la entrega del aptámero al interior de las células cancerosas. Este equilibrio entre biocompatibilidad, estabilidad y funcionalidad del nanosistema parece ser clave para la alta eficiencia de internalización observada [34], [86]. Dado que la ICP-OES proporciona un análisis cuantitativo sin distinción entre nanosistemas internalizados y superficiales, los altos niveles detectados en células VERO CCL-81 podrían atribuirse parcial o principalmente a la adsorción en la superficie celular. Para determinar con mayor precisión la internalización real en células sanas y cancerosas, se recomienda complementar este análisis con técnicas que permitan diferenciar entre ambas localizaciones. El estudio de Carrión *et al.* revela, mediante un ensayo de fluorescencia, la alta especificidad del nanosistema de nanopartículas de oro funcionalizado con aptámero AptHer2, aptámero con la misma secuencia utilizada en este trabajo, pero con un fluoróforo ATTO 647N, el cual muestra una mayor interacción con células cancerígenas ZR-75-30 con alta sobreexpresión de HER2 en comparación con células VERO CCL-81 CCL-81. Por lo que, en

este caso se sugiere profundizar en el estudio de la internalización de este nanosistema mediante técnicas complementarias, a fin de determinar con mayor precisión su localización intracelular y extracelular [70]. Esta información resulta crucial para optimizar la metodología y la aplicación buscada mediante este proyecto.

Los resultados obtenidos, aunque prometedores, sugieren que es necesario optimizar la metodología actual para la cuantificación de la internalización. La integración de técnicas complementarias, como microscopias y citometrías, permitiría confirmar los datos obtenidos por ICP-OES y obtener una caracterización más detallada de la localización intracelular y la interacción del nanosistema con los componentes celulares.

## 5. Conclusiones

Se desarrolló un nuevo copolímero mediante una serie de modificaciones estratégicas, conservando la capacidad amortiguadora de protones de la b-PEI, un polímero de amplio uso en el campo biomédico. La conjugación con goma de mezquite permitió mitigar los efectos hemolíticos de la b-PEI y fue posible fusionar las propiedades sintéticas de la b-PEI con las características naturales de la goma de mezquite.

El copolímero demostró ser un agente reductor y estabilizante altamente eficiente, permitiendo la síntesis de nanopartículas de oro (NS) estables y biocompatibles con un promedio de radio hidrodinámico de 12 nm, ideal para aplicaciones biológicas e internalización celular. La solución de NS obtenida fue homogénea y presentó una carga superficial positiva, lo que facilita su interacción con biomoléculas cargadas negativamente, como los ácidos nucleicos, a través de interacciones electrostáticas.

Utilizando los NS sintetizados, fue posible desarrollar un nanosistema altamente específico, conjugado con un aptámero-PEG, capaz de reducir significativamente la viabilidad celular en células de cáncer de mama HER2-positivo (HCC1954). Con un tamaño de 10 nm aproximadamente y excelentes perfiles de biocompatibilidad y hemocompatibilidad, este nanosistema demostró una citotoxicidad selectiva hacia las células tumorales, induciendo una reducción del 80% en la viabilidad celular con 1 ppm, y 75% de citotoxicidad con 0.5 ppm. El nanosistema exhibió una citotoxicidad selectiva hacia células tumorales HER2-positivas, lo que indica una alta especificidad mediada por el aptámero. Esta selectividad, junto con la baja toxicidad en células no tumorales, sugiere un potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer de mama positivo a HER2.

El nanosistema NS+HeA2\_3 demostró una alta eficiencia de internalización, superando el 78% en las células evaluadas. Sin embargo, se resalta la importancia de continuar con la investigación de este proyecto con la finalidad de evaluar de manera más detallada la internalización de este nanosistema dentro de ambas líneas celular evaluadas.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran el potencial del nanosistema NS+HeA2\_3 como una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer HER2-positivo. La alta eficiencia de internalización, la selectividad hacia células tumorales y la baja toxicidad en células sanas hacen de este sistema un candidato prometedor para superar la resistencia a tratamientos convencionales.

## 6. Referencias

- [1] WHO, "Cáncer". Consultado: el 10 de diciembre de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [2] IMSS, "Epidemiología del cáncer de mama". Consultado: el 9 de abril de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/imss/articulos/epidemiologia-del-cancer-de-mama-318014>
- [3] A. De Juan, L. Calera, L. Gutiérrez, L. Saiz, y M. A. Ruiz De La Fuente, "Actualización del tratamiento del cáncer de mama". Consultado: el 14 de junio de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/232GER.pdf>
- [4] G. Deng, H. Zha, H. Luo, y Y. Zhou, "Aptamer-conjugated gold nanoparticles and their diagnostic and therapeutic roles in cancer", 2023, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, doi: 10.3389/fbioe.2023.1118546.
- [5] M. Entezari *et al.*, "Gold nanostructure-mediated delivery of anticancer agents: Biomedical applications, reversing drug resistance, and stimuli-responsive nanocarriers", *Environmental Research*, 2023, doi: 10.1016/j.envres.2023.115673.
- [6] M. Baghel *et al.*, "Carboxymethylated gums and derivatization: strategies and significance in drug delivery and tissue engineering", *Pharmaceuticals*, 2023, doi: 10.3390/ph16050776.
- [7] D. T. Debela *et al.*, "New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives", *SAGE Open Medicine*, 2021, doi: 10.1177/205031212111034366.
- [8] K. M. Song, S. Lee, y C. Ban, "Aptamers and their biological applications", *Sensors*, 2012. doi: 10.3390/s120100612.
- [9] S. Poussard, M. Decossas, O. Le Bihan, S. Mornet, G. Naudin, y O. Lambert, "Internalization and fate of silica nanoparticles in C2C12 skeletal muscle cells: Evidence of a beneficial effect on myoblast fusion", *International Journal of Nanomedicine*, 2015, doi: 10.2147/IJN.S74158i.
- [10] M. Gijs *et al.*, "Improved aptamers for the diagnosis and potential treatment of HER2-positive cancer", *Pharmaceuticals*, 2016, doi: 10.3390/ph9020029.
- [11] J. S. Brown, S. R. Amend, R. H. Austin, R. A. Gatenby, E. U. Hammarlund, y K. J. Pienta, "Updating the definition of cancer", *Molecular Cancer Research*, 2023, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-23-0411.

- [12] INEGI, “Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer”, Consultado: el 15 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2025/EAP\\_DMvsCancer25.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2025/EAP_DMvsCancer25.pdf)
- [13] Secretaría de Salud, “Cáncer, tercera causa de muerte en México”. Consultado: el 25 de septiembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico#:~:text=En%20M%C3%A9xico%20el%20c%C3%A1ncer%20es,de%20alrededor%20de%2063%20a%C3%B1os>.
- [14] WHO, “Breast cancer”. Consultado: el 6 de octubre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- [15] INEGI, “Estadísticas a propósito del día internacional de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre)”, Consultado: el 7 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.breastcancer.org/es/pruebas-deteccion/mamografias/beneficios-riesgos>
- [16] E. Provenzano, G. A. Ulaner, S.-F. Chin Bsc, A. Affiliations, y A. Member, “Molecular classification of breast cancer”, *PET Clinics*, 2018, doi: 10.1016/j.cpet.2018.02.004
- [17] ACS, “Understanding a breast cancer diagnosis”, Consultado: el 4 de agosto 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.uptodate.com>.
- [18] E. J. Watkins, “Overview of breast cancer”, *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 2019, doi: 10.1097/01.JAA.0000580524.95733.3d.
- [19] K. L. Maughan, M. A. Lutterbie, y P. S. Ham, “Treatment of breast cancer”, Consultado: 17 de marzo de 2024. [En línea]. Disponible en: [www.aafp.org/afpAmericanFamilyPhysician1339](http://www.aafp.org/afpAmericanFamilyPhysician1339)
- [20] S. Maximiano, P. Magalhães, M. P. Guerreiro, y M. Morgado, “Trastuzumab in the treatment of breast cancer”, *BioDrugs*, 2016, doi: 10.1007/s40259-016-0162-9.
- [21] C. J. Bishop, S. Y. Tzeng, y J. J. Green, “Degradable polymer-coated gold nanoparticles for co-delivery of DNA and siRNA”, *Acta Biomaterialia*, 2015, doi: 10.1016/j.actbio.2014.09.020.
- [22] C. J. Murphy *et al.*, “Gold nanoparticles in biology: Beyond toxicity to cellular imaging”, *Accounts of Chemical Research*, 2008, doi: 10.1021/ar800035u.

- [23] Arnida, A. Malugin, y H. Ghandehari, "Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: A comparative study of rods and spheres", *Journal of Applied Toxicology*, vol. 30, 2010, doi: 10.1002/jat.1486.
- [24] Ł. Dziawer *et al.*, "Trastuzumab-modified gold nanoparticles labeled with <sup>211</sup>At as a prospective tool for local treatment of HER2-positive breast cancer", *Nanomaterials*, 2019, doi: 10.3390/nano9040632.
- [25] C. Katragadda, P. Choudhury, y P. Murthy, "Nanoparticles as Non-Viral Gene Delivery Vectors", *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2010, doi: 10.1109/TNB.2007.908996
- [26] Y. Wang, M. Zheng, F. Meng, J. Zhang, R. Peng, y Z. Zhong, "Branched polyethylenimine derivatives with reductively cleavable periphery for safe and efficient *in vitro* gene transfer", *Biomacromolecules*, 2011, doi: 10.1021/bm101364f.
- [27] P. Vicennati, A. Giuliano, G. Ortaggi, y A. Masotti, "Polyethylenimine in medicinal chemistry", *Current Medicinal Chemistry*, 2008, doi: 10.2174/092986708786242778
- [28] Z. Chen, Z. Lv, Y. Sun, Z. Chi, y G. Qing, "Recent advancements in polyethyleneimine-based materials and their biomedical, biotechnology, and biomaterial applications", *Royal Society of Chemistry*, 2020, doi: 10.1039/c9tb02271f.
- [29] D. Costa, A. J. M. Valente, J. A. Queiroz, y Â. Sousa, "Finding the ideal polyethylenimine-plasmid DNA system for co-delivery of payloads in cancer therapy", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.06.063.
- [30] B. Singh *et al.*, "Tuning the buffering capacity of polyethylenimine with glycerol molecules for efficient gene delivery: Staying in or out of the endosomes", *Macromolecular Bioscience*, 2015, doi: 10.1002/mabi.201400463.
- [31] P. Jana, S. Ghosh, y K. Sarkar, "Low molecular weight polyethyleneimine conjugated guar gum for targeted gene delivery to triple negative breast cancer", *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.090.
- [32] L. M. P. Vermeulen, S. C. De Smedt, K. Remaut, y K. Braeckmans, "The proton sponge hypothesis: Fable or fact?", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2018, doi: 10.1016/j.ejpb.2018.05.034.



- [33] A. M. Pinilla-Torres et al., "Green synthesis of mesquite-gum-stabilized gold nanoparticles for biomedical applications: Physicochemical properties and biocompatibility assessment", *Polymers (Basel)*, 2023, doi: 10.3390/polym15173533.
- [34] A. M. Pinilla-Torres, P. Y. Carrión-García, C. N. Sánchez-Domínguez, H. Gallardo-Blanco, y M. Sánchez-Domínguez, "Modification of branched polyethyleneimine using mesquite gum for its improved hemocompatibility", *Polymers (Basel)*, 2021, doi: 10.3390/polym13162766.
- [35] G. Dalei y S. Das, "Carboxymethyl guar gum: A review of synthesis, properties and versatile applications", *European Polymer Journal*, 2022, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111433.
- [36] ThermoScientific, "Pierce Premium Grade EDC", 2017.
- [37] ThermoScientific, "NHS and Sulfo-NHS", 2020.
- [38] A. M. Pinilla Torres, M. Sánchez Domínguez, y H. Gallardo Blanco, "Nanosistema conformado por nanopartículas de oro recubiertas de un copolímero de polietilenimina goma de mezquite conjugado con aptámero HER2 para la administración dirigida de ácidos nucleicos".
- [39] H. Y. Jeong et al., "Development of HER2-specific aptamer-drug conjugate for breast cancer therapy", *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, doi: 10.3390/ijms21249764.
- [40] H. Lee, D. H. M. Dam, J. W. Ha, J. Yue, y T. W. Odom, "Enhanced human epidermal growth factor receptor 2 degradation in breast cancer cells by lysosome-targeting gold nanoconstructs", *ACS Nano*, 2015, doi: 10.1021/acsnano.5b05138.
- [41] Y. L. López Franco, "Uso del mezquite como fuente de polisacáridos de alto valor agregado", Consultado: el 18 de diciembre de 2023. [En línea]. Disponible en: [https://www.conafor.gob.mx/biblioteca/foros/Mezquite/USO\\_DEL\\_MEZQUITE\\_COMO\\_FUENTE\\_DE\\_POLISACARIDOS\\_DE\\_ALTO\\_VALOR\\_AGREGADO.PDF](https://www.conafor.gob.mx/biblioteca/foros/Mezquite/USO_DEL_MEZQUITE_COMO_FUENTE_DE_POLISACARIDOS_DE_ALTO_VALOR_AGREGADO.PDF)
- [42] M. Berenice Moreno-Trejo, A. Adrián Rodríguez-Rodríguez, Á. Suarez-Jacobo, y M. Sánchez-Domínguez, "Development of nano-emulsions of essential citrus oil stabilized with mesquite gum", *Nanoemulsions - Properties, Fabrications and Applications*, 2019. doi: 10.5772/intechopen.84157.
- [43] A. Mahto y S. Mishra, "The removal of textile industrial dye-RB-19 using guar gum-based adsorbent with thermodynamic and kinetic evaluation parameters", *Polymer Bulletin*, 2022, doi: 10.1007/s00289-021-03663-4.

- [44] M. B. Moreno-Trejo y M. Sánchez-Domínguez, "Mesquite gum as a novel reducing and stabilizing agent for modified tollens synthesis of highly concentrated Ag nanoparticles", *Materials*, 2016, doi: 10.3390/ma9100817.
- [45] B. Zhao, T. J. Kolibaba, S. Lazar, y J. C. Grunlan, "Environmentally-benign, water-based covalent polymer network for flame retardant cotton", *Cellulose*, 2021, doi: 10.1007/s10570-021-03874-y.
- [46] T. L. Barr y S. Seal, "Nature of the use of adventitious carbon as a binding energy standard", *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 1995, doi: 10.1116/1.579868.
- [47] M. Pedrosa et al., "Hummers' and Brodie's graphene oxides as photocatalysts for phenol degradation", *Journal of Colloid and Interface Science*, 2020, doi: 10.1016/j.jcis.2020.01.093.
- [48] M. Kehrér et al., "XPS investigation on the reactivity of surface imine groups with TFAA", *Plasma Processes and Polymers*, 2019, doi: 10.1002/ppap.201800160.
- [49] P. Jana *et al.*, "Synthesis of a carboxymethylated guar gum grafted polyethyleneimine copolymer as an efficient gene delivery vehicle", *RSC Advances*, 2016, doi: 10.1039/c5ra23447f.
- [50] S. Choosakoonkriang, B. A. Lobo, G. S. Koe, J. G. Koe, y C. R. Middaugh, "Biophysical characterization of PEI/DNA complexes". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, doi: 10.1002/jps.10437
- [51] A. I. Usman, A. A. Aziz, y O. A. Noqta, "Application of green synthesis of gold nanoparticles: A review", *Jurnal Teknologi*, 2019, doi: 10.11113/jt.v81.11409.
- [52] P. B. Santhosh, J. Genova, y H. Chamati, "Review green synthesis of gold nanoparticles: An eco-friendly approach", *Chemistry (Switzerland)*, 2022, doi: 10.3390/chemistry4020026.
- [53] A. Madhusudhan, G. B. Reddy, y I. M. Krishana, "Green synthesis of gold nanoparticles by using natural gums", *Nanomaterials and Plant Potential, Springer International Publishing*, 2019, doi: 10.1007/978-3-030-05569-1\_4.
- [54] K. Bali *et al.*, "Controlling the morphology of poly(ethyleneimine)/gold nanoassemblies through the variation of pH and electrolyte additives", *Journal of Molecular Liquids*, 2021, doi: 10.1016/j.molliq.2020.114559.

- [55] J. D. S. Newman y G. J. Blanchard, "Formation of gold nanoparticles using amine reducing agents", *Langmuir*, 2006, doi: 10.1021/la060045z.
- [56] T. J. Cho, J. M. Gorham, J. M. Pettibone, J. Liu, J. Tan, y V. A. Hackley, "Parallel multi-parameter study of PEI-functionalized gold nanoparticle synthesis for bio-medical applications: part 1—a critical assessment of methodology, properties, and stability", *Journal of Nanoparticle Research*, 2019, doi: 10.1007/s11051-019-4621-3.
- [57] M. B. Moreno-Trejo y M. Sánchez-Domínguez, "Mesquite gum as a novel reducing and stabilizing agent for modified tollens synthesis of highly concentrated Ag nanoparticles", *Materials*, 2016, doi: 10.3390/ma9100817.
- [58] A. Timoszyk y R. Grochowalska, "Mechanism and antibacterial activity of gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with natural compounds from plants", *Pharmaceutics* 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14122599.
- [59] D. S. B. Gomes *et al.*, "UV-accelerated synthesis of gold nanoparticle–pluronic nanocomposites for x-ray computed tomography contrast enhancement", *Polymers (Basel)*, 2023, doi: 10.3390/polym15092163.
- [60] Y. Shang, C. Min, J. Hu, T. Wang, H. Liu, y Y. Hu, "Synthesis of gold nanoparticles by reduction of  $\text{HAuCl}_4$  under UV irradiation", *Solid State Science*, 2013, doi: 10.1016/j.solidstatesciences.2012.09.002.
- [61] J. Z. Chan, R. Rasit Ali, K. Shameli, M. S. N. Salleh, K. X. Lee, y E. D. Mohamed Isa, "Green synthesis of gold nanoparticles using aqueous extract of *clitoria ternatea* flower", *Conference Series: Materials Science and Engineering, Institute of Physics Publishing*, 2020, doi: 10.1088/1757-899X/808/1/012036.
- [62] S. Sangwan y R. Seth, "Synthesis, characterization and stability of gold nanoparticles (AuNPs) in different buffer systems", *Journal of Cluster Science*, 2022, doi: 10.1007/s10876-020-01956-8.
- [63] H. Tyagi, A. Kushwaha, A. Kumar, y M. Aslam, "A facile pH controlled citrate-based reduction method for gold nanoparticle synthesis at room temperature", *Nanoscale Research Letters*, 2016, doi: 10.1186/s11671-016-1576-5.

- [64] A. Devia, H. A. Castillo, V. J. Benavides, Y. C. Arango, y J. H. Quintero, "Growth and characterization of AuN films through the pulsed arc technique", *Materials Characterization*, 2008, doi: 10.1016/j.matchar.2006.10.023.
- [65] X. D. Zhang *et al.*, "Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy", *Biomaterials*, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.047.
- [66] L. Dreaden, M. & Austin, y El-Sayed, "Size matters: Gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery". Consultado: el 28 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: [www.future-science.com](http://www.future-science.com)
- [67] W. K. Mekhamer, "The colloidal stability of raw bentonite deformed mechanically by ultrasound", *Journal of Saudi Chemical Society*, 2010, doi: 10.1016/j.jscs.2010.04.013.
- [68] K. Yang *et al.*, "Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation", *Protein Engineer*, 2003, doi: 10.1093/protein/gzg093.
- [69] H. Durmaz, B. Colakoglu, U. Tunca, y G. Hizal, "Preparation of block copolymers via Diels Alder reaction of maleimide- and anthracene-end functionalized polymers", *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 2006, doi: 10.1002/pola.21275.
- [70] P. Y. Carrión-García *et al.*, "Aptamer-conjugated gold nanoparticles targeting human epidermal growth factor receptor 2 (her2) for cancer theranostic, *in vitro* assays", *Materials proceedings*, 2023, doi: 10.3390/iocn2023-14502.
- [71] M. Nerantzaki, C. Loth, y J. F. Lutz, "Chemical conjugation of nucleic acid aptamers and synthetic polymers", *Polymer Chemistry*, 2021, doi: 10.1039/d1py00516b.
- [72] S. Belbekhouche, M. Guerrouache, y B. Carbonnier, "Thiol-maleimide michael addition click reaction: A new route to surface modification of porous polymeric monolith", *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2016, doi: 10.1002/macp.201500427.
- [73] T. Järvinen, S. H. Hosseini Shokouh, S. Sainio, O. Pitkänen, y K. Kordas, "Ultrafast photoresponse of vertically oriented TMD films probed in a vertical electrode configuration on Si chips", *Nanoscale Advances*, 2022, doi: 10.1039/d2na00313a.
- [74] P. M. Shanthi, P. J. Hanumantha, K. Ramalinga, B. Gattu, M. K. Datta, y P. N. Kumta, "Sulfonic acid based complex framework materials (cfm): nanostructured polysulfide

immobilization systems for rechargeable lithium–sulfur battery”, *Journal of The Electrochemical Society*, 2019, doi: 10.1149/2.0251910jes.

[75] Creative PEGWorks, “4-Arm PEG-MAL (MAL: Maleimide)”. Consultado: el 24 de septiembre de 2023. [En línea]. Disponible en: [https://creativepegworks.com/product/4-arm-peg-mal-mw-2k?srsId=AfmBOooAAAnN-tj6mxUsTiB6eQktTY5F6oKkOmv3C8riZMn4PpRnhwZ7\\_](https://creativepegworks.com/product/4-arm-peg-mal-mw-2k?srsId=AfmBOooAAAnN-tj6mxUsTiB6eQktTY5F6oKkOmv3C8riZMn4PpRnhwZ7_)

[76] S. M. Taghdisi *et al.*, “Targeted delivery of Epirubicin to cancer cells by PEGylated A10 aptamer”, *Journal of Drug Targeting*, 2013, doi: 10.3109/1061186X.2013.812095.

[77] D. Kim, Y. Y. Jeong, y S. Jon, “A drug-loaded aptamer - Gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer”, *ACS Nano*, 2010, doi: 10.1021/nn901877h.

[78] N. Shahidi-Hamedani, W. T. Shier, F. Moghadam Ariaee, K. Abnous, y M. Ramezani, “Targeted gene delivery with noncovalent electrostatic conjugates of sgc-8c aptamer and polyethylenimine”, *Journal of Gene Medicine*, 2013, doi: 10.1002/jgm.2718.

[79] M. F. Zarabi, N. Arshadi, A. Farhangi, y A. Akbarzadeh, “Preparation and characterization of gold nanoparticles with amino acids, examination of their stability”, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2014, doi: 10.1007/s12291-013-0358-4.

[80] J. J. Petkowski, W. Bains, y S. Seager, “Natural products containing a nitrogen-sulfur bond”, *Journal of Natural Products*, 2018, doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00921.

[81] J. Watts y J. Wolstenholme, “An introduction to surface analysis by XPS and AES”. Wiley, 2003.

[82] J. F. Moulder, W. F. Stickle, P. E. ' Sobol, K. D. Bomben, y J. Chastain, “Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy a reference book of standard spectra for identification and interpretation of XPS data”. Perkin-Elmer Corporation, 1993.

[83] Y. F. Huang, Y. W. Lin, Z. H. Lin, y H. T. Chang, “Aptamer-modified gold nanoparticles for targeting breast cancer cells through light scattering”, *Journal of Nanoparticle Research*, 2009, doi: 10.1007/s11051-008-9424-x.

[84] H. Liu, H. Zhang, J. Wang, y J. Wei, “Effect of temperature on the size of biosynthesized silver nanoparticle: Deep insight into microscopic kinetics analysis”, *Arabian Journal of Chemistry*, 2020, doi: 10.1016/j.arabjc.2017.09.004.

[85] ASTM, “Standar practice for assessment of hemolytic properties of materials”, 2017.

- [86] A. M. Pinilla-Torres *et al.*, “Green synthesis of mesquite-gum-stabilized gold nanoparticles for biomedical applications: Physicochemical properties and biocompatibility assessment”, *Polymers (Basel)*, 2023, doi: 10.3390/polym15173533.
- [87] Y. L. López-Franco, C. I. Cervantes-Montaña, K. G. Martínez-Robinson, J. Lizardi-Mendoza, y L. E. Robles-Ozuna, “Physicochemical characterization and functional properties of galactomannans from mesquite seeds (*Prosopis spp.*)”, *Food Hydrocolloids*, 2013, doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.08.012.
- [88] D. Kim *et al.*, “*In vitro* test methods for evaluating high molecular weight polyethylene oxide polymer induced hemolytic and thrombotic potential”, *Toxicology in Vitro*, 2024, doi: 10.1016/j.tiv.2024.105793.
- [89] H. Jeong, J. Hwang, H. Lee, P. T. Hammond, J. Choi, y J. Hong, “*In vitro* blood cell viability profiling of polymers used in molecular assembly”, *Scientific Reports*, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10169-5.
- [90] W. Wang, W. Xiong, Y. Zhu, H. Xu, y X. Yang, “Protective effect of PEGylation against poly(amidoamine) dendrimer-induced hemolysis of human red blood cells”, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 2010, doi: 10.1002/jbm.b.31558.
- [91] E. Pędziwiatr-Werbicka *et al.*, “Pegylation of dendronized gold nanoparticles affects their interaction with thrombin and siRNA”, *Journal of Physical Chemistry B*, 2021, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c10177.
- [92] S. Kumar, I. Jha, N. K. Mogha, y P. Venkatesu, “Biocompatibility of surface-modified gold nanoparticles towards red blood cells and haemoglobin”, *Applied Surface Science*, 2020, doi: 10.1016/j.apsusc.2020.145573.
- [93] ISO, “ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity”, 2009.
- [94] M. Galogre, D. Rodin, M. Pyatnitskiy, M. Mackelprang, y I. Koman, “A review of HER2 overexpression and somatic mutations in cancers”, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2023, doi: 10.1016/j.critrevonc.2023.103997.
- [95] J. Zhang *et al.*, “A dual-functional HER2 aptamer-conjugated, pH-activated mesoporous silica nanocarrier-based drug delivery system provides in vitro synergistic cytotoxicity in her2-

positive breast cancer cells”, *International Journal of Nanomedicine*, 2019, doi: 10.2147/IJN.S201688.

[96] A. Latorre *et al.*, “DNA and aptamer stabilized gold nanoparticles for targeted delivery of anticancer therapeutics”, *Nanoscale*, 2014, doi: 10.1039/c4nr00019f.

[97] P. Carrión, “Desarrollo y evaluación de un nanosistema para la detección de células que sobreexpresan HER2”, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2023.

[98] D. B. Chithrani, M. Dunne, J. Stewart, C. Allen, y D. A. Jaffray, “Cellular uptake and transport of gold nanoparticles incorporated in a liposomal carrier”, *Nanomedicine*, 2010, doi: 10.1016/j.nano.2009.04.009.

[99] Y. Liu, M. K. Shipton, J. Ryan, E. D. Kaufman, S. Franzen, y D. L. Feldheim, “Synthesis, stability, and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly(ethylene glycol) monolayers”, *Analytical Chemistry*, 2007, doi: 10.1021/ac061578f.

[100] D. U. Santos-Ballardo *et al.*, “A simple spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture”, *Aquaculture*, 2015, doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.044.

[101] A. Jafarian, B. Zolfaghari, y K. Shirani, “Cytotoxicity of different extracts of arial parts of *Ziziphus spina-christi* on Hela and MDA-MB-468 tumor cells”, *Advanced Biomedical Research*, 2014, doi: 10.4103/2277-9175.125727.

[102] BioTechniques, “Spectrophotometric quantitation of tissue culture cell number in any medium”, 1996.

[103] Roche, “Cell Proliferation Kit I (MTT)”, Mannheim, 2020.

[104] A. Babaei, S. M. Mousavi, M. Ghasemi, N. Pirbonyeh, M. Soleimani, y A. Moattari, “Gold nanoparticles show potential *in vitro* antiviral and anticancer activity”, *Life Sciences*, 2021, doi: 10.1016/j.lfs.2021.119652.

[105] N. O. Alafaleq *et al.*, “Anticancer potential of gold nanoparticles (AuNPs) using a battery of *in vitro* tests”, *Nanotechnology Reviews*, 2022, doi: 10.1515/ntrev-2022-0502.

[106] M. A. Meléndez-Villanueva *et al.*, “Virucidal activity of gold nanoparticles synthesized by green chemistry using garlic extract”, *Viruses*, 2019, doi: 10.3390/v11121111.

- [107] I. M. Gabas, G. Stepien, M. Moros, S. G. Mitchell, y J. M. De La Fuente, “*In vitro* cell cytotoxicity profile and morphological response to polyoxometalate-stabilised gold nanoparticles”, *New Journal of Chemistry*, 2016, doi: 10.1039/c5nj02775f.
- [108] WHO, “Global cancer”. Consultado: el 14 de julio de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
- [109] Y. Sanchez et al., “Cancer cell cycles”, 1995. Consultado: el 1 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)
- [110] O. Warburg, “On the origin of cancer cells”, *Science* (1979), 1956, doi: 10.1126/science.123.3191.309.
- [111] S. A. Albagoush, M. Zubair, y F. Limaiem, “Tissue evaluation for HER2 tumor marker”, Consultado: el 30 de octubre de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30725819/>
- [112] M. C. Figueroa-Magalhães, D. Jelovac, R. M. Connolly, y A. C. Wolff, “Treatment of HER2-positive breast cancer”, *Breast*, 2014, doi: 10.1016/j.breast.2013.11.011.
- [113] S. Loibl y L. Gianni, “HER2-positive breast cancer”, *The Lancet*, 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)32417-5.
- [114] A. J. Ditto, P. N. Shah, y Y. H. Yun, “Non-viral gene delivery using nanoparticles”, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2009, doi: 10.1517/17425240903241796.
- [115] I. Khan, K. Saeed, y I. Khan, “Nanoparticles: Properties, applications and toxicities”, *Arabian Journal of Chemistry*, 2019, doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
- [116] B. Demeneix y J. P. Behr, “Polyethylenimine (PEI)”, *Advances in Genetics*, 2005, doi: 10.1016/S0065-2660(05)53008-6.
- [117] D. Mudgil y S. Barak, “Mesquite gum (*Prosopis* gum): Structure, properties & applications - a review”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.153.
- [118] E. J. Vernon-Carter, C. I. Beristain, y R. Pedroza-Islas, “Mesquite gum (*Prosopis* gum)”, *Novel Macromolecules in Food Systems*, 2000, doi: 10.1016/S0167-4501(00)80011-4.



- [119] T. McKee y J. R. McKee, “Bioquímica. La base molecular de la vida”, 3a ed. Madrid: The McGrawHill Companies, 2003.
- [120] J. Wu, J. Xiao, Z. Zhang, X. Wang, S. Hu, y J. Yu, “Ribogenomics: The science and knowledge of RNA”, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2014, doi: 10.1016/j.gpb.2014.04.002.
- [121] A. J. Siddon y C. A. Tormey, “The chemical and laboratory investigation of hemolysis”, *Advances in Clinical Chemistry*, 2019, doi: 10.1016/bs.acc.2018.12.006.
- [122] FDA, “Guidance for industry nonclinical studies for the safety evaluation of pharmaceutical excipients”, Consultado: el 3 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> or [Officehttp://www.fda.gov/cber/guidelines.htm](http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm)
- [123] J. M. Walker, “Mammalian cell viability Hatfield: Humana press”, Consultado: el 25 de noviembre de 2024. [En línea]. Disponible en: [www.springer.com/series/7651](http://www.springer.com/series/7651)
- [124] J. van Meerloo, G. J. L. Kaspers, y J. Cloos, “Cell sensitivity assays: The MTT assay”, *Cancer cell culture*, 2011, pp. 237–245. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5\_20.
- [125] S. Kamiloglu, G. Sari, T. Ozdal, y E. Capanoglu, “Guidelines for cell viability assays”, *Food Frontier*, 2020, doi: 10.1002/fft2.44.
- [126] M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, y I. Kempson, “The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis”, *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, doi: 10.3390/ijms222312827.

# Anexos

## A. Evaluación de la densidad celular óptima para ensayos de viabilidad celular mediante MTT

Con el objetivo de optimizar el número de células en los ensayos de viabilidad mediante MTT para las líneas celulares VERO CCL-81 CCL-81 y HCC1954, se realizó un estudio de densidad celular. Se sembraron diferentes cantidades de células (2000-14000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 48 horas. Posteriormente, se añadió el reactivo MTT y se midió la absorbancia.

Las curvas estándar de absorbancia vs. densidad celular (**Figura 36 y Figura 37**) muestran una relación lineal dentro del rango evaluado, lo que indica una buena correlación entre la cantidad de células y la señal del MTT. Esta linealidad asegura la confiabilidad y reproducibilidad de los ensayos posteriores.

Basándose en los resultados obtenidos, se determinó que la densidad celular óptima para ambos tipos celulares es de 8000 células/pocillo. Este valor se encuentra dentro del rango lineal de las curvas estándar y garantiza una señal detectable sin saturar el ensayo. Es importante destacar que esta densidad celular óptima puede variar entre diferentes líneas celulares debido a su metabolismo específico. Por lo tanto, la realización de curvas estándar es fundamental para cada línea celular, a fin de obtener resultados precisos y confiables [100], [101], [102].

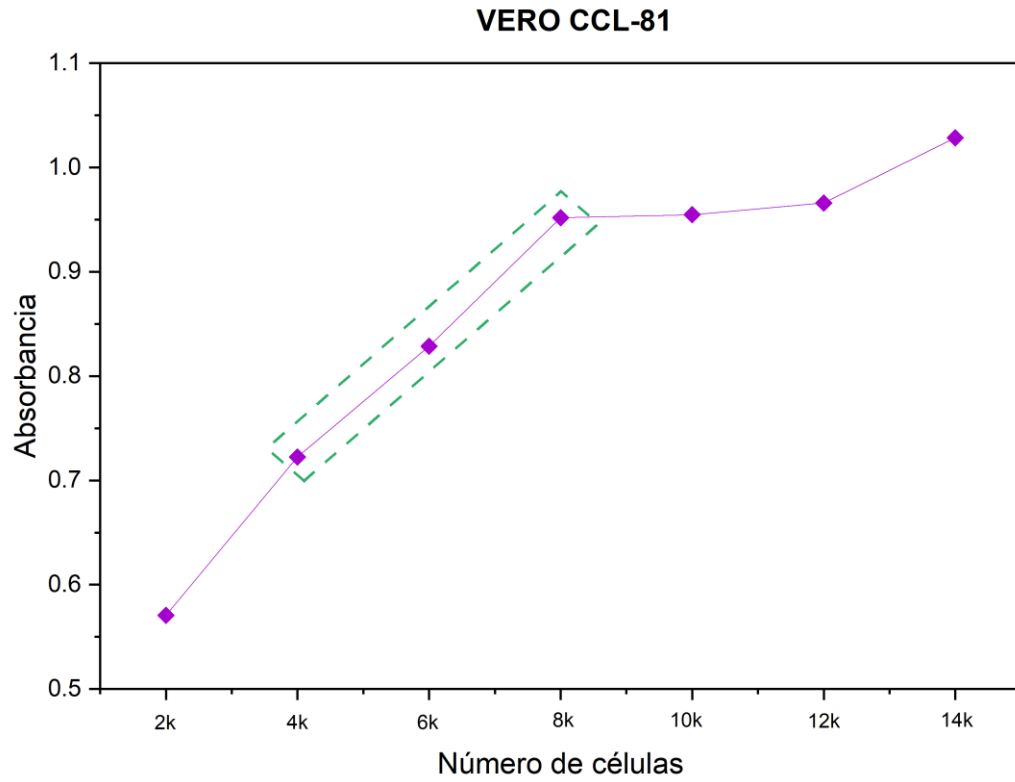


Figura 36. Densidad celular VERO CCL-81 CCL-81.

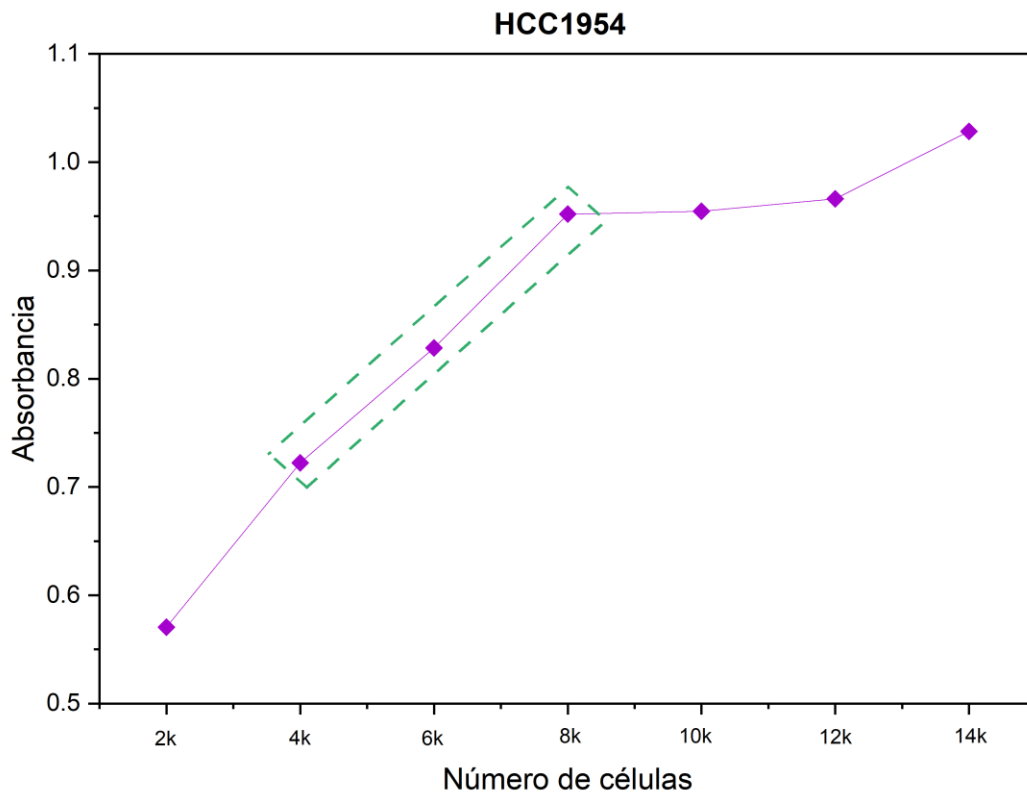


Figura 37. Densidad celular HCC1954.

## B. Optimización de metodologías para el ensayo de viabilidad celular MTT

Debido a la posible interferencia de las NS y el nanosistema en el ensayo MTT, se evaluaron diferentes metodologías para optimizar las condiciones del ensayo y obtener resultados confiables.

Las células VERO CCL-81 se sembraron a una densidad de 10,000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se cultivaron en 100  $\mu$ L de DMEM. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Para asegurar la reproducibilidad, cada muestra se probó por triplicado. Después de 24 horas, se añadió el tratamiento con NS@GM-CBX-b-PEI. Después de 24 horas adicionales, se preparó un volumen suficiente de solución medio-MTT para todos los pocillos. El sobrenadante medio-nanosistema se eliminó de los pocillos y se añadieron 100  $\mu$ L de la solución medio-MTT. La placa se incubó a continuación en condiciones estándar durante 3 horas. Después del período de incubación, se añadió isopropanol acidificado pH 3 para disolver los cristales de formazán. La **Tabla 29** detalla las modificaciones específicas realizadas al protocolo estándar del ensayo MTT en este estudio. Finalmente, la absorbancia de cada pocillo se midió a 570 nm y 651 nm utilizando un lector de microplacas.

Tabla 29. Variaciones del protocolo del ensayo de MTT.

	Protocolo	Variaciones			Referencia
		Medio-nanosistema	Medio-MTT	Solvente para disolver cristales de formazán	
1	Protocolo del laboratorio de Nanomedicina*	95 $\mu$ L medio y 5 $\mu$ L nanosistema	10 $\mu$ L de MTT por cada 100 $\mu$ L de medio	100 $\mu$ L de isopropanol acidificado	N/A
2	Roche			100 $\mu$ L buffer de solubilización	[103]
3	Babaei, A.			50 $\mu$ L de DMSO a concentración 1 mg/mL	[104]
4	Alafaleq, N. O.		10 $\mu$ L de MTT por cada 100 $\mu$ L de PBS	100 $\mu$ L de isopropanol acidificado	[105]
5	Meléndez-Villanueva, M.A.			100 $\mu$ L de DMSO a concentración 10 mg/mL	[106]
6	Protocolo del laboratorio de Nanomedicina modificado 1	80 $\mu$ L de medio y 20 $\mu$ L de nanosistema	10 $\mu$ L de MTT por cada 100 $\mu$ L de medio	100 $\mu$ L de isopropanol acidificado	N/A
7	Maicas, I.	Lavar tres veces pocillo con PBS 1X y después añadir solución medio-nanosistema			[107]
8	Modificación de la preparación del nanosistema **	Nanosistema diluido en medio en lugar de agua ultrapura grado biológico			N/A
9	Protocolo del laboratorio de Nanomedicina modificado 2	95 $\mu$ L de medio y 5 $\mu$ L de nanosistema	Reactivo MTT nuevo y sin abrir.		
10	Protocolo del laboratorio de Nanomedicina modificado 3		10 $\mu$ L de MTT por cada 100 $\mu$ L de medio	100 $\mu$ L de etanol acidificado	

\*Protocolo desarrollado por el laboratorio de nanomedicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

\*\*Las concentraciones del nanosistema se prepararon inicialmente mediante la dilución con agua ultrapura grado biológico. Para investigar más a fondo las interferencias en el MTT, las diluciones posteriores se realizaron utilizando medio de cultivo.

Se realizó un ensayo MTT para identificar la metodología óptima para las nanopartículas de oro recubiertas con GM-CBX-b-PEI. La **Figura 38** representa visualmente la coloración de cada pocillo, comparando las muestras tratadas con sus respectivos controles. Es importante destacar que algunos controles se compartieron entre varios protocolos, ya que su influencia se consideró insignificante en ciertos casos.

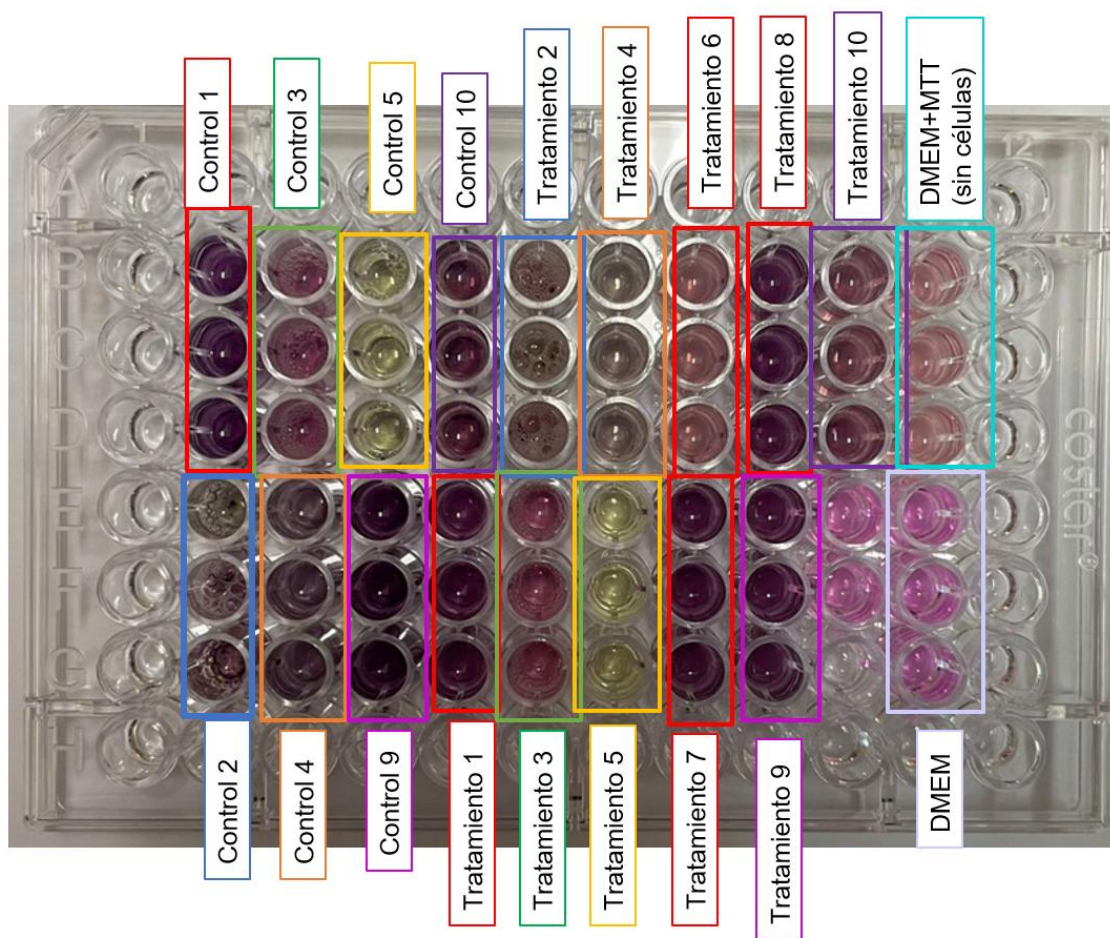


Figura 38. Placa de 96 pocillos para metodologías experimentales realizadas en el ensayo MTT.

El ensayo MTT proporcionó información valiosa sobre la metodología óptima para las nanopartículas de oro recubiertas con GM-CBX-b-PEI. El uso de DMSO y buffer de solubilización para disolver los cristales de formazán resultó en la formación de burbujas, disolución incompleta de los cristales e interferencia en las lecturas de absorbancia. Los pocillos tratados con PBS-MTT, en lugar de Medio-MTT, no mostraron el color púrpura esperado, volviéndose amarillos y potencialmente llevando a evaluaciones inexactas de baja viabilidad celular.

Como se esperaba, el aumento de la concentración de nanopartículas en el Protocolo 6 condujo a una disminución de la viabilidad celular en comparación con concentraciones más bajas. Curiosamente, los Protocolos 1 y 7-10 no mostraron diferencias significativas, indicando que la preparación de nanopartículas en agua o medio no afecta significativamente los resultados. Además, las variaciones en las soluciones madre de MTT no afectaron el resultado, destacando la importancia de las condiciones de almacenamiento adecuadas. Un lavado adicional con PBS antes de agregar Medio-MTT tuvo un efecto insignificante en los resultados. Finalmente, aunque tanto el isopropanol como el etanol fueron efectivos para disolver los cristales de formazán, el examen microscópico reveló cristales residuales con etanol, sugiriendo que el isopropanol puede ser un solvente más eficiente.

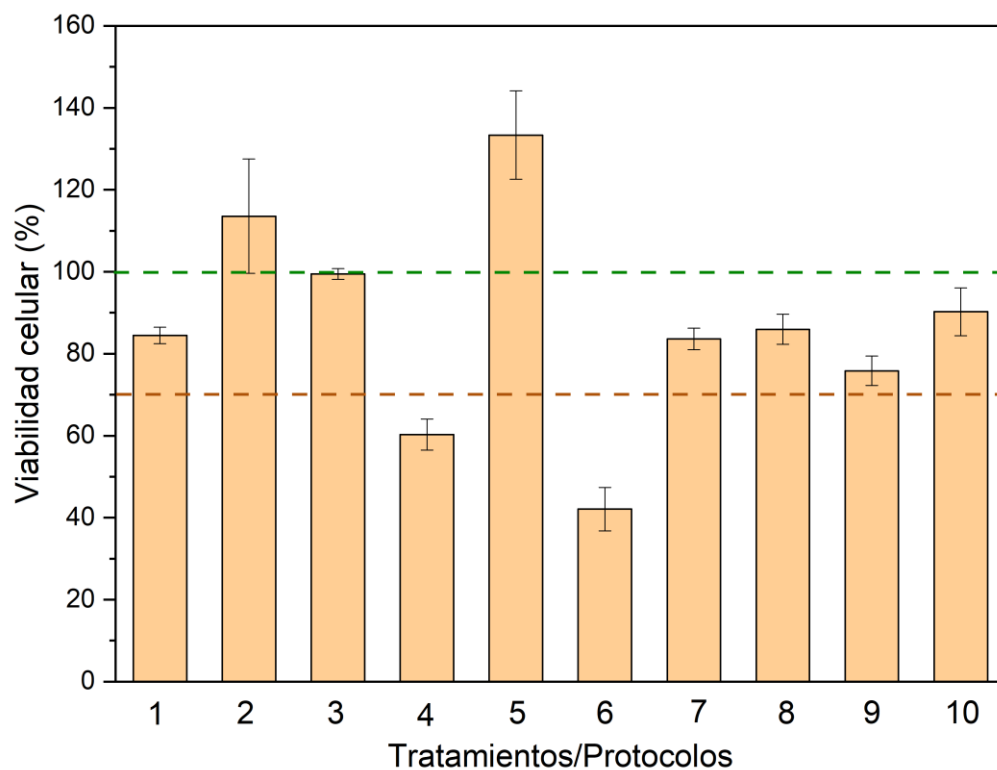


Figura 39. Viabilidad celular mediante distintas metodologías de MTT.

## C. Conceptos básicos

### Cáncer

El cáncer es una enfermedad en la que ocurre un crecimiento descontrolado de células anormales en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo, la mayoría de los tipos de cánceres forman

un absceso el cual es conocido como tumor. El cáncer puede ser adquirido de distintas formas tales como mutaciones genéticas, factores ambientales, patógenos (bacterias, virus y parásitos) y estilo de vida [108]. En el ciclo celular, el objetivo de las células es replicar de manera exacta el ácido desoxirribonucleico (ADN) y que las copias cromosómicas idénticas se distribuyan por igual entre dos células hijas. Las células sanas se dividen de forma controlada mientras que, si se detecta alguna alteración o mutación en el material genético portado, estas son capaces de programar su muerte celular o apoptosis para evitar el crecimiento y desarrollo de dicho daño. A diferencia de las células cancerosas, estas poseen material genético con mutaciones, a dicho material se denominan oncogenes y permiten el crecimiento descontrolado de las células afectadas, además le confieren la capacidad de no morir como lo hacen las células sanas cuando una alteración es detectada [109], [110].

### **Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano**

El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) es una glicoproteína con actividad tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico, y es el encargado de controlar el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales [111]. El cáncer de mama es uno de los cánceres que presentan una sobreexpresión de este antígeno el cual es medido mediante estado inmunohistoquímico o por hibridación *in situ* por fluorescencia. La amplificación de este antígeno está asociado a diagnósticos clínicos pobres por lo que se ha comenzado a realizar estudios para tratar este subtipo de cáncer de mama mediante terapias puntuales y dirigidas, así como el estudio de fármacos como el trastuzumab que han mostrado resultados alentadores para dicha enfermedad [112], [113].

### **Nanopartículas**

Las nanopartículas, por su tamaño nanométrico y su alta capacidad de funcionalización, se han posicionado como herramientas prometedoras para tratamientos oncológicos. Para ser considerada una nanopartícula ideal, esta debe ser capaz de: i) reconocer de manera específica las células cancerígenas, ii) atravesar las barreras celulares, iii) escapar del compartimento endosómico y iv) liberar su carga terapéutica en el sitio de acción. [114]. Dentro de la clasificación de este tipo de tratamiento se encuentran las nanopartículas a base de carbón, metal, cerámicos, semiconductores, poliméricos y basadas en lípidos. Las nanopartículas metálicas son utilizadas



debido a su conocida resonancia del plasmón superficial localizado, así mismo por el fácil control en la obtención y caracterización del tamaño y forma adecuados. De los metales más utilizados son el cobre, plata y oro, debido a sus avanzadas propiedades ópticas [115]. Las nanopartículas de oro se emplean en aplicaciones biomédicas debido a sus características biocompatibles y de estabilidad.

### **Polietilenimina ramificada**

La polietilenimina ramificada es un polímero catiónico (**Figura 40**), con un alto peso molecular y genera una estructura porosa que mejora su capacidad para interactuar con biomoléculas, haciéndola un polímero ideal para aplicaciones biomédicas. Dentro de las características de este polímero es que es altamente soluble en agua, tiene un peso molecular de 25 kDa y una alta capacidad de buffering o amortiguamiento del pH cuando se añade un ácido al sistema. Debido a esto, la polietilenimina ramificada (b-PEI) ha sido utilizado en gran manera en conjunto con vehículos tales como nanopartículas, vectores virales y no virales para tratamientos del área oncológica [26], [27]. La PEI se presenta en dos configuraciones principales, lineal (L-PEI) y ramificada (b-PEI). La estructura ramificada de la b-PEI le confiere una mayor densidad de grupos amino, incluyendo primarios, secundarios y terciarios, en comparación con la L-PEI que solo posee grupos secundarios. Esta diversidad de grupos funcionales en la b-PEI facilita la formación de complejos estables con ácidos nucleicos, como los aptámeros. Además, la estructura ramificada de la b-PEI promueve un mayor efecto de la esponja de protones, lo que facilita el escape endosomal y la liberación del material genético en el citoplasma. Como resultado, la b-PEI es ampliamente utilizada en aplicaciones de entrega de fármacos y genes, donde su capacidad para interactuar con ácidos nucleicos debido a su alta densidad de cargas positivas es para unirse a las cargas negativas de los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos y promover la liberación intracelular es fundamental mediante el efecto de esponja de protones [28].

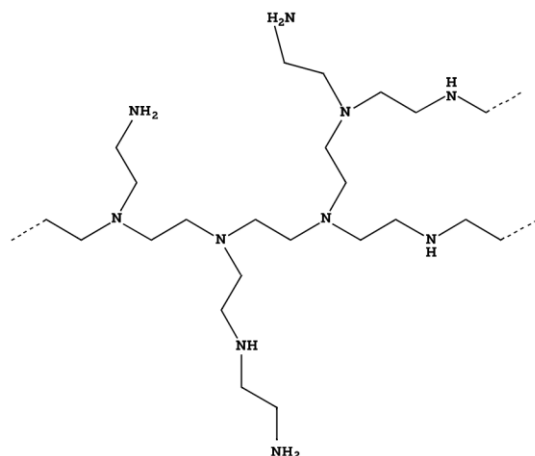


Figura 40. Polietilenimina ramificada (b-PEI) [116].

### Goma de mezquite

La goma de mezquite se obtiene de los árboles del género *Prosopis*, de las cuales un gran número de especies, especialmente 44, se concentran principalmente en el estado de Sonora, México. Dentro de las propiedades importantes que posee, son una alta solubilidad en agua, viscosidad intrínseca, capacidad emulsionante, capacidad encapsulante, entre otros [117]. Está formada principalmente de D-galactosa, L-arabinosa, D-glucuronato, D-manosa y D-xilosa, su estructura química se puede observar en la **Figura 41** [118].

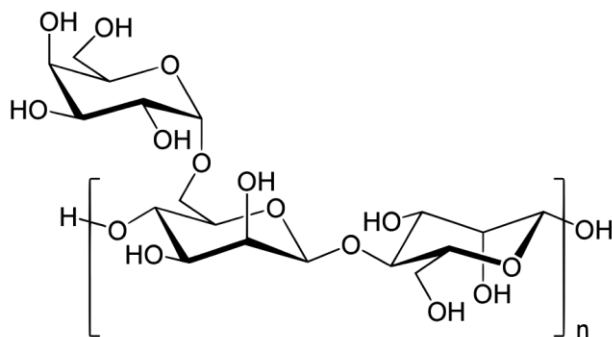


Figura 41. Estructura química de la goma de mezquite [41].

### Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son cadenas formadas por anillos de azúcares de cinco miembros enlazados por grupos fosfato. Los ácidos nucleicos se pueden dividir principalmente en ácidos desoxirribonucleicos (ADN) y en ácidos ribonucleicos (ARN). El ADN es considerado como una molécula de doble hélice que se encuentran plegadas entre sí, estos contienen nucleótidos que están compuestos de bases púricas (adenosina y guanina) y bases pirimidínicas (citosina o timina),

un fosfato y una azúcar desoxirribosa y estos nucleótidos están unidos por enlaces covalentes. La información que se encuentra dentro del ADN se transmite a las células por medio de la síntesis del ADN que ocurre a través del apareamiento de las bases de nucleótidos de ambas hebras para que posteriormente se lleve a cabo el proceso celular para la síntesis posterior del ARN [119]. Mientras que el ARN es un polímero de nucleótidos usualmente formado por una cadena, cuya principal función es la síntesis de proteínas. Mediante el apareamiento de bases complementarias se sintetizan las moléculas de ARN, formado por cuatro bases de nucleótidos (guanina, adenina, citosina y uracilo), una ribosa (azúcar) y un grupo fosfato. Por lo que es posible apreciar las diferencias principales en la estructura del ADN y ARN en la **Figura 42** [120].

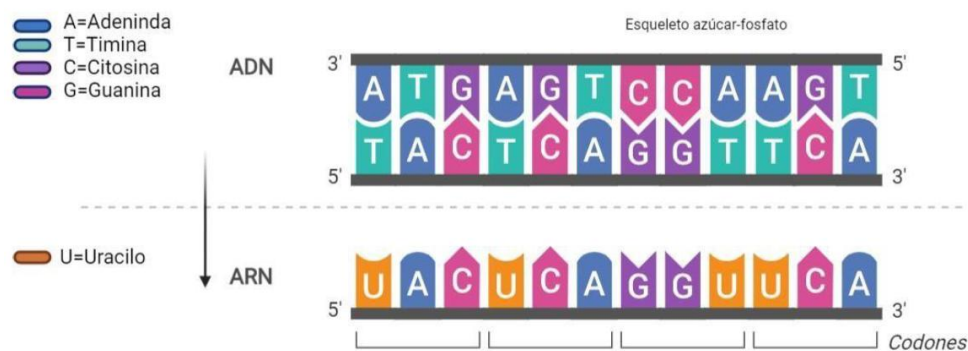


Figura 42. Comparación entre la estructura del ADN y ARN. Modificada de [119].

## Hemolisis

La hemólisis es la ruptura anormal de los glóbulos rojas, lo cual implica un problema clínico referente a una enfermedad, desorden o respuesta a algún tratamiento y/o medicamento. Los medicamentos o tratamientos a ciertas concentraciones pueden provocar hemólisis en la sangre, por lo que la FDA insta que, para nuevos tratamientos que pretenden ser inyectables es necesario realizar una prueba de hemólisis a la concentración prevista para la administración [121], [122].

## Viabilidad celular

La viabilidad celular se refiere al número de células vivas y sanas en una muestra por lo que los ensayos de viabilidad celular se basan en la detección de la proliferación celular o efectos citotóxicos. Existen diversos ensayos para determinar y estimar el número de células viables después de un tratamiento [123]. Entre ellos se destaca el ensayo colorimétrico de viabilidad celular con MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio), la cual relaciona linealmente la viabilidad celular con la actividad mitocondrial.

Las células viables poseen enzimas oxidorreductasas que son capaces de reducir una sal de tetrazolio amarilla (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán de color morado mediante succinato deshidrogenasa presentes en la actividad metabólica (Figura 3) [124].

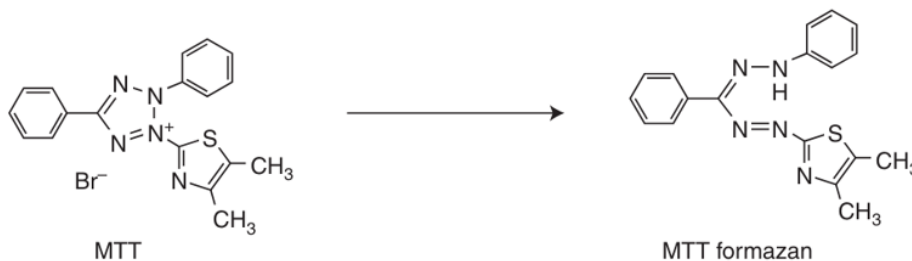


Figura 43. Reducción de sal de tetrazolio a cristales de formazán [124].

La cuantificación de la proliferación celular se realiza mediante la medición de la absorbancia producida luego de la ruptura de la sal de tetrazolio por la enzima mitocondrial, succinato deshidrogenasa, y que da lugar al producto de color morado. La conversión sólo se realiza en células vivas y la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células vivas [125], [126]. La intensidad del color nos indica la cantidad de células viables que subsisten después de la aplicación del tratamiento, como se observa en la Figura 4, el color lila indica un bajo porcentaje de viabilidad celular mientras que el color morado intenso revela un alto porcentaje de células viables.

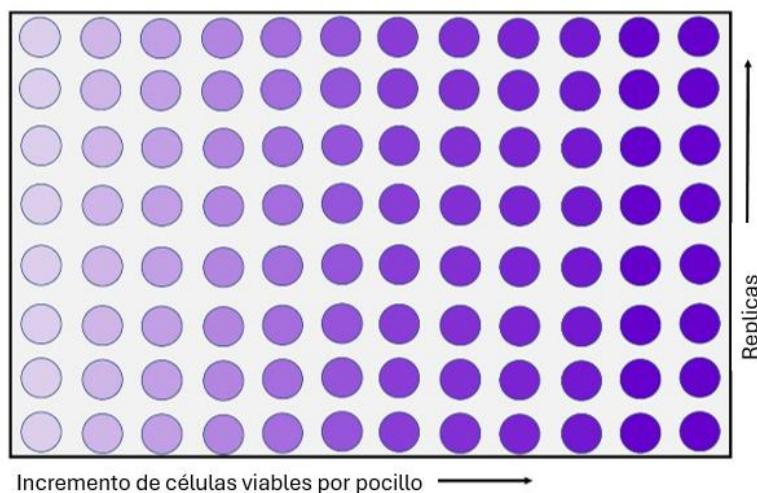


Figura 44. Metabolismo de MTT por células viables.