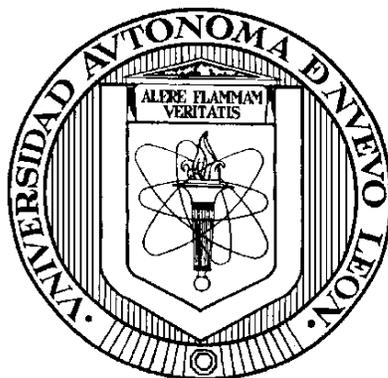


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN NANOSISTEMA PARA LA
DETECCIÓN DE CÉLULAS QUE SOBREENPRESAN HER2**

Por

Q.C.B. PAOLA YAMILETH CARRIÓN GARCÍA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestría en Ciencias con
Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Agosto, 2023

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN NANOSISTEMA PARA LA
DETECCIÓN DE CÉLULAS QUE SOBREENPRESAN HER2**

Aprobación de la Tesis:

Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

Directora de Tesis

Dra. C. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda

Co director de Tesis

Dr. C. Jorge Alberto Roacho Pérez

Miembro de la Comisión de Tesis

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Paola Yamileth Carrión García

Fecha de Graduación:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN NANOSISTEMA PARA LA DETECCIÓN DE CÉLULAS QUE SOBREENPRESAN HER2

Número de Páginas: 106

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Área de Estudio: Nanomedicina

Propósito y Método del Estudio: El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) es una proteína transmembranal involucrada en el desarrollo del cáncer. Se encuentra sobreexpresada en una variedad de tumores y representa mayor agresividad y pobre pronóstico. En el presente trabajo se llevó a cabo la conjugación de nanopartículas de oro con un aptámero específico contra HER2 para la detección de células que sobreexpresan el receptor. El nanosistema fue caracterizado por métodos físicos como espectrometría UV-Vis, DLS, potencial Zeta y TEM, además de la caracterización biológica por el ensayo de MTT y la prueba de hemólisis. Adicionalmente se evaluó la capacidad de unión in vitro a líneas celulares dependiente del nivel de expresión de HER2 evaluando su detección en el equipo Countess II FL y mediante microscopía de fluorescencia.

Contribuciones y Conclusiones: Se obtuvo un nanosistema con diámetro hidrodinámico de 65.3 nm, carga superficial de -17.4 mV, diámetro de partícula de 19.2 nm, morfología esférica, con distribución homogénea y en dispersión. Demostró ser biocompatible en células sanas y con reducción de la viabilidad en células de cáncer con sobreexpresión de HER2, ligeramente hemolítico, específico para HER2 y capaz de detectar líneas celulares en función de su nivel de expresión.

FIRMA DEL ASESOR:

DEDICATORIA

A mi madre y mi padre, por su sacrificio y esfuerzo para formar a una persona de bien con valores y principios, por creer en mis capacidades, enseñarme a ser perseverante y seguir mis sueños.

A mis hermanas, cuñados y sobrinos, por no dejarme decaer y alentarme a seguir adelante, por su comprensión y amor.

A toda la familia Melchor Guerrero, por ser mi segundo hogar y brindarme apoyo incondicional en cada paso que doy. Gracias por enseñarme con el mejor ejemplo sobre disciplina y amor por tu vocación.

A mis amigas y amigos, gracias por siempre estar presentes, por su paciencia, apoyo, cariño, consejos y palabras de aliento cuando más lo necesito.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Celia Nohemí Sánchez Domínguez, por creer en mis capacidades y brindarme la oportunidad de trabajar todos estos años en este proyecto. Por sus enseñanzas en todos los aspectos de la vida y ser un ejemplo a seguir. Por su guía durante todo el proceso de investigación. Sus conocimientos, paciencia y disposición han sido invaluableles.

Al Dr. Hugo Gallardo Blanco, por su apoyo durante toda la realización de este trabajo, sus enseñanzas, orientación y aliento han sido fundamentales para alcanzar este logro.

Al M.C. Samuel Longoria García, por tu paciencia, amistad, sinceridad y compartirme tus conocimientos y experiencias.

A la Dra. Ana María Pinilla Torres, gracias por estos años de amistad, apoyo constante, comprensión y tu confianza en mí.

A la Dra. Margarita Sánchez Domínguez, por ayudarnos con la caracterización de los materiales, por sus consejos, enseñanzas y brindarnos nuevas oportunidades de crecimiento.

Al Dr. José Juan Pérez Trujillo, quien generosamente compartió su experiencia y conocimientos en el área de microscopía conmigo. Sus ideas y perspectivas han sido fundamentales para el desarrollo y culminación de mi investigación.

A la Dra. Elsa Nancy Garza Treviño, por proporcionarnos el anticuerpo trastuzumab y brindar comentarios valiosos. Sus sugerencias y observaciones críticas han ayudado a mejorar la calidad de mi trabajo.

Dr. Rolando Delgado Balderas, por brindarnos apoyo durante la realización de los proyectos del equipo de investigación y facilitarnos líneas celulares fundamentales para complementar los resultados.

A mi familia.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cáncer	1
1.2 HER2	2
1.2.1 Estructura	2
1.2.2 Vías de Señalización	4
1.3 Tumorigénesis Mediada por HER2	6
1.3.1 HER2 en Diferentes Tipos de Cáncer	7
1.4 Cáncer de Mama HER2 Positivo	8
1.5 Diagnóstico Convencional del Cáncer de mama HER2 positivo	9
1.6 Tratamiento Convencional del Cáncer de mama HER2 positivo	12
1.7 Nanotecnología	14
1.7.1 Nanopartículas de oro	15
1.8 Aptámeros	18
1.9 Nanosistemas teranósticos	21
1.9.1 Caracterización Física	21
1.9.2 Caracterización Biológica	23
1.9.3 Antecedentes Teranósticos Basados en HER2	25
1.10 Justificación	27
1.11 Hipótesis de Trabajo	28
1.12 Objetivo General	28
1.12.1 Objetivos Específicos	28
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1 Materiales	29

2.2 Estrategia Experimental General	33
2.3 Construcción del Nanosistema	34
2.3.1 Reducción del Aptámero	35
2.3.2 Purificación en Columna	35
2.3.3 Conjugación de Nanopartículas de oro	35
2.4 Caracterización por Métodos Físicos	36
2.4.1 Espectroscopía UV-Vis	36
2.4.2 Dispersión Dinámica de la luz	37
2.4.3 Potencial Zeta	38
2.4.4 Microscopía Electrónica de Transmisión	38
2.5 Prueba de hemólisis	39
2.6 Ensayo MTT	40
2.7 Ensayo de Detección en Suspensión	42
2.8 Microscopía de Fluorescencia	43
2.9 Análisis Estadístico	45
CAPÍTULO III. RESULTADOS	47
3.1 Caracterización Física del Nanosistema	47
3.1.1 Espectroscopía UV-Vis	47
3.1.2 Dispersión Dinámica de la luz	49
3.1.3 Potencial Zeta	50
3.1.4 Microscopía electrónica de transmisión	52
3.2 Prueba de hemólisis	55
3.3 Ensayo MTT	57
3.3.1 Ensayo MTT AuNP-PEG	58
3.3.2 Ensayo MTT Aptámero AptHer2	59
3.3.3 Ensayo MTT Nanosistema AuNP-PEG-AptHer2	59

3.3.4 Ensayo MTT Anticuerpo Trastuzumab	60
3.4 Capacidad de Unión <i>in Vitro</i> en Suspensión	62
3.5 Capacidad de Unión <i>in Vitro</i> por Microscopía de Fluorescencia	71
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN	75
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	84
CAPÍTULO VI. PERSPECTIVAS	86
REFERENCIAS	87

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
I.	Clasificación molecular del cáncer de mama	9
II.	Diferencias entre aptámeros y anticuerpos	20
III.	Características de las líneas celulares utilizadas	41
IV.	Porcentaje de hemólisis \pm SD	57
V.	Viabilidad celular en las líneas celulares Vero, LNCaP, ZR-75-30 y HCC1954	63

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructura del receptor HER2	3
2.	Vías de señalización activadas mediante HER2	5
3.	Determinación del estado de sobreexpresión de la proteína HER2 mediante IHC	10
4.	Identificación del gen HER2 mediante FISH	11
5.	Nanomateriales usados como portadores de fármacos o como agentes de contraste en el cáncer	15
6.	Propiedades físicas de las AuNPs	16
7.	Estrategia general de trabajo	34
8.	Espectros UV-Visible	48
9.	Dispersión dinámica de la luz	50
10.	Potencial Zeta	51
11.	TEM AuNP-PEG	52
12.	TEM AuNP-PEG-AptHer2	53
13.	Histograma de frecuencia de diámetro con ajuste Gaussiano	54
14.	TEM de AuNP-PEG y AuNP-PEG-AptHer2	55
15.	Hemólisis in vitro de las AuNP-PEG, aptámero AptHer2, nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 y trastuzumab	56
16.	MTT 24 h AuNP-PEG	58
17.	MTT 24 h aptámero AptHer2	59
18.	MTT 24 h Nanosistema AuNP-PEG-AptHer2	60
19.	MTT 24 h trastuzumab	61

20.	Micrografías del ensayo de capacidad de unión <i>in vitro</i> por suspensión en la línea celular ZR-75-30	65
21.	Unidades de fluorescencia relativas (RFU) del ensayo de capacidad de unión <i>in vitro</i> por suspensión en la línea celular ZR-75-30	66
22.	Micrografías del ensayo de capacidad de unión <i>in vitro</i> por suspensión en la línea celular HCC1954	67
23.	Unidades de fluorescencia relativas (RFU) del ensayo de capacidad de unión <i>in vitro</i> por suspensión en la línea celular HCC1954	68
24.	Micrografías del ensayo de capacidad de unión <i>in vitro</i> por suspensión en la línea celular Vero CCL-81	69
25.	Unidades de fluorescencia relativas (RFU) del ensayo de capacidad de unión <i>in vitro</i> por suspensión en la línea celular Vero CCL-81	70
26.	Unidades de fluorescencia relativas (RFU) del ensayo de capacidad de unión <i>in vitro</i> por suspensión en las líneas celulares Vero CCL-81, ZR-75-30 y HCC1954.	71
27.	Microscopía de fluorescencia línea celular Vero CCL-81	72
28.	Microscopía de fluorescencia línea celular HCC1954	73
29.	Intensidad de fluorescencia media en líneas celulares Vero CCL-81 y HCC1954	74

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AuNPs	Nanopartículas de oro
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ER	Receptor de estrógeno
FISH	Hibridación in situ fluorescente
FRET	Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia
HER1	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2
HER3	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 3
HER4	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 4
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas
IHC	Inmunohistoquímica
kDa	Kilodaltons
LSPR	Resonancia de plasmón de superficie localizada
mm	Milímetro
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
mV	Milivoltio
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar

NPs	Nanopartículas
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDI	Índice de polidispersidad
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
PR	Receptor de progesterona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
SELEX	Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial
SFB	Suero fetal bovino
SPR	Resonancia de plasmón de superficie
TAE	Tris acetato EDTA
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGF	Factor de crecimiento transformante
UV-Vis	Ultravioleta visible
μM	Micromolar
μL	Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
α	Alfa
β	Beta
CO ₂	Dióxido de carbono
g	Fuerza g
h	Hora
M	Molar
μ	Micro
λ	Longitud de onda
V	Voltio
°C	Grados Celsius

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad en la que las células crecen sin control y se diseminan a otras partes del cuerpo. Las células cancerosas crecen en ausencia de señales de crecimiento, ignoran señales de apoptosis, se propagan a otras áreas del cuerpo, promueven el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, evaden el sistema inmunológico y acumulan múltiples cambios en sus cromosomas ¹.

Esta enfermedad representa un gran problema de salud a nivel mundial. Para el año 2020 la Organización Mundial de la Salud reportó más de 19 millones de casos nuevos en todo el mundo. En México se presentaron cerca de 200,000 casos nuevos para el 2020, donde el cáncer de mama y próstata ocuparon el primer y segundo lugar en incidencia respectivamente ².

La progresión y agresividad de cada tipo de cáncer depende de una serie de factores como la etapa de la enfermedad, la reprogramación del metabolismo de glucosa, expresión de genes específicos y la sobreexpresión de receptores de membrana para hormonas. En cáncer de mama, entre estos se encuentran los receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) ³.

1.2 HER2

El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/*neu*) es una glicoproteína transmembranal codificada por el protooncogén ErbB2, el cual se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17. Su ubicación celular es principalmente en la membrana plasmática y se expresa ampliamente en la mayoría de los tejidos ⁴.

HER2 pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) con actividad de tirosina quinasa. Otros miembros incluyen el receptor que lleva el mismo nombre de la familia (HER1), el receptor 3 (HER3) y el receptor 4 (HER4). Estos receptores están involucrados de manera normal en la regulación del crecimiento celular, morfogénesis y diferenciación ⁵. Estudios en modelos murinos han revelado que son esenciales para el desarrollo de diversos órganos, como cerebro, tracto gastrointestinal y pulmones ⁶.

1.2.1 Estructura de HER2

HER2 es una proteína transmembranal de 185 kilodaltons (kDa) conformada por 1,255 aminoácidos. La familia de proteínas HER se caracteriza por presentar una estructura general similar: contienen una región extracelular, una región transmembranal y una región intracelular ⁴.

En la Figura 1 se muestra una representación gráfica simplificada de la estructura del receptor HER2. La región extracelular está conformada por 630 aminoácidos y contiene cuatro dominios: I/LD1, II/CR1, III/LD2 y IV/CR2 ⁷. Las regiones LD1 y LD2 (dominio de unión a ligando) son responsables del reconocimiento y unión al ligando, mientras que las regiones CR1 y CR2 (secuencias ricas en cisteína) permiten la reorientación de las regiones LD ⁸.

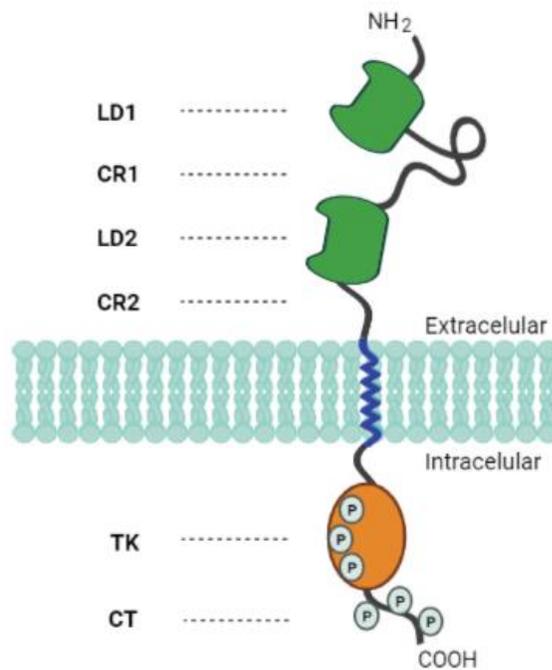


Figura 1. Estructura del receptor HER2 ⁸.

La región intracelular está conformada por dos regiones principales: el dominio catalítico con actividad de tirosina quinasa (TK) con diversos sitios de fosforilación y una cola carboxilo terminal (CT) ⁸.

1.2.2 Vías de Señalización

Existen al menos 10 ligandos conocidos para la familia de receptores HER e incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante (TGF)- α , anfiregulina, betacelulina, epiregulina, el factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina y neuregulinas. A la fecha no se conoce un ligando de unión directa al receptor HER2 por lo que existe en una conformación activa de forma constitutiva ⁹.

La familia de proteínas HER se homo y heterodimerizan cuando ocurre la unión de su ligando en el dominio extracelular, lo cual conlleva a la transfosforilación de los dominios intracelulares ⁴. Estos residuos de tirosina fosforilados acoplan otras moléculas de señalización celular que activan segundos mensajeros y conducen a la activación de vías que culminan en diversos efectos biológicos dependiendo del tipo de dímeros formado ¹⁰. Estas cascadas de señalización ocurren a través de dos vías distintas: la vía PI3K-AKT-mTOR y la vía Ras/Raf/MAPK (Figura 2) ⁴.

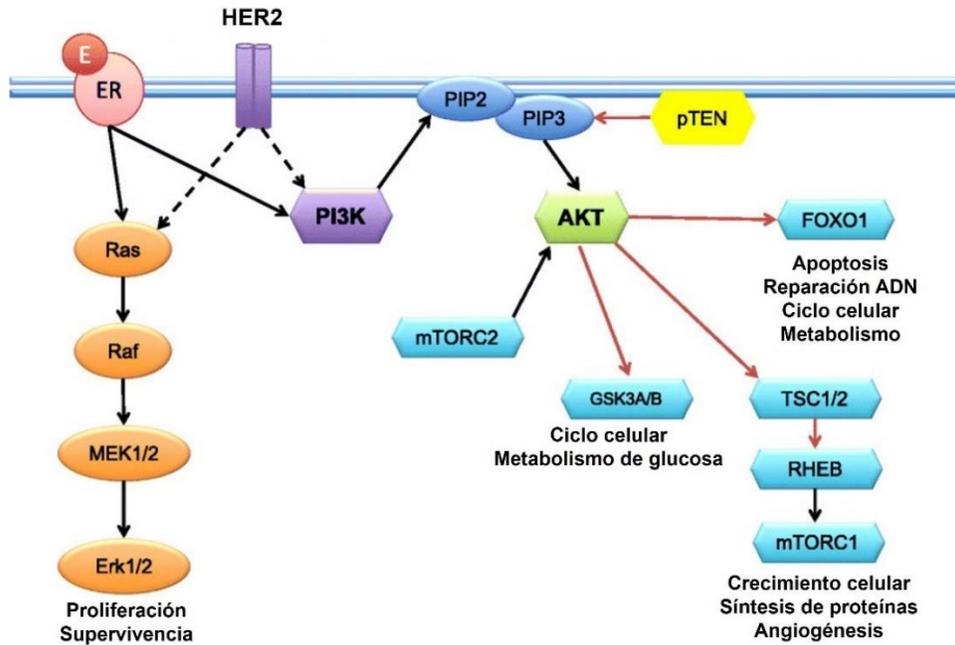


Figura 2. Vías de señalización activadas mediante HER2. Recuperado de Toss, A. *et al* (2015) ¹¹.

La inducción de la vía PI3K comienza con la formación del heterodímero compuesto por HER2 y HER3. La fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) pertenece a una familia de quinasas con la capacidad de fosforilar los grupos 3'-OH del anillo del inositol en fosfoinosítidos. PI3K se recluta en la membrana uniéndose a los residuos de fosfotirosina del dominio intracelular TK del receptor, lo cual conlleva a la activación de la subunidad catalítica de PI3K ¹². Esta activación genera el segundo mensajero fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol (3,4)-bifosfato (PIP2) ¹³. PIP3 recluta una serie de proteínas que llevan a la activación de AKT/proteína quinasa B (PKB), la cual participa en la regulación de distintas funciones celulares como proliferación y supervivencia,

respuesta a nutrientes, metabolismo de glucosa, transición epitelial mesenquimal, estabilidad genómica y angiogénesis ⁸.

La vía Ras/Raf/MAPK puede ser activada por cualquiera de los heterodímeros formados en la familia de receptores HER que contenga HER2. Seguido de la unión del ligando y la activación del dominio tirosina quinasa de los receptores, se unen proteínas adaptadoras como la proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento (GRB2) que reclutan el factor de intercambio de nucleótidos de guanina son of sevenless (SOS) ¹⁴. SOS se recluta en la membrana plasmática donde se localizan las proteínas Ras, promoviendo el intercambio de GDP (guanosina difosfato) por GTP (guanosina trifosfato) en Ras. Ras unido a GTP activa las proteínas quinasas Raf, que son capaces de fosforilar las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) quinasas (MAPKK) MEK1 y MEK2 ¹⁵. Estas MAPKK reconocen y fosforilan MAPK como ERK1 y ERK2. Las proteínas activadas ERK1/2 fosforilan y activan diversos sustratos y regulan diferentes factores de transcripción, llevando a la expresión de genes involucrados en el crecimiento celular, supervivencia y diferenciación ¹⁶.

1.3 Tumorigénesis Mediada por HER2

En células normales las cascadas de señalización culminan principalmente en la endocitosis de los dímeros formados por los receptores HER y sus ligandos. Después los receptores HER pueden ser reciclados hacia la membrana o

degradados. Esta serie de procesos se mantienen en un equilibrio dinámico y son esenciales para el crecimiento celular normal, proliferación, supervivencia y apoptosis ¹⁷.

Cuando ocurre una amplificación del gen ErbB2 se induce la sobreexpresión del receptor HER2, usualmente de 10 a 100 veces más que en una célula normal. Esto genera un exceso de receptores disponibles para la formación de heterodímeros y homodímeros, aumentando la respuesta de señalización a factores de crecimiento y promoviendo el crecimiento maligno y tumorigénesis ¹⁸.

El aumento de heterodímeros HER1/HER2 evade la degradación endocítica en favor de la vía de reciclaje provocando un aumento en la duración de señalización de la vía proliferativa MAPK. La activación de la vía PI3K/Akt mediada por el heterodímero HER2/HER3 se asocia con la supervivencia y promueve un fenotipo invasivo ¹⁹. De igual forma, la sobreexpresión de HER2 genera la disrupción de las adherencias celulares y desregulación del ciclo celular, lo cual lleva a la proliferación descontrolada ²⁰.

1.3.1. HER2 en Diferentes Tipos de Cáncer

La sobreexpresión del receptor HER2 se ha encontrado en una variedad de tumores sólidos como cáncer de mama, próstata, ovario, gástrico, colorrectal, de pulmón, vejiga y orofaríngeo ²¹.

El cáncer de próstata ocupa el segundo lugar en incidencia a nivel mundial en hombres ²². Entre los mecanismos que soportan la progresión de la enfermedad se encuentra la sobreexpresión de HER2 en alrededor 10% de los casos. Se ha visto relacionado con un aumento en la agresividad y expansión de las células madre de tumor, así como el desarrollo de metástasis a hueso ²³.

El cáncer gástrico se posiciona en el quinto lugar en incidencia a nivel mundial para ambos sexos de todas las edades ²². Los casos reportados con sobreexpresión de HER2 varía de 4.4% - 53.4%, asociado a un comportamiento agresivo del tumor y mayores frecuencias de recurrencia ²⁴.

El cáncer de ovario representa la causa más común de muerte por cáncer ginecológico y la sobreexpresión de HER2 se estima en 9% - 32% de los casos ²⁵. Esto se ha asociado con mal pronóstico clínico y supervivencia, así como la inducción de resistencia a quimioterapéuticos en las células madre de tumor ²⁶.

1.4 Cáncer de Mama HER2 Positivo

Dentro de la clasificación molecular del cáncer de mama (TABLA I) se encuentran el subtipo luminal A, luminal B, HER2 positivo y triple negativo, de acuerdo con la expresión de receptores de membrana como el receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y HER2 ²⁷.

TABLA I

Clasificación molecular del cáncer de mama ²⁸

Subtipo	ER	PR	HER2
Luminal A	+	+/-	-
Luminal B	+	+/-	+/-
HER2 +	-	-	+
Triple negativo	-	-	-

El cáncer de mama HER2 positivo representa el 25%-30% de las neoplasias malignas de mama, presentándose hasta 25-50 copias del gen ErbB2 y un aumento de 40-100 veces del receptor HER2 resultando en cerca de 2 millones de receptores expresados en la superficie de la célula ²⁹.

Esta sobreexpresión se ha asociado con un comportamiento agresivo, resistencia a quimioterapéuticos y pobre pronóstico. Se considera uno de los subtipos de cáncer de mama más difíciles de tratar, presentando una tasa de supervivencia y tiempo de recaída considerablemente bajos en comparación con otros subtipos ³⁰.

1.5 Diagnóstico Convencional del Cáncer de mama HER2 Positivo

Actualmente las técnicas más usadas para detectar la amplificación del gen ErbB2 o la sobreexpresión del receptor HER2 son la inmunohistoquímica (IHC), que detecta directamente la proteína, y la hibridación in situ fluorescente (FISH),

que identifica el gen. Cerca del 80% de las evaluaciones de HER2 inician con IHC como prueba de tamizaje, mientras que FISH es usado como prueba confirmatoria ³¹.

La inmunohistoquímica (Figura 3) es un método semi cuantitativo y presenta algunas limitaciones. No existe control uniforme en el tiempo, temperatura, tipo de fijación y procesamiento de las muestras, llevando a fluctuaciones en los resultados dentro de un mismo espécimen ³².

Puntaje a reportar	Determinación del estado de sobreexpresión de la proteína HER2	Patrón de tinción
0	Negativo	No hay tinción observada, o tinción en membrana es observada en <10% de las células tumorales.
1+	Negativo	Una tinción de membrana leve y ligeramente perceptible es detectada en >10% de las células tumorales. Las células exhiben tinción de membrana incompleta.
2+	Débilmente positivo	Una tinción de membrana completa leve a moderada es observada en >10% de las células tumorales.
3+	Positivo	Una tinción de membrana completa e intensa es observada en >10% de las células tumorales.

Figura 3. Determinación del estado de sobreexpresión de la proteína HER2 mediante IHC. Recuperado de Kamangar, E. *et al.* (2019) ³³.

El análisis por hibridación in situ fluorescente (Figura 4) usualmente toma dos días para realizarse, requiere entrenamiento, personal especializado y experiencia para la diferenciación de las células malignas a las normales ³⁴. Otras limitaciones son que la señal de fluorescencia puede decaer con el tiempo, las muestras y reactivos usados deben ser preservados de manera cuidadosa y la digestión de proteínas puede afectar la morfología de las muestras ³⁵.

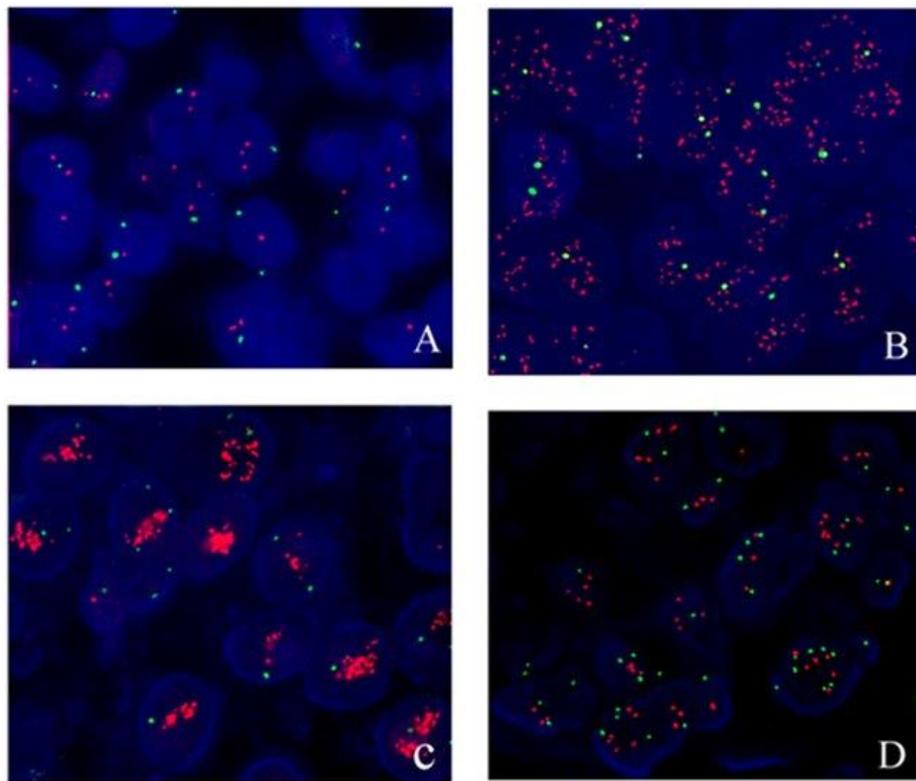


Figura 4. Identificación del gen HER2 mediante FISH. Las señales rojas representan el gen HER2, las señales verdes representan el centrómero del cromosoma 17 CEP17. A: gen HER2 negativo; B: positivo para el gen HER2; C: positivo del gen HER2, las señales están agrupadas; D: gen HER2 con ganancia de CEP17. Recuperado de Ji, H. *et al.* (2015) ³⁶.

Tanto por IHC como por FISH se pueden obtener resultados inconsistentes debido a variaciones en los procedimientos pre analíticos, analíticos y post analíticos entre laboratorios ⁴. Debido a la imprecisión de los resultados obtenidos en el análisis, es posible que algunas mujeres diagnosticadas con cáncer de mama no reciban la mejor atención médica posible ³⁷.

Las guías de la Sociedad Americana de Oncología Clínica reconocen a HER2 como un importante biomarcador pronóstico, predictivo y terapéutico en el cáncer de mama. La evaluación del estado de HER2 puede facilitar la elección de una terapia molecular apropiada al predecir la respuesta a la quimioterapia, terapia hormonal y terapia anti HER2. Por ello es necesario determinar la sobreexpresión de este biomarcador en todos los casos de cáncer de mama de manera temprana para guiar la terapia y evaluar recurrencia ³⁸.

1.6 Tratamiento Convencional del Cáncer de mama HER2 Positivo

En el caso del cáncer de mama no metastásico, los objetivos principales del tratamiento son eliminar por completo el tumor en la mama y los ganglios linfáticos regionales, así como prevenir la recurrencia. Además, se considera la posibilidad de administrar radioterapia después de la cirugía. La terapia sistémica puede ser administrada antes de la cirugía (terapia neoadyuvante), después de la cirugía (terapia adyuvante) o en ambos momentos ³⁹.

El trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado diseñado para unirse específicamente a la región IV del dominio extracelular del receptor HER2, se introdujo por primera vez en ensayos clínicos en la década de 1990 como terapia dirigida. Su mecanismo de acción implica el bloqueo de señalización del receptor al unirse a la porción extracelular y evitar su activación, la inducción de la respuesta inmune mediante la activación de citotoxicidad dependiente de anticuerpos, inhibición de la angiogénesis y sensibilización a la quimioterapia ⁴⁰.

Aunque el trastuzumab ha demostrado ser efectivo en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo, también puede tener algunos inconvenientes y efectos secundarios. Algunos de ellos incluyen baja respuesta de los pacientes a largo plazo, reacciones alérgicas o hipersensibilidad durante la infusión, interacciones con otros medicamentos, el desarrollo de resistencia, costos altos que limitan el acceso al tratamiento y de mayor importancia la cardiotoxicidad; este tratamiento puede afectar la función del corazón y llevar a problemas cardíacos, como la disminución de la fracción de eyección ventricular o insuficiencia cardíaca ⁴¹. Todos estos inconvenientes destacan la necesidad de nuevas estrategias de abordaje del cáncer HER2 positivo, tanto de diagnóstico como de tratamiento.

1.7 Nanotecnología

La nanotecnología se define como la habilidad de medir, manipular, ensamblar, controlar y manufacturar materia en la escala nanométrica, que va de 1 a 100 nanómetros (nm) ⁴². Cuando se crean nanopartículas (NPs) con estas dimensiones, las propiedades de los materiales pueden cambiar significativamente con respecto a las de escalas más grandes. Esta es la escala de tamaño donde los efectos cuánticos pueden regir el comportamiento y las propiedades de las partículas. A nanoescala, propiedades como el punto de fusión, la fluorescencia, la conductividad eléctrica, la permeabilidad magnética y la reactividad química pueden cambiar en función del tamaño de la partícula ⁴³.

Recientes avances en la nanotecnología han resaltado el potencial de su aplicación en la biomedicina para el diagnóstico, administración de fármacos y estudios de imagen para diversas enfermedades humanas, materiales a los cuales se les llamado “teranósticos” (Terapia y Diagnóstico) (Figura 5) ⁴². La capacidad de manipulación de las NPs ofrece ventajas como baja inmunogenicidad y toxicidad sistémica, mejora la estabilidad de material genético, modulación del efecto terapéutico, dirigir sistemas a células o tejidos específicos y efectos sinérgicos mediante terapias combinadas ⁴⁴.

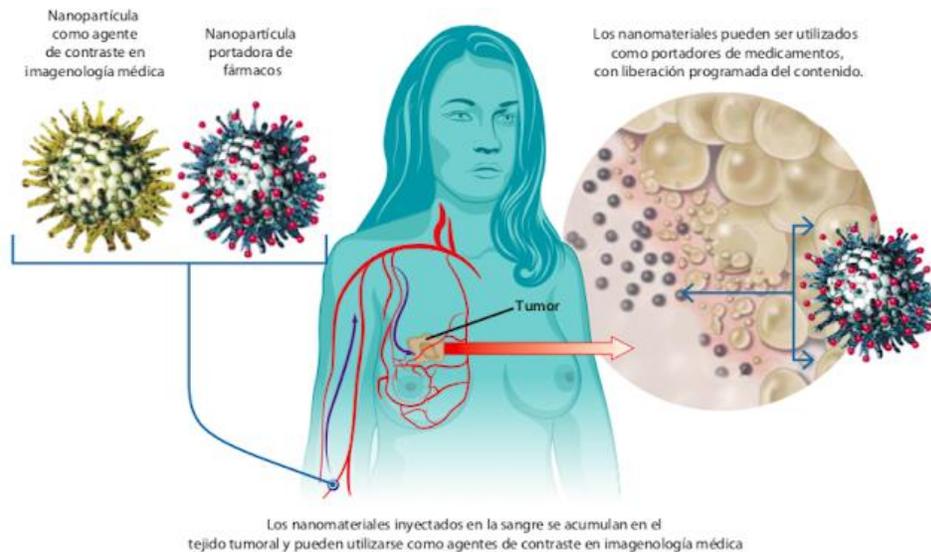


Figura 5. Nanomateriales usados como portadores de fármacos o como agentes de contraste en el cáncer. Recuperado de INCyTU (2019) ⁴⁵.

1.7.1 Nanopartículas de oro

En la escala nanométrica, las nanopartículas de oro (AuNPs) poseen propiedades que las diferencian del estado a granel o molecular. Estas incluyen propiedades ópticas únicas, síntesis sencilla y versátil, mayor reactividad de partícula, mayor relación superficie/volumen, baja citotoxicidad y capacidad de modificación en la superficie, haciéndolas ampliamente estudiadas en el campo del diagnóstico y tratamiento del cáncer ⁴⁶.

Entre las propiedades físicas de las AuNPs (Figura 6) se encuentra la resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR), fluorescencia de superficie mejorada, conversión fototérmica y respuestas colorimétricas. Dichas

características han sido ampliamente aplicadas para detecciones no invasivas in vivo, estudios de imagen, terapia fototérmica y diagnóstico in vitro ⁴⁷.

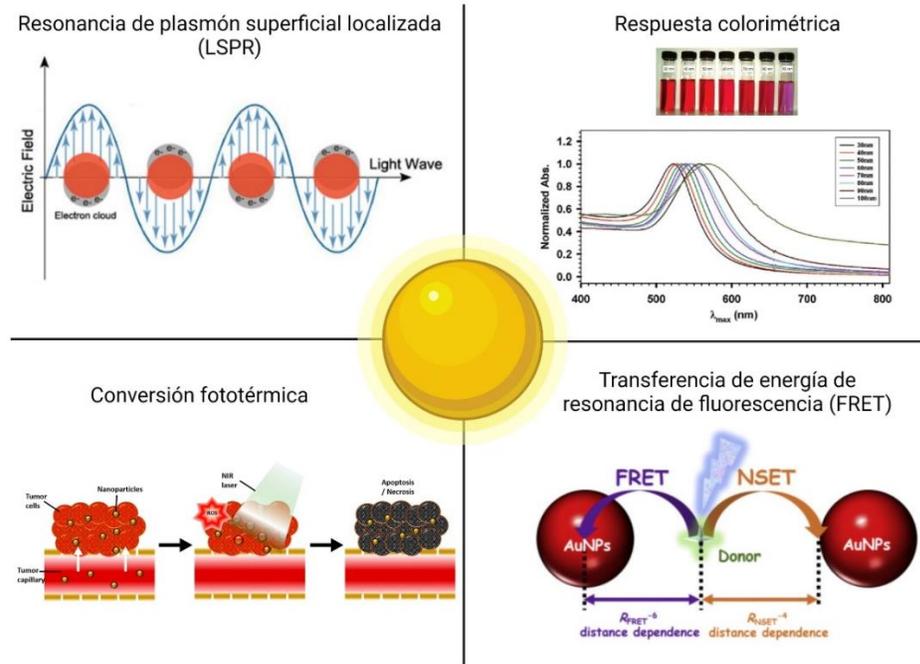


Figura 6. Propiedades físicas de las AuNPs.

Bajo la estimulación de la luz, los electrones de conducción en un metal noble oscilan colectivamente, lo que se denomina "plasmón". La resonancia de plasmón es una banda de absorción que se produce cuando la frecuencia del fotón incidente resuena con la oscilación de los electrones de conducción. Debido a que este fenómeno a menudo se produce en la superficie del metal, se conoce como resonancia de plasmón superficial (SPR) ⁴⁸. Cuando la SPR se restringe a volúmenes pequeños, como en el caso de las NPs, se produce el LSPR. Cuando

la LSPR ocurre, el coeficiente de extinción molar de las AuNPs se maximiza, mejorando la eficiencia de conversión fototérmica y la absorción de luz ⁴⁷.

La LSPR puede producir dos efectos completamente opuestos en la intensidad de la señal de las moléculas fluorescentes: extinción y mejora de la fluorescencia. Esto depende de la distancia entre las moléculas de fluorescencia y las AuNPs. La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) es la razón principal de la extinción de la fluorescencia. Cuando la distancia entre estas moléculas es inferior a 5 nm, la energía del grupo fluorescente excitado se transferirá a las AuNPs en su totalidad, lo que provocará la extinción de la fluorescencia. En este caso es común conjugar AuNPs y moléculas fluorescentes con diferentes enlazadores para aumentar la distancia entre las AuNPs y las moléculas fluorescentes ⁴⁹.

Después de absorber los fotones, las AuNP convierten la energía luminosa de los electrones en energía cinética, que finalmente se expresa en forma de calor. Este es el llamado “efecto fototérmico”. La capacidad de enfriamiento de los tejidos tumorales es menor que la del tejido normal, por lo que el calor producido se acumula dentro del tumor y su temperatura puede alcanzar más de 46 °C, mientras que los tejidos normales circundantes solo pueden llegar a 41 °C. Además, las células tumorales son intrínsecamente menos resistentes al calor que las células normales; las primeras suelen tener una temperatura letal de 42.5-43 °C, mientras que las últimas pueden soportar temperaturas de hasta 47 °C. La región infrarroja cercana (650-900 nm) es la más usada ya que ha demostrado los efectos más eficientes para la terapia fototérmica ⁵⁰.

Aunque la naturaleza inherente de las AuNPs las hace relativamente biocompatibles, esto es dependiente de su forma, tamaño, composición química y modificaciones de la superficie ⁴⁶. El polietilenglicol (PEG) es un polímero ampliamente usado como recubrimiento ya que ha demostrado mejorar la estabilidad de las NPs y disminuir la fagocitosis por el sistema fagocítico mononuclear y aumentar el tiempo de circulación ⁵¹.

Entre los tipos de estrategias para dirigir las nanopartículas a blancos específicos como células tumorales existen las rutas de orientación pasiva y activa. El direccionamiento pasivo se refiere a la acumulación en el sitio del tumor debido a las diferencias anatómicas y fisiopatológicas con respecto a los tejidos normales, como vasculatura permeable y disminución de la tasa de aclaramiento. El direccionamiento activo ocurre una interacción directa entre un ligando y un receptor o epítipo específico expresado en la superficie de la célula permitiendo una entrada selectiva ⁴⁴.

1.8 Aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos cortos de una hebra de ácido desoxirribonucleico (ADN) o de ácido ribonucleico (ARN) con una longitud de entre 20-80 nucleótidos. Estos son capaces de formar estructuras tridimensionales únicas que les permiten unirse a una variedad de objetivos ⁵².

El proceso de generación de aptámeros se denomina evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX), proceso desarrollado en 1990 por dos laboratorios independientes. En la tecnología convencional se utiliza una biblioteca que contiene oligonucleótidos de regiones aleatorias que están flanqueadas por regiones constantes cortas. En el caso de los aptámeros de ADN, la biblioteca de ADN sintetizada se incuba con moléculas diana. Las moléculas no unidas se eliminan y el complejo diana/ADN se separa. Las secuencias de ADN liberadas se amplifican mediante PCR y se realizan rondas adicionales de selección. Se secuencian los aptámeros potenciales obtenidos a partir de varias rondas de selección y se evalúa su cinética de unión ⁵³.

Debido a que los aptámeros pueden formar múltiples estructuras secundarias (como tallo-bucle, horquillas, pseudonudos, etc.) y formar estructuras tridimensionales únicas, pueden unirse a una gran variedad de objetivos, incluidas proteínas, células, bacterias, viriones y moléculas orgánicas e inorgánicas pequeñas, a través de complementariedad espacial y por medio de interacciones electrostáticas/iónicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, así como interacciones hidrofóbicas ⁵⁴. Las afinidades de unión de los aptámeros usualmente se encuentran entre el rango bajo nanomolar y alto picomolar, incluso llegando al femtomolar. El nivel de reconocimiento es tan sensible que pueden discriminar diferencias estructurales entre enantiómeros y la presencia o ausencia de grupos hidroxilo ⁵⁵.

En comparación con los anticuerpos, los aptámeros tienen algunas ventajas debido a su naturaleza molecular: su tamaño pequeño permite la penetración de

las barreras de los tejidos para llegar a los sitios objetivo *in vivo* de manera más eficiente que los anticuerpos proteicos de mayor tamaño, tienen una alta estabilidad y baja inmunogenicidad y toxicidad (TABLA II) ⁵⁴.

TABLA II

Diferencias entre aptámeros y anticuerpos ⁵⁴.

Criterio	Aptámeros	Anticuerpos
Composición química	Ácido nucleico	Proteína
Peso molecular	10-50 kDa	140-700 kDa
Estabilidad	Estable a 80 °C	Desnaturalización a 80 °C
Costo	Bajo	Alto
Inmunogenicidad	No	Sí
Internalización	Mayor posibilidad	Difícil

Gijs y colaboradores en 2016 generaron y evaluaron aptámeros para el reconocimiento de HER2 mediante una modalidad de SELEX con células completas adherentes. Se demostró que dos aptámeros, HeA2_1 y HeA2_3, se unen a la proteína HER2 con afinidades en el rango nM. Además, ambos aptámeros pudieron unirse con alta especificidad a células que sobreexpresan HER2 y a muestras de tejido tumoral positivo para HER2. Se demostró que el

aptámero HeA2_3 se internaliza en las células cancerosas y tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la viabilidad ⁵⁶.

1.9 Nanosistemas Teranósticos

La construcción de un nanosistema se debe basar principalmente en su aplicación biomédica. Las distintas partes que conformen el nanosistema brindan características y ventajas únicas para garantizar que se cumpla su propósito dado. La caracterización también es importante para garantizar que las partículas preparadas estén a nanoescala. En la ciencia de los materiales, el término "caracterización" se refiere a los procesos y técnicas a través de los cuales se evalúan las propiedades y la estructura del material. La caracterización ayuda a determinar las propiedades, composición y estructura de los materiales, así como evaluar si el método de síntesis fue exitoso o no ⁵⁷.

1.9.1 Caracterización Física

La espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-Vis) consiste en exponer la muestra a longitudes de onda en la región ultravioleta y visible para obtener el espectro de absorción. Este método es útil para obtener información sobre las propiedades ópticas, tamaño, concentración, estado de aglomeración y brinda sugerencias sobre la forma de las NPs. Las nanopartículas metálicas dispersan

la luz óptica con mucha eficacia debido a la resonancia de plasmón superficial. El ancho de banda del espectro, la magnitud y el pico de longitud de onda máxima de la resonancia de plasmón depende de la composición del material, el medio ambiente, la forma y el tamaño ⁵⁸.

La caracterización de soluciones coloidales y nanopartículas se realiza mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). El análisis se basa en el movimiento browniano, en el que las partículas grandes se mueven más lentamente y dispersan más luz que las partículas pequeñas. El diámetro hidrodinámico se calcula a partir de la dependencia del tiempo de la medición de la intensidad de dispersión. También proporciona detalles sobre el estado de agregación de las nanopartículas ⁵⁹.

La carga superficial en suspensión de nanopartículas o partículas coloidales se determina mediante potencial zeta. Al aplicar un campo eléctrico, las partículas comienzan a moverse debido a la interacción entre el campo eléctrico y su carga. La velocidad de la partícula se mide observando el desplazamiento Doppler en la luz dispersada, y la velocidad proporcional al potencial eléctrico de la partícula en el plano de corte se denomina potencial zeta. La magnitud del potencial zeta también proporciona información sobre la estabilidad de las partículas. La magnitud más alta representa una mayor estabilidad debido a una mayor repulsión electrostática ⁶⁰.

Dentro de las técnicas de microscopía para la caracterización de NPs se encuentra la microscopía electrónica de transmisión (TEM). En ella se aprovecha

la interacción entre un haz de electrones de densidad de corriente uniforme y la muestra. Cuando el haz de electrones alcanza la muestra, parte de los electrones se transmiten, mientras que el resto se dispersa. La magnitud de la interacción depende de varios factores, como el tamaño, la densidad de la muestra y la composición elemental. TEM es la técnica más común para analizar el tamaño y la forma de las nanopartículas, ya que proporciona no solo imágenes directas de la muestra, sino también una estimación de la homogeneidad de las nanopartículas ⁶¹.

1.9.2 Caracterización Biológica

Además de los procedimientos para la elaboración y evaluación fisicoquímica del nanosistema, nuestro grupo de trabajo estableció que es necesaria una batería de pruebas *in vitro* para evaluar la seguridad de un nanosistema, siendo el primero elaborado en nuestro laboratorio aquel compuesto por microesferas de quitosano/Tween 80 con NPs de magnetita (Roacho y colaboradores en 2021). Estas pruebas incluían el ensayo de MTT para la evaluación de la citotoxicidad en la línea celular de fibroblastos 3T3L1, tinción hematoxilina y eosina (HyE) para observar cambios morfológicos y prueba de hemólisis. No se encontraron efectos citotóxicos en concentraciones de 1 a 100 µg/mL en exposiciones de 24 horas ⁶².

Uno de los ensayos más versátiles y populares para la evaluación de la citotoxicidad es el ensayo de MTT, basado en la medición de la viabilidad de las

células a través de la actividad metabólica. El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difeníl tetrazolio (MTT) de color amarillo y soluble en agua se reduce metabólicamente en células viables a formazán, compuesto insoluble color violeta. El número de células viables se correlaciona con la intensidad de color determinada por mediciones espectrofotométricas después de disolver el formazán en alcohol ⁶³.

La evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad con la sangre es una parte necesaria en el desarrollo preclínico temprano de nanomateriales con aplicaciones biomédicas. La prueba de hemólisis estudia el grado de hemólisis generado por materiales detectando la hemoglobina liberada espectrofotométricamente después de incubar la sangre con las nanopartículas y separar las células no dañadas por centrifugación ⁶⁴.

Adicionalmente han surgido técnicas para evaluar el daño al ADN como marcador de estrés y daño celular. El intercambio de cromátidas hermanas (ICH) es un ensayo toxicológico clásico para la genotoxicidad y detección de alteraciones en la bioquímica relacionada a la recombinación homóloga celular. ICH es el fenómeno del intercambio parcial de ADN durante la replicación; la misma cantidad de ADN se intercambia en el mismo lugar en cada cromátida. La elevación de la frecuencia de ICH observados se considera como resultado del estrés de replicación por defectos genéticos, estrés por especies reactivas de oxígeno (ROS), y daños genómicos ⁶⁵.

1.9.3 Antecedentes Teranósticos Basados en HER2

Poturnayová y colaboradores en 2019 desarrollaron un método basado en un sensor acústico para la detección de células que sobreexpresan HER2 utilizando el aptámero previamente diseñado por Gijs y nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro modificadas con estreptavidina. Este sensor demostró un límite de detección de 550 células/mL con la línea celular SK-BR-3 HER2 positiva, además de establecer una concentración no tóxica de AuNP de 1 µg/mL en las líneas celulares SK-BR-3, MDA-MB-231 y MCF10A ⁶⁶.

Ranganathan y colaboradores en 2019 diseñaron un ensayo colorimétrico para la detección de HER2 en suero basado en AuNPs y aptámeros. Los aptámeros fueron retenidos en una superficie con las nanopartículas de oro. En la presencia de HER2 se crea un complejo aptámero-HER2 y se libera de las AuNPs. Al añadir NaCl las nanopartículas se agregan, cambiando de color rojo a azul. Se obtuvo un límite de detección en suero de 10 nM ⁶⁷.

En 2015 Choy y colaboradores desarrollaron NPs de base plurónica funcionalizadas con un anticuerpo anti HER2 y marcadas con Cy5.5 para la obtención de imágenes ópticas *in vivo*. Los autores conjugaron NPs de óxido de hierro y doxorubicina para combinar la resonancia magnética y la quimioterapia. La captación celular específica se estudió en células SKBR-3 que sobreexpresan HER2. Además, en un tumor de xenoinjerto *in vivo*, las NP funcionalizadas con trastuzumab mostraron una mayor captación tumoral y eficacia antitumoral en comparación con las no funcionalizadas 14 días después del tratamiento ⁶⁸.

Wu, Y. et al (2022) diseñaron un nanosistema basado en AuNPs funcionalizadas con dos aptámeros para la clasificación del cáncer de mama basada en FRET. Los aptámeros específicos para el receptor de estrógeno (ER) y HER2 marcados con fluorescencia se unen de manera específica a la proteína blanco, siendo potencialmente útiles para la clasificación cuantitativa de diferentes subtipos de cáncer de mama ⁶⁹.

1.10 Justificación

El receptor HER2 es un biomarcador involucrado en vías de proliferación celular, supervivencia y diferenciación. Su sobreexpresión en células cancerosas representa una mayor agresividad y pobre pronóstico de la enfermedad.

Los métodos de detección convencionales del cáncer de mama HER2 positivo como IHC o FISH presentan limitaciones ya que más de la mitad de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas, por lo que es necesario desarrollar un método diagnóstico altamente sensible que permita identificar el cáncer en una etapa temprana.

Recientes avances en la nanotecnología han resaltado el potencial de las propiedades únicas de las nanopartículas de oro conjugadas con la alta selectividad y afinidad de los aptámeros como una alternativa prometedora para la detección de células que sobreexpresan HER2. La información obtenida servirá para futuras investigaciones en el campo de la nanomedicina y como base para la creación de biosensores y nanosistemas teranósticos.

1.11 Hipótesis de Trabajo

El nanosistema compuesto por nanopartículas de oro recubiertas con PEG y un aptámero específico contra HER2 es capaz de detectar mediante fluorescencia células que sobreexpresan HER2.

1.12 Objetivo General

Construir, caracterizar y evaluar *in vitro* un nanosistema compuesto por nanopartículas de oro recubiertas con PEG y un aptámero específico contra HER2 para la detección de células que sobreexpresan HER2.

1.12.1 Objetivos Específicos

1. Construir y caracterizar por métodos físicos el nanosistema compuesto por nanopartículas de oro recubiertas con PEG y aptámero específico contra HER2.
2. Realizar la caracterización biológica del nanosistema compuesto por nanopartículas de oro recubiertas con PEG y aptámero específico contra HER2.
3. Evaluar la capacidad de unión *in vitro* del nanosistema dependiente del nivel de expresión de HER2.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Reactivos y materiales:

- Kit de conjugación Nanopartículas de oro 20 nm (3 reacciones) OligoREADY™ Cytodiagnosics (MG5K-20-1).
- NaCl grado biología molecular Sigma-Aldrich (71376-1KG).
- Trizma base Sigma-Aldrich (93362-1KG).
- Acetona CTR Scientific (AS-E0284).
- Metanol CTR Scientific (TK-310-12N-5ML).
- Ácido bórico US Biological (B2560).
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) EMD Millipore (324503-1KG).
- Buffer fosfato salino (PBS) 10X Invitrogen (AM9624).
- Ditioneitol (DTT) 0.5 M.
- TE 1X pH 7.6 Sigma-Aldrich (93302-100ML).
- Alcohol isopropílico CTR Scientific (CTR1244).
- H₂O destilada UltraPure Invitrogen (10977-015).
- Herceptin® Trastuzumab solución 440 mg Roche (N7279).
- Kit proliferación celular I (MTT) Roche (11465007001).

- Medio de montaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ThermoFisher Scientific (P36931).
- Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1X Gibco (11965-092).
- Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 1X Gibco (11875-093).
- Suero fetal bovino (SFB) Gibco (26140-079).
- Penicilina/estreptomicina Gibco (15140-122).
- Anfotericina B Gibco (15290-026).
- Solución tripsina-EDTA Sigma-Aldrich (T4049-500ML).
- Columnas Illustra MicroSpin G-25 Healthcare (27-5325-01)
- Microplacas 96 pozos tratada fondo plano Costar (3628).
- Microplacas de 6 pozos tratada fondo plano Costar (3516).
- Botellas de cultivo celular 25 cm² Corning (430639).
- Tubos cónicos 15 mL Corning (430791).
- Tubos cónicos 50 mL Corning (430829).
- Viales criogénicos 2 mL Corning (430488).
- Microtubos 0.65 mL Bio Basic Inc. (BT613-NS).
- Pipetas serológicas 2 mL Costar (4486).
- Pipetas serológicas 5 mL Costar (4051).
- Pipetas serológicas 10 mL Costar (4488).
- Tubo para extracción sanguínea con EDTA BD Vacutainer.
- Aguja eclipse BD Vacutainer (368607).

- Portaobjetos 25 x 75 Corning (2947).
- Cubreobjetos redondos 12 mm Pearl (680).

Material biológico:

- Aptámero AptHer2 26.2 nanomoles (nmoles) secuencia 5'- /5ThioMC6-D/TCT AAA AGG ATT CTT CCC AAG GGG ATC CAA TTC AAA CAG /3ATTO647NN/ -3' Integrated DNA Technologies.
- Línea celular Vero CCL-81 American Type Culture Collection (ATCC).
- Línea celular LNCaP clone FGC American Type Culture Collection (ATCC).
- Línea celular ZR-75-30 American Type Culture Collection (ATCC).
- Línea celular HCC1954 American Type Culture Collection (ATCC).

Equipos:

- Espectrofotómetro Marca NanoDrop Modelo ND-1000.
- Agitador Thermomixer Marca Eppendorf modelo 5350.
- Centrífuga Marca Eppendorf Modelo 5430.
- Centrífuga Marca Eppendorf Modelo 5415 C.
- Vortex Marca Thermolyne Modelo M37615.
- Incubadora Marca VWR Modelo 2310.
- Cabina de seguridad clase II Marca Nuair Modelos UN425-400.

- Microscopio óptico Marca Olympus Modelo CKX41SF.
- Zetasizer Nano ZS Marca Malvern.
- Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 2200FS+CS Marca Nanotech.
- Microscopio de fluorescencia Leica DM 1000.
- Lector de microplaca Marca BioTek Cytation 3 Imaging Reader.
- Countess II FL Marca Invitrogen Thermo Fisher Scientific.

2.2 Estrategia Experimental General

En la figura 7 se muestra la estrategia experimental general que se llevó a cabo. En primer lugar, se realizó la construcción del nanosistema conjugando las AuNP-PEG al aptámero específico contra HER2 por medio de una reacción maleimida-tiol y se realizó la caracterización física por medio de espectroscopía UV-Vis, DLS, potencial Z y TEM.

Como parte del segundo objetivo se realizó la caracterización biológica *in vitro* del nanosistema, los cuales incluyen el ensayo de MTT para la determinación de la viabilidad en las líneas celulares Vero CCL-81, LNCaP, ZR-75-30 y HCC1954, así como la prueba de hemólisis en sangre periférica.

Por último, como parte del tercer objetivo se evaluó la capacidad de unión *in vitro* del nanosistema dependiente del nivel de expresión de HER2 por medio de un ensayo en suspensión y microscopía de fluorescencia.

Todos los procedimientos realizados en este trabajo se llevaron a cabo bajo los estándares establecidos por el comité de ética y bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con la clave de registro de Subdirección de Investigación BI23-00004.

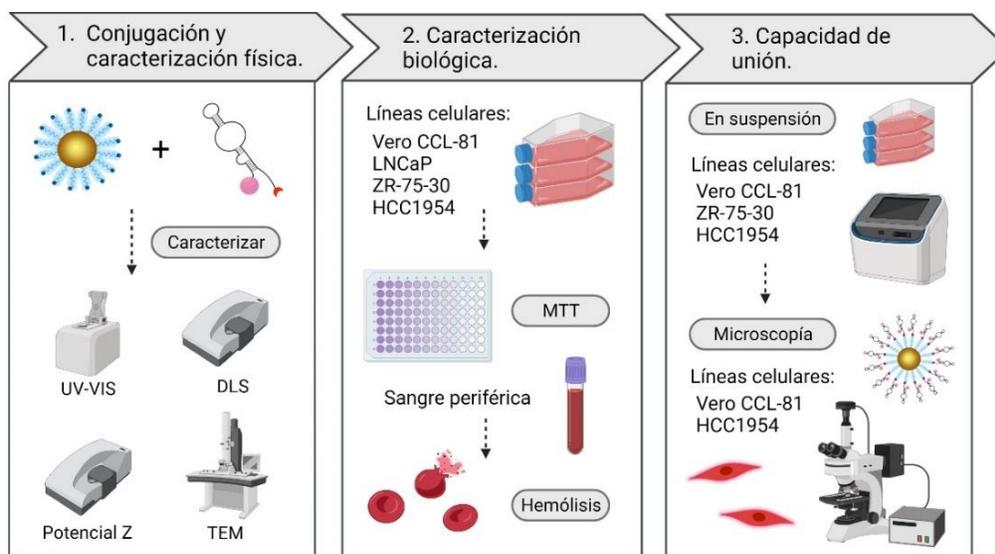


Figura 7. Estrategia general de trabajo.

2.3 Construcción del Nanosistema

Se utilizaron nanopartículas de oro comerciales de 20 nm de diámetro, recubiertas con PEG de 5 kDa (AuNP-PEG) modificado con grupos maleimida en su extremo libre. El aptámero HER2 fluorescente (AptHer2) se adquirió a una concentración final de 26.2 nmoles, con la secuencia 5'- /5ThioMC6-D/TC TAA AAG GAT TCT TCC CAA GGG GAT CCA ATT CAA ACA G/3ATTO647NN/ -3' reportada previamente por Gijs y colaboradores ⁵⁶, cuenta en su extremo 3' con el fluoróforo ATTO 647N y en su extremo 5' posee un grupo tiol.

Para realizar la conjugación se utilizó el kit Cytodiagnosics OligoREADY™ 20 nm Gold Nanoparticle Conjugation, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la formación de un enlace covalente tioéter entre el grupo tiol en el extremo 5' del aptámero y el grupo maleimida en la AuNP-PEG. Los pasos necesarios para la conjugación se describen en los siguientes apartados.

2.3.1 Reducción del Aptámero

El aptámero AptHer2 de 26.2 nmoles liofilizado se ajustó a 100 μM agregando 262 μL de TE 1X pH 7.6. Se tomaron 50 μL del aptámero resuspendido y se añadió 1 μL de ditioneitol (DTT) a 0.5 M. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad para reducir el oligonucleótido.

2.3.2 Purificación en Columna

La columna Illustra MicroSpin G-25 se preparó resuspendiendo la resina agitando con vórtex por un minuto. Se colocó la columna en el tubo de recogida y se centrifugó durante 1 minuto a 735 \times g. Posteriormente se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL libre de DNAsas. Se aplicaron lentamente los 50 μL del aptámero ya reducido al centro superior de la resina, teniendo cuidado de no perturbarla. Se centrifugó durante 2 minutos a 735 \times g. El aptámero purificado se recogió en el fondo del tubo de 1.5 mL y fue almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Se realizó una segunda y tercera elución agregando 50 μL de TE 1X pH 7.6 para recuperar el aptámero que pudo quedar retenido en la columna.

2.3.3 Conjugación de Nanopartículas de oro

En un tubo de microcentrífuga se añadieron 60 μL del buffer de reacción y 48 μL del aptámero AptHer2 100 μM . Se transfirieron 90 μL de la solución al vial que contiene las nanopartículas de oro liofilizadas y se mezcló bien. El preparado

se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora protegido de la luz. Posteriormente se añadieron 10 μL de solución de extinción previamente reconstituida y se incubó por 15 minutos para detener la reacción. Se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó durante 30 minutos a $5,500 \times g$. El sobrenadante fue desechado y se agregaron 100 μL de TE 1X pH 7.6 para volver a resuspender el conjugado.

2.4 Caracterización por Métodos Físicos

Para confirmar la correcta conjugación del nanosistema se llevó a cabo la caracterización física de la siguiente manera:

- Espectroscopía UV-Vis utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.
- Dispersión dinámica de la luz (DLS) y potencial Z en el equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern, para determinar el diámetro hidrodinámico y carga superficial.
- Microscopía electrónica de transmisión (TEM) para corroborar forma y tamaño de las nanopartículas en el equipo Nanotech TEM JEOL JEM 2200FS+CS.

2.4.1 Espectroscopía UV-Vis

Para la identificación de los espectros de absorbancia de las AuNP-PEG, el aptámero AptHer2 y el nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 se realizaron

mediciones de absorbancia haciendo un barrido de 200 a 800 nm de longitud de onda en el equipo NanoDrop ND-1000 modalidad UV-Vis.

Las mediciones de concentración de cada muestra se realizaron registrando las absorbancias a 520 y 646 nm que corresponden a la longitud de onda de máxima absorción de las AuNP-PEG de 20 nm y del fluoróforo ATTO 647N presente en el aptámero respectivamente, considerando un trayecto óptico de 0.1 cm, un coeficiente de extinción molar para las AuNPs de 921,000,000 L/(moles*cm) y para el aptámero AptHer2 de 404,900 L/(moles*cm) mediante la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Donde A es la absorbancia de la solución a una longitud de onda dada, ε el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$), b el trayecto óptico (cm) y c la concentración de la solución (M).

2.4.2 Dispersión Dinámica de la luz

La evaluación del diámetro hidrodinámico de las AuNP-PEG (2.5 μ g/mL) y el nanosistema (2.5 μ g/mL) se realizó por medio de DLS en el equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern, en una cubeta de cuarzo con trayecto óptico de 1 cm llevando a cabo tres mediciones independientes. Las condiciones de trabajo utilizadas fueron las siguientes: temperatura 25 °C, índice de refracción AuNPs

0.20, índice de refracción dispersante 1.33, viscosidad 0.8872 y la absorbancia correspondiente de cada muestra a 632 nm en un trayecto óptico de 1 cm.

2.4.3 Potencial Zeta

Para la determinación de la carga superficial de las AuNP-PEG (2.5 µg/mL) y el nanosistema (2.5 µg/mL) se realizó la medición del potencial Z en el equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern en una cubeta de cuarzo con trayecto óptico de 1 cm, utilizando un adaptador a la cubeta con electrodos y llevando a cabo tres mediciones independientes. Las condiciones de trabajo utilizadas fueron las siguientes: temperatura 25 °C, índice de refracción AuNPs 0.20, índice de refracción dispersante 1.33, viscosidad 0.8872 y la absorbancia correspondiente de cada muestra a 632 nm en un trayecto óptico de 1 cm.

2.4.4 Microscopía Electrónica de Transmisión

La caracterización y confirmación de la forma y tamaño de las AuNP-PEG (2.5 µg/mL) y el nanosistema (2.5 µg/mL) se evaluó por medio de TEM en el equipo JEOL JEM 2200FS+CS de Nanotech. Las muestras fueron preparadas colocando una gota de la solución sobre una rejilla de cobre y se dejaron secar por 15 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes fueron capturadas con un voltaje de aceleración de 200 kV y un aumento de 100 k.

A partir de las imágenes capturadas se realizaron mediciones del diámetro de 100 partículas mediante el software ImageJ y se analizó la frecuencia de distribución de tamaños.

2.5 Prueba de Hemólisis

Se realizó una toma de muestra de sangre venosa periférica de donador sano en un tubo con EDTA, la muestra se centrifugó a 3000 revoluciones por minuto (rpm) por tres minutos. El plasma fue decantado y los eritrocitos lavados con PBS 1X tres veces. Se realizó una dilución 1:99 de los eritrocitos tomando 100 μL de los eritrocitos lavados anteriormente y suspendiéndolos en 9800 μL de PBS 1X. Como control negativo de hemólisis se usó PBS 1X y como control positivo H_2O destilada. Se incubaron 16 μL de las diferentes concentraciones [AuNP-PEG (0.05, 0.5 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 (0.05, 0.5 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), aptámero AptHer2 (50, 100 y 200 nM) y trastuzumab (0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)], H_2O destilada o PBS 1X, con 4 μL de la dilución 1:99 de eritrocitos. Fueron incubados por 30 minutos a 37 °C en un Thermomixer Eppendorf a 300 rpm. Transcurrido el tiempo se centrifugaron a 14,000 rpm por tres minutos y finalmente se leyó la liberación de hemoglobina espectrofotométricamente en NanoDrop ND-100 a 415 nm. El control negativo se toma como 0% hemólisis y el control positivo como 100% hemólisis.

El cálculo del porcentaje de hemólisis se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{A \text{ muestra} - A \text{ control negativo}}{A \text{ control positivo} - A \text{ control negativo}} \times 100$$

Donde A es la absorbancia obtenida a 415 nm. La interpretación de los resultados se realizó en base a la norma ASTM-F756-08 que determina la práctica estándar para la evaluación de las propiedades hemolíticas de materiales, donde se clasifican los materiales como no hemolíticos cuando provocan una hemólisis menor al 2%, ligeramente hemolítico de 2% a 5%, y altamente hemolítico cuando el material presenta una hemólisis mayor al 5%.

2.6 Ensayo MTT

Para la caracterización biológica mediante la prueba de MTT para la evaluación de la viabilidad se utilizaron las líneas celulares (TABLA III) Vero CCL-81 como células control no cancerosas y con expresión basal de HER2, LNCaP de cáncer de próstata con nivel bajo de expresión de HER2, ZR-75-30 de cáncer de mama de sobreexpresión de HER2 sensible a trastuzumab y la línea HCC1954 de cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 resistente a trastuzumab. Las células Vero fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM y las líneas LNCaP, ZR-75-30 y HCC1954 en medio de cultivo RPMI-1640, ambos suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% estreptomycin-

penicilina/anfotericina B, a 37 °C con 5% CO₂ hasta lograr una confluencia del 70%. Se sembraron 10,000 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos y fueron incubadas por 24 horas a 37°C y 5% CO₂.

TABLA III

Características de las líneas celulares utilizadas ^{70 71 72 73}.

Línea Celular	Vero CCL-81	LNCaP Clone FGC	ZR-75-30	HCC1954
Morfología	Epitelial	Epitelial	Epitelial	Epitelial
Organismo	<i>Cercopithecus aethiops</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Tejido	Riñón	Carcinoma de próstata metastásico	Carcinoma de mama ductal invasivo	Carcinoma de mama ductal
Nivel de expresión de HER2	Control no canceroso Expresión basal	Expresión baja	Expresión alta Sensible a trastuzumab	Expresión alta Resistente a trastuzumab
Medio de cultivo	DMEM	RPMI-1640	RPMI-1640	RPMI-1640

Las AuNP-PEG (0.05, 0.5 y 5 µg/mL), nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 (0.05, 0.5 y 5 µg/mL), aptámero AptHer2 (50, 100 y 200 nM) y trastuzumab (0.01, 0.1 y 1 µg/mL) fueron dispersados en condiciones estándar de esterilidad en medio RPMI-1640 o medio DMEM según sea el caso. A las placas de 96 pozos

donde se cultivaron las células se les retiró el medio de cultivo y se aplicaron 100 μ L de cada tratamiento por triplicado incluyendo control negativo con células tratadas solamente con medio. Las células fueron incubadas con los distintos tratamientos por 24 horas en condiciones de cultivo estándar.

La viabilidad celular fue medida 24 horas después de la exposición a los tratamientos incubando con una solución de MTT (100 μ g/mL en medio) durante 4 horas. El formazán presente en la placa fue disuelto agregando 100 μ L de isopropanol a pH 3. Se midió la absorbancia a 570 y 651 nm en lector de microplaca BioTek Cytation 3 Imaging Reader.

Se realizó la corrección de las lecturas restando la absorbancia a 570 nm de la absorbancia a 651 nm para eliminar el ruido de fondo y se utilizaron las lecturas corregidas para el cálculo de la viabilidad celular con la siguiente ecuación:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{A\ muestra}{A\ control\ negativo} \times 100$$

2.7 Ensayo de Detección en Suspensión

Para evaluar la capacidad de unión *in vitro* del nanosistema dependiente del nivel de expresión del receptor HER2 en las distintas líneas celulares, se realizó un ensayo de detección en suspensión mediante la unión directa del nanosistema a las líneas celulares Vero CCL-81, ZR-75-30 y HCC1954. Para

esto se preparó una suspensión celular de 100,000 células en 100 μL de medio de cultivo sin suplementar. Estas fueron incubadas con 200 μL del nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó por 30 minutos a 37°C con 5% CO_2 . Los tubos se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 10 μL de medio de cultivo.

Posteriormente se tomaron los 10 μL de la suspensión y fueron depositados en la cámara para conteo celular del equipo Countess II FL Automated Cell Counter. Se midió la concentración celular, porcentaje de células marcadas y la intensidad de fluorescencia relativa en el canal de fluorescencia para Cy5 a una longitud de onda de 664 nm.

Para descartar la unión inespecífica del nanosistema se realizó un ensayo de bloqueo previo del receptor HER2 haciendo una primera incubación de las células con un exceso del anticuerpo trastuzumab (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) el cual es específico al receptor. Las células fueron incubadas por 30 min a 37 °C con 5% CO_2 . Los tubos se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se realizó la incubación con el nanosistema (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 minutos, llevando a cabo el procedimiento previamente descrito.

2.8 Microscopía de Fluorescencia

Para confirmar los resultados obtenidos mediante la detección por suspensión, se realizó microscopía de fluorescencia en las líneas celulares Vero

CCL-81 como control no canceroso de baja expresión de HER2 y la línea HCC1954 de sobreexpresión de HER2.

Las células fueron sembradas en placas de 6 pozos con 2 cubreobjetos redondos por pozo. 500,000 células/mL con 1 μ L penicilina/estreptomicina y anfotericina B se incubaron a 37 °C con 5% CO₂ por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS 1X. La fijación se llevó a cabo agregando 1 mL de acetona/metanol relación 1:1, cubriendo la placa con papel aluminio e incubando por 20 min a 4°C. Transcurrido el tiempo de fijación se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con PBS 1X.

Una vez fijadas las células se agregó 1 mL del nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 (10 μ g/mL en PBS 1X) y fueron incubadas por 1 hora a 37 °C con 5% CO₂. Como control negativo las células fueron tratadas con 1 mL de PBS 1X e incubadas en las mismas condiciones. Una vez terminado el tiempo de incubación se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS 1X. Se colocaron 2 μ L de DAPI listo para montaje sobre un portaobjetos, el cubreobjetos fue retirado del pocillo con pinzas estériles y colocado en el portaobjetos sobre la gota de DAPI. Para evitar el movimiento del cubreobjetos se colocó una pequeña cantidad de esmalte transparente en las orillas del cubreobjetos y se dejó secar.

Las laminillas fueron resguardadas de la luz a 4°C (máximo 2 semanas) hasta su observación en el microscopio de fluorescencia Leica DM 1000, en los canales azul para DAPI a 461 nm, y en el canal rojo para el fluoróforo ATTO 647N

presente en el nanosistema a 664 nm, donde las imágenes fueron capturadas en el software QCapture. Todas las imágenes fueron capturadas bajo las mismas condiciones y tiempos de exposición.

Para el análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas del canal de fluorescencia rojo correspondiente a la señal del nanosistema, se realizaron mediciones de la intensidad de fluorescencia media en 50 células individuales y 50 lecturas de fondo mediante el software ImageJ. Para comparar la intensidad de la fluorescencia entre líneas celulares se determinó la fluorescencia celular total corregida (CTCF) restando la señal de fondo mediante la siguiente fórmula:

$$CTCF = \text{Densidad de fluorescencia integrada} - (\text{Área de la célula} \times$$

$$\text{Fluorescencia promedio de las lecturas del fondo})$$

2.9 Análisis Estadístico

El análisis estadístico y las gráficas de los resultados obtenidos se realizó en el software GraphPad Prism 5.

Para el análisis del diámetro de las partículas mediante TEM, se utilizaron las mediciones obtenidas en ImageJ. Luego se generó un histograma de frecuencias, el cual fue ajustado mediante una distribución Gaussiana para visualizar la distribución de tamaños y determinar el diámetro promedio.

Los análisis de los resultados de MTT se realizaron mediante la prueba de ANOVA de dos vías con post hoc Bonferroni y $n=3$, donde se realizó la comparación de los grupos experimentales contra el control de células sin tratar, considerándose significativo cuando se obtuvo una $p < 0.05$ y graficándose el promedio \pm desviación estándar (SD).

El análisis de resultados obtenidos de la prueba de hemólisis se realizó mediante la prueba de ANOVA de dos vías con post hoc Bonferroni y $n=5$, donde se realizó la comparación entre todos los grupos experimentales, considerándose significativo cuando se obtuvo una $p < 0.05$ y graficándose el promedio \pm SD.

El análisis correspondiente a los resultados de la evaluación de la capacidad de unión *in vitro* del nanosistema se llevó a cabo mediante la prueba de ANOVA de una vía con post hoc Bonferroni ($n=3$ en suspensión y $n=50$ en microscopía de fluorescencia), donde se realizó la comparación entre las líneas celulares, considerándose significativo cuando se obtuvo una $p < 0.05$ y graficándose el promedio \pm SD.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Caracterización Física del Nanosistema

Después de construir el nanosistema se realizó la caracterización y los resultados se describen a continuación:

3.1.1 Espectroscopía UV-Vis

En la figura 8a se muestra el espectro de absorción obtenido de las AuNP-PEG comerciales. Las AuNPs exhiben una propiedad óptica conocida como resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR). Esto da como resultado una fuerte banda de absorbancia en la región visible (500 nm - 600 nm), lo cual concuerda con la banda de máxima absorción observada a 520 nm.

El espectro de absorción obtenido del aptámero AptHer2 se observa en la figura 8b. Se presentó un pico de absorción máxima a 260 nm correspondiente a la absorción característica de los ácidos nucleicos, así como un máximo de absorción a 646 nm el cual corresponde a la absorción del fluoróforo ATTO 647N presente en el extremo 3' del aptámero.

En la figura 8c se observa el espectro UV-Vis obtenido del nanosistema AuNP-PEG-AptHer2, presentándose una integración de las tres señales de

máxima absorción anteriormente observadas en los espectros de los componentes individuales: la absorción a 260 nm correspondiente a los ácidos nucleicos, la banda de resonancia a 523 nm de las AuNP-PEG y una tercera señal a 646 nm correspondiente a la absorción del fluoróforo ATTO 647N del aptámero.

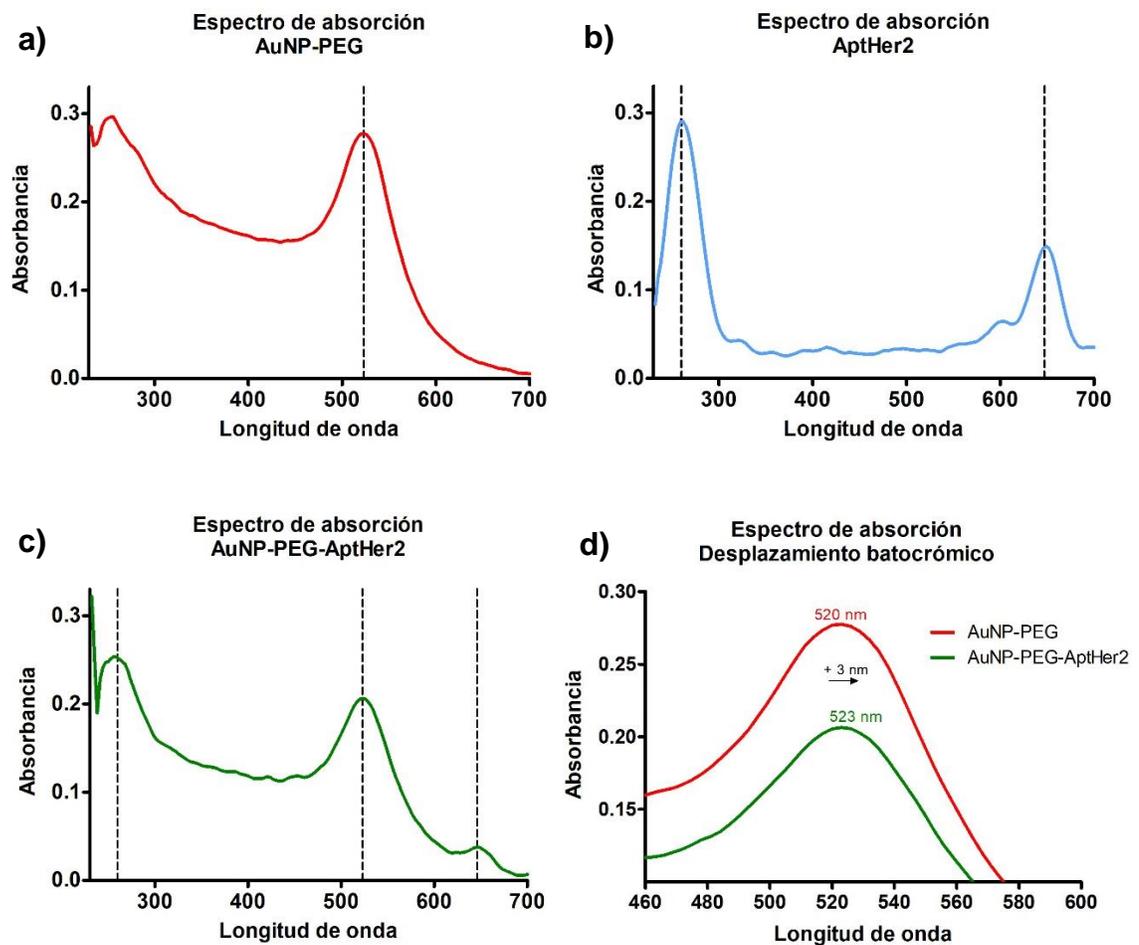


Figura 8. Espectros UV-Visible. a) AuNP-PEG. b) AptHer2. c) AuNP-PEG-AptHer2. d) Desplazamiento batocrómico del nanosistema.

Al realizar una comparación de la banda de resonancia de las AuNP-PEG antes y después de realizar la conjugación con el aptámero como se ilustra en la figura 8d, se observó un desplazamiento en la longitud de onda de máxima absorción correspondiente a la resonancia de plasmón de superficie de las nanopartículas de oro, de 520 nm a 523 nm.

3.1.2 Dispersión Dinámica de la luz

El análisis de la dispersión dinámica de la luz tanto de las AuNP-PEG comerciales como del nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 se llevó a cabo en suspensión en TE 1X pH 7.4. En la figura 9a se observan los resultados obtenidos del diámetro hidrodinámico de AuNP-PEG, donde se obtuvo un diámetro promedio de 53.03 ± 2.69 nm con un índice de polidispersidad (PDI) de 0.318 ± 0.013 .

La dispersión de tamaños del nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 se observa en la figura 9b, donde se observó un aumento del diámetro hidrodinámico promedio a 65.30 ± 1.12 nm y PDI de 0.237 ± 0.039 .

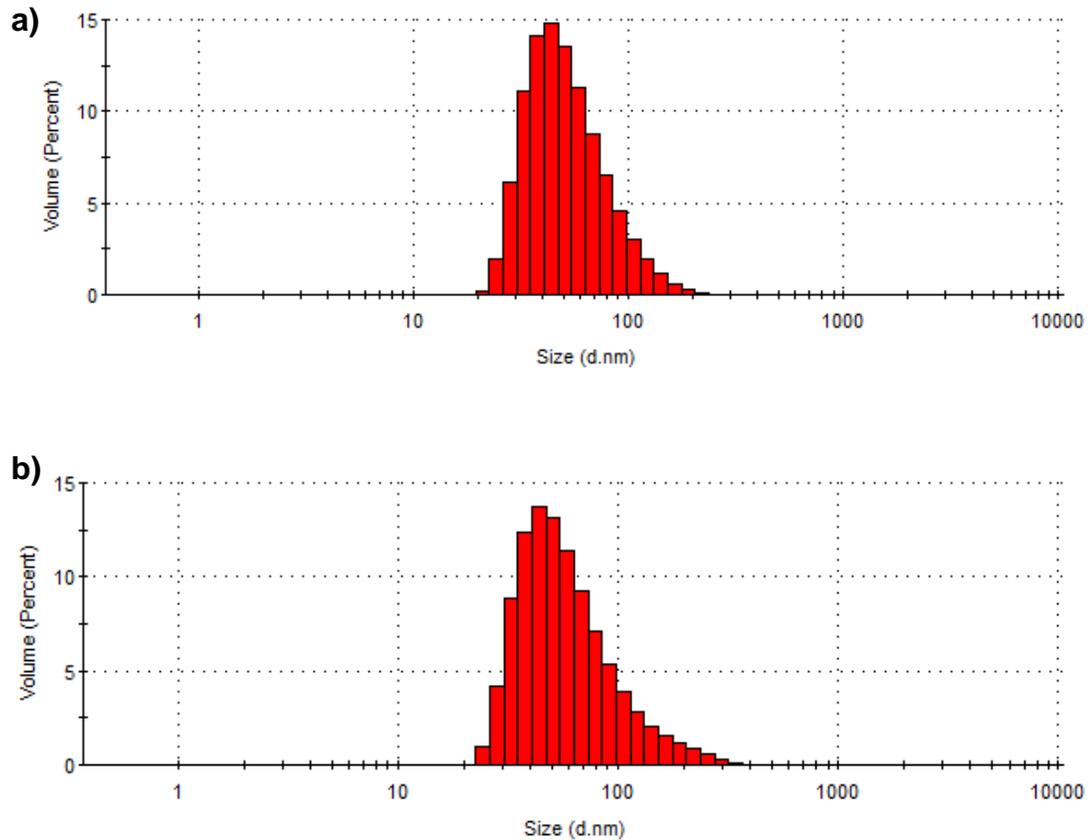


Figura 9. Dispersión dinámica de la luz. A) Dispersión de tamaños por volumen de AuNP-PEG. b) Dispersión de tamaños por volumen de AuNP-PEG-AptHer2.

3.1.3 Potencial Zeta

La medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas se evaluó mediante potencial Zeta en TE 1X pH 7.4. Las muestras con un alto potencial Zeta, tanto negativo como positivo, se estabilizan eléctricamente. Mientras que aquellas que poseen un bajo potencial Zeta pueden dar lugar a una estabilidad física deficiente.

El análisis de potencial Z de las AuNP-PEG se muestra en la figura 10a, donde se obtuvo una carga superficial de -3.62 ± 0.27 mV. Los resultados del nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 se muestran en la figura 10b, donde se observó un aumento en la carga negativa a -17.40 ± 0.68 mV.

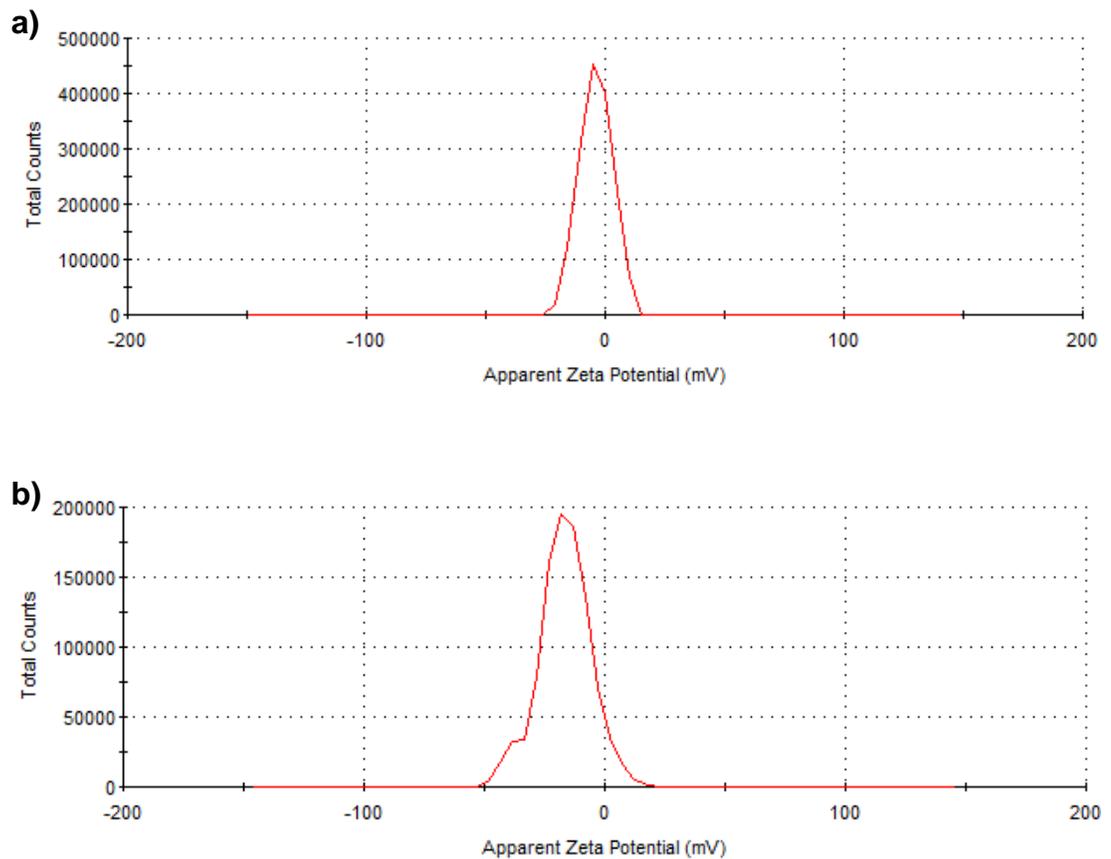


Figura 10. Potencial Zeta. a) AuNP-PEG, b) AuNP-PEG-AptHer2.

3.1.4. Microscopía Electrónica de Transmisión

Para la confirmación de forma y tamaño de las nanopartículas comerciales AuNP-PEG y el nanosistema se realizó microscopía electrónica de transmisión. En la figura 11 se muestran imágenes representativas a diferentes aumentos de las AuNP-PEG. Debido a la naturaleza del tipo de análisis y los componentes del nanosistema, solo es visible el núcleo metálico de oro, donde se observaron morfologías principalmente esféricas, ocasionalmente poligonales y dispersas.

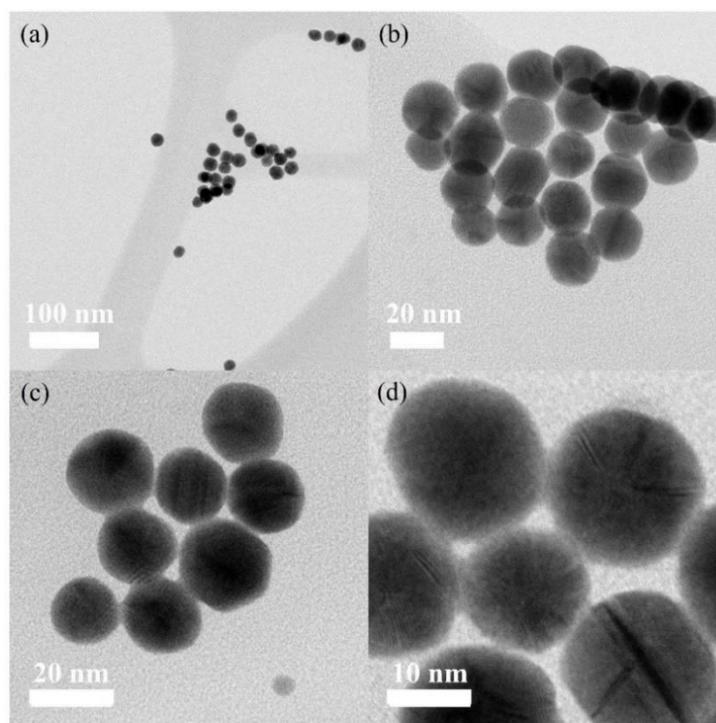


Figura 11. TEM AuNP-PEG. a), b), c) y d) Micrografías representativas a distintos aumentos.

En la figura 12 se muestran micrografías representativas correspondientes al nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 a distintos aumentos. Se observaron morfologías principalmente esféricas y las partículas dispersas. En la figura 8d se destaca un acercamiento donde se observó un halo alrededor de la partícula, sugiriendo la presencia del recubrimiento con PEG y el aptámero AptHer2.

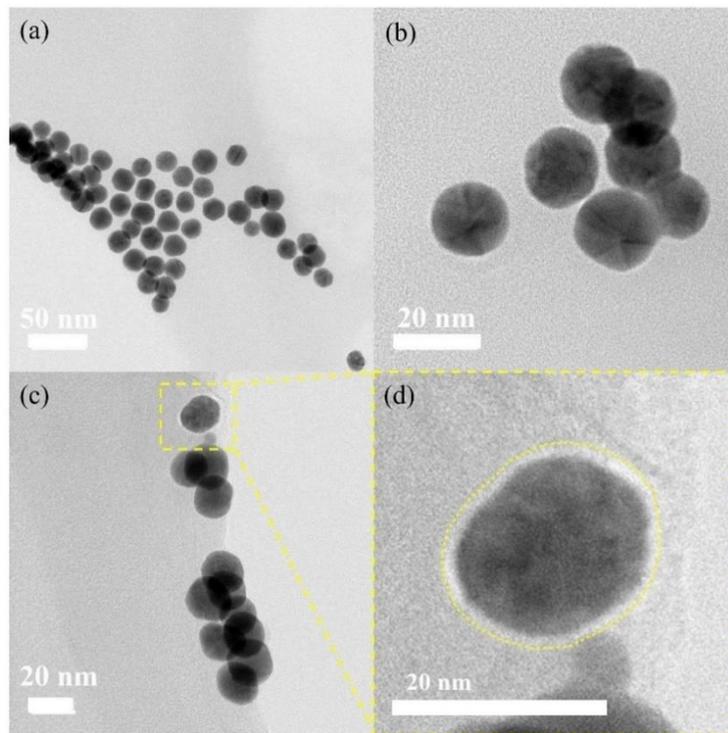


Figura 12. TEM AuNP-PEG-AptHer2. a), b) y c) Micrografías representativas a distintos aumentos, d) Acercamiento de partícula que muestra un halo en la superficie.

A partir de las micrografías obtenidas se realizaron mediciones del diámetro de las partículas (n=100) y se elaboró un histograma de frecuencia de

diámetro (Figura 13). Para las AuNP-PEG (Figura 13a) se observó una distribución de tipo Gaussiana donde se obtuvo un diámetro de AuNP promedio de 19.29 ± 1.83 nm. Para el nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 (Figura 13b) se observó una distribución de tipo Gaussiana donde se obtuvo un diámetro de AuNP promedio de 19.21 ± 1.86 nm.

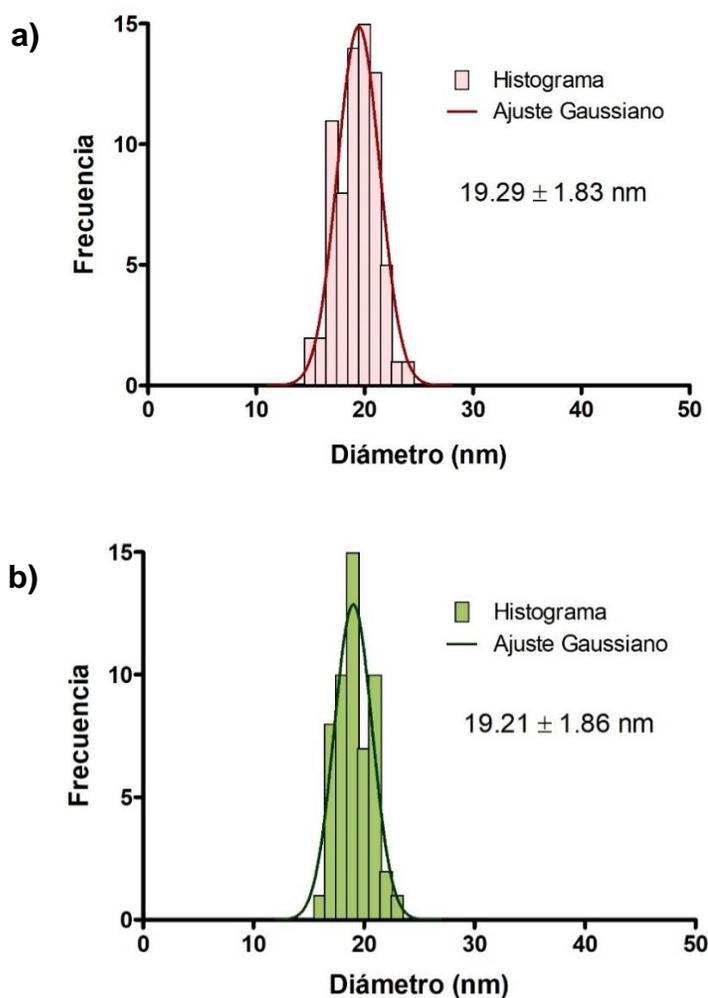


Figura 13. Histograma de frecuencia de diámetro obtenido por TEM con ajuste Gaussiano. a) AuNP-PEG, b) AuNP-PEG-AptHer2.

Al realizar una comparación de las micrografías obtenidas de las AuNP-PEG y nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 como se muestra en la Figura 14, se puede observar que las partículas se encuentran más separadas una de la otra en el nanosistema que sin conjugar con el aptámero AptHer2.

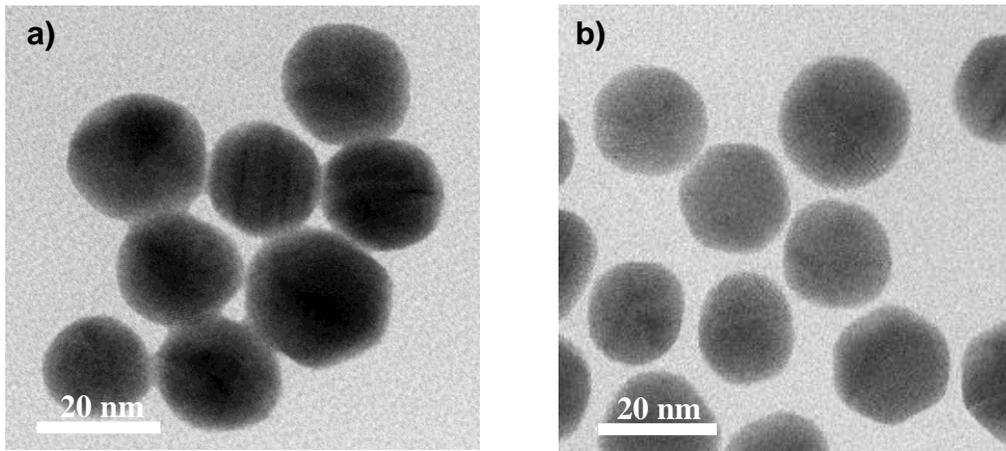


Figura 14. TEM de a) AuNP-PEG y b) AuNP-PEG-AptHer2. Micrografías representativas donde en b) se observa una separación entre las partículas.

3.2 Prueba de Hemólisis

Los resultados de la evaluación de la hemotoxicidad *in vitro* mediante la prueba de hemólisis se resumen en la Figura 15. De acuerdo con la guía ASTM-F756-08, que determina la práctica estándar para la evaluación de las propiedades hemolíticas de materiales, estos pueden ser clasificados como no

hemolíticos cuando provocan una hemólisis menor al 2%, ligeramente hemolítico entre 2 y 5%, y altamente hemolítico mayor al 5%.

Las AuNP-PEG presentaron una actividad no hemolítica en todas las concentraciones probadas, mostrando una hemólisis menor al 2%. El aptámero AptHer2 a 50 nM presentó hemólisis menor al 2%, mientras que a 100 y 200 nM presentó hemólisis menor al 5%. El nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 presentó hemólisis menor al 2% a la concentración baja, mientras que a 0.5 y 5 $\mu\text{g/mL}$ demostró hemólisis menor al 5%. El anticuerpo trastuzumab presentó hemólisis menor al 2% a 0.01 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$, mientras que a 1 $\mu\text{g/mL}$ se observó hemólisis mayor al 2% (TABLA III).

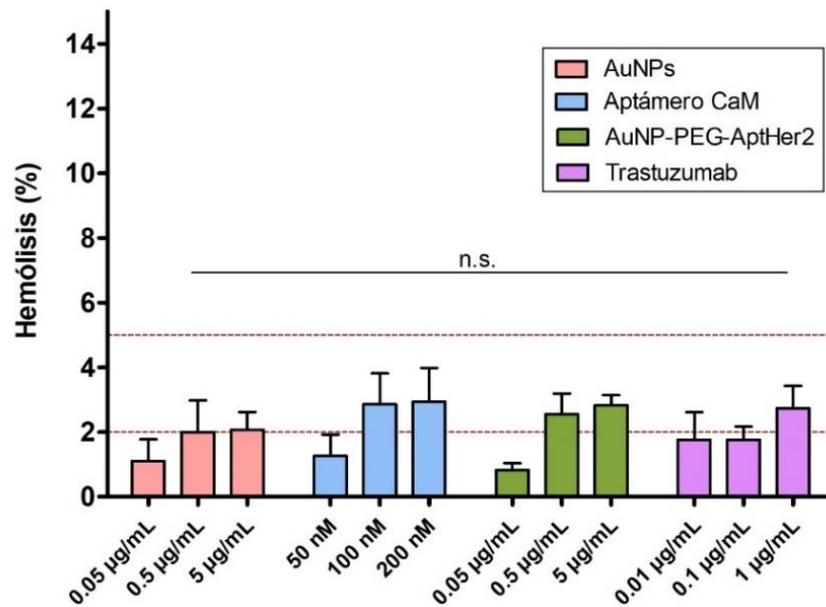


Figura 15. Hemólisis *in vitro* de las AuNP-PEG, aptámero AptHer2, nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 y trastuzumab. n = 5, n.s. no significativo.

No existió diferencia estadísticamente significativa en el grado de hemólisis provocada entre los grupos estudiados. En la TABLA IV se visualizan los porcentajes de hemólisis obtenidos para cada grupo, y de acuerdo con la guía ASTM- F756-17, las AuNP-PEG se clasifican como no hemolíticas, y el aptámero AptHer2, el nanosistema y el trastuzumab como ligeramente hemolíticos a las concentraciones evaluadas, destacando que en ningún caso se presentó actividad altamente hemolítica.

TABLA IV

Porcentaje de hemólisis \pm SD.

Concentración	AuNP-PEG	AptHer2	Nanosistema	Trastuzumab
Baja	1.10 \pm 0.66	1.26 \pm 0.67	0.83 \pm 0.21	1.76 \pm 0.85
Media	1.99 \pm 0.98	2.85 \pm 0.95	2.55 \pm 0.63	1.76 \pm 0.40
Alta	2.07 \pm 0.55	2.94 \pm 1.05	2.83 \pm 0.32	2.73 \pm 0.69

Verde: no hemolítico, amarillo: ligeramente hemolítico.

3.3 Ensayo MTT

La evaluación de la citotoxicidad *in vitro* por medio del ensayo de MTT se realizó transcurridas las 24 h de los tratamientos con AuNP-PEG, aptámero

AptHer2, nanosistema y anticuerpo trastuzumab en las líneas celulares Vero CCL-81 como control no canceroso, LNCaP, ZR-75-30 y HCC1954.

3.3.1 Ensayo MTT AuNP-PEG

En la Figura 16 se muestran los resultados del tratamiento con las AuNP-PEG sin conjugar en las líneas celulares. En la línea celular control no canceroso Vero CCL-81, ZR-75-30 y HCC1954 no se observó un efecto estadísticamente significativo en la disminución de la viabilidad, mientras que en la línea LNCaP se observó una disminución estadísticamente significativa del 16.4% en la viabilidad celular a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

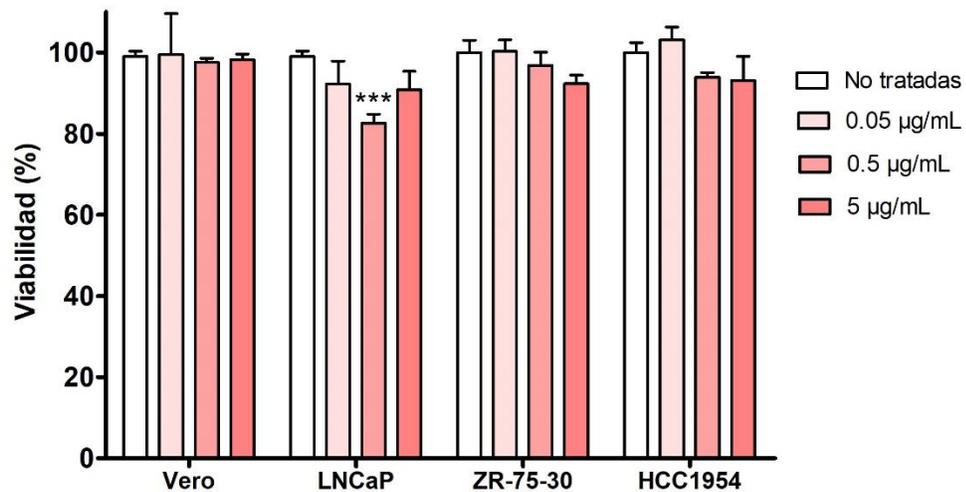


Figura 16. MTT 24 h AuNP-PEG. $n = 3$, *** $p < 0.001$ contra el control de células no tratadas.

3.3.2 Ensayo MTT Aptámero AptHer2

Los resultados del tratamiento por 24 h con el aptámero AptHer2 se resumen en la Figura 17. Se destaca la disminución estadísticamente significativa del 10% de viabilidad en la línea celular ZR-75-30 de sobreexpresión de HER2 a 200 nM, mientras que en el resto de las líneas se puede observar una tendencia a tener un efecto dependiente de la concentración.

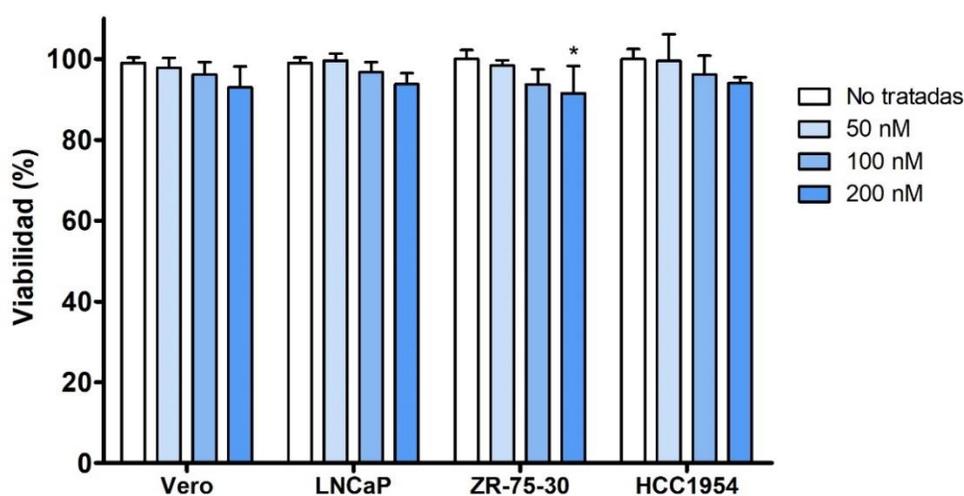


Figura 17. MTT 24 h aptámero AptHer2. n = 3, * p < 0.05 contra el control de células no tratadas.

3.3.3 Ensayo MTT Nanosistema AuNP-PEG-AptHer2

En la Figura 18 se muestran los resultados del tratamiento de las diferentes líneas celulares con el nanosistema. En la línea celular Vero CCL-81 no se observó un efecto significativo en la disminución de la viabilidad celular a las concentraciones evaluadas, mientras que en las líneas celulares de cáncer

LNCaP, ZR-75-30 y HCC1954 se observó un efecto estadísticamente significativo en la disminución de la viabilidad de hasta el 15-20%. Se resalta el efecto del nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 en la línea de sobreexpresión de HER2 HCC1954 resistente a trastuzumab, donde se observó una disminución de la viabilidad estadísticamente significativa a todas las concentraciones evaluadas de hasta el 20% a 0.5 µg/mL.

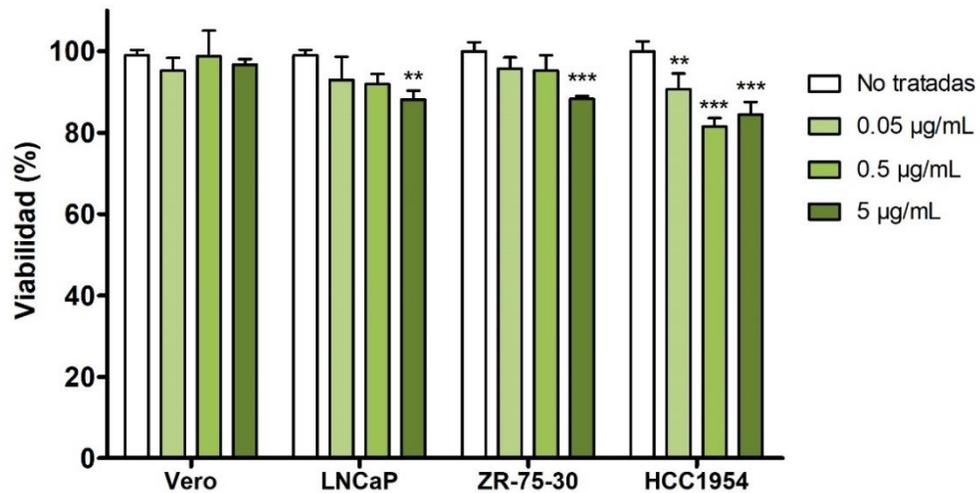


Figura 18. MTT 24 h Nanosistema AuNP-PEG-AptHer2. n = 3, ** p < 0.01, *** p < 0.001 contra el control de células no tratadas.

3.3.4 Ensayo MTT Anticuerpo Trastuzumab

Los resultados del tratamiento por 24 h con el anticuerpo trastuzumab se ilustran en la Figura 19, donde se observa que existió un efecto significativo en todas las líneas celulares dependiente de la concentración.

En la línea celular Vero utilizada como control no canceroso y con niveles bajos de expresión de HER2 demostró una reducción de la viabilidad no específica estadísticamente significativa del 25%. La línea celular LNCaP demostró disminución de la viabilidad estadísticamente significativa a todas las concentraciones evaluadas.

La línea ZR-75-30 de sobreexpresión de HER2 y sensible a trastuzumab mostró una disminución de la viabilidad dependiente de la concentración, donde a la mayor concentración se observó una disminución del 24%. En la línea HCC1954 de sobreexpresión de HER2 y resistente a trastuzumab existió una disminución de la viabilidad celular del 18% a la mayor concentración evaluada.

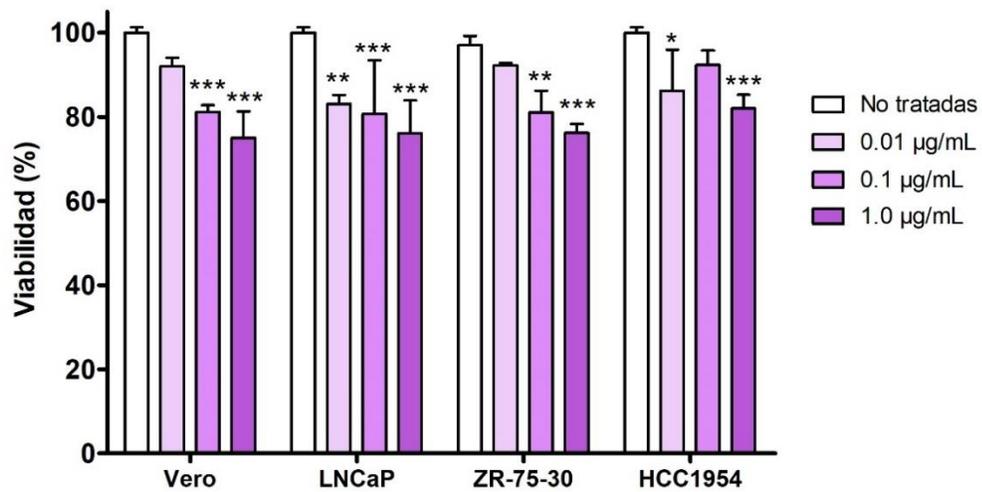


Figura 19. MTT 24 h trastuzumab. n = 3, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 contra el control de células no tratadas.

En la TABLA V se muestran los porcentajes de viabilidad celular obtenidos de cada grupo estudiado para una visión general del efecto que tuvo cada grupo de estudio en las diferentes líneas celulares.

3.4 Capacidad de Unión *in Vitro* en Suspensión

Para evaluar la capacidad de unión del nanosistema *in vitro* en líneas celulares con distintos niveles de expresión de HER2, se realizó un ensayo de detección por fluorescencia con células en suspensión. De acuerdo con los resultados obtenidos en el objetivo 2, se decidió continuar trabajando con las líneas celulares Vero como control no canceroso, así como las líneas ZR-75-30 y HCC1954 de cáncer de mama y sobreexpresión de HER2. Se realizó un ensayo de incubación directa con el nanosistema, y para confirmar la especificidad de unión al receptor HER2 se llevó a cabo un ensayo de bloqueo previo del receptor realizando una primera incubación con exceso del anticuerpo trastuzumab específico para HER2, y una segunda incubación con el nanosistema.

TABLA V

Viabilidad celular en las líneas celulares Vero, LNCaP, ZR-75-30 y HCC1954.

Se muestra el promedio (%) \pm SD.

	Concentración	Vero CCL-81	LNCaP	ZR-75-30	HCC1954
AuNP-PEG	Control	99.00 \pm 1.35	99.00 \pm 1.35	100.00 \pm 3.04	100.00 \pm 2.44
	0.05 μ g/mL	108.40 \pm 10.12	92.28 \pm 5.63	100.31 \pm 2.86	103.12 \pm 3.16
	0.5 μ g/mL	106.39 \pm 0.98	82.61 \pm 2.20	96.86 \pm 3.22	93.91 \pm 1.14
	5 μ g/mL	106.98 \pm 1.49	90.80 \pm 4.57	92.34 \pm 2.09	93.08 \pm 6.03
AptHer2	Control	99.00 \pm 1.35	97.85 \pm 2.43	100.00 \pm 2.25	100.00 \pm 2.44
	50 nM	97.85 \pm 2.43	99.63 \pm 1.74	98.39 \pm 1.34	99.56 \pm 6.56
	100 nM	96.15 \pm 3.14	96.76 \pm 2.49	93.71 \pm 3.73	96.25 \pm 4.60
	200 nM	89.46 \pm 5.17	93.78 \pm 2.73	91.52 \pm 6.74	94.00 \pm 1.47
AuNP-PEG-AptHer2	Control	99.00 \pm 1.35	99.00 \pm 1.35	100.00 \pm 2.25	100.00 \pm 2.44
	0.05 μ g/mL	103.32 \pm 3.15	92.98 \pm 5.67	95.77 \pm 2.73	90.64 \pm 3.88
	0.5 μ g/mL	98.81 \pm 6.27	91.91 \pm 2.51	95.28 \pm 3.77	81.47 \pm 2.11
	5 μ g/mL	96.68 \pm 1.43	88.11 \pm 2.23	88.28 \pm 0.74	84.45 \pm 3.12
Trastuzumab	Control	100.00 \pm 1.33	100.00 \pm 1.33	97.04 \pm 2.19	100.00 \pm 1.33
	0.01 μ g/mL	92.00 \pm 2.06	83.09 \pm 2.14	92.26 \pm 0.52	86.25 \pm 9.73
	0.1 μ g/mL	81.19 \pm 1.62	80.73 \pm 12.74	81.06 \pm 5.16	92.35 \pm 3.43
	1 μ g/mL	75.01 \pm 6.28	76.08 \pm 7.83	76.16 \pm 2.19	82.01 \pm 3.30

En la Figura 20 se muestran micrografías representativas obtenidas de la línea ZR-75-30 de sobreexpresión de HER2, donde se muestran en la primera fila el campo claro y en la segunda fila el campo de fluorescencia en el canal rojo correspondiente a la señal del fluoróforo presente en el nanosistema. En la primera columna se observa el grupo de células no tratadas en campo claro, mientras que en el canal de fluorescencia se observó 0% de señal. En la segunda columna se muestra el grupo del ensayo de incubación directa con el nanosistema, donde se observan las células en campo claro, mientras que en el canal de fluorescencia se obtuvo un 90% de señal correspondiente a la unión del nanosistema. En la tercera columna se muestran imágenes representativas del ensayo de bloqueo previo del receptor HER2 tanto en campo claro como en el canal de fluorescencia, donde se observa que el bloqueo previo con Trastuzumab ocasionó una disminución de la señal de fluorescencia del 85% respecto al ensayo de unión directa.

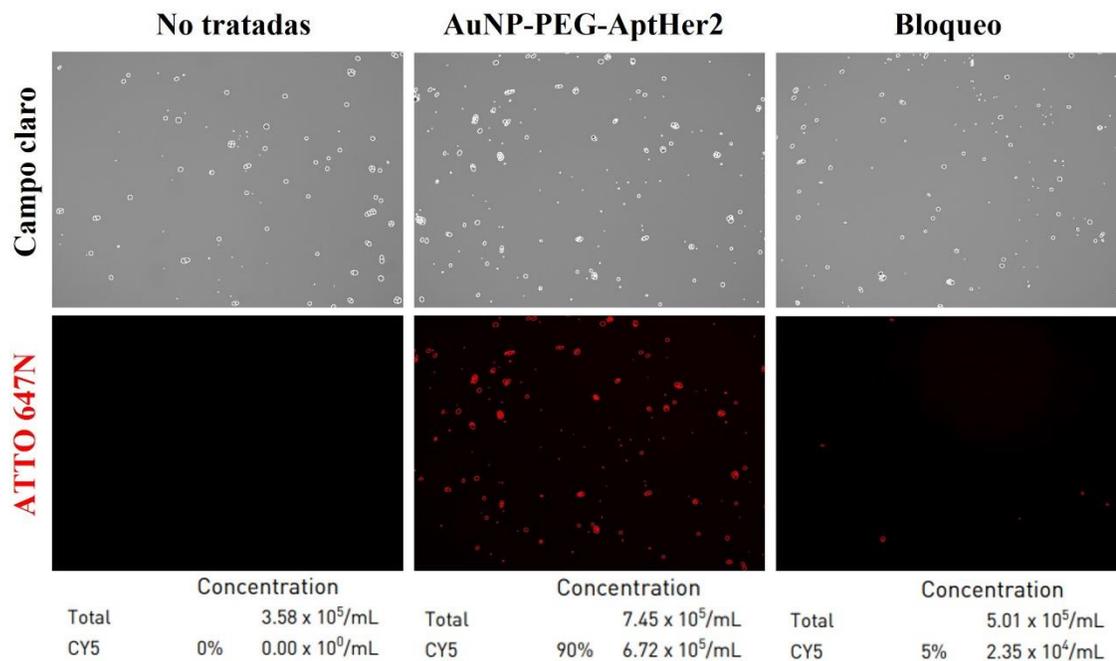


Figura 20. Micrográficas del ensayo de capacidad de unión *in vitro* por suspensión en línea celular ZR-75-30. Aumento 2.5X.

En el análisis estadístico de los resultados se graficaron las unidades de fluorescencia relativa (RFU) de la unión directa del nanosistema y el ensayo de bloqueo previo. En la Figura 21 se observa que existió una disminución estadísticamente significativa de la señal de fluorescencia del nanosistema al realizar el bloqueo previo del receptor con el anticuerpo trastuzumab, representando una disminución en la capacidad de unión del nanosistema al receptor HER2.

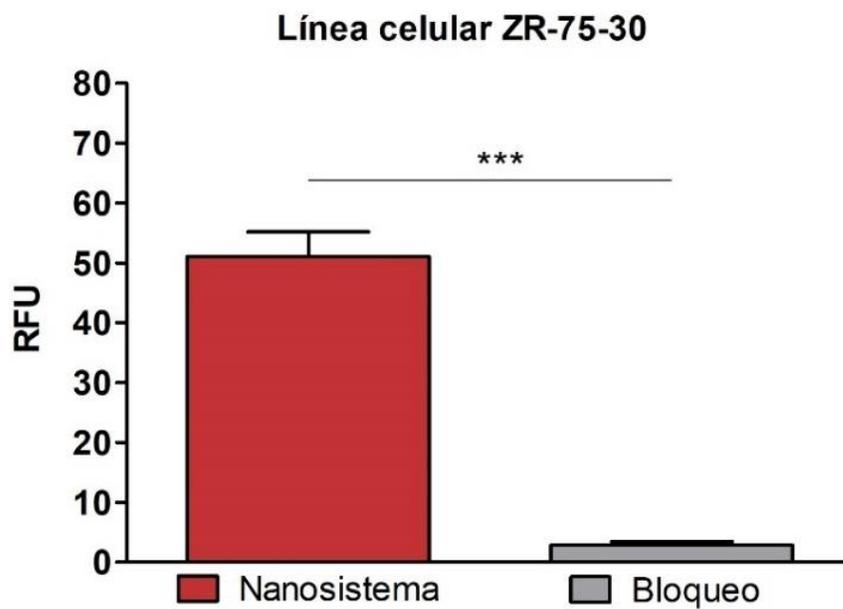


Figura 21. Unidades de fluorescencia relativas (RFU) del ensayo de capacidad de unión *in vitro* en suspensión en línea celular ZR-75-30. n = 3, *** p < 0.001.

Las imágenes representativas obtenidas de la línea HCC1954 de sobreexpresión de HER se muestran en la Figura 22. Las células no tratadas se pueden observar en campo claro, así como en el canal de fluorescencia donde no se presentó señal. En la segunda columna se observan las células incubadas con el nanosistema en campo claro y en campo de fluorescencia presentando una señal del 80%. La tercera columna corresponde a las células incubadas con exceso de anticuerpo trastuzumab, donde se demostró una disminución de la señal de fluorescencia de 76% respecto al ensayo de unión directa.

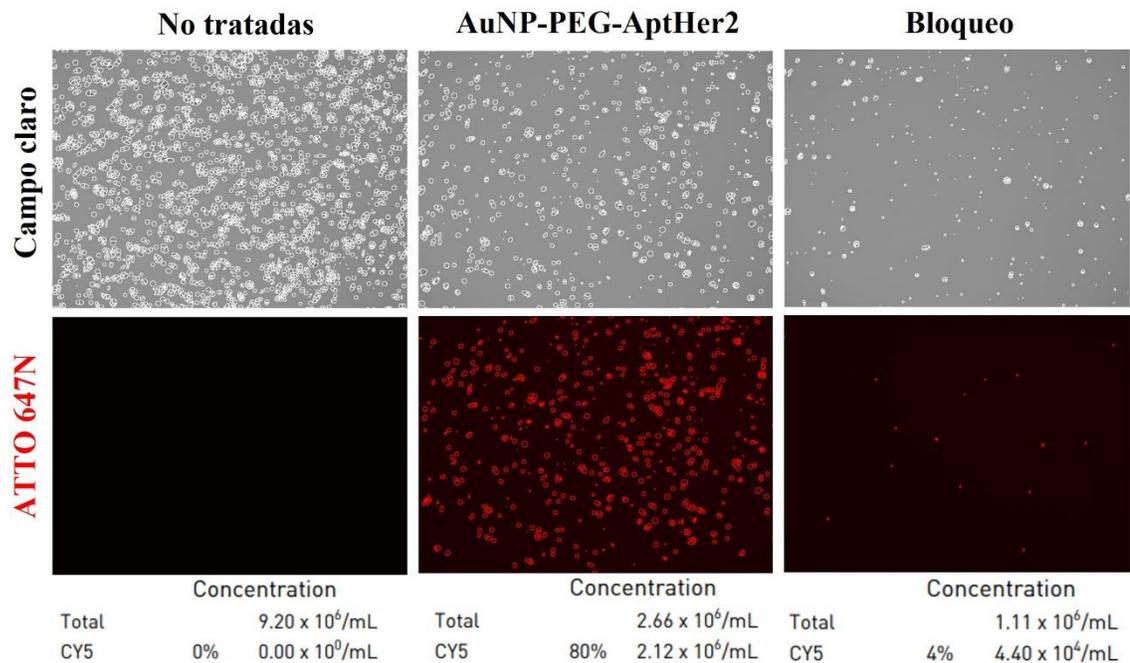


Figura 22. Micrografías del ensayo de capacidad de unión *in vitro* por suspensión en línea celular HCC1954. Aumento 2.5X.

En el análisis estadístico de los resultados se graficaron las unidades de fluorescencia relativa (RFU) de la unión del nanosistema y el bloqueo previo del receptor HER2. En la Figura 23 se muestran los resultados correspondientes a la línea HCC1954, donde existió una alta señal de fluorescencia en el ensayo de unión directa con el nanosistema, mientras que al realizar el bloqueo previo del receptor HER2 con el anticuerpo trastuzumab existió una disminución estadísticamente significativa de la señal de fluorescencia obtenida.

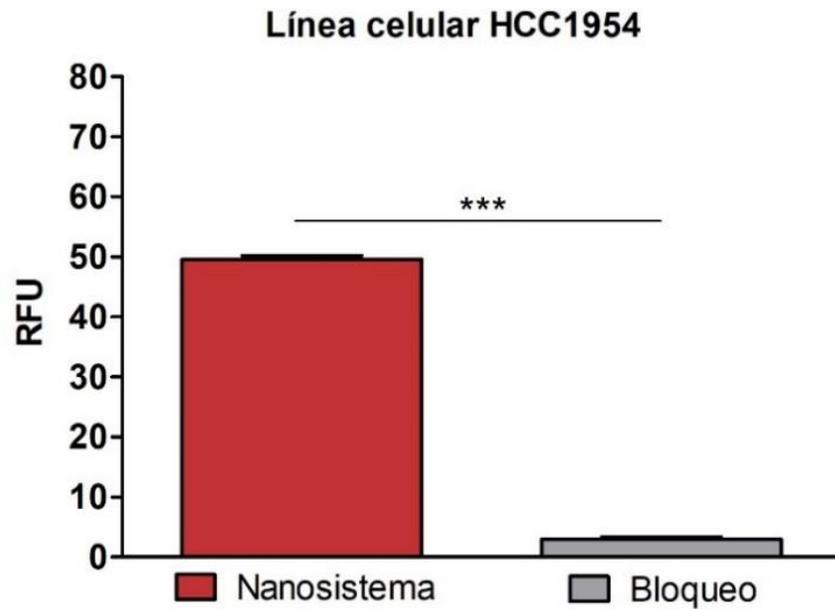


Figura 23. Unidades de fluorescencia relativas (RFU) del ensayo de capacidad de unión *in vitro* en suspensión en línea celular HCC1954. n = 3, *** p < 0.001.

Las fotografías representativas obtenidas de la línea Vero CCL-81 se resumen en la Figura 24. En las células no tratadas no se obtuvo señal de fluorescencia, al realizar la incubación con el nanosistema se obtuvo un 5% de señal en el canal de fluorescencia, y al hacer el bloqueo previo del receptor se vio una disminución de la señal del 5% al 1%.

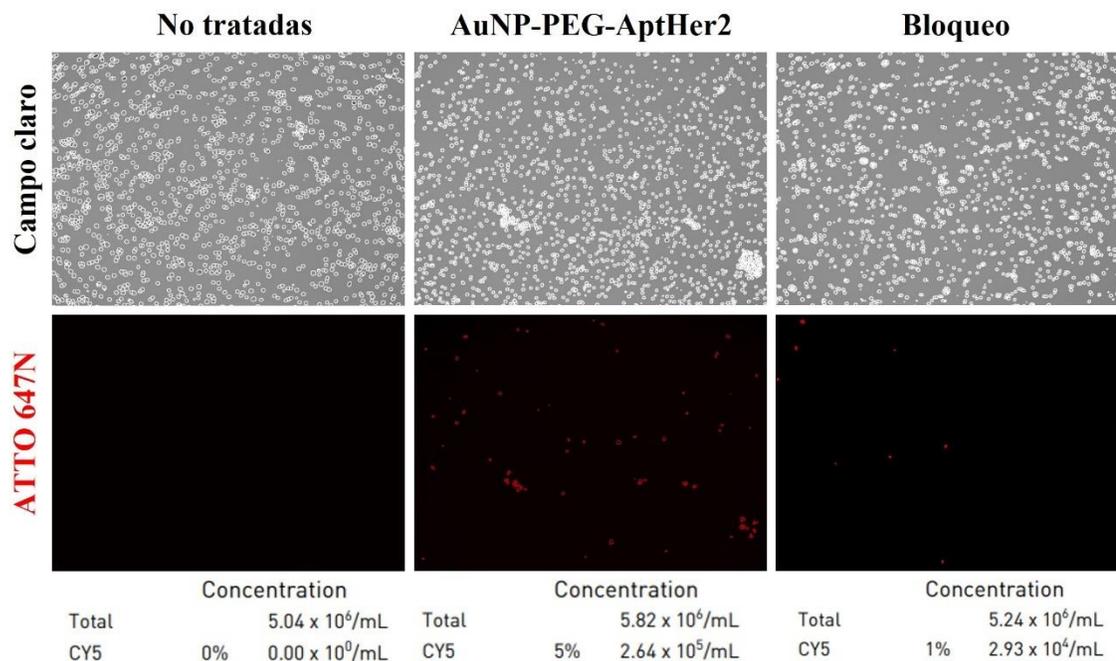


Figura 24. Micrografías del ensayo de capacidad de unión *in vitro* por suspensión en línea celular Vero CCL-81. Aumento 2.5X.

En la Figura 25 se muestra el análisis de las unidades de fluorescencia relativa (RFU) de la línea Vero CCL-81, donde se observó una disminución estadísticamente significativa de la señal de fluorescencia correspondiente a la unión del nanosistema al realizar el bloqueo previo del receptor HER2.

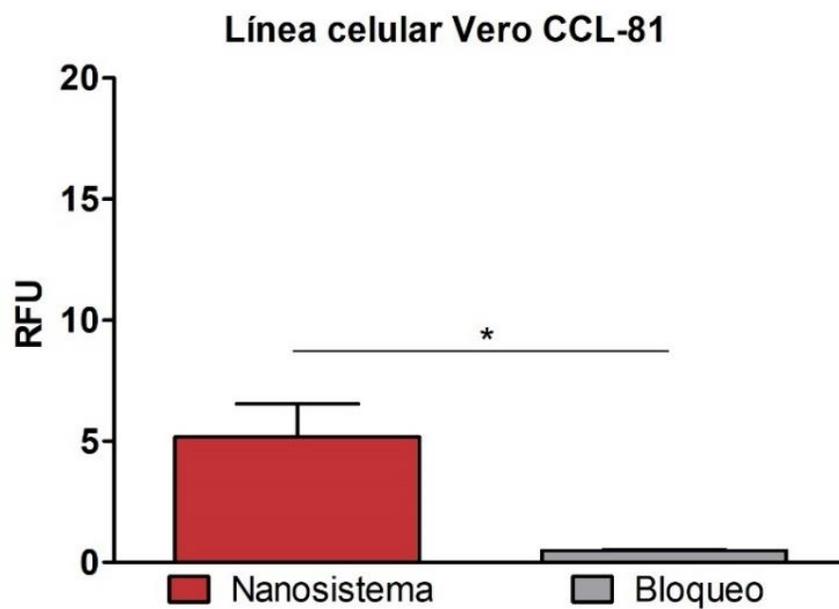


Figura 25. Unidades de fluorescencia relativas (RFU) del ensayo de capacidad de unión *in vitro* en suspensión en línea celular Vero CCL-81. n = 3, * p < 0.05.

En la comparación directa de las unidades de fluorescencia relativa obtenidas en las distintas líneas celulares (Figura 26), se observó incremento estadísticamente significativo de la señal de fluorescencia correspondiente al ensayo de incubación directa con el nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 en las líneas de cáncer de mama ZR-75-30 y HCC1954 de sobreexpresión de HER2 al compararlas con la señal obtenida de la línea Vero CCL-81 de expresión basal del receptor.

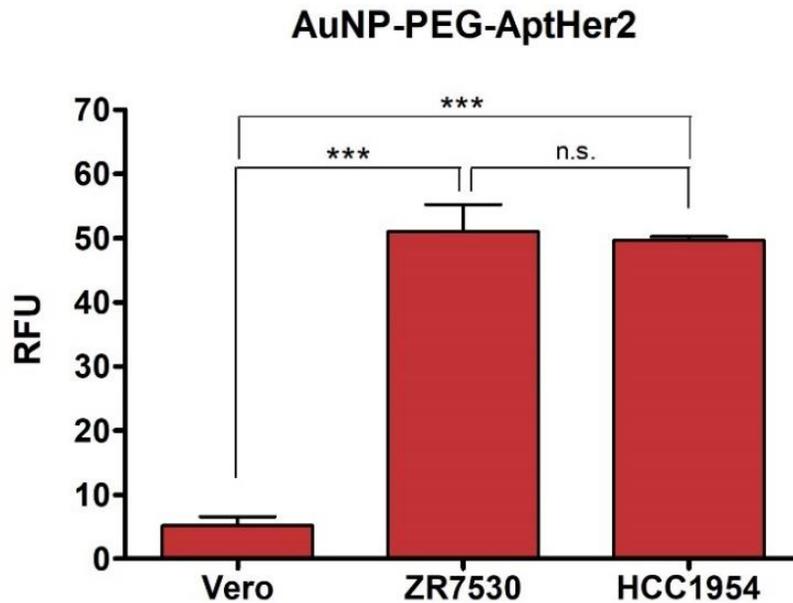


Figura 26. Unidades de fluorescencia relativas (RFU) del ensayo de capacidad de unión *in vitro* en suspensión en líneas celulares Vero CCL-81, ZR-75-30 y HCC1954. n = 3, *** p < 0.001, n.s. no significativo.

3.5 Capacidad de Unión *in Vitro* por Microscopía de Fluorescencia

Para corroborar los resultados obtenidos del ensayo de unión *in vitro* en suspensión se llevó a cabo microscopía de fluorescencia en la línea Vero CCL-81 como control no canceroso de expresión basal de HER2 y la línea HCC1954 de sobreexpresión de HER2 incubando con el nanosistema AuNP-PEG-AptHer2.

En la Figura 27 se muestran micrografías representativas obtenidas de la línea Vero CCL-81. En la primera fila se muestra el control negativo tratado con PBS 1X y montado con DAPI, mientras que la segunda fila corresponde a la incubación con el nanosistema. Se observa que el control negativo solo presentó

señal de fluorescencia en el canal azul correspondiente a la señal de DAPI de los núcleos de las células. En la incubación con el nanosistema se observa la señal de los núcleos en color azul, mientras que en el canal rojo correspondiente a la señal del fluoróforo ATTO 647N en el nanosistema se observó una baja señal presente en las células.

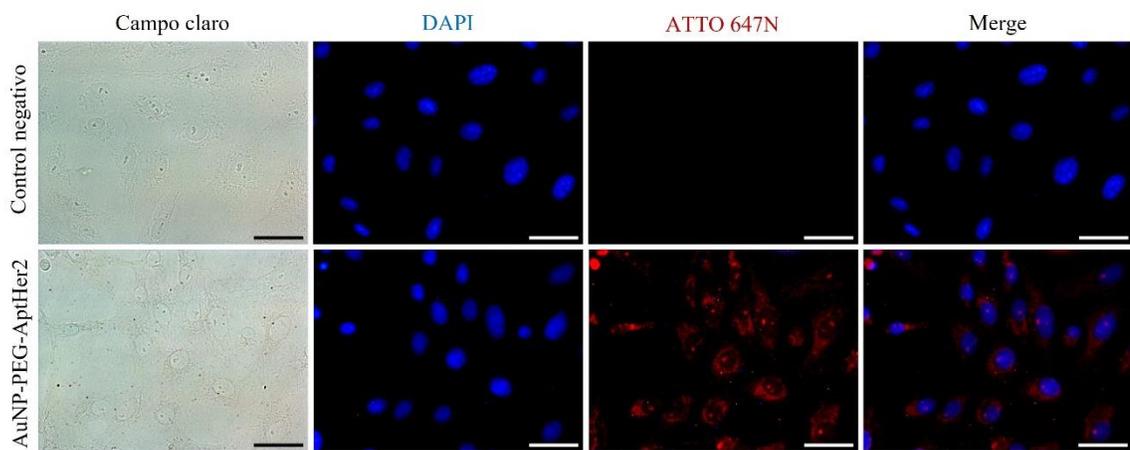


Figura 27. Microscopía de fluorescencia línea celular Vero CCL-81. Aumento 40X. La barra de escala corresponde a 10 µm.

En la Figura 28 se muestran micrografías representativas obtenidas de la línea celular HCC1954. En el control negativo solo se obtuvo señal de fluorescencia en el canal azul correspondiente a la señal de DAPI de los núcleos. En la segunda fila correspondiente a la incubación con el nanosistema, en el canal azul se observa la presencia de señal correspondiente a los núcleos,

mientras que en el canal rojo se detectó una fuerte señal de fluorescencia en las células correspondiente a la unión del nanosistema.

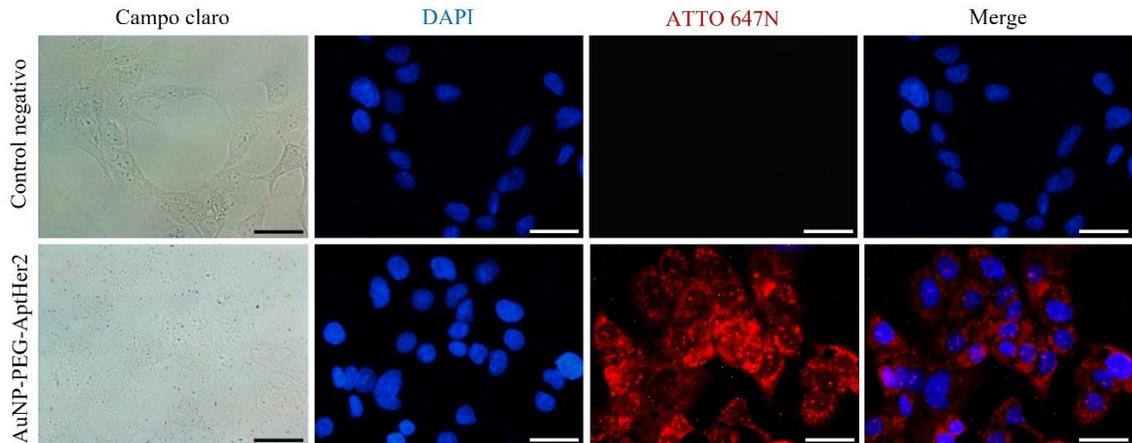


Figura 28. Microscopía de fluorescencia línea celular HCC1954. Aumento 40X.

La barra de escala corresponde a 10 μm .

A partir de las micrografías obtenidas en el canal de fluorescencia rojo en ambas líneas celulares se realizaron mediciones de la intensidad de fluorescencia celular corregidas con el ruido de fondo, y los resultados se muestran en la Figura 29.

La incubación de la línea celular HCC1954 de sobreexpresión de HER2 demostró un incremento estadísticamente significativo en la intensidad de fluorescencia media correspondiente a la unión del nanosistema en comparación

con la línea celular Vero CCL-81 de expresión basal, donde se presentó una baja señal de fluorescencia.

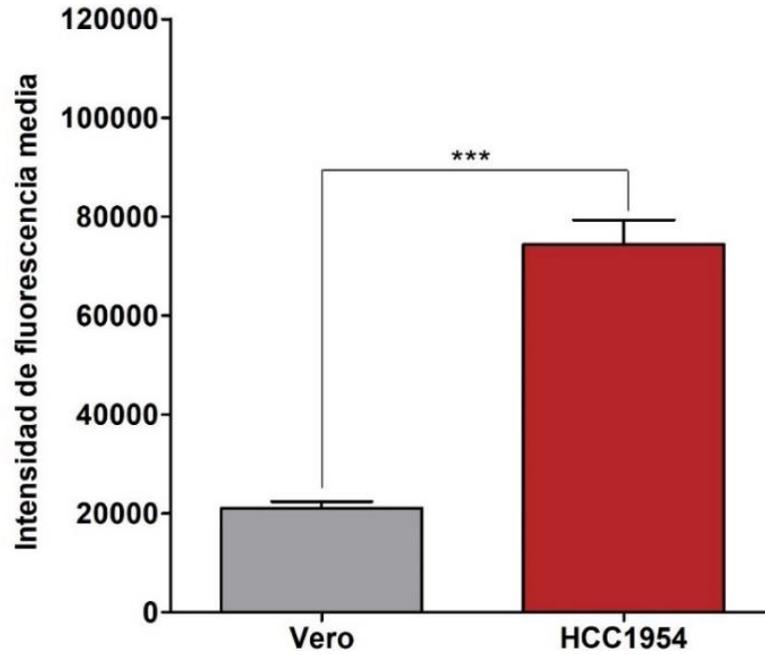


Figura 29. Intensidad de fluorescencia media en líneas celulares Vero CCL-81 y HCC1954. n=50, *** p< 0.001.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

La caracterización de nanomateriales mediante espectroscopía UV-Vis permite la identificación de sus componentes individuales, así como del espectro característico de cada uno. En los espectros UV-Vis obtenidos de las AuNPs comerciales recubiertas con PEG de 5 kDa se observó un espectro de absorción un pico de máxima absorción a 520 nm. Esta banda de absorción corresponde a la resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR), y esta dependerá principalmente del diámetro y forma de las NPs, oscilando los 520 nm para las AuNPs esféricas de 20 nm de diámetro ⁷⁴.

El espectro de absorción obtenido del aptámero AptHer2 demostró dos señales principales de máxima absorción; la señal a 260 nm corresponde a la absorción de los ácidos nucleicos, como ha sido reportado previamente por Shen, C. (2019) ⁷⁵. Adicionalmente se observó la presencia del fluoróforo ATTO 647N con la señal de máxima absorción a 646 nm.

En el espectro de absorción correspondiente al nanosistema se observó una integración de las señales principales observadas anteriormente en los componentes individuales; la señal de los ácidos nucleicos, del LSPR de las AuNPs y la señal del fluoróforo. Esta integración de señales observadas mediante UV-Vis se ha reportado como indicio de una conjugación exitosa ⁷⁶.

El desplazamiento observado en la longitud de onda de máxima absorción correspondiente a la banda de resonancia de plasmón de 520 nm para las AuNP-PEG a 523 nm para el nanosistema es un fenómeno denominado desplazamiento batocrómico, esto debido a un cambio en el índice de refracción de la superficie de la partícula al estar conjugada. En la literatura han sido reportados desplazamientos batocrómicos de entre 2 y 4 nm al conjugar AuNPs con aptámeros o anticuerpos ^{77 78}.

La determinación del diámetro hidrodinámico mediante DLS en las AuNP-PEG demostró un diámetro promedio de 53.03 ± 2.69 nm y un PDI de 0.318 ± 0.013 . Este aumento en el diámetro core de 20 nm de la AuNP comerciales puede ser explicado por el recubrimiento de la superficie con el polímero PEG de 5 kDa; previamente ha sido reportado que la estabilización de nanopartículas de oro con PEG representa un aumento en el diámetro hidrodinámico de entre 20-30 nm, dependiendo de la longitud de las cadenas del polímero ⁷⁹.

En el caso del nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 se presentó un aumento en el diámetro hidrodinámico promedio a 65.30 ± 1.12 nm y PDI de 0.237 ± 0.039 . La conjugación de aptámeros en la superficie de AuNPs ha demostrado aumentos en el diámetro mediante DLS de 10-20 nm ⁸⁰, lo cual concuerda con lo observado en este trabajo y sugiere la correcta conjugación del nanosistema.

En cuanto al PDI, esta es una medida de la uniformidad de distribución de tamaños en una población de partículas, donde valores menores a 0.3 son considerados poblaciones homogéneas ⁸¹. Tanto para las AuNP-PEG como el

nanosistema se obtuvieron PDI aceptables, destacando la disminución de este al realizar la conjugación con el aptámero. Esto indica una mejora en la homogeneidad y distribución de la muestra.

Mediante potencial Zeta se obtuvo la carga eléctrica superficial promedio de las AuNP-PEG de -3.62 ± 0.27 mV, mientras que para el nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 se obtuvo una carga superficial promedio de -17.4 ± 0.68 mV. Se puede destacar el aumento en la carga negativa en el nanosistema que presenta el aptámero en su superficie; este fenómeno ha sido reportado previamente por Wu, Y. *et al.* (2022) al conjugar nanopartículas de oro con aptámeros, demostrando cambios en el potencial Z de -2 mV a -18 mV ⁶⁹. Este aumento de la carga negativa puede ser explicado por la naturaleza de la estructura de los ácidos nucleicos, ya que estos contienen grupos fosfato en su esqueleto que bajo condiciones fisiológicas les confieren una carga neta negativa ⁸².

Asimismo, mediante potencial Z se puede realizar una estimación de la estabilidad de los nanomateriales, ya que valores cercanos al 0 hablan de poblaciones que tienden a la aglomeración, mientras que valores alejados del 0 presentan buena estabilidad ⁸³. En cuanto a los resultados obtenidos, se observó que las AuNP-PEG con un valor de carga cercano al 0 pueden tener tendencia a la aglomeración, mientras que al realizar la conjugación con el aptámero AptHer2 aumenta la carga negativa y mejora la estabilidad del nanosistema.

El análisis del diámetro de partícula por TEM demostró que las AuNP-PEG poseen un diámetro promedio de 19.29 ± 1.83 nm y morfologías principalmente

esféricas, mientras que para el nanosistema se obtuvo un diámetro promedio de 19.21 ± 1.86 nm y morfologías esféricas, concordando con lo reportado por el fabricante de las nanopartículas de oro comerciales ⁸⁴. Se debe tomar en cuenta que, debido a la naturaleza del análisis, el voltaje de aceleración utilizado para la captura de las imágenes y el estado deshidratado de la muestra no es posible observar a simple vista el recubrimiento de PEG o el aptámero, sino que solamente se observa la partícula metálica. En el caso del nanosistema se logró observar un halo alrededor de una partícula, lo cual podría ser indicio de ese recubrimiento.

Para mejorar la visualización y resolución de los componentes de los nanosistemas se utilizan técnicas como la tinción negativa con tungstato o acetato de uranilo ⁸⁵. Otra alternativa para la visualización de los componentes biológicos del sistema como el polímero es la microscopía electrónica de barrido (SEM), a partir de la cual se obtiene cierta cantidad de información tridimensional que se puede utilizar para reconstruir la forma de una estructura simple ⁸⁶.

Al comparar las micrografías obtenidas de las AuNP-PEG y nanosistema mediante TEM, se observó que las partículas al estar conjugadas con el aptámero AptHer2 se encontraban más separadas unas de las otras. Al correlacionar con los resultados obtenidos por potencial Z, el nanosistema presentó una mayor carga eléctrica negativa. Este efecto ha sido reportado previamente por Stiufiuc, R. *et al.* (2013), donde a mayor carga negativa existe mayor repulsión electrostática entre las partículas y mediante TEM se pueden observar más separadas unas de otras al estar conjugadas con el aptámero ⁸⁷.

El estado de agregación o dispersión puede ser estimado por medio de TEM, de tal manera que nanopartículas agregadas se observarían una sobre otra formando cúmulos, mientras que en estado de dispersión se logran observar separadas y de manera individual. A su vez las micrografías obtenidas pueden correlacionarse con los espectros UV-Vis, ya que las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro cambian cuando se agregan y la resonancia del plasmón superficial cambia a energías más bajas, provocando que los picos de absorción se ensanchen y se desplacen hacia longitudes de onda mayores ⁸⁸. Al observar los espectros UV-Vis obtenidos y las micrografías por TEM tanto para las AuNP-PEG como para el nanosistema se logró determinar que ambas poblaciones se encuentran en estados de dispersión.

En la evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, la incubación con las AuNP-PEG no demostró un efecto significativo en la reducción de la viabilidad de la línea control Vero y las líneas de cáncer de mama ZR-75-30 y HCC1954. Sin embargo, se observó una reducción significativa en la línea LNCaP del 16.3% respecto al control no tratado. La sensibilidad de esta línea celular de cáncer de próstata a las AuNPs recubiertas con polímeros como el quitosano fue caracterizada por Tangthong, T. *et al.* (2021), donde se demostró una reducción cerca del 30% de viabilidad a 6.25 µg/mL ⁸⁹.

El tratamiento con el aptámero AptHer2 no mostró un efecto significativo en la línea control Vero y las líneas de cáncer LNCaP y HCC1954. Sin embargo, se observó una reducción significativa en la línea ZR-75-30 del 10% a la mayor concentración probada respecto al control no tratado. Esta línea celular de cáncer

de mama sobreexpresa HER2, y debido a que el aptámero es dirigido a este receptor, podría representar un efecto selectivo, cómo fue reportado por Gijs y colaboradores (2016) ⁵⁶.

La incubación con el nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 no provocó una disminución significativa de la viabilidad en la línea Vero control, sugiriendo su biocompatibilidad, mientras que en las líneas de cáncer LNCaP, ZR-75-30 y HCC1954 presentó un efecto significativo en la disminución de la viabilidad entre el 15 y 20% respecto al control no tratado. Se destaca el efecto observado a todas las concentraciones probadas en la línea de cáncer de mama HCC1954 con sobreexpresión de HER2 ya que es una línea resistente al tratamiento convencional trastuzumab, observándose el mayor efecto con hasta 20% de reducción de la viabilidad celular.

Por un lado, el efecto citotóxico de las AuNPs con carga negativa ha sido caracterizado previamente en líneas celulares de cáncer, debido principalmente a la generación de ROS, estrés oxidativo y modificaciones epigenéticas; sin embargo, estos efectos se presentaron a concentraciones muy altas de hasta 1000 µg/mL ⁹⁰. Por otra parte, Gijs, M. y colaboradores (2016) caracterizaron el efecto específico del aptámero HeA2_3 en líneas celulares con sobreexpresión de HER2, donde observaron reducciones de hasta el 20% a concentraciones altas de 0.1 µM y en tratamientos prolongados de 6 días ⁵⁶. Debido a la incorporación de ambos componentes en el nanosistema, se logró observar un efecto sinérgico en líneas de cáncer HER2+ que permitió utilizarlo a concentraciones bajas y cortos tiempos de incubación.

En el tratamiento con el anticuerpo trastuzumab se observó un efecto significativo en la reducción de la viabilidad en todas las líneas celulares evaluadas, destacando una disminución de la viabilidad no específica en la línea Vero control de hasta el 25% respecto al control no tratado. A la fecha no ha sido reportado el efecto del trastuzumab en líneas sanas como la Vero o en la línea de cáncer de próstata LNCaP, sin embargo, tanto en la línea ZR-75-30 como en la línea HCC1954 de sobreexpresión de HER2 ha reportado un efecto en la disminución del 15-20% de la viabilidad ^{91 92}, concordando con lo observado en este trabajo y en el rango de concentraciones evaluadas.

Existen distintos factores que influyen en las propiedades hemolíticas de los nanomateriales y que deben ser considerados al ser evaluados, tales como el tamaño, carga superficial de la partícula, el recubrimiento y la metodología utilizada. Respecto a los resultados obtenidos, no existió una diferencia estadísticamente significativa en el grado de hemólisis provocado entre los distintos grupos estudiados, los cuales fueron clasificados entre no hemolíticos y ligeramente hemolíticos, sin sobrepasar el 5% de hemólisis de acuerdo con la guía ASTM-F756-17.

En 2019 Verimli, N. y colaboradores determinaron la actividad hemolítica de AuNPs de 13 nm recubiertas con PEG, donde se presentaron hemólisis menores al 2% clasificándose como no hemolíticas ⁹³, correspondiendo con los resultados obtenidos. Por otra parte, se ha reportado la actividad hemolítica de aptámeros conjugados con nanomateriales como el óxido de nanografeno,

presentando hemólisis menores al 5% y clasificándose como ligeramente hemolíticos ⁹⁴.

En cuanto a la detección del nivel de expresión de HER2, el ensayo de unión en suspensión demostró un aumento significativo de la señal de fluorescencia en las líneas de cáncer de mama de sobreexpresión de HER2 en comparación con la línea celular Vero CCL-81 de expresión basal. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gijs, M. *et al.* (2016), donde demuestran que la intensidad de la señal de fluorescencia depende del nivel de expresión de HER2 en cada línea celular, tanto en el marcaje con anticuerpos como con aptámeros ⁵⁶.

Por microscopía de fluorescencia fue posible corroborar los resultados obtenidos mediante el ensayo en suspensión, donde de igual manera se observó intensidad de fluorescencia dependiente del nivel de expresión de HER2 y existió un incremento significativo en la línea celular HCC1954 que sobreexpresa el receptor respecto a la línea Vero. El patrón de tinción y ubicación de HER2 en la línea celular HCC1954 ha sido demostrado previamente ⁹⁵, concordando con lo observado en los resultados.

El ensayo de bloqueo previo del receptor permitió demostrar que existe una disminución significativa de la señal de fluorescencia al realizar una primera incubación con exceso del anticuerpo trastuzumab y la subsecuente incubación con el nanosistema. El análisis de la especificidad de unión y competencia del epítopo fue reportado utilizando un exceso de aptámero y la tinción con

anticuerpos, donde se observó disminución de la unión a las células ⁵⁶. Esto puede ser debido a distintas razones: la unión involucra el mismo epítipo, HER2 sufre un cambio alostérico cambiando el epítipo o HER2 no está disponible por internalización. Estos resultados sugieren que el nanosistema es capaz de unirse de manera específica al receptor HER2.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Los espectros UV-Vis permitieron identificar los componentes del nanosistema AuNP-PEG-AptHer2. Se obtuvo un nanosistema con diámetro hidrodinámico de 65.3 nm y carga superficial de -17.4 mV. Por TEM se confirmó el diámetro core de 19.2 nm, morfología esférica, distribución homogénea y un estado de dispersión.

Las AuNP-PEG a 0.5 µg/mL mostraron una disminución de la viabilidad en la línea LNCaP. El aptámero AptHer2 200 nM disminuyó la viabilidad de la línea de cáncer ZR-75-30. El nanosistema demostró disminución de viabilidad en las líneas de cáncer LNCaP, ZR-75-30 y HCC1954 entre 15 – 20%. El anticuerpo trastuzumab demostró una disminución del 25% de viabilidad en la línea no cancerosa Vero CCL-81.

De acuerdo con la guía ASTM-F756-17, las AuNP-PEG se consideran no hemolíticas a las concentraciones evaluadas. El aptámero y nanosistema se clasificaron como no hemolíticos a la concentración baja, y ligeramente hemolíticos a las concentraciones media y alta probadas. El anticuerpo trastuzumab presentó actividad ligeramente hemolítica a la mayor concentración.

La detección en suspensión con incubación directa del nanosistema permitió diferenciar la línea de baja expresión y las líneas de alta expresión de

HER2. La disminución de la señal de fluorescencia en el ensayo de bloqueo sugiere especificidad hacia el receptor. Por microscopía de fluorescencia se observó una unión dependiente del nivel de expresión de HER2.

Como conclusión global y respondiendo a la hipótesis del presente trabajo, se obtuvo un nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 de 65.3 nm de diámetro hidrodinámico y -17.4 mV de carga superficial, biocompatible en células sanas y con efecto en la reducción de la viabilidad en células de cáncer con sobreexpresión de HER2, ligeramente hemolítico, específico para HER2 y capaz de detectar líneas celulares en función de su nivel de expresión.

CAPÍTULO VI

PERSPECTIVAS

Como perspectivas se tiene utilizar una línea celular humana sana como control negativo, prolongar los tiempos de incubación del ensayo de MTT a 48 y 72 horas, realizar un grupo de tratamiento combinando el nanosistema desarrollado y el anticuerpo trastuzumab, llevar a cabo una curva de concentración tanto de nanosistema como de células para la detección por fluorescencia, agregar el grupo de bloqueo previo de receptor en la microscopía de fluorescencia y a largo plazo estudiar los cambios moleculares generados en el tratamiento con el nanosistema.

REFERENCIAS

1. National Cancer Institute. (2021) What Is Cancer? *What is cancer?* <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (2021).
2. Sung, H. *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249.
3. Afifi, N. & Barrero, C. A. (2023) Understanding Breast Cancer Aggressiveness and Its Implications in Diagnosis and Treatment. *J. Clin. Med.* **12**, 10–12.
4. Lv, Q. *et al.* (2016) Molecular mechanisms and translational therapies for human epidermal receptor 2 positive breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **17**,.
5. Hynes, N. E. (1996) ErbB2 activation and signal transduction in normal and malignant mammary cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **1**, 199–206.
6. Gassmann, M. *et al.* (1995) Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* **378**, 390–394.
7. Cho, H. S. *et al.* (2003) Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **421**, 756–760.
8. Moasser, M. M. (2007) The oncogene HER2: Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* **26**, 6469–6487.
9. Finigan, J. H., Downey, G. P. & Kern, J. A. (2012) Human epidermal growth factor receptor signaling in acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **47**, 395–404.
10. Prenzel, N., Fischer, O. M., Streit, S., Hart, S. & Ullrich, A. (2001) The

epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr. Relat. Cancer* **8**, 11–31.

11. Toss, A. & Cristofanilli, M. (2015) Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **17**, 1–11.
12. Porta, C., Paglino, C. & Mosca, A. (2014) Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front. Oncol.* **4 APR**, 64.
13. Sukawa, Y. *et al.* (2014) HER2 expression and PI3K-Akt pathway alterations in gastric cancer. *Digestion* **89**, 12–17.
14. De Luca, A., Maiello, M. R., D'Alessio, A., Pergameno, M. & Normanno, N. (2012) The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin. Ther. Targets* **16 Suppl 2**,.
15. Chang, F. *et al.* (2003) Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: Potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* **17**, 1263–1293.
16. Degirmenci, U., Wang, M. & Hu, J. (2020) Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells* **9**,.
17. Esteva, F. & Pusztai, L. (2005) Optimizing outcomes in HER2-positive breast cancer: the molecular rationale. *Oncol. (willist. Park)* **19**, 5–16.
18. Neve, R. M., Lane, H. A. & Hynes, N. E. (2001) The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **12 Suppl 1**,.
19. Woods Ignatoski, K. M. *et al.* (2000) ERBB-2 overexpression confers PI 3' kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br. J. Cancer* **82**, 666–674.

20. Timms, J. F., White, S. L., O'Hare, M. J. & Waterfield, M. D. (2002) Effects of ErbB-2 overexpression on mitogenic signalling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells. *Oncogene* **21**, 6573–6586.
21. Oh, D. Y. & Bang, Y. J. (2020) HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **17**, 33–48.
22. Bray, F. *et al.* (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424.
23. Day, K. C. *et al.* (2017) HER2 and EGFR overexpression support metastatic progression of prostate cancer to bone. *Cancer Res.* **77**, 74.
24. Lucas, F. A. M. & Cristovam, S. N. (2016) HER2 testing in gastric cancer: An update. *World J. Gastroenterol.* **22**, 4619–4625.
25. Pils, D. *et al.* (2007) In ovarian cancer the prognostic influence of HER2/neu is not dependent on the CXCR4/SDF-1 signalling pathway. *Br. J. Cancer* **96**, 485–491.
26. Wang, W., Gao, Y., Hai, J., Yang, J. & Duan, S. (2019) HER2 decreases drug sensitivity of ovarian cancer cells via inducing stem cell-like property in an NFκB-dependent way. *Biosci. Rep.* **39**,.
27. Slamon, D. J. *et al.* (1987) Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene. *Science* (80-). **235**, 182–191.
28. Russo, J. (2021) Molecular classification of breast cancer. *Breast Cancer Essentials Perspect. Surg.* **27**, 33–38.
29. Venter, D. J., Kumar, S., Tuzi, N. L. & Gullick, W. J. (1987) Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet*

(London, England) **2**, 69–72.

30. Tai, W., Mahato, R. & Cheng, K. (2010) The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J. Control. Release* **146**, 264–275.
31. Wesola, M. & Jeleń, M. (2015) A Comparison of IHC and FISH Cytogenetic Methods in the Evaluation of HER2 Status in Breast Cancer. *Adv. Clin. Exp. Med.* **24**, 899–904.
32. Dowsett, M. *et al.* (2000) Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? *Eur. J. Cancer* **36**, 170–176.
33. Kamangar, E. & Bishop, J. (2019) Current Challenges for HER2 Immunohistochemistry Testing in Diagnostic Pathology. *Cancer Care* <https://health.ucdavis.edu/blog/lab-best-practice/current-challenges-for-her2-immunohistochemistry-testing-in-diagnostic-pathology/2019/05> (2019).
34. Bilous, M. *et al.* (2003) Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod. Pathol.* **16**, 173–182.
35. Moelans, C. B., de Weger, R. A., van der Wall, E. & van Diest, P. J. (2011) Current technologies for HER2 testing in breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **80**, 380–392.
36. Ji, H., Xuan, Q., Nanding, A., Zhang, H. & Zhang, Q. (2015) The Clinicopathologic and Prognostic Value of Altered Chromosome 17 Centromere Copy Number in HER2 Fish Equivocal Breast Carcinomas. *PLoS One* **10**, e0132824.
37. Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. (2017) Día Mundial de la Lucha contra el Cáncer de Mama. *Gobierno de México* <https://www.gob.mx/issste/articulos/dia-mundial-de-la-lucha-contra-el-cancer-de-mama-131191?idiom=es> (2017).

38. Lin, L., Sirohi, D., Coleman, J. F. & Gulbahce, H. E. (2019) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists 2018 Focused Update of Breast Cancer HER2 FISH Testing Guidelines Results From a National Reference Laboratory. *Am. J. Clin. Pathol.* **152**, 479–485.
39. Waks, A. G. & Winer, E. P. (2019) Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA* **321**, 288–300.
40. Vivekanandhan, S. & Knutson, K. L. (2022) Resistance to Trastuzumab. *Cancers (Basel)*. **14**,.
41. Barish, R., Gates, E. & Barac, A. (2019) Trastuzumab-Induced Cardiomyopathy. *Cardiol. Clin.* **37**, 407–418.
42. Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. & Rizzolio, F. (2019) The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* **25**,.
43. What Is So Special about “Nano”? | National Nanotechnology Initiative. <https://www.nano.gov/about-nanotechnology/what-is-so-special-about-nano>.
44. Vago, R., Collico, V., Zuppone, S., Prosperi, D. & Colombo, M. (2016) Nanoparticle-mediated delivery of suicide genes in cancer therapy. *Pharmacol. Res.* **111**, 619–641.
45. INCyTU. (2019) Nanomedicina. *Oficina de Información Científica y Tecnológica para el Congreso de la Unión* 1–6 <https://www.foroconsultivo.org.mx/INCyTU/index.php/notas/ciencia-y-tecnologia/138-32-nanomedicina-3> (2019).
46. Singh, P. *et al.* (2018) Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**,.
47. Bai, X. *et al.* (2020) The Basic Properties of Gold Nanoparticles and their

Applications in Tumor Diagnosis and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **21**,.

48. Schuller, J. A. *et al.* (2010) Plasmonics for extreme light concentration and manipulation. *Nat. Mater.* **9**, 193–204.
49. Yun, C. S. *et al.* (2005) Nanometal surface energy transfer in optical rulers, breaking the FRET barrier. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 3115–3119.
50. Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W. & El-Sayed, M. A. (2006) Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2115–2120.
51. Perrault, S. D., Walkey, C., Jennings, T., Fischer, H. C. & Chan, W. C. W. (2009) Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. *Nano Lett.* **9**, 1909–1915.
52. Chushak, Y. G., Martin, J. A., Chávez, J. L., Kelley-Loughnane, N. & Stone, M. O. (2014) Computational design of RNA libraries for in vitro selection of aptamers. *Methods Mol. Biol.* **1111**, 1–15.
53. Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H. & Ruml, T. (2015) Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1141–1161.
54. Fu, Z. & Xiang, J. (2020) Aptamers, the nucleic acid antibodies, in cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **21**,.
55. Röthlisberger, P. & Hollenstein, M. (2018) Aptamer chemistry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **134**, 3–21.
56. Gijs, M. *et al.* (2016) Improved aptamers for the diagnosis and potential treatment of HER2-positive cancer. *Pharmaceuticals* **9**, 15–19.
57. Campbell, J., Burkitt, S., Dong, N. & Zavaleta, C. (2020) Nanoparticle characterization techniques. *Nanoparticles Biomed. Appl. Fundam.*

Concepts, Biol. Interact. Clin. Appl. 129–144 doi:10.1016/B978-0-12-816662-8.00009-6.

58. Martínez, J. C., Chequer, N. A., González, J. L. & Cordova, T. (2012) Alternative Methodology for Gold Nanoparticles Diameter Characterization Using PCA Technique and UV-VIS Spectrophotometry. *Nanosci. Nanotechnol.* **2**, 184–189.
59. Khlebtsov, B. N. & Khlebtsov, N. G. (2011) On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. *Colloid J.* **73**, 118–127.
60. Clogston, J. D. & Patri, A. K. (2011) Zeta potential measurement. *Methods Mol. Biol.* **697**, 63–70.
61. Malatesta, M. (2021) Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 22.
62. Roacho-Pérez, J. A. *et al.* (2021) A full set of in vitro assays in chitosan/tween 80 microspheres loaded with magnetite nanoparticles. *Polymers (Basel)*. **13**, 1–15.
63. Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P. D. (2018) Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2018**, 469–471.
64. Dobrovolskaia, M. A. *et al.* (2008) Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano Lett.* **8**, 2180–2187.
65. Sunada, S., Haskins, J. S. & Kato, T. A. (2019) Sister chromatid exchange as a genotoxic stress marker. *Methods Mol. Biol.* **1984**, 61–68.
66. Poturnayová, A., Dzubinová, L., Buríková, M., Bízík, J. & Hianik, T. (2019) Detection of breast cancer cells using acoustics aptasensor specific to HER2 receptors. *Biosensors* **9**, 1–15.

67. Ranganathan, V., Srinivasan, S., Singh, A. & DeRosa, M. C. (2020) An aptamer-based colorimetric lateral flow assay for the detection of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). *Anal. Biochem.* **588**, 113471.
68. Choi, W. Il *et al.* (2015) Targeted antitumor efficacy and imaging via multifunctional nano-carrier conjugated with anti-HER2 trastuzumab. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **11**, 359–368.
69. Wu, Y., Feng, Y. & Li, X. (2022) Classification of breast cancer by a gold nanoparticle based multicolor fluorescent aptasensor. *J. Colloid Interface Sci.* **611**, 287–293.
70. ATCC. Vero CCL-81. <https://www.atcc.org/products/ccl-81>.
71. ATCC. LNCaP clone FGC. <https://www.atcc.org/products/crl-1740>.
72. ATCC. ZR-75-30. <https://www.atcc.org/products/crl-1504>.
73. ATCC. HCC1954. <https://www.atcc.org/products/crl-2338>.
74. Jeon, H. Bin, Tsalu, P. V. & Ha, J. W. (2019) Shape Effect on the Refractive Index Sensitivity at Localized Surface Plasmon Resonance Inflection Points of Single Gold Nanocubes with Vertices. *Sci. Rep.* **9**, 1–8.
75. Shen, C.-H. (2019) Detection and Analysis of Nucleic Acids. *Diagnostic Mol. Biol.* 167–185 doi:10.1016/B978-0-12-802823-0.00007-9.
76. Ramyah Aaryasomayajula, V. S. *et al.* (2014) Assembly of a Dual Aptamer Gold Nanoparticle Conjugate Ensemble in the Specific Detection of Thrombin when Coupled with Dynamic Light Scattering Spectroscopy. doi:10.4172/2157-7439.1000210.
77. Peng, L. *et al.* (2020) Aptamer-Conjugated Gold Nanoparticles Targeting Epidermal Growth Factor Receptor Variant III for the Treatment of Glioblastoma. *Int. J. Nanomedicine* **15**, 1363.

78. Bikkarolla, S. K. *et al.* (2020) A lateral flow immunoassay with self-sufficient microfluidic system for enhanced detection of thyroid-stimulating hormone. *AIP Adv.* **10**, 125316.
79. Wang, W., Kim, H. J., Bu, W., Mallapragada, S. & Vaknin, D. (2020) Unusual Effect of Iodine Ions on the Self-Assembly of Poly(ethylene glycol)-Capped Gold Nanoparticles. *Langmuir* **36**, 311–317.
80. Yang, X. *et al.* (2011) A one-step sensitive dynamic light scattering method for adenosine detection using split aptamer fragments. *Anal. Methods* **3**, 59–61.
81. Danaei, M. *et al.* (2018) Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **10**,.
82. Maffeo, C. *et al.* (2014) Close encounters with DNA. *J. Phys. Condens. Matter* **26**, 413101.
83. Ding, Z., Jiang, Y. & Liu, X. (2018) Nanoemulsions-Based Drug Delivery for Brain Tumors. *Nanotechnology-Based Target. Drug Deliv. Syst. Brain Tumors* 327–358 doi:10.1016/B978-0-12-812218-1.00012-9.
84. Cytodiagnosics Inc. 20nm Maleimide-Activated Gold Nanoparticle Conjugation Kit. <https://www.cytodiagnosics.com/collections/maleimide-activated-gold-nanoparticles/products/20nm-maleimide-activated-gold-nanoparticle-conjugation-kit-3-reactions>.
85. Hart, R. (2020) Improved Negative Stain Electron Microscopy Procedure for Detecting Surface Detail on High Density Lipoproteins. *Micros. Today* **28**, 54–58.
86. Vladár, A. E. & Hodoroaba, V. D. (2019) *Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy*. *Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/B978-0-12-814182-3.00002-X.

87. Stiuftuc, R. *et al.* (2013) One-step synthesis of PEGylated gold nanoparticles with tunable surface charge. *J. Nanomater.* **2013**,.
88. Chang, T. *et al.* (2016) Duplex Identification of *Staphylococcus aureus* by Aptamer and Gold Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **16**, 5513–5519.
89. Tangthong, T. *et al.* (2021) Water-Soluble Chitosan Conjugated DOTA-Bombesin Peptide Capped Gold Nanoparticles as a Targeted Therapeutic Agent for Prostate Cancer. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **14**, 69–89.
90. Surapaneni, S. K., Bashir, S. & Tikoo, K. (2018) Gold nanoparticles-induced cytotoxicity in triple negative breast cancer involves different epigenetic alterations depending upon the surface charge. *Sci. Reports 2018 8* **1**, 1–12.
91. Zhao, Y. *et al.* (2011) Overcoming Trastuzumab Resistance in Breast Cancer by Targeting Dysregulated Glucose Metabolism. *Cancer Res.* **71**, 4585.
92. Gu, S. *et al.* (2016) Therapeutic siRNA for drug-resistant HER2-positive breast cancer. *Oncotarget* **7**, 14727–14741.
93. Verimli, N., Demiral, A., Yılmaz, H., Çulha, M. & Erdem, S. S. (2019) Design of Dense Brush Conformation Bearing Gold Nanoparticles as Theranostic Agent for Cancer. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2019 1893** **189**, 709–728.
94. Pourhajbagher, M., Etemad-Moghadam, S., Alaeddini, M., Miri Mousavi, R. sadat & Bahador, A. (2022) DNA-aptamer-nanographene oxide as a targeted bio-theragnostic system in antimicrobial photodynamic therapy against *Porphyromonas gingivalis*. *Sci. Reports 2022 12* **12**, 1–18.
95. de Abreu Pereira, D. *et al.* (2022) Proteomic Analysis of HCC-1954 and MCF-7 Cell Lines Highlights Crosstalk between α v and β 1 Integrins, E-Cadherin and HER-2. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1–21.

