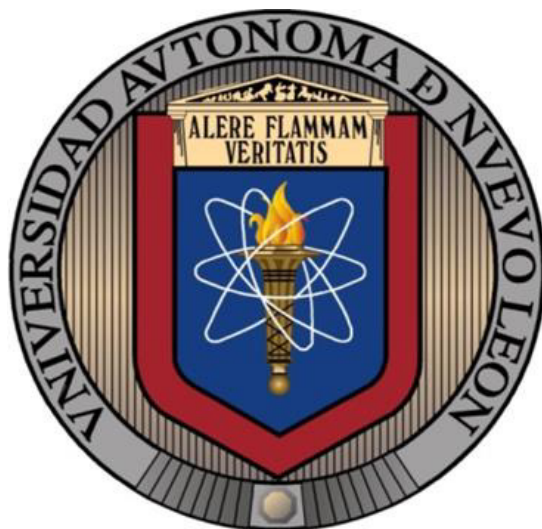


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**ANÁLISIS DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR
NANOPARTÍCULAS DE ORO RECUBIERTAS CON QUITOSANO EN
CÉLULAS LEUCÉMICAS K562 Y CEM: IMPLICACIÓN DE LAS
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

PRESENTA

HELEN YARIMET LORENZO ANOTA

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

Enero, 2018

Lugar de trabajo

El presente trabajo se realizó en la Unidad de muerte celular regulada en cáncer y sistema inmune, del Laboratorio de Inmunología y virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Autónoma de Nuevo León; bajo la dirección de la Dra. Ana Carolina Martínez Torres.

“La enfermedad es el lado nocturno de la vida, una ciudadanía más onerosa. Todos, al nacer, somos ciudadanos de dos reinos, el de los sanos y el de los enfermos. Y aunque todos preferimos usar solo el buen pasaporte, tarde o temprano cada uno de nosotros se ve obligado, al menos por un tiempo, a identificarse como ciudadano de aquel otro lugar”.

SUSAN SONTAG

DEDICATORIA

*Para Sergio, Faustina, Sergio G., Mauricio E., y Hania G.,
...y para todos los que han estado conmigo
los dos últimos años de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología.

Extiendo mi reconocimiento a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por permitirme pertenecer al Laboratorio de Inmunología y Virología; gracias por los recursos, consejos y comentarios a lo largo de este proyecto; y sobre todo por el inmenso apoyo durante la enfermedad de mi tío.

Reconozco mi admiración y confío mi más sincero agradecimiento a la Dra. Ana Carolina Martínez Torres, por ser la primera persona en confiar en mí, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de iniciar una carrera científica. Gracias por todo el tiempo me ha dedicado, por su sabiduría, inteligencia y ejemplo. Gracias por los buenos y malos ratos, por la paciencia, por los consejos, por inspirarme a ser mejor persona, por enseñarme a cuestionarme, por todos los conocimientos, especialmente gracias por la amistad.

Agradezco a todos mis asesores de tesis, al Dr. Moisés, Dra. Diana Zarate y Dra. Diana Caballero, gracias por sus interesantes clases, por la confianza y el ejemplo; sobre todo, por el incondicional apoyo brindado durante estos dos largos años de trabajo, agradezco que cada uno se tomó el tiempo para ir a verme y cuestionarme en mis presentaciones.

A la Dra. Erikita por tener toda la paciencia del mundo para enseñarme a usar el citómetro y analizar mis resultados, por confiarme el citómetro e ir a mis presentaciones. Gracias infinitas, sin tí este trabajo no se habría realizado.

Gracias a la mejor compañera de trabajo y amiga: Andrea. Agradezco todas y cada una de las experiencias que hemos compartido durante este proyecto, por no dejarme sola, por hacer más amena mi estancia en el laboratorio, por todo tu conocimiento, por ayudarme con mis análisis, por ser inspiración.

A Karlita, por ser una linda compañerita siempre, por enseñarme las técnicas de laboratorio, por quedarse conmigo en el laboratorio hasta muy tarde, por darme sus

horas en el citómetro, por darme la oportunidad de compartir mi primer congreso con poster, por llevarme a clases de folklor, por la hermosa amistad, gracias.

A Luis Gómez, por regalarme de sus células, por hacer de mi estancia en el lab muy divertida, por escuchar y corregir mis presentaciones mil veces en un día; a Alan por cuestionarme y hacerme pensar mucho; a Keny por las buenas prácticas de laboratorio; a Ashanty por enseñarme a manipular a los ratones y por todos tus consejos; a Abi por todas las células que me regaló y los buenos ratos en el lab; a María por ser la persona más divertida del laboratorio y por ser mi alumna aunque sea por una semana; a Adal por estar en el lab apoyando siempre; a Claudia por ayudarme incondicionalmente en mis experimentos. A los pioneros en este proyecto, Carito y Martín de quienes nunca me faltaron sus consejos. En general a todo el personal de LIV de quienes siempre recibí apoyo.

Agradezco a mis compañeras y amigas de la maestría Karlita, Alaley, Marcela por ser siempre un ejemplo y en especial Gloria por todos los fines de semana en el laboratorio, por todos los consejos y por todos los buenos momentos juntas, por la más sincera amistad, gracias.

A mi familia y comitiva Regia, tía Chayo por ser mi mami en Monterrey, a mi primito Octavio por quererme mucho, nunca dejarme sola y estar pendiente de mí siempre, a Oscar por sus buenos consejos y sus deliciosos cafés de verano y a Katy por sus lindas platicas y todo el apoyo en estos dos años.

Agradezco a mis padres Sergio y Faustina de quienes nunca he dejado recibir incondicional e infinito amor y apoyo, quienes nunca me han abandonado ni en los peores ni en los mejores momentos, porque sin ellos no valgo. Gracias por hacer de mí una mejor persona, los amo. Gracias a mi mayor ejemplo Sergio Guillermo, gracias por tus buenos consejos, te amo. A mi hermanita Hania el amor en la vida, gracias por siempre sacar mi mejor versión, te amo.

Finalmente, reconozco a mi incondicional MAURICIO porque sin ti no estaría aquí y nada de esto sería una realidad, gracias por cada consejo y regaño, gracias por ser mi compañero de vida, gracias por cariño y amor. Te amo hermano.

INDICE

I.	RESUMEN.....	14
II.	ABSTRACT.....	15
III.	INTRODUCCIÓN	16
IV.	ANTECEDENTES.....	18
4.1	Cáncer	18
4.1.1	Leucemias.....	18
4.2	Nanotecnología	24
4.2.1	Nanopartículas de oro.....	27
4.2.2	Quitosano.....	29
4.2.3	AuNPs recubiertas de quitosano.....	30
4.3	Muerte celular	33
4.3.1	Muerte celular accidental	34
4.3.2	Muerte celular regulada.....	34
4.3.3	Implicación de las especies reactivas de oxígeno en la muerte celular	43
4.3.4	Daño nuclear en la muerte celular regulada	46
V.	JUSTIFICACIÓN	49
VI.	HIPÓTESIS.....	50
VII.	OBJETIVO GENERAL	51
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
VIII.	METODOLOGÍA	52
8.1	Síntesis de nanopartículas de oro recubiertas con quitosano	52
8.2	Caracterización de las nanopartículas de oro recubiertas con quitosano	52
8.3	Cultivos celulares	53
8.4	Extracción de PBMC.....	53
8.5	Ensayos de citometría de flujo	54
8.6	Evaluación de características de la muerte celular: exposición de fosfatidilserina y permeabilidad de la membrana plasmática	54
8.7	Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante DCFDA	55

8.8 Evaluación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial mediante marcaje con TMRE	55
8.9 Evaluación del daño nuclear	56
-Análisis del ciclo celular	58
8.10 Determinación de la formación de autofagosomas	58
8.11 Análisis de la activación de la caspasa-3	59
8.12 Análisis de muerte celular por citometría de flujo utilizando distintos inhibidores de muerte: NAC, Spautina-1, Q-VD-OPH y Necrostatina-1	59
8.13 Análisis Estadístico	60
IX. RESULTADOS.....	61
9.1 Caracterización de nanopartículas de oro recubiertas con quitosano: plasmón de resonancia.....	61
9.2 Caracterización de nanopartículas de oro recubiertas con quitosano: tamaño	62
9.3 Análisis de la muerte celular regulada inducida por las AuNPs-Qts en células sanas no tumorales PBMC y en células leucémicas K562 y CEM.....	63
9.4 Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno inducido por las AuNPs-Qts en células leucémicas K562 y CEM	65
9.5 Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno inducido por las AuNPs-Qts en presencia del antioxidante NAC en células leucémicas.....	66
9.6 Análisis de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial inducido por las AuNPs-Qts en células leucémicas	67
9.7 Análisis del daño nuclear inducido por las AuNPs-Qts en células leucémicas: fosforilación de la histona H2AX, activación de p53 y ciclo celular.....	69
9.8 Análisis de la implicación de las ROS en la muerte celular inducida por las AuNPs-Qts en células leucémicas K562 y CEM	72
9.9 Análisis del rol de la autofagia en el mecanismo de muerte celular inducido por las AuNPs-Qts en células leucémicas K562 y CEM	73
9.10 Análisis del mecanismo de muerte celular inducido por las AuNPs-Qts en células leucémicas K562 y CEM: rol de la apoptosis	77
9.11 Análisis de la necroptosis en el mecanismo de muerte celular inducido por las AuNPs-Qts en células leucémicas K562 y CEM.....	81
X. DISCUSION	86
XI. CONCLUSIONES	103
XII. PERSPECTIVAS	104
XIII. BIBLIOGRAFIA	106

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales y clasificación de las leucemias.....	16
Tabla 2. Tipos de necrosis regulada emergentes.....	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas (HSC).....	13
Figura 2. Escala de tamaños de nano materiales y sistemas biológicos.....	18
Figura 3. Representación esquemática de una nanopartícula.....	19
Figura 4. Interacciones de la nanopartícula con la célula.....	20
Figura 5. Estructura química del quitosano.....	24
Imagen 6. Diagrama de las nanopartículas de oro cubiertas con quitosano.	26
Figura 7. Clasificación de la muerte celular.	27
Figura 8: Tipos de muerte celular regulada que pueden inducir distintas nanopartículas.....	29
Figura 9. Muerte celular regulada por vía de apoptosis mediada por nanomateriales.....	31
Figura 10: Muerte celular regulada por autofagia mediado por nanomateriales.....	33
Figura 11. Señalización de necroptosis inducida por nanomateriales.....	35
Figura 12. Procesos celulares en los que está involucrado el estrés oxidativo.....	39
Figura 13. Relación en las fases del ciclo celular y el histograma de ADN.....	42
Figura 14. Análisis del plasmón de resonancia de AuNPs-Qts.....	54
Figura 15. Análisis del tamaño de las AuNPs-Qts.....	55
Figura 16. Efecto de la citotoxicidad de las AuNPs-Qts en PBMC, K562 y CEM.....	57
Figura 17. Análisis de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células K562 y CEM.....	58
Figura 18. Análisis de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en presencia del antioxidante NAC en células K562 y CEM.....	59
Figura 19. Análisis de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial de células K562 y CEM.	60

Figura 20. Análisis del potencial de membrana mitocondrial en presencia de un antioxidante (NAC) en células K562 y CEM.	61
Figura 21. Análisis de la fosforilación de la histona H2AX, en su variante γ -H2AX.....	63
Figura 22. Análisis de la activación de p53.	64
Figura 23. Análisis del ciclo celular.	65
Figura 24. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de NAC.....	66
Figura 25. Análisis de la formación de autofagosomas inducido por las AuNPs-Qts.....	68
Figura 26. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de spautina-1.....	69
Figura 27. Las AuNPs-Qts causan la activación de la caspasa 3 efectora de la muerte celular por apoptosis.	71
Figura 28. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de Q-VD-OPH.....	72
Figura 29. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de Q-VD-OPH y spautina-1.	74
Figura 30. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de Nec1.....	76
Figura 31. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de Nec-1 y spautina-1.	77
Figura 32. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de Nec-1 y Q-VD-OPH.	78
Figura 33. Mecanismo propuesto de muerte celular inducido por AuNPs-Qts.....	98

ABREVIATURAS

Símbolo	Abreviaturas
ACS	American Cancer Society
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALL	Leucemia Linfoide Aguda
AnnV	Anexina V
AML	Leucemia Mieloide Aguda
AuNPs	Nanopartículas de Oro
AuNPs-Qts	Nanopartículas de Oro recubiertas con Quitosano
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50
CC ₁₀₀	Concentración citotóxica 100
CLL	Leucemia linfoide crónica
CLP	Progenitor Linfoide Común
CML	Leucemia Mieloide Crónica
CMP	Progenitor mieloide común
DCFDA	Diacetato de diclorofluoresceína
DLS	Difracción de Luz Dinámica
h	Horas
HSC	Célula Madre Hematopoyética
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LLA-T	Leucemia Linfoide Aguda de células T
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
MCA	Muerte Celular Accidental
MCP	Muerte Celular Programada
MCR	Muerte Celular Regulada
Min	Minutos
NIH	National Institutes of Health
NNI	National Nanotechnology Initiative
NAC	N-Acetil cisteína

NCCD	Comité Nacional de Muerte Celular
Necrostatina-1	5-(1H-Indol-3-ylmethyl)-3-methyl-2-thioxo-4- Imidazolidinone, 5-(Indol-3-ylmethyl)-3-methyl-2- thio-Hydantoin, MTH-DL-Tryptophan
Nm	Nanómetros
NPs	Nanopartículas
PBS	Buffer de Fosfato Salino
PI	Yoduro de propidio
Qts	Quitosano
Q-VD-OPH	(3S)-5-(2,6-Difluorophenoxy)-3-[[[(2S)-3-methyl-1- oxo-2-[(2-quinolinilcarbonil)amino]butil]amino]-4- oxo-hidrato de ácido pentatónico
OMS	Organización Mundial de la Salud
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium
SFB	Suero Fetal Bovino
Spautina-1	6-Fluoro-N-[(4-fluorophenyl)methyl]-4- quinazolinamine
PBMC	Células mononucleares de Sangre periférica
TMRE	Acetato de tetrametilrodamina

RESUMEN

La leucemia es un serio problema de salud a nivel mundial. Actualmente, las terapias convencionales afectan a células normales causando resistencia al tratamiento; por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas terapias que puedan ser específicas para las células cancerosas y evitar la resistencia a la muerte celular por la inducción simultánea de diversas vías de muerte. Estudios recientes demuestran que tanto las nanopartículas de oro (AuNPs) como el quitosano tienen actividades biológicas interesantes que incluyen posibles efectos antitumorales. En este estudio, se analizó el mecanismo de muerte celular regulada (MCR), que inducen las nanopartículas de oro recubiertas con quitosano (AuNPs-Qts) en células leucémicas (K562 y CEM). Para ello, se sintetizaron AuNPs-Qts por el método de Turkevich. La muerte celular se evaluó por citometría de flujo, midiendo la exposición de fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática en células leucémicas y células mononucleares de sangre periférica (PBMC), como control sano no tumoral. La generación de ROS se midió utilizando DCFDA y en presencia del antioxidante N-acetilcisteína (NAC) como un inhibidor de ROS. Para analizar el daño mitocondrial se midió la pérdida del potencial de membrana mitocondrial mediante TMRE y el daño nuclear mediante el estudio de γ -H2AX, p53 y el análisis del ciclo celular. Para evaluar el efecto de las ROS en diferentes mecanismos de MCR, primero se analizó la formación de autofagosomas y se utilizó la spautina-1 para analizar la dependencia de autofagia; la activación de la caspasa efectora 3 y el Q-VD-OPH para analizar la dependencia de la apoptosis; y a la necrostatina-1 para analizar la dependencia de necroptosis. Los resultados obtenidos indican que las AuNPs-Qts inducen MCR dependiente de concentración en células leucémicas, mientras que muestran baja toxicidad en PBMC. Además, inducen la producción de ROS que generan daño mitocondrial y nuclear; induciendo MCR dependiente de ROS. Finalmente, los resultados demuestran que la MCR inducida por AuNPs-Qts en líneas celulares leucémicas es dependiente de la línea celular; induciendo apoptosis en células CEM y necroptosis en células K562. Estos resultados abren las puertas a próximos estudios que permitan probar su efectividad *in vivo*, además de la posibilidad de acoplar a las AuNPs-Qts con agentes que permitan abarcar más tipos de MCR, evitando así la resistencia de las células cancerosas al tratamiento.

ABSTRACT

Leukemia represent a serious health problem around the world. Currently, the available treatments present the disadvantages of affecting normal cells, and promoting treatment resistance. Therefore, the development of new therapies that can be specific to cancer cells and capable to avoid cell death resistance is needed. Recent studies show that both gold nanoparticles (AuNPs) and chitosan have interesting biological activities including potential antitumor effects. For this thesis, I synthesized chitosan-capped gold nanoparticles (AuNPs-Qts) by a chemical method (Turkevich), and analyzed their capacity to induce cell death in leukemic (K562 and CEM) and non-cancerous cells (PBMC). Cell death was measurement by the analysis of phosphatidylserine exposure, and plasma membrane permeabilization. ROS generation was measured using DCFDA and the antioxidant N-Acetyl Cystein (NAC) as a ROS inhibitor. Mitochondrial and nuclear damage were measured using TMRE and γ -H2AX, p53 and the cell cycle, respectively. Finally, to evaluate the effect of ROS in different mechanisms of regulated cell death, the role of autophagy, apoptosis and necroptosis was measured using spautin-1, Q-VD-OPH and necrostatin-1, respectively. Results show that AuNPs-Qts are cytotoxic in a dose-dependent manner in leukemia cells lines, while they showed low toxicity on PBMC. Additionally, they induced ROS production, which generated mitochondrial and nuclear damage and ROS dependent cell death. Finally, the results also show that cell death induced by AuNPs-Qts is dependent in the type of leukemic cell line, as they induce apoptosis in CEM and necroptosis in K562. These results open the doors to future studies to test efficiency *in vivo*, in addition to the possibility of coupling the AuNPs-Qts with other agents aiming at the simultaneous activation of different cell death pathways to overcome cell death resistance.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una neoplasia maligna que se caracteriza por la división y proliferación descontrolada de células que van adquiriendo la capacidad de invadir a otros tejidos, conduciendo a la pérdida de la homeostasis del organismo e incluso la muerte (NIH, 2015). En los últimos años, se ha convertido en un serio problema de salud a nivel mundial y en México, debido a su alto índice de morbilidad y mortalidad. De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud estadounidense (NIH), por sus siglas en inglés *National Institutes of Health*, el cáncer es clasificado en seis grandes grupos de acuerdo a sus características histológicas (NIH, 2015): carcinoma, sarcoma, mieloma, leucemia y de tipo compuesto.

En nuestro país, las leucemias son el octavo tipo de cáncer más frecuente. Las leucemias son un tipo de cáncer hematológico que se caracteriza por la proliferación no regulada de leucocitos malignos. Al igual que otros tipos de cáncer, la célula leucémica posee una gran cantidad de características; como su alta tasa de proliferación celular, replicación celular descontrolada, inestabilidad genómica; así como también una resistencia a la muerte celular regula (MCR) (Hanahan & Weinberg, 2011). Con base en las características clínicas y celulares de las leucemias, estas pueden ser clasificadas según la población celular afectada y su agresividad. De acuerdo al tipo celular se encuentran aquellas que son derivadas de linaje mieloide o linaje linfoide. En cuanto a la agresividad tenemos las que son de curso agudo y las de curso crónico.

En este proyecto, se empleó la línea celular K562 de leucemia mieloide crónica (LMC) y las células CEM de leucemia linfoide aguda de células T (LLA-T). La LMC ocupa el 15% de las leucemias y afecta a adultos mayores siendo los 40 años la edad promedio de diagnóstico. Por otro lado, la LLA representa la primera causa de muerte en niños y jóvenes menores de 20 años (INEGI, 2013 y GLOBOCAN, 2013). Actualmente, los principales tratamientos contra las leucemias son las quimioterapias, inhibidores de cinasas o las prácticas médicas como la leucoaféresis y el trasplante de médula ósea; sin embargo, con el uso de estas terapias se ha visto que la neoplasia reemerge. Aunado a ello, estos tratamientos afectan a las células sanas, generando múltiples efectos secundarios indeseables para el paciente.

En los últimos años, la nanotecnología ha contribuido con la medicina en el desarrollo y aplicación de las nanopartículas para fines y prácticas médicas. Recientes estudios demuestran que las nanopartículas de oro (AuNPs) poseen diversas propiedades que le confieren un gran potencial antitumoral, como lo son su capacidad citotóxica en células cancerosas y su biocompatibilidad con tejidos sanos. Se ha observado que esta capacidad depende de su forma, tamaño y superficie; así como también de los agentes precursores de síntesis. En el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, recientemente se reportó que las nanopartículas de oro recubiertas con quitosano (AuNPs-Qts) inducen muerte celular regulada (MCR) en células cancerosas HeLa (De León-Chávez, 2016), MCF-7 (Rodríguez-Abrego, 2016), K562 y Jurkat (García-Juárez, 2017); este tipo de muerte se caracteriza por la producción de ROS. También se demostró que las AuNPs-Qts no tienen actividad citotóxica significativa en células sanas no tumorales (PBMC) (Álvarez-Chairez L, 2016; García-Juárez, 2017), indicando que inducen MCR selectiva en células cancerosas.

Por estas razones, en el presente proyecto se buscó entender la implicación de las ROS en el mecanismo de MCR que inducen las AuNPs-Qts en las líneas celulares leucémicas K562 y CEM; para ello se efectuaron una serie de ensayos que permitieran conocer el mecanismo de MCR que generan las AuNPs-Qts. Los resultados demuestran que las AuNPs-Qts inducen muerte celular selectiva en células leucémicas K562 y CEM, sin dañar PBMC, mediante la producción de ROS que generan daño a nivel mitocondrial y nuclear e inducen la MCR dependiente de línea celular; ya que en células CEM inducen MCR dependiente de caspasas (apoptosis) y en células K562 inducen MCR independiente de caspasas, pero dependiente del necrosoma (necroptosis).

ANTECEDENTES

Cáncer

De acuerdo con el NIH el cáncer es una neoplasia maligna que se caracteriza por la división y proliferación descontrolada de células que van adquiriendo la capacidad de invasión a otros tejidos (NIH, 2015). Hoy en día, el cáncer es un grave problema de salud pública tanto en México, como a nivel mundial. Cada año, mueren miles de personas a causa de esta enfermedad, siendo una de las enfermedades que destaca por su alto índice de morbilidad y mortalidad. Según lo reportado por la INEGI en 2016, las cifras parecen ir en un constante e importante aumento (INEGI, 2016).

El cáncer posee tres características principales: *multigenicidad* el resultado de la acumulación de múltiples alteraciones de genes que regulan el crecimiento celular, *multicausal* porque puede ser originado por diferentes factores y *multietapas* ya que su estadio puede deberse a etapas diferentes en las que se encuentre. También, puede ser clasificado en seis categorías de acuerdo a sus características histológicas: carcinoma, neoplasia maligna de tipo epitelial o de tejidos que recubren a los órganos internos; sarcoma, neoplasia que se origina en el tejido conectivo de sostén; mieloma, neoplasia que proviene de células plasmáticas; linfoma, neoplasia del tejido linfático; leucemia, neoplasia que se origina a partir de médula ósea y provoca un gran número de células sanguíneas anormales (U.S. National Institutes of Health [NIH], 2014).

Leucemias

La leucemia es el tipo de cáncer que se presenta en células derivadas de la médula ósea. Las células hematopoyéticas o tejido sanguíneo, se forman mediante un proceso de diferenciación llamado hematopoyesis en la médula ósea. Este proceso, comienza con una población pequeña de células madre pluripotentes; también conocidas como células madre hematopoyéticas (HSC). En la figura 1, se presenta un esquema de la de la producción de células de la sangre maduras y en etapas intermedias a partir de HSC. Esta célula madre hematopoyética, tiene la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares hematopoyéticos y de auto regenerarse. Esta capacidad de regeneración se mantiene en un ciclo abierto que permite la producción continua de células sanguíneas. El resto de las células de la progenie no pueden regenerarse nuevamente; por tanto, se

diferencian en el progenitor mieloide común (CMP) y progenitor linfoide común (CLP).

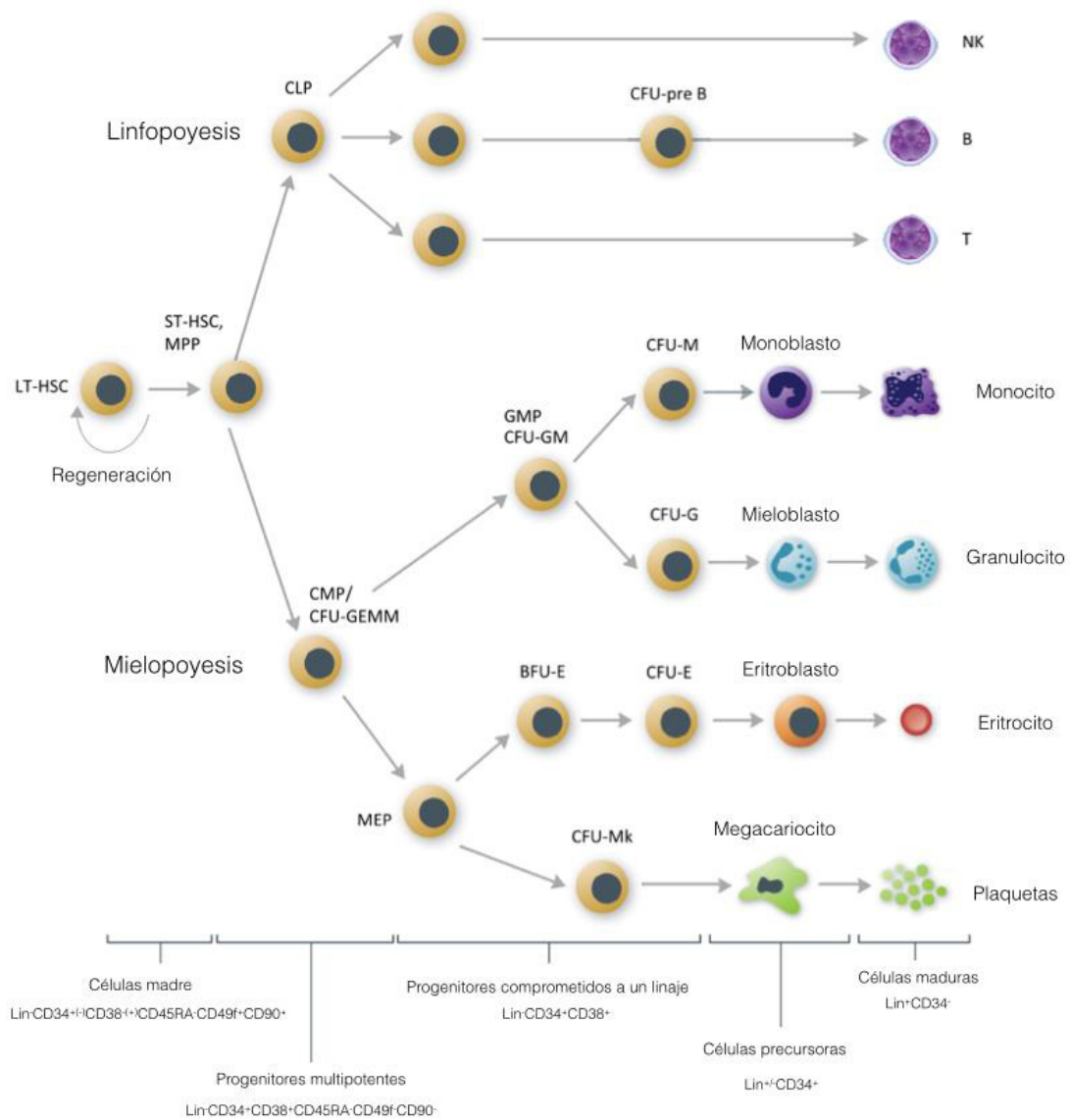


Figura 1. **Proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas (HSC).** Representación esquemática de la producción de células de la sangre maduras y en etapas intermedias a partir de HSC. Los marcadores inmunológicos más ampliamente utilizados para identificar los distintos tipos celulares en humanos se muestran en la parte inferior de la figura. No se muestran las células dendríticas plasmocitoides ni mieloides, que provienen de los linajes CLP y CMP, respectivamente. Abreviaturas: LT-HSC = HSC de largo plazo, con capacidad de regeneración; ST-HSC = HSC de corto plazo, sin capacidad de regeneración; MMP = Progenitor Multi-Potencial; CLP = Progenitor Linfoide Común; MLP = Progenitor Mieloide Común; CFU = Unidad formadora de colonias; GEMM = Granulocito/Eritrocito/Macrófago/ Megacariocito; MEP = Progenitor eritroide común; GMP = Progenitor mieloide de granulocitos. (Modificado de (Telford, 2013).

Los CLP se diferencian los linfocitos T, B y NK, mientras que a partir de las CMP se diferencian los megacariocitos (precursores de plaquetas) y eritrocitos; y los precursores mielocíticos de macrófagos y granulocitos, que dan lugar a los mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos y macrófagos (George A. Fritsma MS MLS, 2014).

Tanto en sangre periférica como en médula ósea existe una estricta regulación en la concentración de cada uno de los tipos celulares; su desequilibrio, puede provocar y ser indicativo de enfermedades como la leucemia, que se caracteriza por la sobreproducción de leucocitos o de sus progenitores inmaduros (blastos) en sangre periférica que obstaculiza el transporte de oxígeno a los tejidos, desregula el sistema de la coagulación e interfiere en el sistema inmunológico (NCI, 2013). La célula leucémica posee características de una célula cancerosa como la ausencia de regulación sobre el crecimiento, la proliferación; así como la falta de función de los leucocitos o glóbulos blancos (Hanahan & Weinberg, 2013). Las leucemias se han clasificado de acuerdo con las características moleculares de la línea hematopoyética que afecta (linfoide o mieloide); así como de acuerdo, a su progresión (aguda o crónica). Es por ello, que se han catalogado en cuatro grupos: la leucemia linfoide aguda (ALL), leucemia linfoide crónica (CLL), leucemia mieloide aguda (AML), y leucemia mieloide crónica (CML). En la *tabla 1* se describen cada una de las categorías de las leucemias.

Las leucemias repercuten gravemente en la población mexicana y de todo el mundo. La alta tasa de morbilidad y mortalidad lo ha convertido en un serio problema de salud pública a nivel mundial, siendo una problemática para todas las edades a nivel global y local. Se estima que en el mundo alrededor de 352,000 personas fueron diagnosticadas con leucemia en 2012, con incidencias que varían según la locación. En 2013, el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) reportó que la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos es el cáncer de órganos hematopoyéticos en población de 0-20 años (62% en las mujeres y 58.7% en los hombres). La INEGI estima que cada año se presentan siete mil nuevos casos de leucemia en niños, 90% de los cuales mueren sin haber recibido atención médica, según informes de la Organización Mundial de la Salud (INEGI, 2016). Para hacer frente a

Característica/Leucemia	Leucemia Linfocítica Aguda (ALL)	Leucemia Linfocítica Crónica (CLL)	Leucemia Mielógena Aguda (AML)	Leucemia Mielógena Crónica (CML)
Línea celular afectada	Linfocitos T y B	Linfocitos B	Mielocitos	Mielocitos
Características generales	Aparición de linfoblastos en sangre periférica. Progresión rápida	Exceso de linfocitos B que expresan los antígenos de superficie CD5 y CD23 en la sangre	Sobreproducción de mieloblastos en la médula ósea	Aumento en la proliferación de granulocitos sin perder la capacidad para diferenciarse
Epidemiología en Estados Unidos	-12% de las leucemias diagnosticadas -60% en < 22 años -Afecta de 2-5 y > 60 años	-18,960 casos -4,660 muertes -25% de las leucemias diagnosticadas	-19,950 nuevos casos -430 muertes - Edad promedio de inicio 70 años	-8,220 nuevos casos -1,070 muertes -Aumento 10% de los casos
Mutaciones principales	Translocación más común del cromosoma Filadelfia (9:22). Otras translocaciones menos comunes (4; 11), o (8; 14).	Delección del brazo largo del cromosoma 13 (delección 13q14), genera sobreexpresión de Bcl-2	- Translocación t(8;21) (q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 -Inversión t(3;3) (q21;126.2); RPN1-EVII	Translocación del cromosoma Filadelfia: t(9;22) (q34;q11) que da lugar a un homólogo del oncogen viral de leucemia murina Abelson, ABL-1 Su translocación con BCR provoca una reproducción celular descontrolada
Diagnóstico diferencial	Inmunofenotipo	-Expresión de proteínas ZAP70 y CD38 - marcadores de suero, CD23, quinasa de timidina. microglobulina β-2, lactato deshidrogenasa. -Anormalidades	-Tinción para mieloperoxidasa -Tinción Sudan Black B -Tinción para esterasa no específica	Biopsia de médula ósea se busca el cromosoma Filadelfia (Ph)
Tratamientos	Quimioterapia Trasplante de médula ósea	Quimioterapia Trasplante de médula ósea	Quimioterapia Trasplante de médula ósea	Quimioterapia Inhibidores de cinasas Trasplante de médula ósea

Tabla1. **Características generales y clasificación de las leucemias.** (NCI, 2013), (Hanahan & Weinberg, 2011).

este grave problema de salud pública, es importante emplear sistemas de diagnóstico diferencial e implementar tratamientos específicos propios de cada tipo de leucemia.

Actualmente, los tratamientos más utilizados para la leucemia son prácticas médicas; como la leucoaféresis y el trasplante de médula ósea, la quimioterapia, inhibidores de cinasas la inmunoterapia, y radioterapia en menores casos. La leucoféresis es una técnica médica que consiste en extraer de forma selectiva leucocitos de sangre periférica mediante centrifugación devolviendo el resto del contenido sanguíneo al paciente (Ranganathan, 2008). El trasplante de médula ósea consiste en reemplazar la médula ósea dañada o destruida por células madre de médula ósea sana de otro paciente. La inmunoterapia es una terapia que hace uso del sistema inmunológico del paciente para combatir enfermedades. Puede ser, a través de la activación de la respuesta inmunitaria específica contra el antígeno por medio de la inmunidad celular dependiente de linfocitos T o por medio de la inmunidad humoral dependiente de linfocitos B productores de anticuerpos (Sánchez-González, Sosa-Luna, & Vásquez-Moctezuma, 2011).

La quimioterapia actúa causando un daño en el ADN lo que conlleva a la destrucción de las células. Su función principal es matar a las células tumorales; sin embargo, no son selectivos ya que pueden afectar a las células normales en proliferación siendo las células del sistema inmunológico (SI) de las más afectadas. Este daño, más aquel generado por el reemplazo de las poblaciones del SI por las células leucémicas anormales, genera efectos secundarios graves en los pacientes como leucopenia (disminución en los leucocitos), inhibición en la eritropoyesis y trombocitopenia (bajo recuento de plaquetas en sangre periférica).

La radioterapia es un tratamiento que se basa en el uso de radiaciones ionizantes (rayos X, rayos gamma y partículas alfa). Este tratamiento es utilizado en la leucemia mieloide aguda (AML), cuando se ha propagado al cerebro y al líquido cefalorraquídeo o a los testículos. Actúan, generando alteraciones bioquímicas en la célula como cambios estructurales, alteraciones en la actividad enzimática, daños a la membrana células, daño al ADN, daño directo en la mitocondria y en el resto de los orgánulos celulares. El daño producido en el ADN induce muerte celular radioinducida (Hsiao &

Stewart, 2008). Se ha observado que los tejidos tumorales son más sensibles que el tejido normal; por ello, se aplica de forma local. Aunque esta terapia ocasiona una serie de efectos secundarios graves al paciente, sigue siendo de las más utilizadas.

La inmunoterapia es un tratamiento que utiliza ciertos componentes del sistema inmunológico (SI) de una persona para combatir enfermedades como el cáncer. Esto se puede realizar mediante el estímulo del propio sistema inmune del paciente o mediante la administración de componentes del SI innato, tales como proteínas del SI de forma artificial.

A pesar de que muchas terapias inmunológicas han logrado tener éxito en los pacientes aún no existe una terapia que sea eficaz; debido a la resistencia a la muerte celular, una de las características principales de la célula cancerosa. Por esta razón, la medicina ha buscado soluciones terapéuticas en otras áreas que brinden soluciones eficientes al tratamiento con el cáncer.

Nanotecnología

La nanotecnología es la ciencia dedicada a diseñar y manipular la materia en escala nanométrica. De acuerdo con la Fundación Nacional de Ciencia y la NNI (National Nanotechnology Initiative); la nanotecnología comprende, controla y manipula la materia a nivel de átomos y moléculas individuales (Bhattacharyya, Singh, & Satnalika, 2009). Esta ciencia se encarga de la construcción de materiales de tamaño entre 1 y 100 nm ($1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$), mediante la utilización de técnicas y herramientas desarrolladas para diseñar productos de alto rendimiento. En la figura 2, observamos escalas de diferentes materiales y se compara con sistemas biológicos.

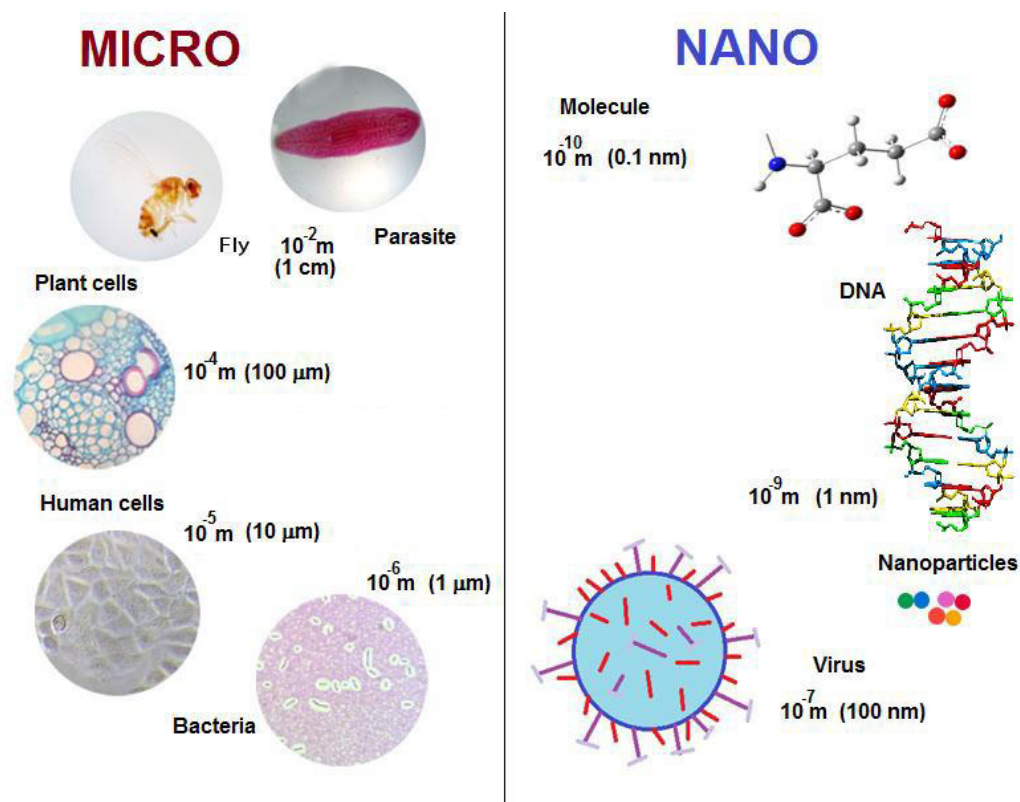


Figura 2. Escala de tamaños de nano materiales y sistemas biológicos. $1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$. Adaptado (Miguel Angel Méndez-Rojas, José Luis Sánchez-Salas, 2013).

La aplicación de la nanotecnología en la medicina busca innovar con nuevas técnicas y materiales para diagnóstico, tratamientos y terapias preventivas de diferentes enfermedades como el cáncer. Existe una larga lista de productos y materiales nanométricos que se encuentran en investigación para la búsqueda de sus aplicaciones

en la medicina. Por ejemplo, el nanodiagnóstico, la liberación controlada de fármacos, la medicina regenerativa y el uso de nanopartículas como tratamiento antineoplásico (Wo et al., 2017).

Las nanopartículas (NPs) son materiales que tienen tamaños entre 1-100 nm (Nikam, Ratnaparkhiand, & Chaudhari, 2014). A diario estamos expuesto a ellas, producidas de forma natural como la erosión del suelo, la evaporación del agua del océano, los incendios forestales, las reacciones fotoquímicas, entre otras. Sin embargo, mediante el uso de técnicas como dispersión de polímeros preformados, polimerización de monómeros y gelación iónica (Nikam, Ratnaparkhiand, & Chaudhari, 2014), se han diseñado NPs de diferentes materiales incluidos los metálicos, como la magnetita, oro, plata, entre otros. Las NPs metálicas exhiben excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas que no son presentadas en los materiales en escala convencional, y que se deben a su tamaño nanométrico (Auffan et al., 2009); en la figura 3 se muestra una representación esquemática de una nanopartícula. Las propiedades exhibidas por las NPs gracias a su tamaño nanométrico son aprovechadas para el desarrollo de tratamientos de enfermedades como el cáncer, ya que tienen una mayor acumulación en el tejido tumoral (potencial mejora del efecto terapéutico), reducción de la toxicidad sistémica y capacidad de la superficie de las nanopartículas para ser funcional (lo que permite ser una terapia dirigida) (Cruz & Toledo, 2009).

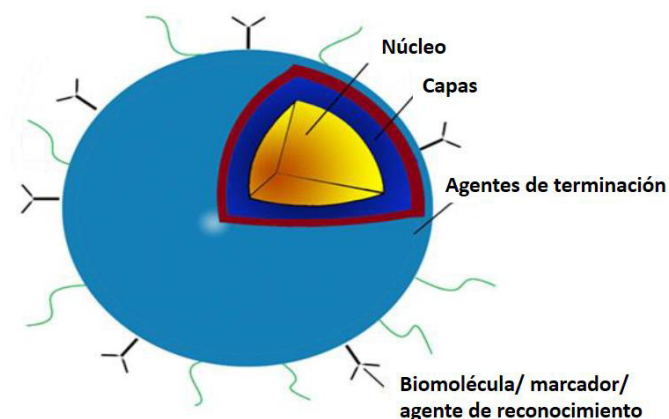


Figura 3. **Representación esquemática de una nanopartícula.** El núcleo determina algunas de las propiedades físicas del material; la capa actúa como estabilizador; la envoltura como un agente para aumentar biocompatibilidad. Adaptado (Méndez-Rojas, Et al., Environmental risks of nanotechnology: Evaluating the ecotoxicity of nanomaterials, 2014).

El tamaño de las Nps les permite interactuar con la superficie y el interior celular, ejerciendo mecanismos de citotoxicidad, que pueden ser aprovechadas en el diseño de nuevas terapias contra el cáncer. En la figura 4, se muestra un esquema representativo de las interacciones de las NPs con la célula. Las NPs recientemente más estudiadas por su potencial actividad contra el cáncer son las nanopartículas de oro (AuNps) (Andón & Fadeel, 2012) (Chueh, et al., 2014). Se ha observado que las AuNPs tienen alta citotoxicidad sobre las células cancerosas y que mantiene selectividad sobre células sanas (García-Juárez; deLeón-Chávez; Rodríguez-Abrego, 2016).

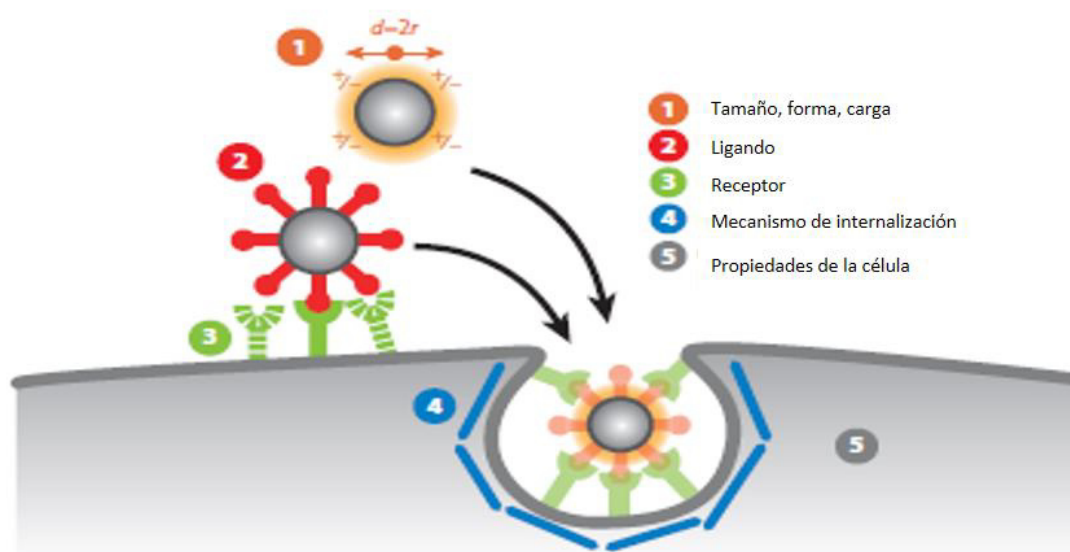


Figura 4. **Interacciones de la nanopartícula con la célula.** Las interacciones de las NPs con la célula puede deberse a: 1) Tamaño, forma y carga de las NPs; 2) Ligando o envoltura de las NPs; 3) Receptor de la célula; 4) Mecanismos de internalización y 5) Propiedades propias de la célula. Adaptado de: Albanese, et al., (Albanese, Tang, & Chan, 2012).

Los métodos de síntesis de nanopartículas se agrupan en dos categorías, las aproximaciones «de arriba hacia abajo» y las «de abajo hacia arriba». La primera consiste en la división de sólidos en porciones más pequeñas. En este método se incluye la evaporación térmica, el depósito químico en fase vapor, la preparación de clusters gaseosos, la implantación de iones, la molienda de partículas. Estos métodos requieren de instrumentos complejos y complicados, lo cual los hace costosos. Los métodos «de abajo hacia arriba» consisten en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución.

Este último enfoque es mucho más popular en la síntesis de nanopartículas. Existen diversos métodos que utilizan la aproximación de “abajo hacia arriba” para la síntesis de nanopartículas, los más empleados son aquellos que utilizan procedimientos químicos. Por lo general, inician con la reducción de las sales metálicas a átomos metálicos, seguido por la agregación controlada de estos átomos. Estas incluyen la reducción fotoquímica, irradiación con microondas, utilización de dendrímeros, síntesis salvotermal, método sol-gel, depósito de coloides; sin embargo, el método químico es el más conveniente para la obtención de nanopartículas (Zanella R, 2012).

La síntesis química, coloidal o método de Turkevich es un método de dispersión metálica coloidal que consiste en la integración de un agente precursor metálico de baja concentración en una solución acuosa a temperatura de ebullición del agua, junto con un agente reductor y un agente estabilizador. Para la síntesis de nanopartículas de oro como agente precursor se utiliza el ácido tetracloroaurico [$H (AuCl_4)$] y como agente reductor puede utilizarse una serie de agente químicos diversos ya sea de estructura orgánica o inorgánica como lo son el ácido cítrico y sus respectivas sales principalmente, el tartrato de sodio y potasio, formaldehído, solución acuosa de metanol, clorhidrato de hidroxilamina, borohidruro de sodio, peróxido de hidrógeno, glucosa, fósforo, monóxido de carbono, hidrógeno, entre otros, participan en el proceso de óxido-reducción; y agentes protectores que actúan como estabilizantes principalmente el poli etilenglicol (PEG), el alcohol polivinílico (PVA), poliacrilato de sodio, polivinilpirrolidina (PVP). Se sabe que el tamaño de la partícula depende directamente de la relación molar entre el agente precursor y el agente reductor; por ello, se ha vinculado ambos componentes con la capacidad citotóxica de la nanopartícula tanto tejido sano como maligno (Corzo Alberto, 2012).

Nanopartículas de oro

El oro es un metal precioso de los más valorados en el mundo. Nuestros ancestros les encontraron múltiples aplicaciones médicas que se remontan hacia la antigua China en 2500 AC. En el siglo XVI, se utilizó para el tratamiento de la epilepsia de forma oral y a principios del siglo XIX se consideró como el fármaco de elección para el tratamiento

de la sífilis. Con el descubrimiento del efecto bacteriostático del cianuro de oro frente al bacilo de la tuberculosis por el médico alemán Robert Koch, se marcó el comienzo de su utilización en la medicina moderna siendo introducido en la terapia de la tuberculosis en 1920, (Münch, 2003). Recientemente, se han utilizado nanopartículas de oro (AuNPs) en el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades reumáticas como las psoriasis y el lupus eritematoso; también, se ha observado su aplicación en el área de la odontología (Sevinç & Hanley, 2010). En la actualidad, las múltiples aplicaciones del oro se han visto asociadas al diseño en NPs. Ya que las AuNPs pueden funcionar como plataformas versátiles para el suministro de múltiples agentes terapéuticos y para el diagnóstico de enfermedades. Además de sus funciones como acarreador de fármacos, agentes de contraste, agentes fototérmicos y radiosensibilizadores (Jain, Hirst, & O'Sullivan, 2012), se ha documentado su propiedad citotóxica y se ha propuesto como tratamiento contra el cáncer (Arvizo et al., 2012).

La citotoxicidad de las AuNps es un fenómeno multiparamétrico ya que no sólo se ve regulada por las características de la superficie de las mismas, sino también por otros factores relacionados a su forma, tamaño, capacidad de agregación y el tipo celular. Hay numerosos estudios que muestran que las Nps más pequeñas tienen mayor actividad citotóxica. En ensayos *in vitro* sobre fagocitos (J774A1) y fibroblastos (L929) de ratón tratadas con AuNps de 1 y 5nm, reflejaron un mayor potencial citotóxico de las nanopartículas más pequeñas, pues demostraron que el tamaño menor permite una distribución más amplia en los tejidos (Pan et al., 2007). En ensayos realizados por Jeyarj y colaboradores, mostraron que las AuNps son capaces de causar daño citotóxico sobre células de cáncer de cérvix (HeLa) (Jeyaraj et al., 2014); al igual que lo reportado por Chompoosor y colaboradores, que demostraron que AuNPs de 2nm generan citotoxicidad en células HeLa (Chompoosor, et al., 2010). Otro estudio, demostró que AuNPs reducidas con un extracto metanólico (60uM), generan toxicidad dosis y tiempo dependiente en células de linfoma de linfoma de linfocitos B (SUDHL-4) (Pradida et al., 2014). Ramalingan y colaboradores reportaron que las AuNPs-Borohidraro de sodio de 29 nm generan la producción de ROS y que cumplen un rol

importante en la señalización intracelular del mecanismo de toxicidad inducido por las AuNPs en células A549 (Ramalingan et al., 2017).

Se ha observado que las AuNPs desnudas en una solución tienden a agregarse; por ello, se ha propuesto el uso de moléculas cargadas que actúen como agentes estabilizantes a través de la repulsión electrostática (Collado-González et al., 2015). Pamies y colaboradores, en su artículo en 2010 mencionan que, si el medio en el que están disueltas tiene una alta fuerza iónica o bajo pH, la interacción electrostática se tamiza y se produce la agregación (Pamies et al., 2010). Para evitar la agregación de las AuNPs se ha propuesto el uso de agentes reductores durante la síntesis de las NPs.

Los agentes reductores mejoran la estabilidad de las Nps en solución, disminuyendo la repulsión electrostática. Ciertos agentes reductores, tienen citotoxicidad selectiva sobre diferentes células cancerosas y una alta tasa de biocompatibilidad en células sanas del sistema inmunológico; por ello, su aplicación se ha acoplado con el diseño de Nps. El acoplamiento con las Nps, en muchos casos se ha visto beneficioso. En diversos estudios, se ha visto este efecto de mejoría en el efecto citotóxico de las Nps con agentes reductores naturales (Rodríguez-León et al., 2013), como sintéticos (Collado-González et al., 2015). A pesar de que el uso de agentes reductores depende directamente de la naturaleza de las Nps y de la citotoxicidad de ella. Uno de los agentes reductores naturales más estudiados es el quitosano.

Quitosano

El quitosano, es un aminopolisacárido lineal formado por unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina, que se obtiene por desacetilación de la quitina, figura 5 (Collado-González et al., 2015). Los grupos amino y el -OH le brindan al quitosano muchas propiedades especiales, por lo que se aplica en diferentes áreas de la industria química. Es seguro, no es tóxico y puede interactuar con polianiones para formar complejos y geles (Lim, et al., 2011). Cheung y colaboradores, han propuesto la aplicación del quitosano en forma de Nps para su utilización como fármaco terapéutico (Cheung, et al., 2015). Su síntesis puede realizarse utilizando múltiples técnicas químicas o físicas.

En previos estudios, las Nps de quitosano mostraron actividad antibacteriana en medio ácido debido a su solubilidad menor a pH 6.5 (Qi, et al., 2004). Su actividad antimicrobiana depende del peso molecular y del disolvente, ya que en medios más ácidos (pH menor a 6.5) su actividad se ve mejorada (Qi et al., 2004). También, han mostrado sus efectos citotóxicos sobre diferentes líneas celulares cancerosas y una alta selectividad sobre las células del sistema inmunológico. Huiying Luo y colaboradores, mostraron que las Nps de quitosano, inhiben la viabilidad de las células K562 (células leucémicas) con una concentración citotóxica media (CC50) de 14,26 mg / ml (24 h), por medio de apoptosis y necrosis de forma sincrónica. Debido a su biocompatibilidad y citotoxicidad selectiva sobre células cancerosas, se ha propuesto su utilización como agente reductor y protector en la síntesis de AuNPs (Collado-González et al., 2015).

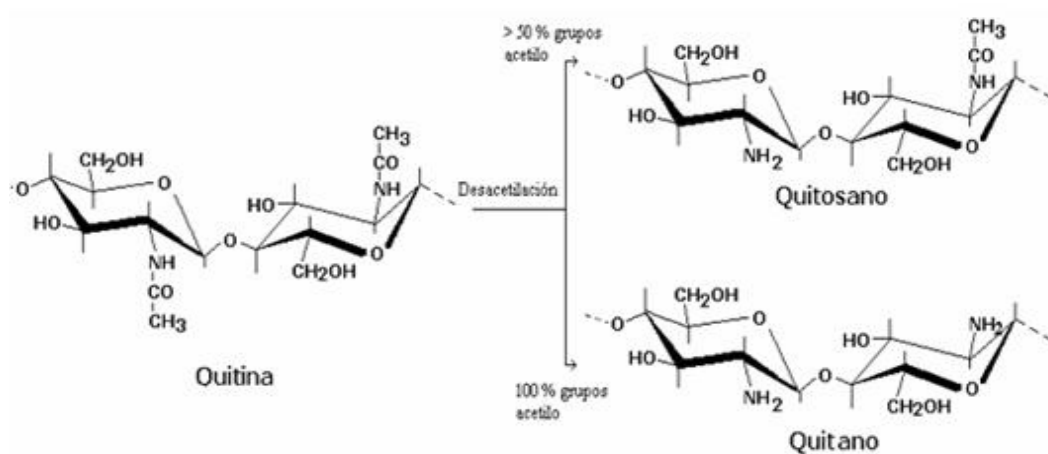


Figura 5. Estructura química del quitosano.

AuNPs recubiertas de quitosano

Como ya se mencionó anteriormente las AuNPs presentan características como biocompatibilidad, con un excelente potencial en nanoinmunología, multifuncionalidad y además de síntesis muy sencilla; por lo tanto, se su estudio se ha propuesto para el tratamiento del cáncer (Shan et al., 2011). Por su parte, el quitosano es un polímero catiónico natural, lo que le confiere características como la capacidad de actuar como floculante, humectante y quelante así como la capacidad de formar complejos con metales y actuar como fungicida natural (Bir, Nmeth, Sisak, Fecz, & Gyenis, 2008) (Dambies, e al., 2001). Sus propiedades hidrofílicas, biocompatibles,

biodegradables y no tóxicas, como nanopartícula le han conferido aplicaciones como acarreador de fármacos. Bhumkar y Pokharker utilizaron AuNPs con quitosano como transportador de insulina vía oral y nasal en ratas diabéticas de la cepa Wistar y observaron estabilidad a largo plazo de las AuNPs debido al quitosano, sin signos de agregación, efectividad en la reducción de glucosa en sangre y la absorción del oro nanométrico (Bhumkar & Pokharker, 2006).

Con base en lo anterior, se han diseñado nanopartículas de oro recubiertas de quitosano (AuNPs-Qts) como una interesante posibilidad para los tratamientos contra el cáncer, sin afectar de forma negativa a las células del sistema inmunológico. La mayoría de los métodos de síntesis de AuNPs promueve la reducción química de las sales metálicas mediante el empleo de un agente que actúa como reductor en presencia o no de agentes estabilizantes (Barrio, 2012). La síntesis de las AuNPs con quitosano puede realizarse utilizando el método de Turkevich (J. Turkevich; P.C. Stevenson; J. Hiller, 1951), que es un método que promueve que las NPs sintetizadas sean pequeñas y uniformes en cuanto a su estructura y tamaño. El quitosano cargado positivamente, forma una red que interactúa con las AuNPs cargadas negativamente, evitando su agregación; en la figura 6 se presenta un diagrama de las AuNPs-Qts (Collado-González et al., 2015). El quitosano se distribuye principalmente en la superficie de las AuNPs, de tal manera que están lo suficientemente cerca, pero no en el contacto necesario para formar agregados. En previos estudios se ha visto que las AuNPs pueden formar complejos de mayor tamaño al interactuar con el medio de cultivo celular o el plasma (Maiorano et al., 2010). Cuando las AuNPs son suspendidas en un medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (medio RPMI), o cuando se encuentran en contacto con plasma sanguíneo, se forma una corona de proteínas en la superficie del oro, que determina la estabilidad coloidal y la captación celular de nanopartículas (Sabuncu, Zhuang, Kolb, & Beskok, 2012; Maiorano et al., 2010), siendo aquellas que poseen una corona de proteínas de menor grosor las que poseen mayor penetración y citotoxicidad relacionada con el tipo de medio de cultivo en donde son suspendidas y el tipo de agente reductor (Cheng et al., 2015).

Antes de evaluar el efecto biológico de las NPs es importante caracterizarlas. Existen varias técnicas analíticas como el plasmón de resonancia y el tamaño de partícula que permiten caracterizar las propiedades físico-químicas de las NPs. El plasmón de resonancia es una característica de materiales metálicos, se produce por las oscilaciones en los electrones del último orbital energético al ser atravesadas por un haz de luz, la cual sólo se presenta cuando dicho elemento se encuentra en estado sólido nanométrico. Se sabe que las AuNPs con quitosano tienen un plasmón de resonancia de 520 nm (Collado-González et al., 2015). El tamaño de Nps se mide a través de difracción de luz dinámica (DLS). DLS se basa en la medición de los movimientos aleatorios de las partículas (movimiento browniano) y su velocidad.

Boyles y colaboradores, demostraron que las AuNPs-Qts con tamaño menor a 10 nm, no presentan toxicidad en monocitos humanos (Boyles et al., 2015). Devika R. Bhumkar y colaboradores, mostraron que las NPs tiene la capacidad de unirse a una amplia gama de biomoléculas, tales como aminoácidos, proteínas/enzimas y ADN y exponer áreas de superficie grandes para la inmovilización de tales biomoléculas (Bhumkar & Pokharkar, 2006; (Andón & Fadeel, 2012). En previos estudios realizados el Laboratorio de Inmunología y Virología de la FCB de la UANL, se ha mostrado que las AuNPs con quitosano inducen muerte celular no apoptótica sobre las células cancerosas manteniendo selectividad sobre las células sanas del sistema inmunológico (García-Juárez 2016, Rodríguez-Abrego 2016, De León- Chávez 2016, y Álvarez-Chairez, 2016).

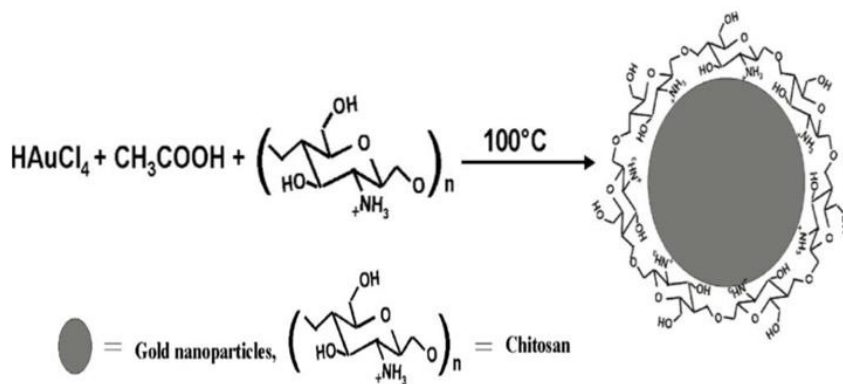


Figura 6. **Diagrama de las nanopartículas de oro cubiertas con quitosano.** Adaptado, Bhumkar, Chitosan Reduced Gold Nanoparticles as Novel Carriers for Transmucosal Delivery of Insulin, 2007 (Bhumkar, Joshi, Sastry, & Pokharkar, 2007a).

Muerte celular

Anteriormente, se mencionó que uno de los obstáculos para la eficacia de los tratamientos es la desregulación en el proceso de muerte celular, que lleva a una evasión de la misma por parte de la célula tumoral y que produce un estado inmortal. Por ello, la inducción de muerte en estas células es uno de los principales enfoques de los tratamientos contra el cáncer.

La muerte celular es un proceso fisiológico en el que las células que han perdido su función biológica, mueren y posteriormente, son eliminadas por fagocitosis (Shan et al., 2011). Este proceso junto con el control de la proliferación y la diferenciación celular son cruciales para mantener la homeostasis del organismo (Matmati et al., 2011), incluyendo la formación y el desarrollo de órganos; así como, la renovación celular. Actualmente, el comité de nomenclatura en muerte celular o NCCD (Nomenclature Committee on Cell death) clasifica los tipos de muerte celular, basado en consideraciones bioquímicas y funcionales de muerte. Aunque esta clasificación es extensa, la NCCD clasifica en dos grandes grupos: la muerte celular accidental (MCA) y la muerte celular regulada (MCR) (Hanahan & Weinberg, 2011) (Kroemer et al., 2009), figura 7.

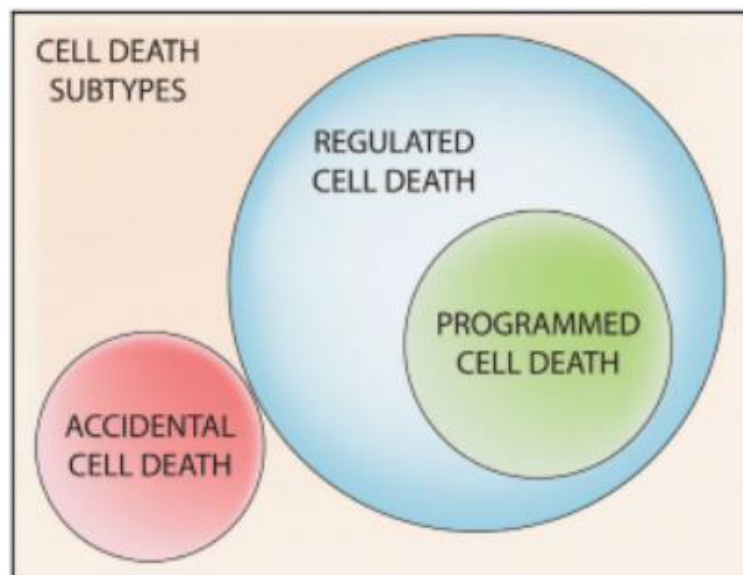


Figura 7. Clasificación de la muerte celular. La muerte celular se clasifica en dos subtipos, muerte celular accidental, MCA (Accidental cell death, ACD) y muerte celular regulada, MCR (Regulated cell death, RCD). Dentro de la MCR encontramos la muerte celular programada, MCP (Programmed cell death, PCD), se usa para indicar eventos de MCR que ocurren como parte del desarrollo o para mantener la homeostasis tisular. (Tomado de Galluzzi et al., 2014).

Muerte celular accidental

La muerte celular accidental (MCA) o necrosis accidental, es un tipo de muerte generado a causa de daño físico, químico, o mecánico (Kroemer et al., 2009; Cabon, Martinez-Torres, & Susin, 2013). En la necrosis se producen importantes cambios morfológicos, causando una liberación abrupta y desorganizada de los componentes intracelulares, generando que el contenido citoplasmático sea liberado al tejido circundante lo que activa a un proceso inflamatorio debido a las señales quimiotácticas que se generan (Irachela, 2007); ya que este proceso no cuenta con una maquinaria específica que la regule, lo cual es un inconveniente en el desarrollo de terapias (Kroemer et al., 2009). La NCCD sugiere que el término necrosis debe ser reemplazado por *oncosis* debido al hinchamiento que presenta la célula y la cual es una de sus principales características morfológicas.

Muerte celular regulada

La muerte celular regulada (MCR o RCD por sus siglas en inglés *Regulated Cell Death*), es un proceso fisiológico en el que una célula innecesaria o malsana muere. Este tipo de muerte que posee una maquinaria molecular específica que se controla de manera sistemática, modulando cada evento ocurrido dentro de la célula; no solo inhibiendo la transducción de las señales letales, sino mejorando la capacidad de las células para adaptarse al estrés, de manera que en la célula pueda restaurar la homeostasia celular. Este proceso ocurre, por la activación de un mecanismo intracelular que dirige conjuntamente el destino final de las células de los tejidos en desarrollo (Ouyang et al., 2012). La desregulación de este proceso está asociado a enfermedades que incluyen trastornos del desarrollo, enfermedades inmunológicas, neurodegeneración y cáncer (Wong, 2011). La MCR puede activarse fisiológicamente en el individuo adulto como defensa como en el sistema inmune humano, donde un proceso de selección sumamente riguroso define la supervivencia de los linfocitos (Fuchs & Steller, 2011). Es a este tipo de procesos de MCR completamente fisiológicos a los que nos referimos como muerte celular programada (MCP) (Galluzzi et al., 2014). Anteriormente, el término MCP era utilizado como sinónimo de MCR; sin embargo, hoy en día este es cada vez menos utilizado y menos recomendado, ya que la MCP es un subtipo de MCR.

La NCCD clasifica a la MCR dependiendo de sus características bioquímicas y morfológicas. Una de las clasificaciones más utilizadas es la clasificación dependiendo de caspasas, un grupo de cisteína aspartato proteasas que median o no el mecanismo de muerte; clasificando a la MCR en dos grandes grupos: dependiente de caspasas (apoptosis) e independiente de caspasas (dentro de esta clasificación se dividen diversos tipos de muerte). De los diferentes tipos de muerte caracterizados, la apoptosis, la autofagia y la necrosis regulada son los mecanismos de MCR más conocidas y mejor descritos actualmente y los que se ha demostrado que pueden ser inducidos por diferentes tipos de nanopartículas (Vandenabeele, Galluzzi, Vanden Berghe, & Kroemer, 2010). (Andón & Fadeel, 2012). En 2012, Andón & Fadeel, reportaron en “*Programmed Cell Death: Molecular Mechanisms and Implications for Safety Assessment of Nanomaterials*” los mecanismos de muerte celular y el efecto que inducen diferentes tipos de nanomateriales en distintas líneas celulares (Andón & Fadeel, 2012); figura 8.

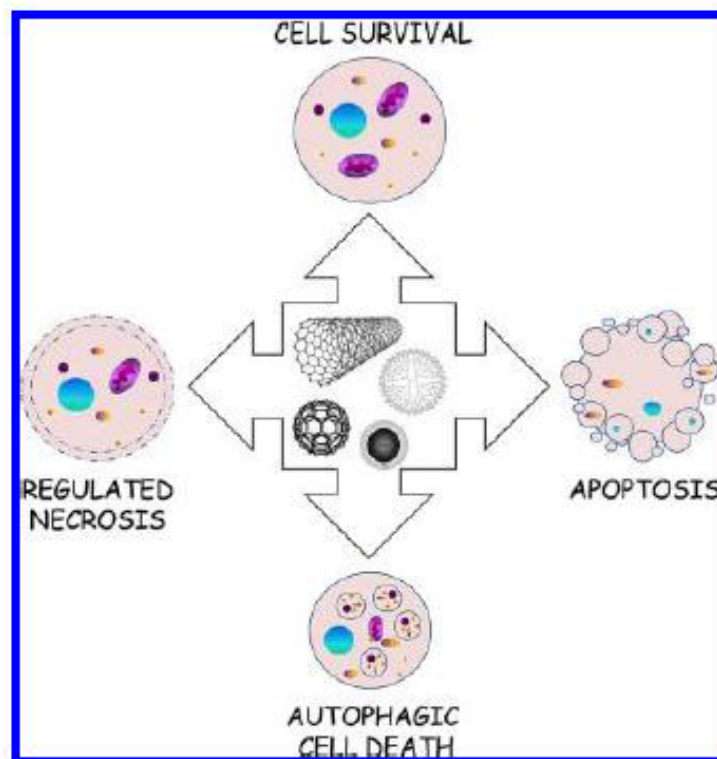


Figura 8: **Tipos de muerte celular regulada que pueden inducir distintas nanopartículas.**

Adaptado de: (Andón & Fadeel, 2012).

Apoptosis

La apoptosis, es el ejemplo más común de MCR dependiente de caspasas, ya que existen otros casos, generalmente tejido-específicos. La MCR por apoptosis es mediada por la activación de una serie coordinada y perfectamente programada de acontecimientos intracelulares, iniciados por un conjunto de productos génicos (Rojas, Salmen, & Berrueta, 2009). El término apoptosis fue acuñado por Kerr, Wyllie, y Currie en 1972 (Kerr, 2002). Mediante este mecanismo de MCR se eliminan células que ya no son necesarias al tejido, funciona como mecanismo de defensa como en las reacciones inmunitarias o cuando las células son dañadas por agentes patógenos o nocivos. Ha sido caracterizada por distintos cambios morfológicos, que incluyen condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, pliegues en la membrana plasmática, desensamble del citoesqueleto y contracción celular (Rojas et al., 2009). Consecuentemente, la célula se rompe en pequeños fragmentos rodeados de membrana (cuerpos apoptóticos); los cuales, posteriormente, son eliminados por un proceso de fagocitosis, y se caracterizan por no iniciar una respuesta inflamatoria considerable (Kurokawa & Kornbluth, 2009). Su activación es dependiente de energía e implica la activación de caspasas (cisteína proteasas) que median la muerte total de la célula.

Hasta la fecha, las investigaciones indican que hay dos principales vías de apoptosis: la vía del receptor, extrínseca, y la vía intrínseca o mitocondrial (Elmore, 2007). Aunque, se ha sabido de una vía adicional que implica de células T mediada por la citotoxicidad y muerte celular mediada por perforina/granzima. En la figura 8 se muestra el mecanismo de MC por apoptosis.

Las vías de señalización extrínsecas que inician la apoptosis se involucran interacciones mediadas por receptores transmembrana, figura 8. Estos implican receptores de muerte que son miembros del factor de necrosis tumoral (TNF). Tras la unión del ligando, las proteínas adaptadoras citoplásmicas son reclutados, exhiben dominios de muerte que se unen a los receptores correspondientes. La unión de ligando de Fas a los receptores de Fas, resulta en la unión de la proteína adaptadora FADD, y la unión del ligando TNF a los receptores de TNF en la unión de la proteína adaptadora TRADD con el reclutamiento de FADD y RIP. FADD se asocia entonces con la pro-

caspasa 8, lo que resulta en la activación de auto-catalítica de procaspasa-8. Una vez que se activa la caspasa-8, se activa la fase de ejecución de la apoptosis.

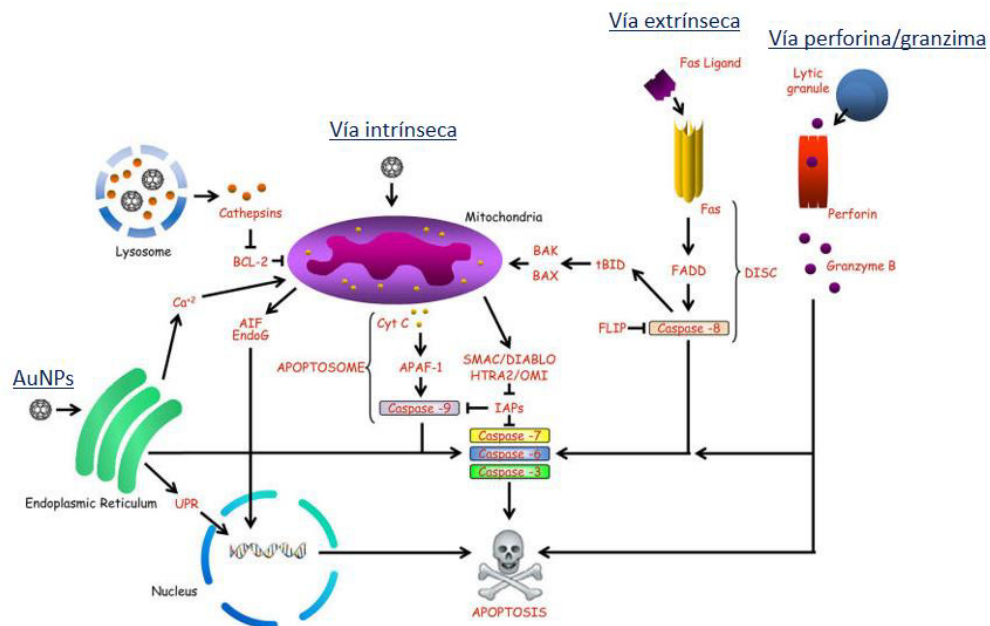


Figura 9. **Muerte celular regulada por vía de apoptosis mediada por nanomateriales.** La activación de esta vía puede ser iniciada por una vía intrínseca, una vía extrínseca o vía perforina/granzima. Las AuNPs pueden inducir estrés en el retículo endoplásmico, lo que puede conducir a la liberación del citocromo c de la mitocondria, desencadenando con ello la cascada de caspasas apoptóticas. Adaptado de: (Andón & Fadeel, 2012).

Las vías de señalización intrínsecas que inician la apoptosis implican una gran variedad de estímulos no mediados por receptores que producen señales intracelulares que actúan directamente sobre los objetivos dentro de la célula y son eventos iniciados en las mitocondrias. Los estímulos que inician la vía intrínseca producen señales intracelulares que pueden actuar, ya sea en una forma positiva o negativa (Hongmei, 2012). Estos estímulos causan cambios en la membrana mitocondrial interna que resulta la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, y la liberación de dos grupos principales de proteínas pro-apoptóticas normalmente secuestradas desde el espacio intermembrana en el citosol (figura 9).

La vía de perforina/granzima puede inducir la apoptosis a través de ya sea la granzima B o granzima A. La vía extrínseca, la vía intrínseca y la vía de granzima B convergen en la misma vía de ejecución. La vía de la granzima A activa una vía de la

muerte celular independiente de caspasas, a través de daño en el ADN monocatenario figura 8 (Elmore, 2007).

Tsai y colaboradores (Tsai et al., 2011), mostraron que las AuNPs son capaces de inducir MCR por apoptosis en células leucémicas K562 (CML), a través de la inducción de estrés en el retículo endoplásmico, lo que conlleva a la liberación del citocromo C mitocondrial, y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés reactive oxygen species), figura 9. Otro estudio demuestra que nanopartículas de oro con quitosano de entre 10-15 nm inducen toxicidad dependiente de concentración en células A549 (adenocarcinoma de pulmón), generando la activación de la caspasa-8 y generando la fragmentación del ADN, concluyendo que inducen apoptosis (Choi., et al., 2011).

Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico que se encarga de la degradación de orgánulos y componentes citoplasmáticos a través de estructuras en forma de vesícula de doble membrana diseñadas para la degradación de varios constituyentes incluidos orgánulos citoplasmáticos llamadas autofagosolisosomas, los cuales se forman a través de la fusión de lisosomas y fagosomas por un proceso que es activado en condiciones de inanición celular asociada a deficiencia de nutrientes, condiciones de hipoxia, y altas temperaturas, así como a un sistema pro-supervivencia (Xu et al., 2013). El término fue acuñado por primera vez por Cristian de Duve, hace ya más de 40 años, derivado del griego, “comer de uno mismo” y se basó en gran medida de la degradación de las mitocondrias y otras estructuras intracelulares dentro de los lisosomas de hígado de rata (Andón & Fadeel, 2012) (Klionsky, 2008).

El mecanismo de autofagia se induce a través de la deficiencia de aminoácidos, lo cual promueve la activación de vías de señalización como fosfatidil-inositol III (PI3), mTOR, JNK y la activación de proteínas Atg (Autophagy-related protein) como: Atg1–10, Atg12–14, Atg16–18, Atg29, Atg3 (Xu et al., 2013). La autofagia promueve la degradación proteolítica de los componentes citosólicos en el lisosoma y en base a ello, se puede definir como macroautofagia, microautofagia y autofagia inducida por

chaperonas (Glick, Barth, & Macleod, 2010). En la macroautofagia, se forma una vesícula de doble membrana que posteriormente se fusiona con el lisosoma formando un autofagosoma, esto a consecuencia de estímulos extrínsecos o intrínsecos de la célula.

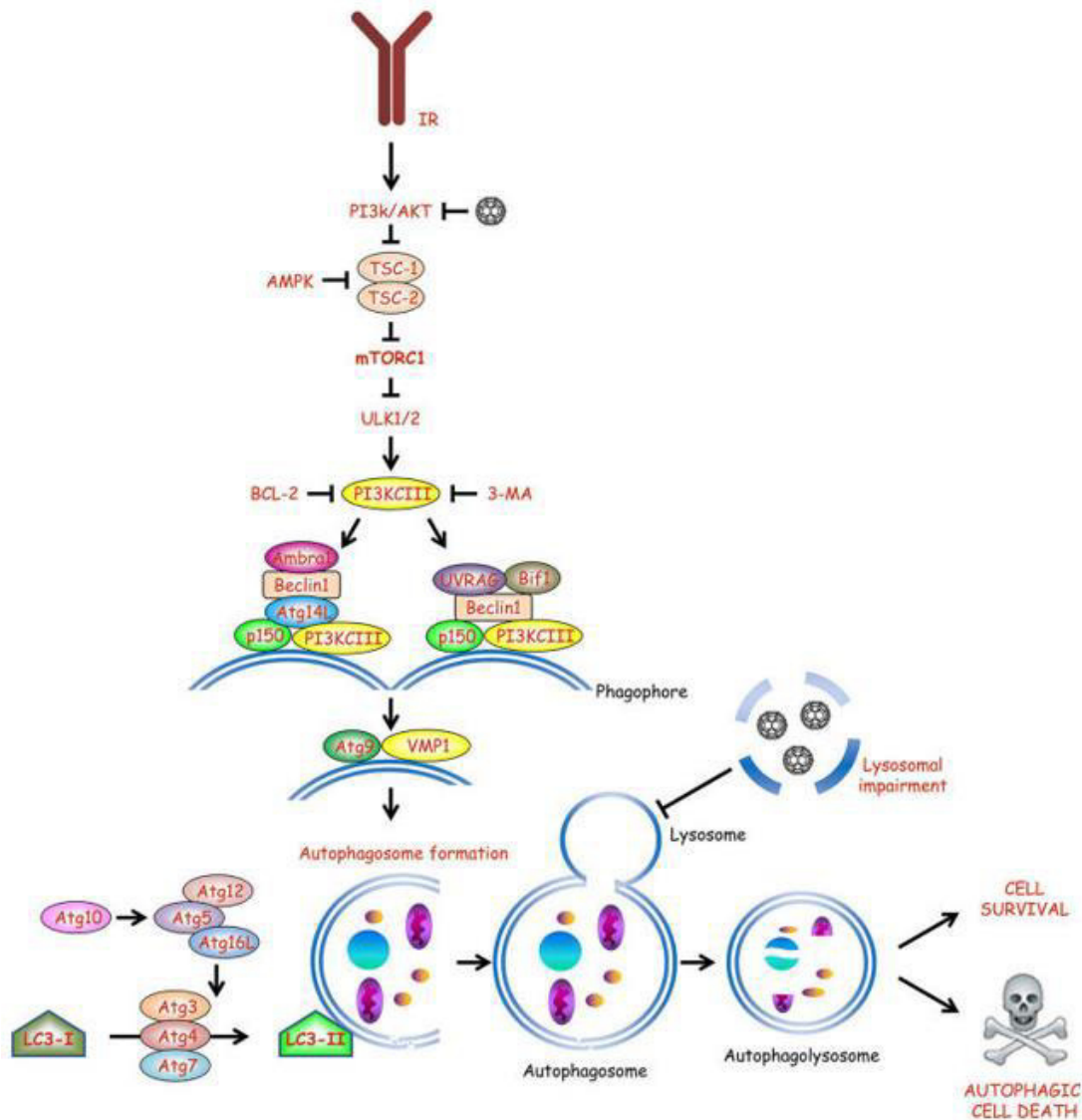


Figura 10: **Muerte celular regulada por autofagia mediado por nanomateriales.** Es un mecanismo de supervivencia en condiciones de privación de nutrientes. Aunque, genéticamente puede resultar MCR. NPs de óxido de hierro para desencadenar MCR por autofagia a través de la perturbación de la vía de mTOR. Las AuNPs pueden inducir bloqueo autofagia por deterioro lisosomal. Adoptado de: (Andón & Fadeel, 2012).

La microautofagia está mediada por componentes citotóxicos que se toman directamente del propio lisosoma. La autofagia mediada por chaperonas se ven involucradas proteínas como HSC-70 y LAMP-2A que son reconocidas por el receptor

de la membrana lisosoma-lisosoma y resulta su despliegue y su degradación, figura 10. Se ha reportado en estudios *in vitro* con células NKR (células de riñón de ratón) que las AuNPs dependiente de tamaño, inducen la formación de autofagolisosomas lo que induce MCR por autofagia (X. Ma et al., 2011).

Necrosis Regulada

La necrosis regulada es definida como un proceso de muerte celular controlado genéticamente que en última instancia dará lugar a la ruptura de la célula con características morfológicas importantes como granularidad citoplasmática, hinchazón de orgánulos y ruptura de la membrana plasmática. La necroptosis es la forma regulada de la necrosis mejor caracterizada (Vandenabeele et al., 2010). Las características de la necrosis regulada no son exclusivas de la necroptosis, sino que existen subclasificaciones que se incluyen en el proceso de necrosis regulada por la similitud en algunos aspectos del proceso; entre estos se encuentran: partanatos, oxitosis, ferroptosis, piroptosis, NETosis, CYPD; en la tabla 2 se muestran características generales de los diferentes tipos necrosis regulada (Vandenabeele et al., 2010) (Galluzzi et. al., 2014; Berghe et.al., 2014).

Necroptosis

La necroptosis es la forma regulada de la necrosis más estudiada y mejor caracterizada (Vandenabeele et al., 2010). La necroptosis posee un alto sistema de regulación dependiente de proteínas RIP (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase) este mecanismo de MCR, al igual que la apoptosis, también puede ser clasificada en extrínseca e intrínseca (Kroemer et al., 2009).

Vía extrínseca de necroptosis

Hasta la fecha, la señal mejor caracterizada que media la necroptosis es mediante ligación del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) a través de su ligando afín TNF-alfa, figura 11 (Fulda, 2013) Tsai et al., 2011).

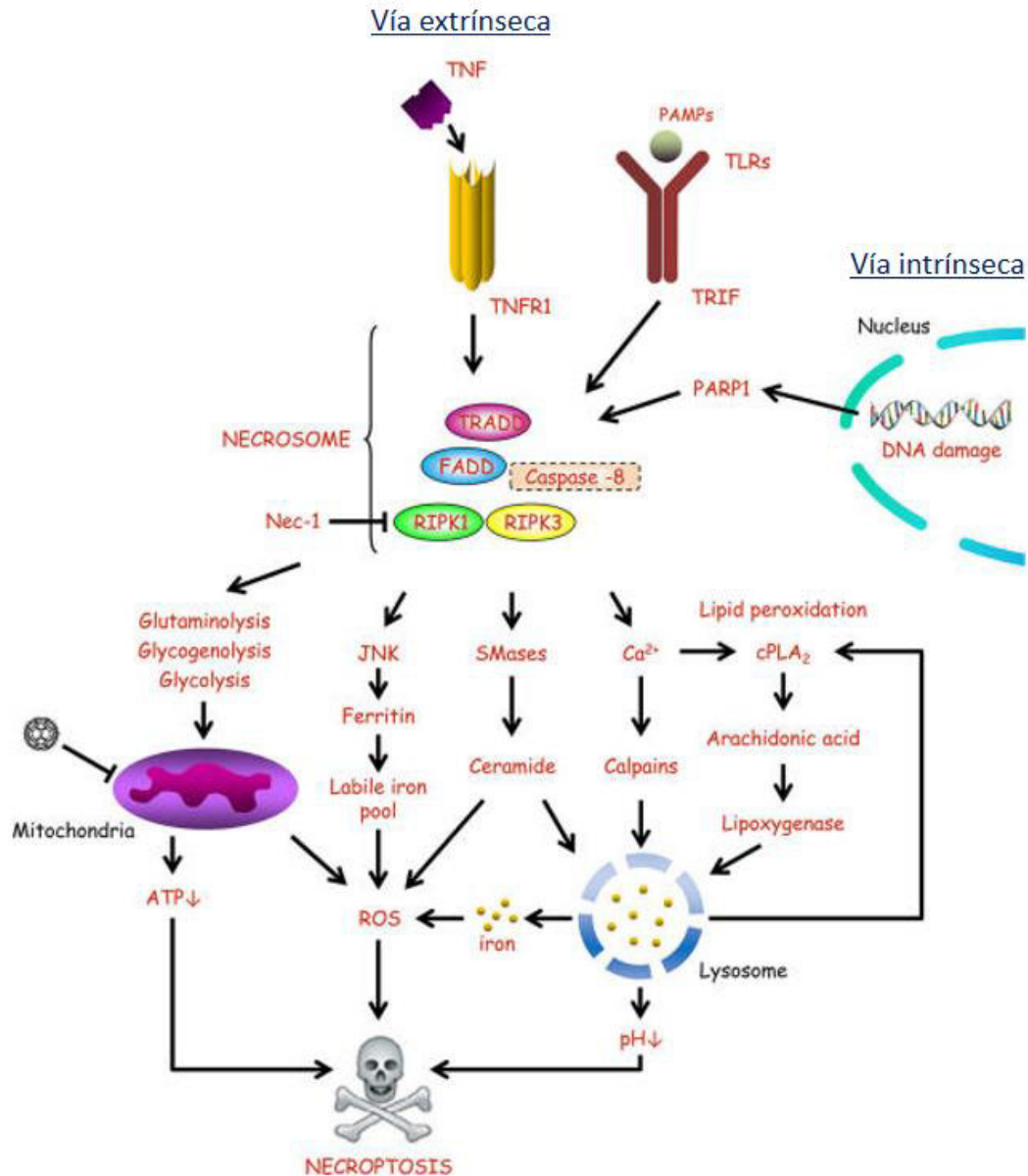


Figura 11. **Señalización de necroptosis inducida por nanomateriales.** Vía extrínseca, inicia con la unión del ligando TNF α , a receptores membrana específicos que se une a un complejo formado por caspasa-8, una proteína adaptadora FADD y RIPK1 y RIPK. Cuando la caspasa 8 es inactivada, RIPK1 Y RIPK3 se unen y promueven su autofosforilación, transfosforilación y formación del necrosoma. La fosforilación de RIPK3 propicia el reclutamiento de proteínas, que al translocarse a la membrana plasmática promueve la formación de poros en la misma; esto genera también un desbalance en el flujo de iónico causando la ruptura de la membrana; también se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que lleva a la permeabilización de la membrana mitocondrial, aumento de Ca²⁺ citoplasmático, y la inducción de necroptosis. La vía intrínseca se activa cuando hay un daño en el ADN. Extraído de: (Andón & Fadeel, 2012).

La vía extrínseca requiere de un estímulo externo a través de receptores TNF como TRAIL, FAS, TWEAK, (Vandenabeele et al., 2010)(Galluzzi et al., 2014), y la

formación del complejo I, el cual requiere la participación de moléculas, como TRADD (TNF receptor 1-associated death domain) TRAF1 (TNF receptor (TNFR) associated factor), RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1), figura 11. La caspasa 8 puede inducir apoptosis a través de la disociación de RIPK1 y RIPK3 y degradación de IAPs (complejo IIa) o por la formación del ripoptosoma y la presencia de cFLIP (complejo IIb). Cuando caspasa 8 se encuentra inhibida RIPK1 y RIPK3 son auto y transfosforiladas (Vanden Berghe et al., 2014), lo que activa proteínas como CrmA (cytokine response modifier protein A) o vIRA (viral inhibitor of RIP activation) y MLKL (mixed lineage kinase domain-like) conllevando a la formación un complejo llamado necrosoma, el complejo efector característico de la necroptosis (Galluzzi et al., 2014).

Las células que reconocen patógenos tras la unión de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a los receptores tipo toll (TLR), también pueden llevar a la formación del necrosoma. MLKL es la responsable de que la célula adquiera el fenotipo de muerte celular accidental debido a que produce una alteración en la continuidad de la membrana plasmática al formar poros (Fulda, 2013) y canales por donde el flujo de Na^+ aumenta dentro de la célula, conduciendo a un desbalance en la presión osmótica que conlleva a una gran entrada de Ca^{2+} , que provoca la pérdida de la función mitocondrial y la consecuente liberación ROS. Esto provoca un colapso en el gradiente electroquímico que afecta la cadena transportadora de electrones y conduce a la pérdida irreversible del potencial de membrana mitocondrial, lo que conlleva a una hinchazón de la célula y la expulsión abrupta del contenido intracelular DAMPs (patrones moleculares asociados a daño) al espacio extracelular (Belizario, Vieira-Cordeiro, & Enns, 2015). En un estudio reciente, se encontró que las NPs de germanio de 4 nm inducen muerte celular en células CHO K1 (ovario hámster), pero la muerte es inhibida en presencia de necrostatina 1 (inhibidor de necrosoma) (Y. H. Ma et al., 2011).

Vía intrínseca de necroptosis

La vía intrínseca de necroptosis, puede activarse cuando ocurre un daño en el ADN. Un daño en el ADN conlleva a la activación de PARP 1 (Poli ADP-Ribosa Polimerasa), que también promueve la formación del necrosoma, que activa a las calpaínas debido

a la liberación de Ca^{2+} citoplasmático y la producción de ROS. También requiere de la interacción de PGAM5L y PGAM5S, dos proteínas fosfatasa que causan la activación de Drp1 (dynamin-related Protein 1) y su translocación a la mitocondria independiente de RIPK1 y RIPK3 a través de procesos oxidativos TBH (tert-Butyl hydroperoxide). Este proceso de fusión es regulado a su vez por MFN-1 y MFN-2 (mitofusín-1 y mitofusín-2) y OPA1 (optix atrophy 1). Drp1 se une a Fis1 y Mff e induce fragmentación mitocondria; sin embargo, el citocromo c no es liberado como en la apoptosis (Belizário, Vieira-Cordeiro, & Enns, 2015).

Implicación de las especies reactivas de oxígeno en la muerte celular

Como se ha mencionado anteriormente, un factor importante en los procesos de muerte celular es el estrés oxidativo. Se originan cuando hay un aumento en la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS, por su siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) (Dalle-Donne, et al., 2003) (Eruslanov & Kusmartsev, 2010). Las ROS son subproductos del metabolismo aeróbico en las mitocondrias. Estas incluyen al anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales de hidroxilo (OH^\cdot), todos ellos tienen propiedades químicas inherentes que confieren reactividad a diferentes blancos biológicos. Normalmente se le asocian al estrés oxidativo, induciendo patologías al inducir daño a los lípidos, las proteínas y el DNA, figura 12 (Schieber & Chandel, 2014; Silva, Oyarzún & Olloquequi, 2015). Así como las ROS juegan un papel esencial en el metabolismo y en la proliferación celular, estas también pueden jugar un papel importante en distintos tipos de MCR. Altas concentraciones de ROS en la célula conducen a la muerte celular (Eruslanov & Kusmartsev, 2010). Algunos tipos de células, tales como L929 y MEFs, producen ROS en respuesta a la estimulación TNF. Debido a que ROS actúa como oxidante de fosfatasa MAP quinasa (MKPS), las cuales desregulan la vía de señalización JNK. Esto resulta en la activación de JNK prolongado y, posteriormente la muerte celular (Christofferson & Yuan, 2010).

<i>Necrosis reguladas emergentes</i>	<i>Características</i>
<i>Ferroptosis</i>	Este tipo de muerte se produce por una falla en el sistema Xc-Cys/Glu que no permite la quelación del hierro intracelular mediante un aumento en la producción de ROS a través de la inhibición de glutatión (GSH) y pérdida de a función de GPX4, lo que genera estrés oxidativo, peroxidación de lípidos, entrada de Ca ²⁺ y muerte celular.
<i>Oxytosis</i>	Este tipo de muerte se produce cuando el sistema Xc – Cys/Glu es inhibido por un exceso de Glu, lo que reduce los niveles intracelulares de ICys requeridos para la síntesis de glutatión (GSH), y activa 12 y 15 lipoxigenasa (LOX12) y LOX15 e inicia una producción de ROS, lo que produce un incremento en el GMP cíclico, abriendo canales de cGMP en la membrana plasmática permitiendo la entrada de Ca ²⁺ posteriormente se activa de la cascada de catepsinas-calpainas, lo que induce permeabilización de la membrana lisosomal o LMP (lysosomal membrane permeabilization).
<i>Partanatos</i>	Este tipo de muerte involucra la participación de PARP1 (Poly (ADP-ribose) polymerase), una enzima que transfiere grupos ADP-ribosa, la cual es inactivada durante la apoptosis. PARP1 induce la liberación de tAIF (truncated apoptosis-inducing factor) en la membrana mitocondial externa, lo que es asociado al desbalance en la producción de ROS y Ca ²⁺ .
<i>NETosis</i>	NOX1 es un metabolito de la familia NOX (NADPH oxidase family) que induce producción de ROS principalmente en neutrófilos, eosinófilos y células cebadas. La producción de ROS induce la liberación de NET (neutrophil extracellular traps) los cuales están compuestas de resto de cromatina e histonas, se considera un tipo de ETosis, sin embargo, esta no requiere activación de caspasas ni actividad de RIPK1.
<i>Pironecrosis</i>	Este tipo de muerte celular es Independiente de caspasa 1 y 11, pero dependiente del componente ASC (apoptosis-associated speck- like protein containing a CARD) del inflamosoma y de la proteína CTSB (cathepsin B), lo que resulta en la liberación de citocinas pro-inflamatorias y del mediado HMGB1 (high mobility group box 1) proceso que resulta en la muerte celular.
<i>CYPD</i>	Ciclofilin D regula la apertura de canales en la transición de le permeabilidad mitocondrial o MPT (Mitochondrial permeability transition) facilitando la translocación de NAD de la membrana interna mitocondrial al citoplasma, lo que induce una liberación de calcio del retículo endoplásmico y producción de ROS.

Tabla 2. **Tipos de necrosis regulada emergentes** (García- Juárez, 2017).

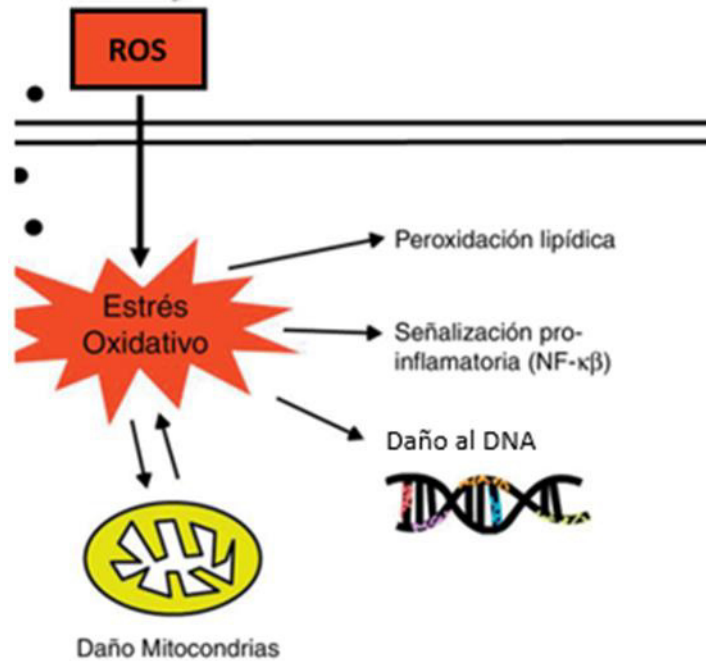


Figura 12. **Procesos celulares en los que está involucrado el estrés oxidativo.** Las ROS pueden generar peroxidación lipídica, dañando las membranas celulares; señalización pro-inflamatoria, causando autoinmunidad; daño al ADN, ocasionando mutaciones y/o daño a mitocondrias. Adaptado de: Silva., Oyarzún & Olloquequi, 2015.

La alta tasa de producción de ROS se compensa con una tasa igualmente alta de actividad antioxidante en la célula, esto para mantener el equilibrio redox. Si la célula no controla sus niveles de ROS, entonces es susceptible a la muerte celular inducida por el estrés oxidativo. Así que los niveles de ROS se determinan tanto por la tasa de producción, como también por la tasa de eliminación. Por lo tanto, en el estado de equilibrio, las células cancerosas pueden mostrar un aumento general de ROS en comparación con las células normales. Ya que las vías de señalización que responden al peróxido de hidrógeno se localizan en las fuentes de generación de ROS, permitiendo la activación de estas vías a pesar de la alta actividad antioxidante de las células cancerosas, las cuales la protegen contra la muerte celular inducida por el estrés oxidativo (Schieber & Chandel, 2014).

El papel de las ROS en la muerte celular puede ser como agente causal, efector de la muerte, o sólo un efecto secundario (Fleury, Mignotte, & Vayssière, 2002; Schieber & Chandel, 2014). Por ejemplo, un daño al ADN inducido por un agente

alquilante puede propiciar la vía intrínseca de la apoptosis, produciendo MOMP y provocando la liberación de ROS producido por el metabolismo aeróbico de la mitocondria. Sin embargo, el daño inicial puede propiciarse por una fuente de ROS diferente a la mitocondria, como la oxidación de NADPH por enzimas oxidasas (NOX), provocando el daño inicial al ADN o un daño directo en la mitocondria (Fleury, Mignotte, & Vayssière, 2002; Schieber & Chandel, 2014).

En varios reportes se ha demostrado de diferentes tipos de NPs pueden inducir un aumento de las ROS en la célula. En el estudio de Schaeublin y colaboradores, NPs aniónicas y catiónicas indujeron la producción de ROS. Sin embargo, se observó un aumento en la muerte celular de NPs de carga positiva debido a la interrupción del potencial de membrana mitocondrial y la estimulación de la señalización de calcio intracelular, respecto a las NPs de carga negativa en donde la muerte celular fue menor (Schaeublin et al., 2011).

Daño nuclear en la muerte celular regulada

Como ya se mencionó anteriormente tanto la apoptosis como la necroptosis son mecanismos de MCR que pueden activarse por un daño en el ADN. El ADN se encuentra unido a histonas nucleares que forman los nucleosomas. Las histonas son ampliamente modificadas por adiciones covalentes como la acetilación, metilación, ubiquitinación, sumoilación, poli (ADP-ribosil) acción y la fosforilación. Estos "códigos de histonas" regulan la expresión génica y un subconjunto son sensibles al daño y reparación del ADN (Marks et al., 2001). La histona H2AX es una de las múltiples variantes de la histona H2A. Se fosforila ante las roturas de las cadenas del ADN ya sea por agentes patológicos o fisiológicos. Por ejemplo, la irradiación de luz ultravioleta, agentes alquilantes, otros productos químicos que dañan el ADN, la inhibición de la histona desacetilasa, reordenamiento de inmunoglobulina, remodelación de la cromatina y la meiosis (Cleaver, 2011) o como se mencionó anteriormente un aumento de ROS pueden generar un daño directo en el ADN. En la Apoptosis, se ha observado que la histona H2AX es fosforilada en el extremo C-

terminal en el sitio Ser139 por c-Jun NH₂ quinasa (JNK1). JNK1 es un miembro del grupo de la proteína quinasa activada por mitógeno (Baritaud et al., 2012). En otros tipos de MCR dependientes de caspasas se ha observado que la histona H2AX es fosforilada por las tres principales fosfatidilinositol-3-OH quinatas relacionadas quinasa (PIKKs): ataxia telangiectasia mutada (ATM), en ATM y Rad-3 relacionados (ATR), o la proteína quinasa dependiente de ADN (DNAPK) (Baritaud et al., 2012). Aunque la función de H2AX se asocia principalmente con la reparación de daños en el ADN y el empaquetamiento del ADN, la fosforilación de las histonas es clave en la MCR (Marks et al., 2001). Sin embargo, cuando hay daño al ADN en una célula, en condiciones normales este puede ser reparado; de no ser así, la célula puede dirigirse a apoptosis o entrar en un estado de senescencia (un estado de detención del ciclo celular irreversible). P53 media parte de la respuesta de las células al daño del DNA, ya sea mediante la estimulación de la reparación del mismo o mediante el inicio de la apoptosis.

P53 es un factor de transcripción que se une a los promotores de sus genes blanco y recluta la maquinaria transcripcional para activar la expresión de ciertos genes. Cientos de genes blanco de p53 han sido identificados, estos incluyen p53AIP1, BAX, caspasa-6, Fas, NOXA, PUMA, así como otros (Riley *et al.*, 2008).

Durante el ciclo celular puede ocurrir la regulación en diferentes fases; primeramente, la fase G1, en la cual la célula se prepara para llevar a cabo la síntesis del ADN; después la síntesis de ADN ocurre durante la fase S; seguida de la fase G2, en donde la célula se prepara para la mitosis. Las fases G1, S, G2 y M son las subdivisiones en las que tradicionalmente se divide el ciclo celular, figura 13 (Vermeulen *et al.* 2003). Las cinasas dependientes de ciclina (CDK) son una familia de enzimas multifuncionales que pueden modificar diversos sustratos proteicos implicados en la progresión del ciclo celular. Puntualmente, fosforilan sustratos activándolos o inactivándolos. Para ello, requieren de la presencia de ciclinas para activarse. Las ciclinas son proteínas regulatorias, las cuales son claves en la transición de la célula a las diferentes fases del ciclo celular, gracias a que activan a las CDKs uniéndose a ellas (Vermeulen *et al.* 2003).

Una de las causas por las que se reduce la proliferación, es el arresto en el ciclo celular (Paruthiyil *et al.* 2004). Se ha determinado mediante ensayos de *Western Blot* que el arresto en el ciclo celular puede ocasionarse por un decremento en las ciclinas (Lv *et al.* 2013; Nigam *et al.* 2009). También se ha observado que múltiples quimioterapéuticos son capaces de inducir un arresto en el ciclo celular, esto debido a que p53 funciona activando la transcripción de genes como p21, cuyo producto proteico produce un arresto en el ciclo celular (Lv *et al.* 2013; Cho *et al.* 2013; Jiménez *et al.* 2001; Nigam *et al.* 2009). Es así como, tanto la inducción de muerte celular como un arresto en el ciclo celular, son blancos importantes de los tratamientos contra el cáncer.

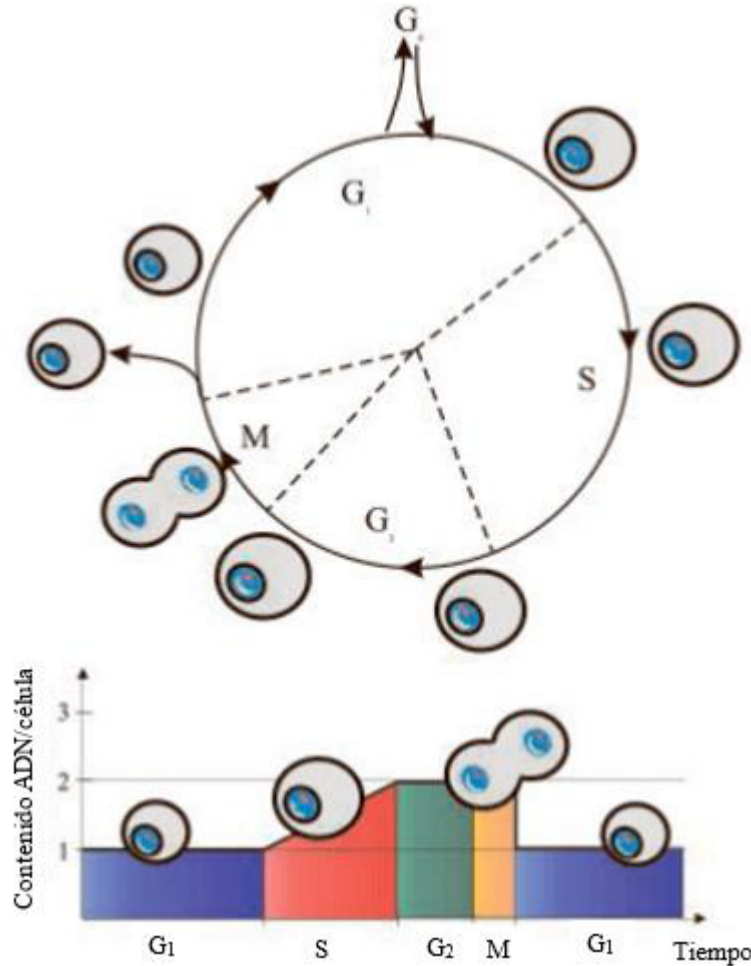


Figura 13. **Relación en las fases del ciclo celular y el histograma de ADN.** Extraído de <https://chemometec.com/cell-counting-assays/cell-cycle-analysis/>

JUSTIFICACIÓN

Las leucemias son malignidades hematológicas en las que diferentes tipos de leucocitos que adquieren la capacidad de proliferar de forma no controlada. La progresión de las leucemias puede ser lenta o acelerada y pueden afectar células de la línea mieloide o de la línea linfoide. Las principales formas de tratamiento consisten en quimioterapias, inhibidores de quinasas o inmunoterapias. Sin embargo, estas terapias carecen de selectividad por lo que son capaces de afectar a las células sanas ocasionando múltiples efectos secundarios indeseables para el paciente. Además, las células leucémicas pueden desarrollar resistencia a los tratamientos provocando que la enfermedad reemerja. Por ello, es de suma importancia, el desarrollo de nuevas terapias que mantengan selectividad sobre células sanas, pero que tengan la capacidad de inducir muerte sobre las células leucémicas. En este sentido, las nanopartículas de oro recubiertas con quitosano (AuNPs-Qts) han mostrado inducir efectos citotóxicos importantes en células cancerosas generando características de muerte celular regulada (MCR), y manteniendo biocompatibilidad con células sanas no tumorales. Sin embargo, sigue sin conocerse el mecanismo de MCR que inducen las AuNPs-Qts en células leucémicas. Por lo que conocer el mecanismo de muerte celular que inducen las AuNPs-Qts en células cancerosas nos permitirá eficientizar su acoplamiento con otros agentes y así inducir varios tipos de muerte celular evitando resistencia por las células cancerosas, para en un futuro poder ofrecerla como una nueva posible alternativa en el tratamiento de las leucemias u otros tipos de cáncer.

HIPÓTESIS

Las nanopartículas de oro recubiertas con quitosano (AuNPs-Qts) inducen Muerte Celular Regulada dependiente de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en líneas celulares leucémicas K562 y CEM.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la implicación de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en el mecanismo de muerte celular inducido por AuNPs-Qts en líneas celulares K562 y CEM.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar y caracterizar las nanopartículas de oro recubiertas con quitosano de 1-10 nm.
2. Analizar la citotoxicidad de las AuNPs-Qts en líneas celulares leucémicas CEM y K562, y PBMC.
3. Evaluar la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) inducido por las AuNPs-Qts en líneas celulares leucémicas K562 y CEM.
4. Determinar el daño a nivel mitocondrial y nuclear en células CEM y K562 inducido por los ROS.
5. Analizar la implicación de las Especies Reactivas de Oxígeno en el mecanismo de muerte celular inducido por AuNPs-Qts en células CEM y K562.

METODOLOGÍA

Síntesis de nanopartículas de oro recubiertas con quitosano

La síntesis de las nanopartículas se basó en la oxidación-reducción de los reactivos, mediante el método de Turkevich (Turkevich, et al., 1951). Las nanopartículas de oro se elaboraron a partir de ácido cloroáurico a una concentración de 2 mM y de una solución ácida de quitosano al 2% p/v. Se tomaron 2 mL de la solución de quitosano y se agregaron 6 mL de ácido cloroáurico 2 mM (relación 1:3). Posteriormente, la solución se mantuvo en agitación continua durante 30 min a temperatura ambiente; en seguida, la solución se expuso a una plancha a una temperatura de $95 \pm 5^\circ\text{C}$, se mantuvo en agitación, aproximadamente 15 min o hasta que la solución viró a un color rojo vino. La suspensión de las nanopartículas se dejó en agitación continua a temperatura ambiente de 12 a 24 h. Pasado el tiempo de reposo las AuNPs con quitosano se filtraron y fueron re suspendidas en medio cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (CORNING Cellgro ®), en una relación 1:1.

Caracterización de las nanopartículas de oro recubiertas con quitosano

Para caracterizar las nanopartículas, se midió el plasmón de resonancia y el tamaño. El plasmón de resonancia, nos permitió conocer si la síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo de forma correcta; ya que esta es una propiedad de algunos materiales en estado sólido y en tamaño nanométrico como el oro. Este ensayo se realizó mediante espectroscopia de luz ultravioleta visible (Uv-vis), en donde utilizamos una muestra directa de nuestras nanopartículas de aproximadamente 20 μL , la cual la colocamos sobre el lector del espectrofotómetro Nanodrop (Thermo scientific Nanodrop, 2000c). Una vez que estaba confirmada la síntesis de nanopartículas de oro, se midió el tamaño y el potencial Zeta de las AuNPs-Qts, para ello se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) mediante un analizador de la distribución de tamaño de partículas en suspensión Nanosizer. Por lo tanto, se realizaron diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10000 con agua mili Q; en seguida, se realizaron las mediciones correspondientes para cada concentración en el Nanosizer. El tamaño se obtuvo al cuantificar la dispersión de la luz provocada por la velocidad y movimientos aleatorios de las partículas basado en el

movimiento browniano de las mismas. El potencial Zeta es una medición sumamente importante con la que se determina la fuerza de repulsión entre las partículas, lo que nos permite saber si estas tienden a aglomerarse o a mantenerse diluidas de forma homogénea en solución. Ambas mediciones se realizaron antes y después de ser diluidas en el medio de cultivo RPMI.

Cultivos celulares

Las líneas celulares neoplásicas que se utilizaron en el presente proyecto fueron K562 (Leucemia Mieloide Crónica) y CEM (Leucemia Linfoide Aguda de células T), las cuales se encontraron presentes en el banco de líneas celulares del LIV de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Las PBMC y los linfocitos, fueron obtenidos de donadores sanos (sin signos clínicos de enfermedad). Todos los cultivos se utilizaron siguiendo los protocolos estándares propuestos por la American Type Culture Collection (ATCC). Las células fueron mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB [CORNING Cellgro®], 2mM L-glutamina y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (GIBCO® by Life Technologies™), y fueron incubadas a 37°C en una atmósfera controlada, humidificada, con 5% ± 0.5% de CO₂. Los lavados se realizaron agregando buffer de fosfato salino (PBS, pH 7.2) (GIBCO by Life Technologies) después de retirar el medio del contenedor. El conteo celular se realizó utilizando azul tripán (solución 0.4% SIGMA-ALDRICH®), una cámara de Neubauer y un microscopio óptico (Primo Star ZEISS®).

Extracción de PBMC

Como control para los experimentos de citotoxicidad se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés *peripheral blood mononuclear cells*), como control sano no tumoral. Para la extracción se requirieron individuos sanos, a los cuales se les extrajo una muestra de sangre de 3 mL en tubos con heparina de sodio. Para la separación de células por gradiente de densidad se realizó una dilución de la sangre 1:1 en PBS para posteriormente vaciar la dilución lentamente en tubos cónicos que contenían un volumen de Ficoll atemperado

(Histopaque®-1077), en una proporción 1:1. Una vez realizada la dilución se centrifugó por media hora a 1600 RPM en una centrifuga plana sin freno. Ya que las células fueron separadas por gradiente mediante centrifugación, se forman varias capas celulares, de la cual se toma la población correspondiente a las PMBC. Finalmente, las células son contadas en cámara de Neubauer y mantenidas en medio de cultivo RPMI 10%.

Ensayos de citometría de flujo

Para realizar los ensayos de citometría de flujo, se realizó de la siguiente manera. Se sembraron 50,000 células por pocillo en un volumen de 100µL en placas de 96 pocillos (Corning Inc. Costar®, USA), en seguida se agregaron diferentes concentraciones de tratamiento y se dejó incubar a 37°C con atmósfera controlada humidificada de 5% ± 0.5% CO₂, durante 24h. Concluido el tiempo de incubación, las células se recolectaron en microtubos de 1.5 mL (Eppendorf), se lavaron con PBS y finalmente se centrifugaron a 1600 RPM por 10 min a temperatura ambiente (Centrifuge 5415D Eppendorf, Hamburg). Después, se retiró el sobrenadante de la solución; en seguida, se realizó el marcaje fluorescente correspondiente. Las muestras en los tubos se analizaron por la técnica de citometría de clasificación de células marcadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) en un BD Accuri™ C6 Flow Cytometer y la población (10,000 células) fue analizada utilizando un software FlowJo.

Evaluación de características de la muerte celular: exposición de fosfatidilserina y permeabilidad de la membrana plasmática

Para analizar las características de muerte celular regulada, se sembraron 50,000 células por pozo y en el caso de las PBMC se sembraron 300,000 en volumen de 100 µL en placas de 96 contenedores de fondo redondo (Corning Inc. Costar®, USA), éstas fueron tratadas inmediatamente con diferentes concentraciones de AuNPs-Qts (0µM, 25 µM, 50 µM y 75 µM) bajo condiciones normales de cultivo (37°C, 5 % CO₂) durante 24h. Posteriormente se recuperaron las células mediante lavados con PBS y se centrifugaron 10 min a 1600 RPMI a temperatura ambiente, el sobrenadante se decantó

y se agregó la tinción de Anexina V y Yoduro de propidio (AnnV/PI), se incubaron durante 20 min a 4°C y finalmente se leyeron las muestras en el citómetro de flujo (BD Accuri™ C6 | Flow Cytometer | BD Biosciences), para su posterior análisis en el FlowJo software.

Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante DCFDA

Para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno se utilizó un marcaje DCFDA (dichlorofluorescein diacetate) un reactivo fluorogénico que penetra en la célula y es desacetilado por esterasas en compuestos no fluorescentes, el cual en presencia de especies reactivas de oxígeno es convertido en 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), un compuesto altamente fluorescente. Para este ensayo las células fueron sembradas de la misma forma anteriormente descrita y tratadas con la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) de AuNPs-Qts durante 24h. Posteriormente se recuperaron las células y se hicieron lavados con PBS, se centrifugaron 10 min, 1600 RPM, se decantaron y marcaron con 200 µL de 2.4µM de DCFDA en 200 µL de PBS, por muestra. Se incubaron las muestras por 20 min con las tapas abiertas a 37°C con atmósfera controlada humidificada de 5% ± 0.5% CO₂. Después se agregó 300 µL de PBS por muestra y se centrifugaron 10 min a 1600 RPM, se decantó y luego se agregaron 100 µL de PBS. Finalmente se pasó a leer en el citómetro de flujo (BD Accuri™ C6 Flow cytometer) por el canal FL-1 y posteriormente se analizó por FlowJo software.

Evaluación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial mediante marcaje con TMRE

Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial se utilizó el marcaje TMRE (Etil éster tetrametilrodamina) el cual es una molécula que en células con potencial de membrana mitocondrial activo es secuestrado y retenido. Una vez este se pierde y la mitocondria es despolarizada, el TMRE es liberado, lo cual puede ser medido mediante la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo. Para este ensayo las células fueron sembradas de la misma forma anteriormente descrita y tratadas con la CC₅₀ de

AuNPs-Qts durante 24h. Posteriormente se recuperaron las células y se hicieron lavados con PBS. Se centrifugaron 10 min, 1600 RPM. Se decantaron y se utilizaron 200 μ L de buffer (200 μ L de PBS y 4 μ L de TMRE (50nM) por muestra). Se incubaron las muestras por 20 min con las tapas abiertas 37°C con atmósfera controlada humidificada de 5% \pm 0.5% CO₂. Después se agregó 300 μ L de PBS por muestra y se centrifugaron 10 min a 1600 RPMI, se decantó y luego se agregaron 100 μ L de PBS. Finalmente se pasó a leer al citómetro de flujo por FACS (BD Accuri TM C6 Flow cytometer) en el canal FL-3 y posteriormente se analizó por FlowJo software.

Evaluación del daño nuclear

-Análisis de γ -H2AX

Para la detección del daño generado por las AuNPs-Qts en células leucémicas, se determinó mediante la cuantificación de la histona H2AX fosforilada (γ -H2AX), ya que la cantidad de γ -H2AX es proporcional a la cantidad de daño. Para este ensayo se sembraron alrededor de un millón de células en placas de 6 contenedores de fondo plano (Corning Inc. Costar®. USA), inmediatamente fueron tratadas con la CC₅₀ de AuNPs-Qts las cuales una vez tratadas fueron incubadas durante 24h. Posteriormente se recuperaron las células mediante lavados con 4 mL de PBS (por muestra) y recolectadas en tubos cónicos de 15 mL, luego fueron centrifugadas a 4°C, 1500 rpm por 10 min. Posteriormente se decantó y se procedió a fijar las células mediante el método de burbujeo con metanol al 100%, durante 1 min. Luego de ser fijadas las células se mantienen a -20°C durante toda la noche. Después se realizaron lavados con 2 mL de PBS +2% SFB por muestra mediante centrifugación a 1600 rpm, 10 min; en seguida, se llevó a cabo la rehidratación o bloqueo con una solución de PBS + 10% de SFB, se dejó durante 30 min a 4°C, finalmente, las células se lavaron con PBS + 2% SFB. Al finalizar, se agregó un anticuerpo primario específico para la forma fosforilada de la histona H2AX (γ -H2AX), en una dilución 1:100 (Kiner; et al., 2008). Este se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante. A los controles negativos se les agregó únicamente PBS con 2% SFB. Después, se realizaron lavadas con PBS +2% SFB por muestra mediante centrifugación a 1600 rpm, 10 min.

Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario, en dilución 1:100, en este experimento se utilizó un anti-mouse acoplado a FIT-C que es detectado por citómetro, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min en agitación constante en oscuridad y se dejó durante toda la noche a 4°C. Finalmente se realizaron dos lavados con PBS + 2% SFB, se pasó a leer al citómetro por el canal FL-1 (BD Accuri TM C6 Flow cytometer), el análisis se realizó por FlowJo software.

-Evaluación de la expresión de p53

Para la detección de la expresión de p53 generado por las AuNPs-Qts en células leucémicas, se determinó mediante la detección de la proteína en citómetro de flujo. Para este ensayo se sembraron alrededor de un millón de células en placas de 6 contenedores de fondo plano (Corning Inc. Costar®. USA), inmediatamente fueron tratadas con la CC₅₀ de AuNPs-Qts las cuales una vez tratadas fueron incubadas durante 24h. Posteriormente se recuperaron las células mediante lavados con 4 mL de PBS (por muestra) y recolectadas en tubos cónicos de 15 mL, luego fueron centrifugadas a 4°, 1500 rpm por 10 min. Posteriormente se decantó y se procedió a fijar las células mediante el método de burbujeo con metanol al 100%, durante 1 min. Luego de ser fijadas las células se mantienen a -20°C durante toda la noche. Después se realizaron lavadas con 2 mL de PBS +2% SFB por muestra mediante centrifugación a 1600 rpm, 10 min; en seguida, se llevó a cabo la rehidratación o bloqueo con una solución de PBS + 10% de SFB, se dejó durante 30 min a 4°C, finalmente, las células se lavaron con PBS + 2% SFB. Al finalizar, se agregó un anticuerpo primario específico para p53, en dilución 1:100. Este se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante. A los controles negativos se les agregó únicamente PBS + 2% SFB. Después, se realizaron lavadas con PBS +2% SFB por muestra mediante centrifugación a 1600 rpm, 10 min. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario, en este experimento se utilizó un anti-mouse acoplado a FIT-C, en dilución 1:100 que es detectado por citómetro, se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 min en agitación constante en oscuridad y se dejó durante toda la noche a 4°C. Finalmente se realizaron dos lavados con PBS + 2% SFB, se pasó a leer al citómetro por el canal FL-1 (BD Accuri TM C6 Flow cytometer), el análisis se realizó por FlowJo software.

-Análisis del ciclo celular

Para evaluar el ciclo celular se utilizó un marcaje de yoduro de propidio (Propidium Iodide o PI), debido a que este es un agente intercalante de ácidos nucleicos como el DNA y RNA, lo que nos permite determinar en qué fase del ciclo celular se encuentra una célula dependiendo de la intensidad de fluorescencia. Las células en fase de crecimiento o G0/G1 tienen una menor proporción de DNA que en una célula en fase de síntesis o fase S, donde el DNA es duplicado, y finalmente en fase G2/M donde la célula está previa a entrar en división. Para este ensayo se sembraron alrededor de un millón de células en placas de 6 contenedores de fondo plano (Corning Inc. Costar®. USA), inmediatamente fueron tratadas con la CC₅₀ de AuNPs-Qts e incubadas durante 24h. Posteriormente se recuperaron las células mediante lavados con 4 mL de PBS (por muestra) y recolectadas en tubos cónicos de 15 mL, luego fueron centrifugadas a 4°, 1500 rpm por 10 min. Posteriormente se decantó y se procedió a fijar las células mediante el método de burbujeo con etanol al 70% (30% de PBS) durante 1 min. Luego de ser fijadas las células se mantienen a -20°C durante 1 hora como mínimo. Después se realizaron lavados con 2 ml de PBS mediante centrifugación a 4°, 1500 rpm, 10 min. Posteriormente se agrega un buffer (RNAasa 50 µg/ml, 100 µl de PBS por muestra) y es incubado durante 20 minutos a temperatura ambiente, al finalizar el lapso se agregó un buffer de Ioduro de propidio (1mg/mL) (5 µl + 100 µl de PBS), se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se pasó a leer al citómetro por el canal FL-2 (BD Accuri TM C6 Flow cytometer), el análisis se realizó por FlowJo software.

Determinación de la formación de autofagosomas

Para determinar la presencia de autofagosomas, se utilizó un kit de detección específico de autofagosomas, CYTO-ID® Autophagy detection kit. Este nos permite medir vacuolas autofágicas, controlando el flujo autofágico en células vivas inhibidas por lisosomas por lo cual, se utiliza un colorante que identifica selectivamente las vacuolas autofágicas acumuladas, mediante la cuantificación de LC3-II, molécula esencial en la formación de los autofagosomas. Para esto, se sembraron 50,000 células por pozo, en un volumen de 100µL en placas de 96 contenedores de fondo redondo (Corning Inc. Costar®. USA), se pre incubaron durante 30 minutos a 37°C, 5% de CO₂, spautina-1

(15 μ M), después fueron tratadas con la CC_{50} de AuNPs-Qts durante 24h. Finalizado el tiempo de exposición de tratamiento, las células se recuperaron con 200 μ L de PBS, se centrifugaron a 1800 RPM durante 10 min, se decantaron y se marcaron con 100 μ L de medio RPMI sin SFB [CORNING Cellgro®], y 0.5 μ L de CYTO-ID® Autophagy detection kit, se dejaron incubar durante 30 min con las tapas abiertas a 37°C con atmósfera controlada humidificada de 5% \pm 0.5% CO_2 . Posteriormente, se lavaron con 200 μ L de PBS, se centrifugaron a 1800 RPM durante 10 min, se decantó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 100 μ L de PBS. Finalmente, se pasó a leer en el citómetro de flujo (BD Accuri TM C6 Flow cytometer) por el canal FL-1 y posteriormente se analizó por FlowJo software.

Análisis de la activación de la caspasa-3

Para analizar si la muerte celular regulada inducida por las AuNPs-Qts involucra la activación de caspasa-3, se sembraron 100,000 células por pozo en volumen de 200 μ L en placas de 96 contenedores de fondo redondo (Corning Inc. Costar®. USA), éstas fueron tratadas inmediatamente la CC_{50} de las AuNPs-Qts bajo condiciones normales de cultivo (37°C, 5 % CO_2) durante 24h. Finalizado el tiempo de exposición de tratamiento, las células se recuperaron con 200 μ L de PBS, se centrifugaron a 2100 RPM durante 5 min, se decantaron y se marcaron con 1500 μ L de medio RPMI sin SFB [CORNING Cellgro®], y 0.5 μ L de FITC-DEV-FMK, se dejaron incubar durante 30 min con las tapas abiertas a 37°C con atmósfera controlada humidificada de 5% \pm 0.5% CO_2 . Posteriormente, se centrifugaron a 3000 RPM durante 5 min, se decantó el sobrenadante y el pellet resultante se lavó con 250 μ L PBS, este proceso se lavado se realizó dos veces. Al finalizar el pellet resultante, se resuspendió en 200 μ L de PBS y se analizó en el citómetro de flujo (BD Accuri TM C6 Flow cytometer) por el canal FL-1 y posteriormente se analizó por FlowJo software.

Análisis de muerte celular por citometría de flujo utilizando distintos inhibidores de muerte: NAC, Spautina-1, Q-VD-OPH y Necrostatina-1

Para determinar la dependencia de ROS, autofagosomas, caspasas, y del necrosoma en la muerte celular inducida por las AuNps-Qts, se utilizaron, a la N-acetilcisteína (NAC)

como inhibidor de ROS, spautina-1 como inhibidor de la formación de autofagosomas, Q-VD-OPH como inhibidor de caspasas y a la Necrostatina-1 (Nec-1) como inhibidor de necrosoma. Para esto, se sembraron 50,000 células por pozo, en un volumen de 100 μ L en placas de 96 contenedores de fondo redondo (Corning Inc. Costar®. USA), se pre incubaron durante 30 minutos a 37°C, 5% de CO₂, con NAC (5mM), Spautina-1 (15 μ M), Q-VD-OPH (10 μ M) y Nec-1(50 μ M), antes de agregar a las AuNPs-Qts durante 24h. Posteriormente se utilizó la tinción Anexina V y PI para la cuantificación de la muerte como se mencionó anteriormente en el apartado de citometría de flujo.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa Graphpad Prism5. Todos los resultados mostrados representan la media \pm desviación estándar de tres ensayos independientes realizados por triplicado. Las diferencias estadísticas se realizaron mediante la prueba estadística de t de Student y se consideraron significativos los valores * p <0.05.

RESULTADOS

Caracterización de nanopartículas de oro recubiertas con quitosano: plasmón de resonancia

La síntesis de las nanopartículas de oro recubiertas con quitosano (AuNPs-Qts) se realizó mediante el método químico de Turkevich, basado en la oxidación-reducción de sus agentes precursores de síntesis; es decir, el quitosano soluble y el ácido tetracloroáurico. Una vez concretada la síntesis de las AuNPs-Qts, se analizó el plasmón de resonancia; una característica de los metales en estado nanométrico. El análisis se realizó mediante espectroscopia ultra violeta visible (UV-Vis), para ello se utilizó un equipo nanodrop. En la figura 14, se puede observar la banda máxima de absorción de las AuNPs-Qts a una longitud de onda en 520 nm, correspondiente con el plasmón de resonancia del oro en estado nanométrico. Este resultado nos demuestra que se obtuvo una síntesis correcta de nanopartículas de oro.

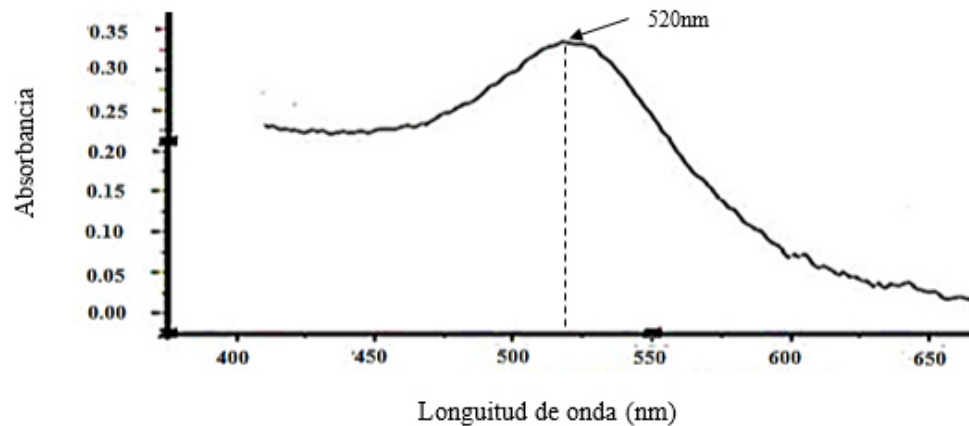


Figura 14. Análisis del plasmón de resonancia de AuNPs-Qts. El análisis se realizó mediante espectroscopia UV-Vis. La banda máxima de absorción de las AuNPs-Qts se encuentra en 520 nm, lo que corresponde con el plasmón de resonancia de oro en estado nanométrico.

Caracterización de nanopartículas de oro recubiertas con quitosano: tamaño

Una vez concluida la síntesis de nanopartículas de oro se continuó con el análisis del tamaño de las AuNPs-Qts; para ello, se utilizó un analizador de distribución de tamaños de partículas en suspensión (Nanosizer), el cual se basa en la medición del movimiento browniano y su velocidad, para determinar el tamaño. En la figura 15, podemos observar que las nanopartículas sintetizadas se encuentran en un tamaño de entre 1-10 nm, con una polidispersidad de 0.3, lo cual nos indica una uniformidad en el tamaño del 70% de las nanopartículas obtenidas.

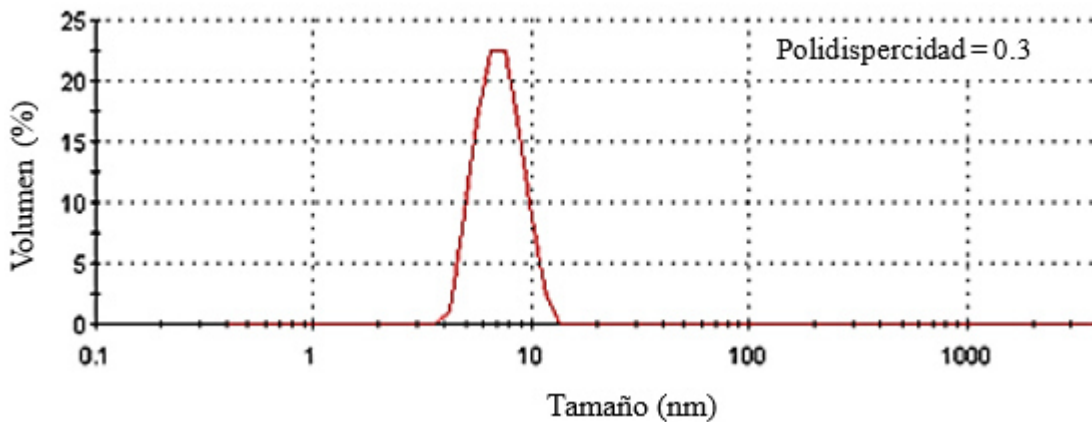


Figura 15. Análisis del tamaño de las AuNPs-Qts. El análisis del tamaño se realizó mediante distribución dinámica de la luz (DLS). Se puede observar un promedio del tamaño menor a 10 nm, con una polidispersidad del 0.3.

Análisis de la muerte celular regulada inducida por las AuNPs-Qts en células sanas no tumorales PBMC y en células leucémicas K562 y CEM

Una vez que se caracterizó a las AuNPs-Qts, se evaluó si inducen características bioquímicas de muerte celular regulada como la exposición de fosfatidilserina (señal cósmeme) y permeabilización de la membrana plasmática, en dos líneas celulares leucémicas K562 (Leucemia Mieloide Crónica) y CEM (Leucemia Linfocítica Aguda-T). Esto se realizó mediante citometría de flujo, utilizando un marcaje con Anexina V para medir la exposición de fosfatidilserina y Yoduro de propidio, un agente intercalante del ADN impermeable a la membrana plasmática, que solo se internaliza si la membrana plasmática perdió su permeabilidad. Para ello, se utilizaron diferentes concentraciones de AuNPs-Qts (25 μ M, 50 μ M y 75 μ M), durante 24h. En la figura 16, se observan los dot plots arrojados por el citómetro de flujo, los resultados muestran que al aumentar la concentración de las AuNPs-Qts en ambas líneas celulares, hay un aumento en el porcentaje de células con marcaje doble positivo (positivo para Anexina V y Yoduro de propidio). En este sentido, se observa claramente que la toxicidad de las AuNPs-Qts es dependiente de concentración, siendo la concentración citotóxica media (CC₅₀) de 25 μ M en células K562 y CEM a las 24h de tratamiento. En el apartado B de la figura 3, podemos observar los resultados en una gráfica de puntos, estos fueron realizados tres veces por triplicado. Una vez confirmado que las AuNPs-Qts inducen muerte celular dependiente de concentración en células leucémicas, se decidió analizar la toxicidad en células sanas no tumorales. Para ello, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC), obtenidas de donadores sanos sin signos clínicos de enfermedad, como un control de células no cancerosas. Tomando en cuenta que la concentración citotóxica media (CC₅₀) de las células leucémicas K562 y CEM es de 25 μ M de AuNPs-Qts, y la CC₁₀₀ es de 75 μ M de AuNPs, se realizó la misma curva dosis respuesta; este ensayo también se llevó a cabo por citometría de flujo, utilizando un marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio. En la figura 16 se puede observar como las AuNPs-Qts inducen baja toxicidad en células sanas a las CC₅₀ y CC₁₀₀ de las células leucémicas, estos resultados sugieren una selectividad del tratamiento hacia las células leucémicas.

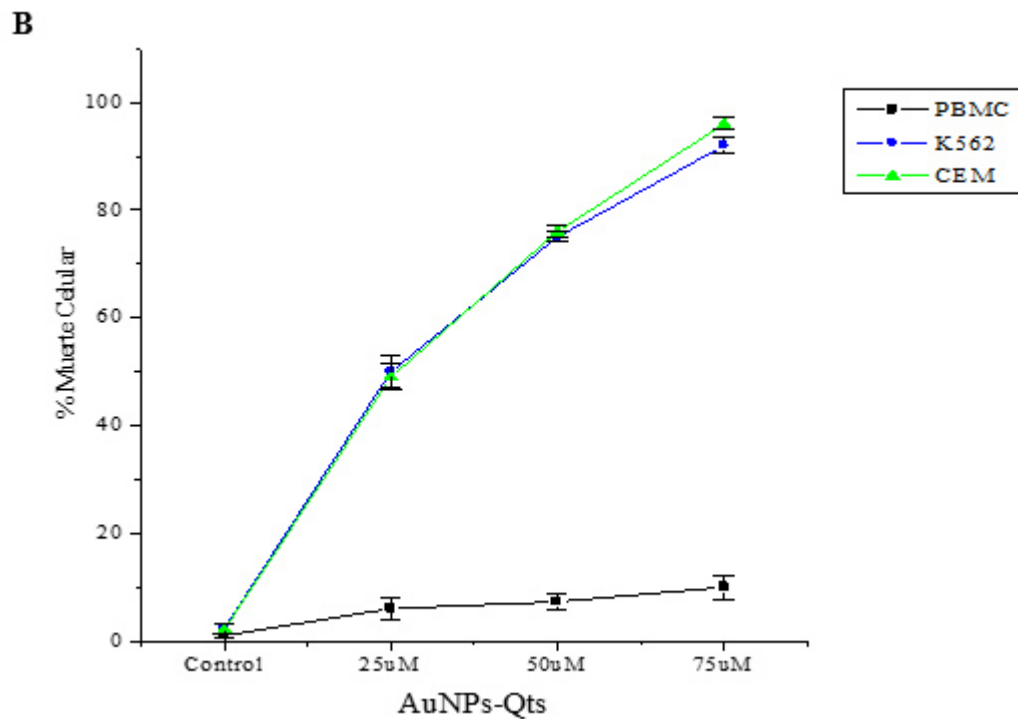
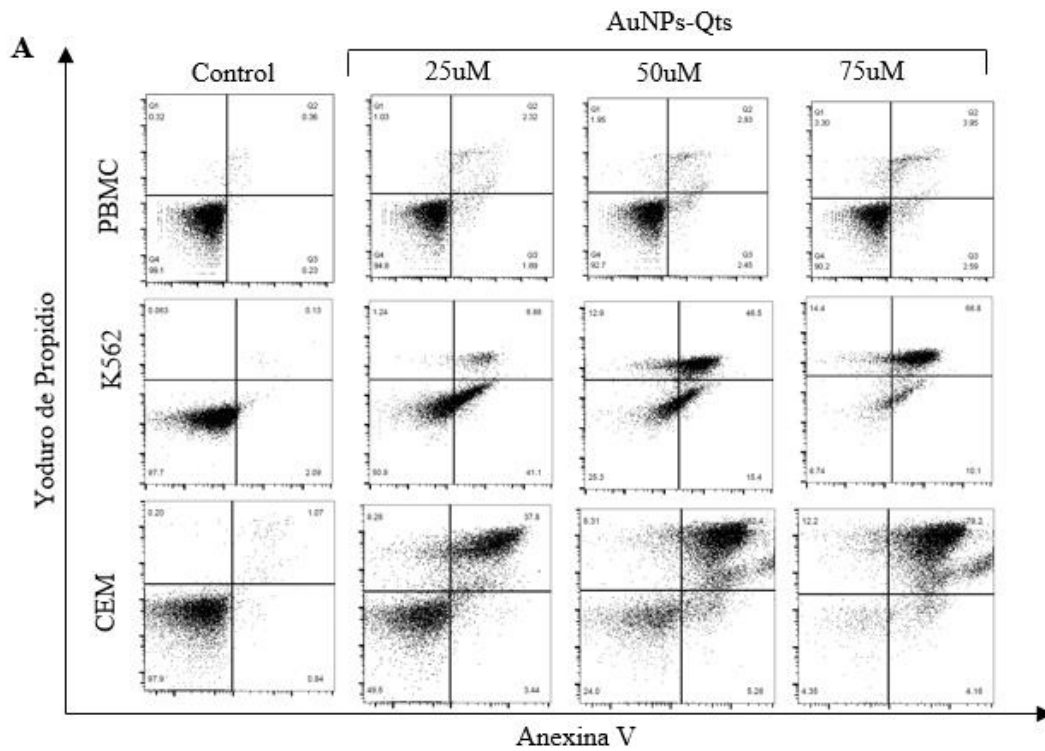


Figura 16. Efecto de la citotoxicidad de las AuNPs-Qts en PBMC, K562 y CEM. Análisis de la muerte celular por citometría de flujo, utilizando un marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio. A) Histograma de células PBMC, K562 y CEM, tratadas con diferentes concentraciones de AuNPs-Qts, durante 24h. B) Grafica de puntos de los promedios obtenidos de tres ensayos independientes por triplicado realizados como en el inciso A.

Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno inducido por las AuNPs-Qts en células leucémicas K562 y CEM

En previos estudios, se ha reportado que las nanopartículas de diversos materiales inducen muerte celular regulada dependiente de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), por sus siglas en inglés (Chompoosor, et al., 2010; Pradida et al., 2014; Ramalingan et al., 2017). Para comprender el mecanismo de muerte celular de las AuNPs-Qts en células leucémicas, se evaluó su efecto en la producción de ROS, en células K562 y CEM. Este ensayo se realizó por citometría de flujo utilizando un marcaje con DCFDA (2'7'-diclorofluorosein diacetato), compuesto que difunde en la célula y es desacetilado por esterasas celulares a un compuesto no fluorescente, que es posteriormente oxidado por las ROS, dentro de la célula en DCF (2'7'-diclorofluoresceína), compuesto altamente fluorescente que puede detectarse en el citómetro de flujo. Los resultados de la figura 17 muestran que las células leucémicas tratadas con la CC₅₀ (25µM) de AuNPs-Qts inducen un aumento en la producción de ROS, respecto a las células control no tratadas. Sin embargo, se puede observar que la concentración de ROS es dependiente de línea celular, ya que podemos ver que en las células K562 las AuNPs-Qts inducen más ROS que en células CEM, siendo 40% y 35%, respectivamente.

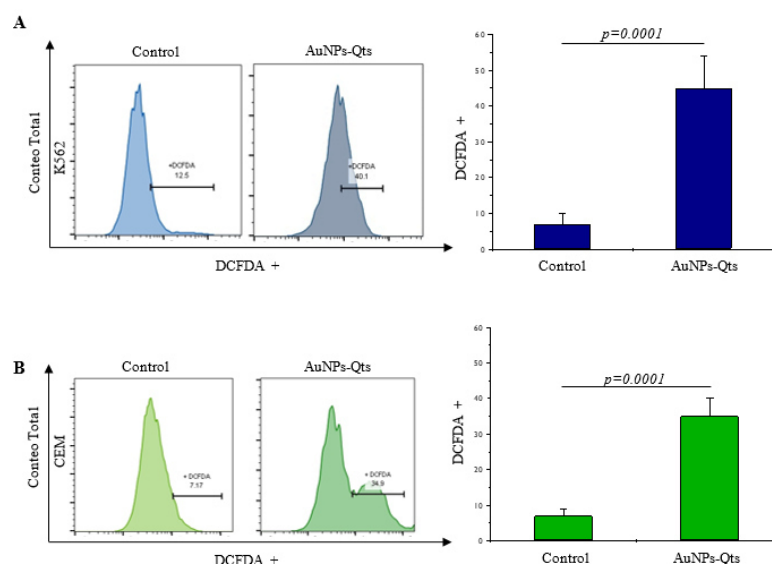


Figura 17. Análisis de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células K562 y CEM. El análisis se realizó por citometría de flujo, utilizando un marcaje con DCFDA (Diclorofluoroceína diacetato). A) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) de ROS de células K562 control y tratadas con 25µM AuNPs-Qts, durante 24h. B) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) de ROS de células CEM control y tratadas con 25µM AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno inducido por las AuNPs-Qts en presencia del antioxidante NAC en células leucémicas

A partir de que se determinó que las AuNPs-Qts inducen un aumento en la producción de ROS tanto en las células K562 y CEM, se decidió evaluar si este efecto se mantenía en presencia de un antioxidante; para ello, se utilizó al NAC (N-Acetil-cisteína) como inhibidor de ROS debido a su capacidad antioxidante per se y como precursor del glutatión. Este ensayo se llevó a cabo como en el apartado anterior. En la figura 18, podemos observar claramente como en presencia de NAC no se observan ROS después del tratamiento con AuNPs-Qts, del mismo modo podemos ver que las ROS generadas de forma basal en la célula se ven inhibidas. Este efecto se observa en ambas líneas celulares; tanto en K562 y CEM a la CC_{50} ($25\mu\text{M}$) de AuNPs-Qts.

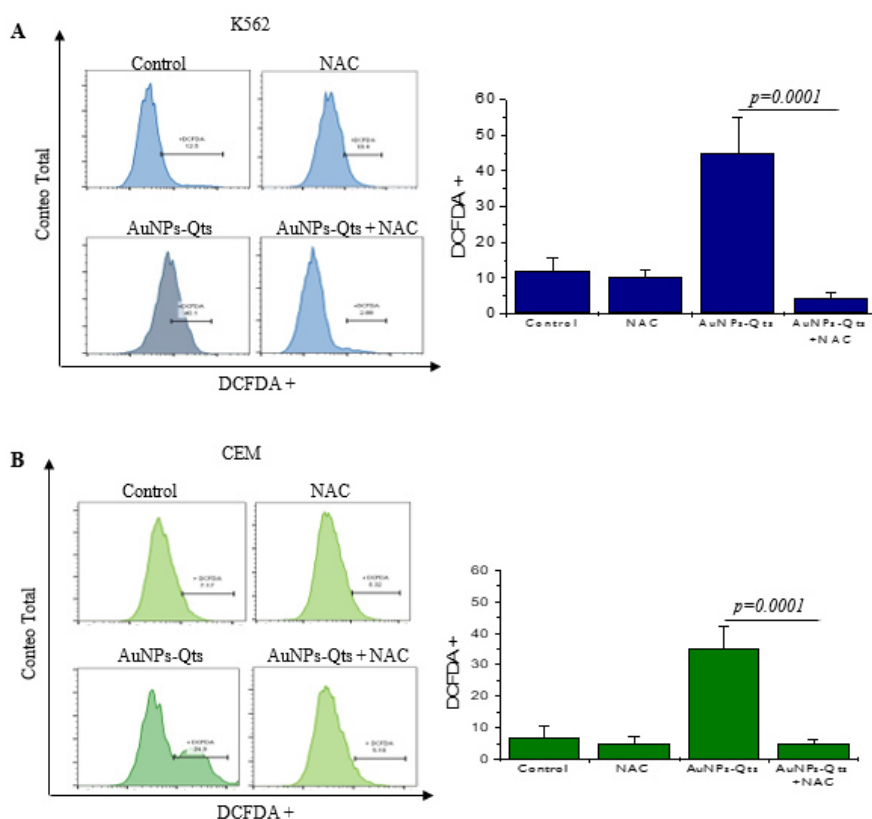


Figura 18. Análisis de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en presencia del antioxidante NAC en células K562 y CEM. El análisis se realizó por citometría de flujo, utilizando un marcaje con DCFDA (Diclorofluoresceína diacetato). A) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) de ROS de células K562 control y tratadas con $25\mu\text{M}$ AuNPs-Qts, durante 24h. B) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) de ROS de células CEM control y tratadas con $25\mu\text{M}$ AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Análisis de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial inducido por las AuNPs-Qts en células leucémicas

Se ha demostrado por años que los ROS pueden dañar diversos organelos, como las mitocondrias y el núcleo (Fu et al., 2014; Schieber & Chandel 2014); además, también se ha reportado que las nanopartículas metálicas pueden dañar estos mismos organelos (Pradida et al., 2014; Ramalingan et al., 2017). Para comprender el mecanismo de muerte celular de las AuNPs-Qts en células leucémicas, se analizó si inducen daño mitocondrial; para ello, se evaluó el efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial. Este análisis se realizó por citometría de flujo utilizando un marcador de actividad mitocondrial TMRE, el cual es un compuesto altamente positivo que es secuestrado por las mitocondrias que mantienen su potencial de membrana integro gracias a la cadena de transporte de electrones que le confiere carga neta negativa. En la figura 19, podemos observar que las células K562 pierden cerca del 70% del potencial de membrana mitocondrial cuando son tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts durante 24h; sin embargo, bajo las mismas condiciones cerca del 100% de las células CEM pierden el potencial de membrana mitocondrial. De aquí podemos concluir que las mitocondrias pierden su potencial de membrana antes de iniciar el proceso de muerte celular ya que a la CC₅₀ obtenemos un importante daño mitocondrial, indicando que el daño mitocondrial es un paso previo a la muerte.

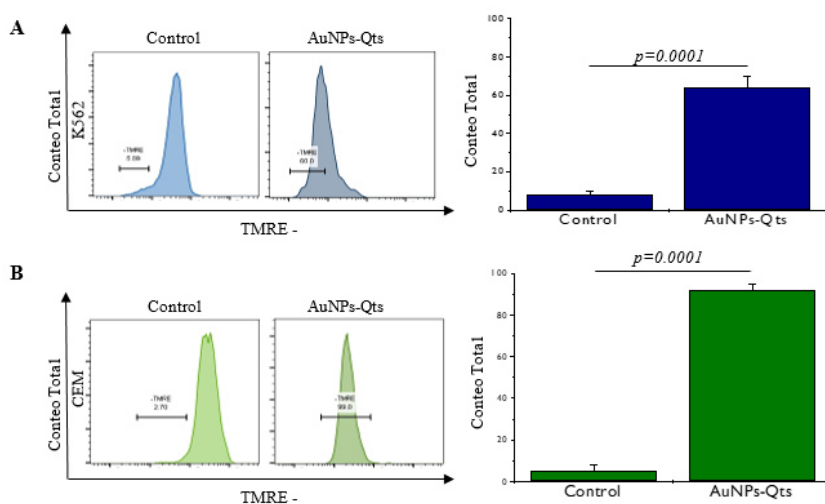


Figura 19. Análisis de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial de células K562 y CEM. El análisis se realizó por citometría de flujo, utilizando un marcaje con TMRE (Etil-éster tetrametilrodamina). A) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) del potencial membrana mitocondrial perdido de células K562 tratadas con 25 μ M AuNPs-Qts, durante 24h. B) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) del potencial de membrana mitocondrial perdido de células CEM tratadas con 25 μ M AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Debido a que las AuNPs-Qts inducen un aumento en la producción de ROS y que se genera un daño mitocondrial importante en ambas líneas celulares. Se decidió evaluar si este efecto se mantenía en presencia de NAC, que previamente demostró inhibir a los ROS producidos por las AuNPs-Qts. Este ensayo permite evaluar si el daño es generado directamente por las nanopartículas, o por las ROS que estas inducen. En la figura 20, podemos observar claramente que, en presencia del NAC el daño mitocondrial generado por el tratamiento de las AuNPs-Qts a $25\mu\text{M}$ en ambas líneas celulares (K562 y CEM), es completamente inhibido. A pesar de que en las células K562 el daño mitocondrial que inducen las AuNPs-Qts es de 60% y en células CEM es cerca del 100%, en presencia del NAC el potencial de membrana mitocondrial no se pierde y es similar al control de células no tratadas con AuNPs-Qts. Por lo tanto, son las ROS generadas a partir de la exposición al tratamiento de las AuNPs-Qts las que inducen daño mitocondrial y no las nanopartículas por sí mismas.

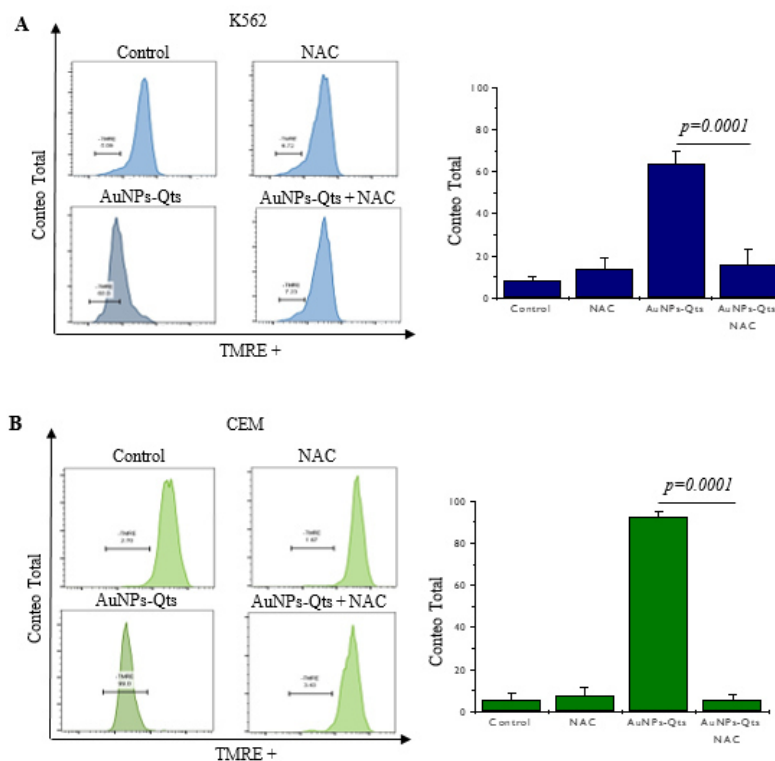


Figura 20. Análisis del potencial de membrana mitocondrial en presencia de un antioxidante (NAC) en células K562 y CEM. El análisis se realizó por citometría de flujo, utilizando un marcaje con TMRE (Etil-éster tetrametilrodamina). A) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) del potencial membrana mitocondrial perdido de células K562 tratadas con $25\mu\text{M}$ AuNPs-Qts, durante 24h. B) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) del potencial de membrana mitocondrial perdido de células CEM tratadas con $25\mu\text{M}$ AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Análisis del daño nuclear inducido por las AuNPs-Qts en células leucémicas: fosforilación de la histona H2AX, activación de p53 y ciclo celular

Se ha reportado, que los ROS son agentes oxidantes que pueden dañar tanto a proteínas, lípidos y/o al ADN (Fu et al., 2014; Schieber & Chandel 2014); además, debido a su tamaño nanométrico las nanopartículas pueden dañar directamente al ADN. Ya que se demostró que las AuNPs-Qts inducen un aumento en la concentración de ROS intracelular que conllevan a la generación de un daño mitocondrial, se decidió analizar si estas generan también daño nuclear. El daño en el ADN puede generar roturas de doble cadena (DBSs) y de simple cadena (SBSs), en respuesta al daño, la histona H2A, particularmente la variante H2AX, es rápidamente fosforilada en el residuo serina 139 (γ -H2AX) por la cinasa ATM activada, formando focos discretos en los sitios del ADN lesionado. La fosforilación de esta histona es un paso esencial para la respuesta al daño en el ADN ya que sirve como señal de localización del daño (marcador epigenético) y por lo tanto ubica el lugar donde será ensamblado el foco de reparación. Sin embargo, un gran número de lesiones en el ADN puede llevar al aumento de los niveles de p53, así como a su activación. La proteína p53, a su vez al ser un factor de transcripción puede activar la expresión de p21, y por lo tanto bloquear la ciclina G1/cdk, llevando así a un arresto en el ciclo celular de la fase G1 (Wan et al., 2013).

Para realizar un análisis general del daño nuclear que generan las AuNPs-Qts a las células leucémicas, decidimos analizar si las AuNPs-Qts inducen la fosforilación de H2AX (γ -H2AX), la expresión (que es indicativa de la activación de la activación) de la proteína p53 y el ciclo celular. Estos tres parámetros se analizaron por citometría de flujo, los primeros dos utilizando un anticuerpo dirigido contra cada una de estas proteínas, y el tercero usando yoduro de propidio.

En la figura 21A, podemos observar que las AuNPs-Qts inducen la formación de γ -H2AX en las células K562, del mismo modo podemos observar que al inhibir la producción de ROS, el daño al ADN es inhibido, lo que nos sugiere que el daño al ADN es causado por un estrés oxidativo en las células. Este mismo efecto puede observarse en la figura 21B para las células CEM, en donde podemos observar que, aunque de forma basal hay una alta cantidad de γ -H2AX, este aumenta con el tratamiento con AuNPs-Qts, pero en presencia de NAC este se reduce a la cantidad

observada de forma basal. Este resultado indica que las ROS generadas por las AuNPs-Qts son las que ocasionan daño al ADN.

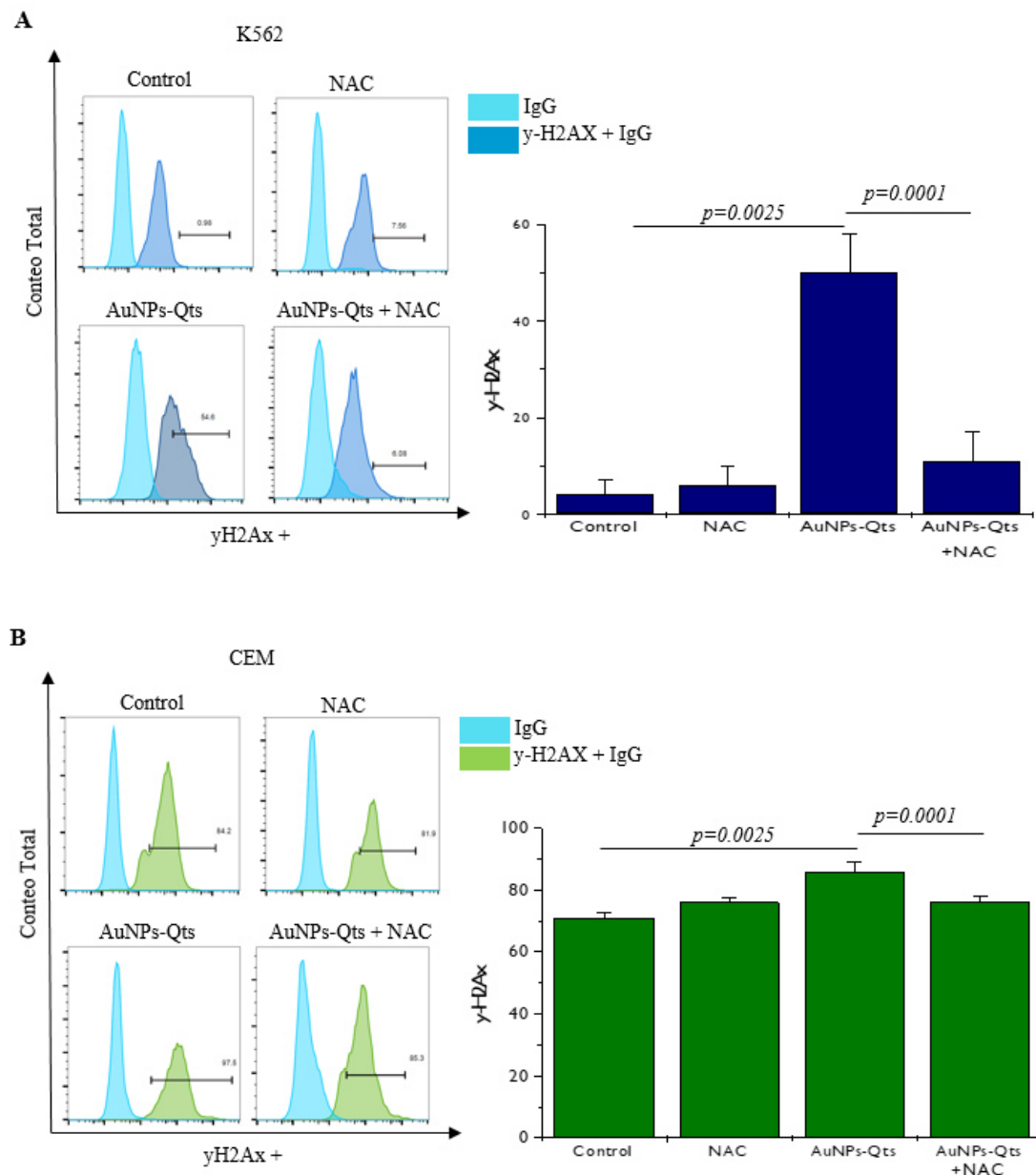


Figura 21. Análisis de la fosforilación de la histona H2AX, en su variante γ -H2AX. El análisis se realizó por citometría de flujo, utilizando un anticuerpo específico para la histona γ -H2AX y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. A) Histograma (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) de γ -H2AX de células K562 tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. B) Histograma (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) de γ -H2AX de células CEM tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

En la figura 22A, podemos observar que el tratamiento con AuNPs-Qts induce una activación ligera, pero significativa de p53 en las células K562. Además, en la

figura 22B podemos observar que las células CEM tienen de forma basal expresión de p53, pero que el tratamiento con AuNPs-Qts inducen un aumento de este. Este resultado sugiere que la célula activa proteínas para intentar reparar el daño al ADN generado por las ROS que inducen las AuNPs-Qts.

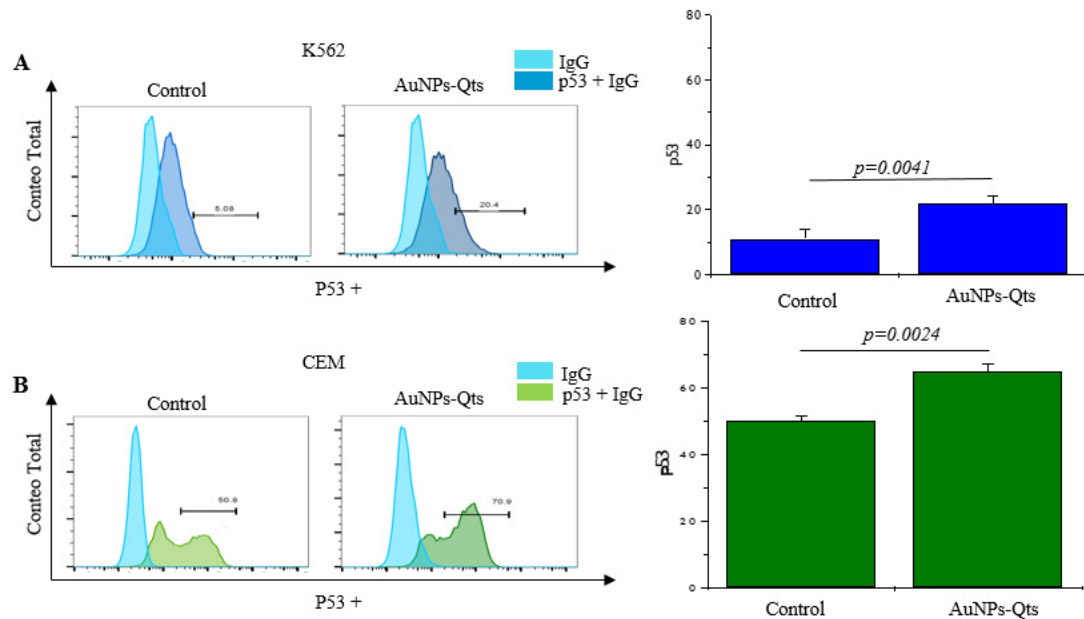


Figura 22. Análisis de la activación de p53. El análisis se realizó por citometría de flujo, utilizando un anticuerpo específico para p53 y un anticuerpo secundario acoplado a FITC. A) Histograma (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) de p53 de células K562 tratadas con 25uM de AuNPs-Qts, durante 24h. B) Histograma (der.) y promedio en gráfica de barras (der.) de p53 de células CEM tratadas con 25uM de AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

En la figura 23, podemos observar el análisis del ciclo celular de las células leucémicas K562 (10A) y CEM (10B) tratadas con AuNPs-Qts. En la figura 23A se observa que las células K562 sufren un ligero arresto en el ciclo celular en la fase G1; ya que se presenta un aumento en la cantidad de ADN de un 35% a un 52% las células control y tratadas con AuNPs-Qts, respectivamente. En la fase de S no hay cambios significativos; sin embargo, en la fase G2 se observa una disminución en las células tratadas con AuNPs-Qts; mostrando un 18% las células control y un 9% las células tratadas con AuNPs-Qts se encuentra en esta fase. Por otro lado, en la figura 23B se observa que las células CEM no presentan una alteración en el ciclo celular de las células control y las células tratadas con AuNPs-Qts.

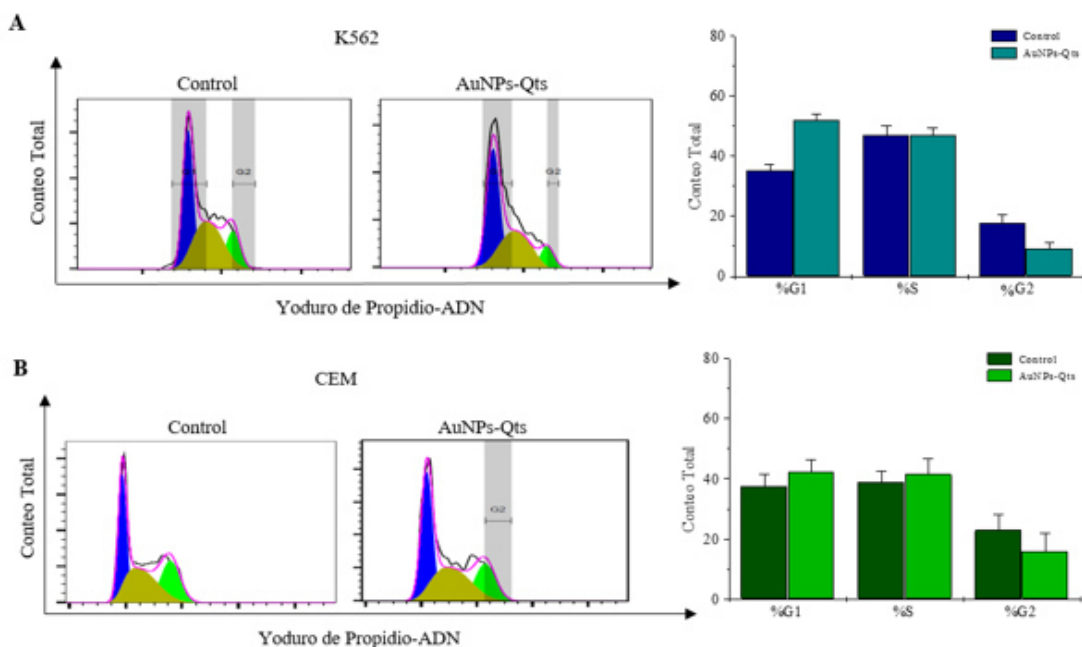


Figura 23. Análisis del ciclo celular. El análisis se realizó por citometría de flujo, utilizando RNAasa y un marcaje con Yoduro de propidio, los datos se analizaron mediante el software Flowjo. A) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) de células K562 control y tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. B) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) de células CEM control y tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Análisis de la implicación de las ROS en la muerte celular inducida por las AuNPs-Qts en células leucémicas K562 y CEM

Ya que se demostró que las AuNPs-Qts inducen la producción de ROS, que a su vez causa daño mitocondrial y nuclear en células leucémicas, se decidió analizar si la muerte celular inducida por las AuNPs-Qts depende de las ROS. Para ello las células fueron marcadas con Anexina V y Yoduro de propidio, utilizando al NAC como un inhibidor de ROS. Los resultados de la figura 11, muestran que, en presencia del NAC, la muerte celular inducida por AuNPs-Qts es inhibida significativamente, y casi en su totalidad en células CEM y K562. En las células K562 la muerte celular inducida por las AuNPs-Qts pasa de 50% a un 5% en presencia de NAC (la figura 24A) y en las células CEM el porcentaje de muerte celular pasa de 49% a 8% en presencia de NAC (figura 24B). Esto indica que las AuNPs con quitosano inducen muerte celular regulada dependiente de la producción de ROS, en ambas líneas celulares.

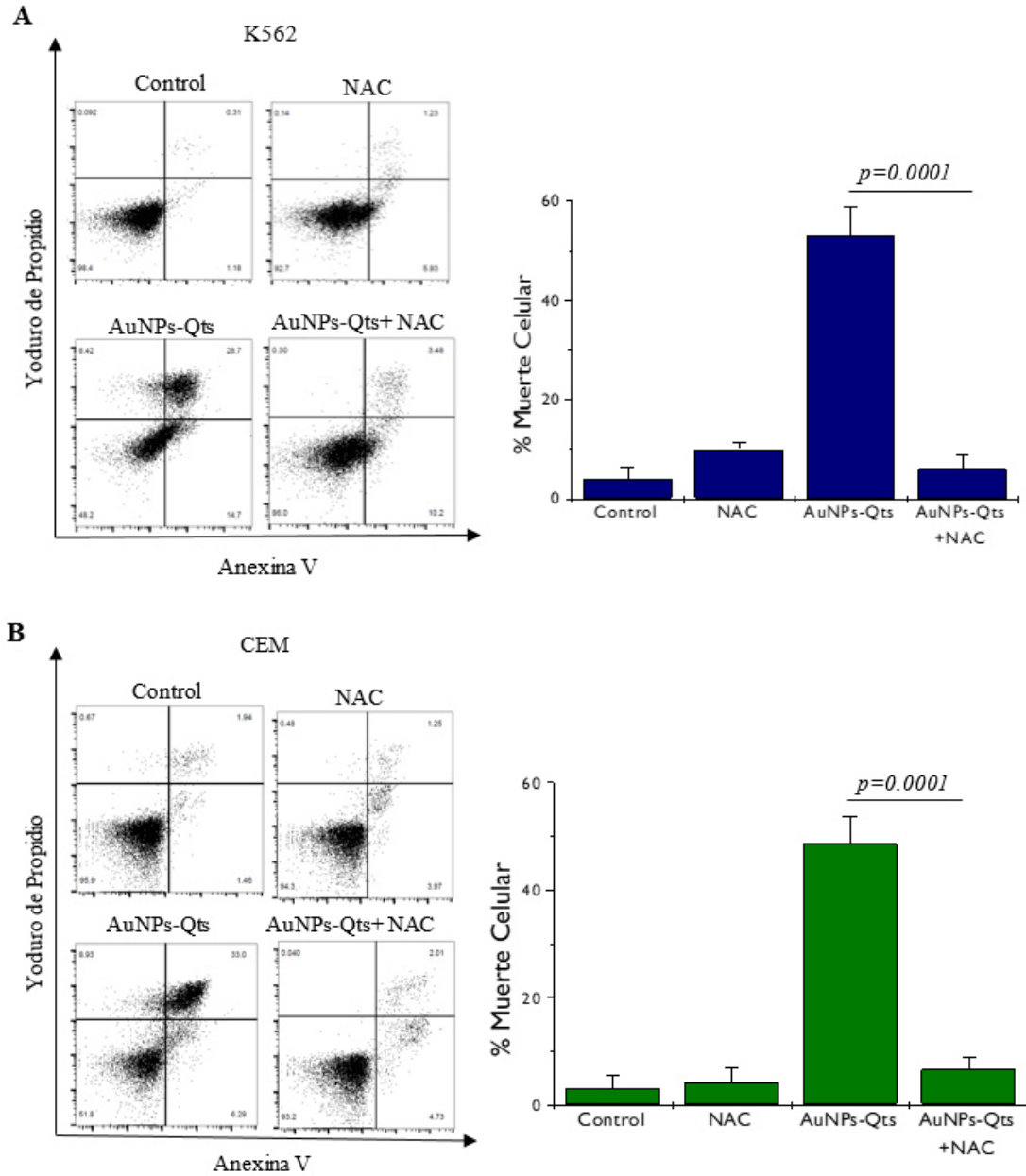


Figura 24. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de NAC. El análisis se realizó por citometría de flujo, utilizando un marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio. A) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células K562 tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. B) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células CEM tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Análisis del rol de la autofagia en el mecanismo de muerte celular inducido por las AuNPs-Qts en células leucémicas K562 y CEM

Uno de los mecanismos de muerte celular regulada más estudiados en los últimos años ha sido la autofagia, este mecanismo de muerte se caracteriza por la formación de autofagosomas, que culminan en la autodestrucción de total de la célula (He &

Klionsky, 2010). Análisis morfológicos previos (García-Juárez, 2017), de las células tratadas con AuNPs-Qts, muestran la presencia de vacuolas en el interior de las células. Con la finalidad de determinar si el mecanismo de muerte celular que inducen las AuNPs-Qts en células leucémicas podría ser autofagia, se decidió analizar la formación de autofagosomas por citometría de flujo, se utilizó un inhibidor específico de autofagia (spautina-1) para confirmar su selectividad. En la figura 25, podemos observar que la cuantificación de autofagosomas de las células K562 y CEM. En la figura 25A, podemos observar que a pesar de que las células K562 presentan de forma basal autofagosomas (cerca del 40%), el tratamiento con AuNPs-Qts induce un aumento en la formación de estos, en donde se observa cerca de un 80% de autofagosomas. También, podemos observar que la spautina-1 logra inhibir la formación de autofagosomas en las células. Además, en la figura 25B se muestra, que las CEM también inducen la formación de autofagosomas bajo el tratamiento con AuNPs-Qts y que la spautina-1 inhibe la formación de estos.

Una vez que se demostró que las AuNPs-Qts inducen la formación de autofagosomas, se decidió analizar si estos mediaban el mecanismo de muerte celular o si estaban promoviendo la supervivencia de las células. Para ello, se utilizó nuevamente al inhibidor de autofagia (spautina-1) para analizar la muerte celular mediante citometría de flujo. En la figura 26A, podemos observar que la spautina-1 no genera muerte celular por sí mismo en las células K562, la muerte celular que inducen las AuNPs-Qts es potenciada en presencia de la spautina-1, pasando de un 50% de muerte celular a un 75% en presencia de spautina-1. En las células CEM, podemos observar que la muerte celular en presencia de spautina-1 la CC_{50} aumenta un 75% de muerte celular (figura 26B). Estos resultados sugieren que la formación de autofagosomas en ambas líneas celulares es un mecanismo prosupervivencia de las células en respuesta al tratamiento con AuNPs-Qts.

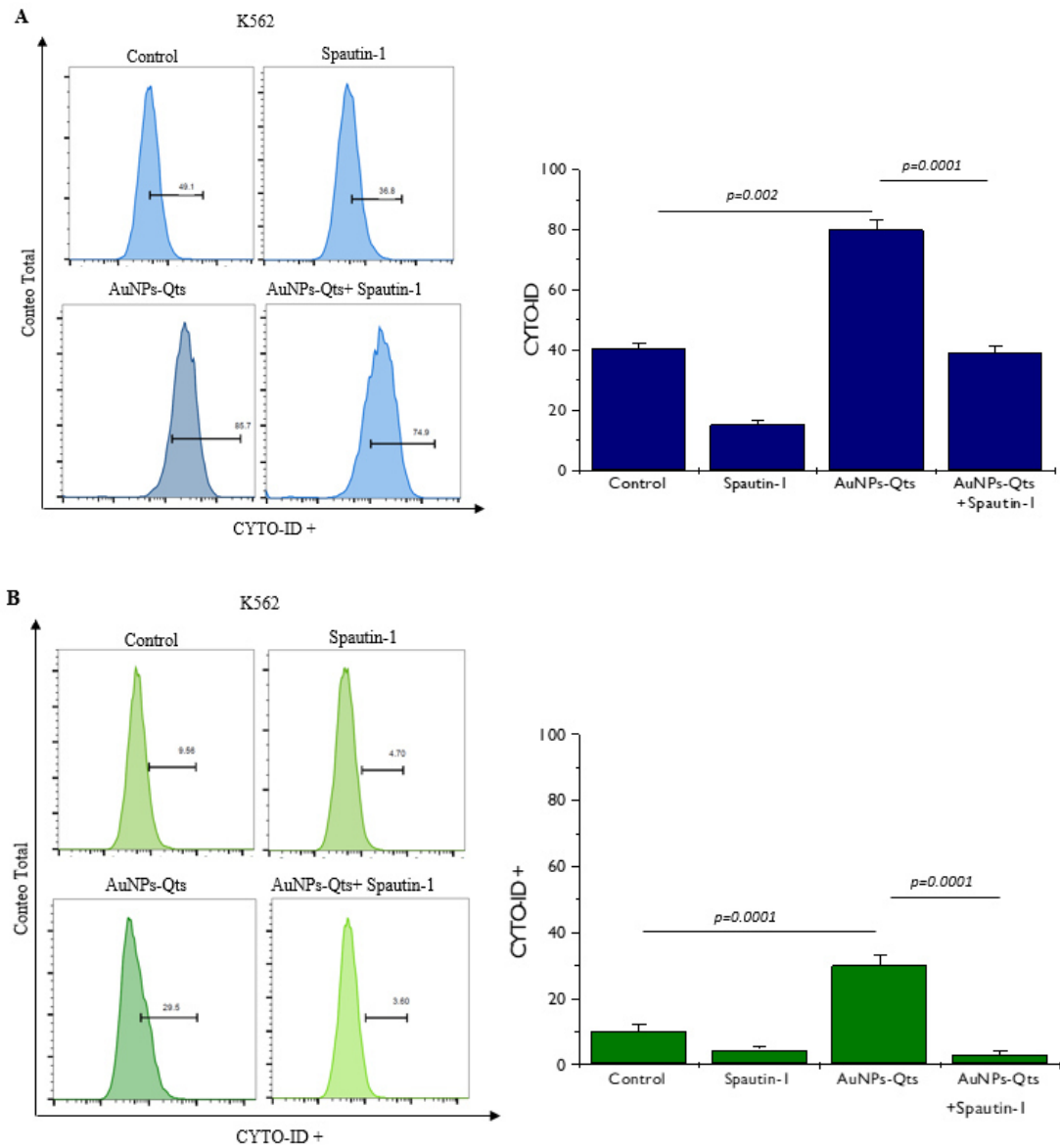


Figura 25. Análisis de la formación de autofagosomas inducido por las AuNPs-Qts. El análisis se realizó por citometría de flujo, utilizando un kit específico para la detección de autofagosomas (CYTO-ID), los datos se analizaron mediante el software Flowjo. A) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) de células K562 tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. B) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) de células CEM tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

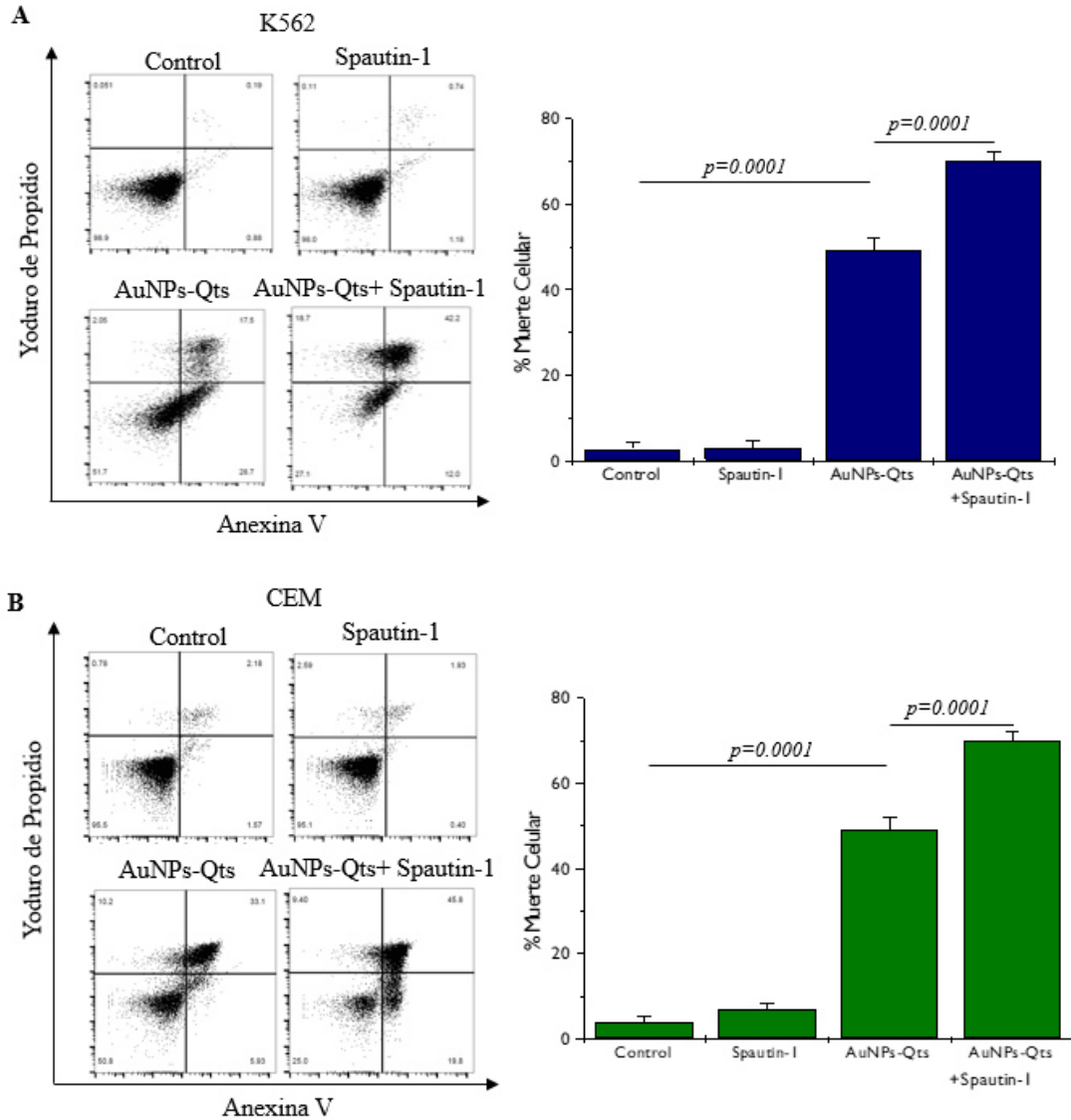


Figura 26. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de Spautina-1
 A) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células K562 tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h con o sin incubación previa con spautina-1 (inhibidor de autofagia). B) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células CEM tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h con o sin incubación previa con spautina-1 (inhibidor de autofagia). Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Análisis del mecanismo de muerte celular inducido por las AuNPs-Qts en células leucémicas K562 y CEM: rol de la apoptosis

Como se demostró que las AuNPs-Qts inducen la formación de autofagosomas, pero que parecen ser activados como un mecanismo prosupervivencia, se decidió analizar si las AuNPs-Qts inducen muerte por apoptosis. La caspasa-3 activa es conocida por ser la caspasa efectora de la apoptosis, por ello, fue el marcador que decidió analizar. En la figura 27A, podemos observar que las células K562 tratadas con la CC_{50} de AuNPs-Qts (25 μ M) inducen una ligera activación de caspasa-3 de 22%, siendo un porcentaje mayor respecto al control no tratado que tiene cerca de un 3% de caspasa-3 activa, esta diferencia es significativa; también, podemos observar que en presencia de NAC no hay activación de caspasa-3. En la figura 27B, para las células CEM, podemos observar que hay un aumento mayor de caspasa-3 en las células tratadas con la CC_{50} de AuNPs-Qts, ya que las células control no tratadas tienen un 2% de caspasa-3 activa y las células tratadas muestran cerca de un 35% de caspasa-3 activa. Tanto las células K562 como CEM, involucran la activación de la caspasa-3; sin embargo, podemos observar que el porcentaje de activación es dependiente de línea celular, las células CEM muestran un aumento mayor que las células K562. También, podemos observar que en presencia de un inhibidor de activación general de caspasas (Q-VD-OPH), la caspasa-3 no se activa y que, en presencia del NAC, tampoco hay activación de caspasa-3. Este resultado sugiere que la activación de caspasa-3 es dependiente del daño intracelular generado por los ROS que generan las AuNPs-Qts en las células leucémicas.

Posteriormente, se decidió analizar si las caspasas son indispensables en el mecanismo de muerte celular inducido por las AuNPs-Qts en las células leucémicas K562 y CEM. Ya que se ha demostrado que las nanopartículas metálicas pueden inducir muerte apoptótica en células cancerosas. Para ello, se utilizó al Q-VD-OPH, como un inhibidor general de la activación de caspasas, y posteriormente se realizó un marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio. En la figura 15, podemos observar el análisis de la muerte celular en presencia de Q-VD-OPH de las células leucémicas K562 y CEM. En la figura 28A, podemos observar que la muerte celular que inducen las AuNPs-Qts en células K562 no es inhibida de forma significativa en presencia del Q-VD-OPH; este resultado sugiere que el mecanismo de muerte es independiente de la

activación de caspasas. En las células CEM, podemos observar que la muerte celular que inducen las AuNPs-Qts es dependiente de la activación de las caspasas, esto se pueden observar ya que en presencia del Q-VD-OPH el porcentaje de muerte celular se ve inhibida de forma significativa pasando de un 50% a un 34% de muerte en presencia de Q-VD-OPH (figura 28B). Este resultado sugiere que el mecanismo de muerte celular que inducen las AuNPs-Qts en células CEM es apoptosis.

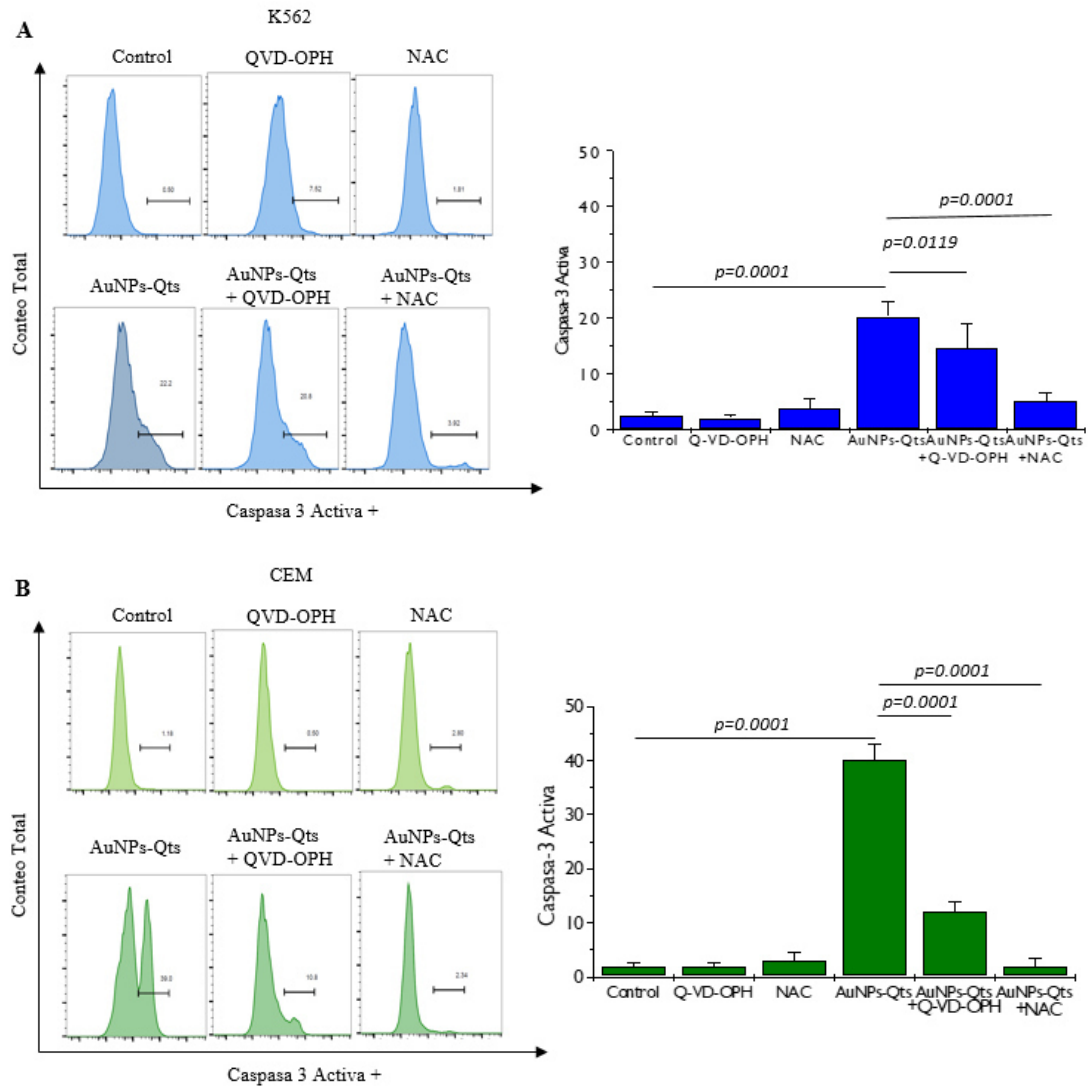


Figura 27. Análisis de la activación de caspasa-3 inducido por las AuNPs-Qts. El análisis se realizó por citometría de flujo utilizando un kit específico para la detección de caspasa-3 activa (FITC-DEVD-FMK). A) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) de células K562 con la CC₅₀ (25µM AuNPs-Qts), durante 24h. B) Histograma (izq.) y porcentaje en gráfica de barras (der.) de células CEM con la CC₅₀ (25µM de AuNPs-Qts) durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

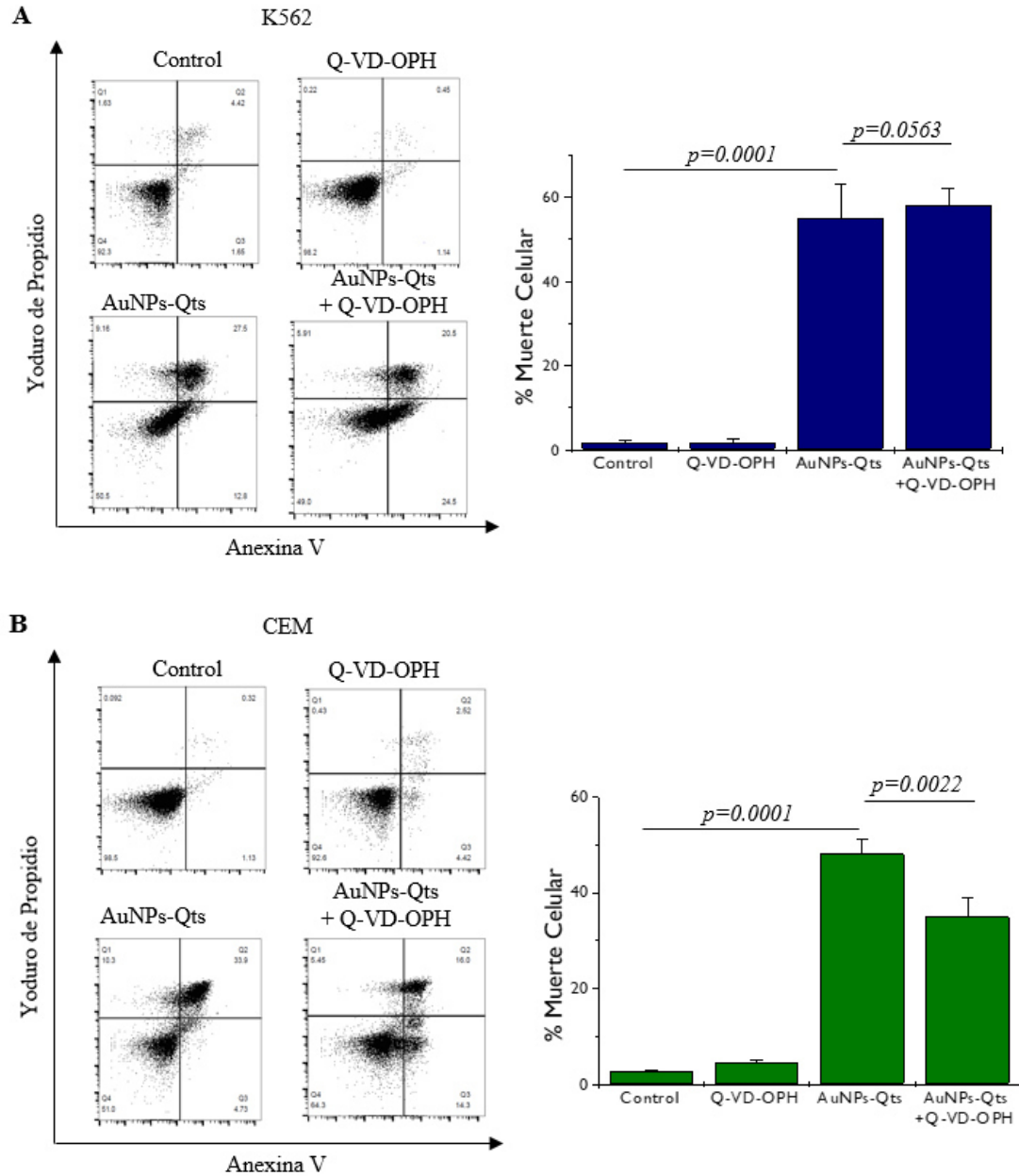


Figura 28. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de Q-VD-OPH. El análisis se realizó utilizando al Q-VD-OPH como inhibidor general de la activación de caspasas, mediante citometría de flujo, utilizando un marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio, los datos se analizaron mediante el software Flowjo. A) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células K562 tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. B) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células CEM tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Debido a que la muerte celular en células CEM es dependiente de caspasas y que se observó, tanto para K562 como para CEM, una potenciación de la muerte en presencia

de spautina-1. Se decidió determinar si la potenciación de la muerte celular observada en presencia de spautina-1 era por un aumento en la muerte dependiente de caspasas. Para ello, se realizó una co-incubación de células en presencia de spautina-1 y Q-VD-OPH, y posteriormente se trataron las células con AuNPs-Qts. En la figura 29A, podemos observar el análisis de muerte en las células K562 tratadas con AuNPs-Qts, en donde se confirma que la muerte celular no es inhibida de forma significativa en presencia de Q-VD-OPH y que es potenciada en presencia de spautina-1; también, podemos observar que al utilizar ambos inhibidores simultáneamente (Q-VD-OPH y spautina-1), el porcentaje de muerte celular aumenta similar a la utilización de spautina-1 únicamente. Este resultado sugiere que el mecanismo de muerte celular de las células K562 no es apoptosis y que la potenciación de la muerte provocada por la spautina-1 está asociada a un mecanismo de muerte diferente a la apoptosis. En la figura 29B, podemos observar el análisis de la muerte celular en células CEM tratadas con AuNPs-Qts, en donde confirmamos que la muerte celular en presencia de Q-VD-OPH es inhibida significativamente y que en presencia de spautina-1 es potenciada a cerca de un 80%, al utilizar la co-inhibición de apoptosis y autofagia (Q-VD-OPH y spautina-1), el porcentaje de muerte disminuye significativamente de un 80% de células tratadas con AuNPs-Qts y spautina-1, a un 34% al utilizar la co-incubación con spautina-1 y Q-VD-OPH. Este resultado sugiere que el mecanismo de muerte celular potenciado por la spautina-1 en células CEM es apoptosis.

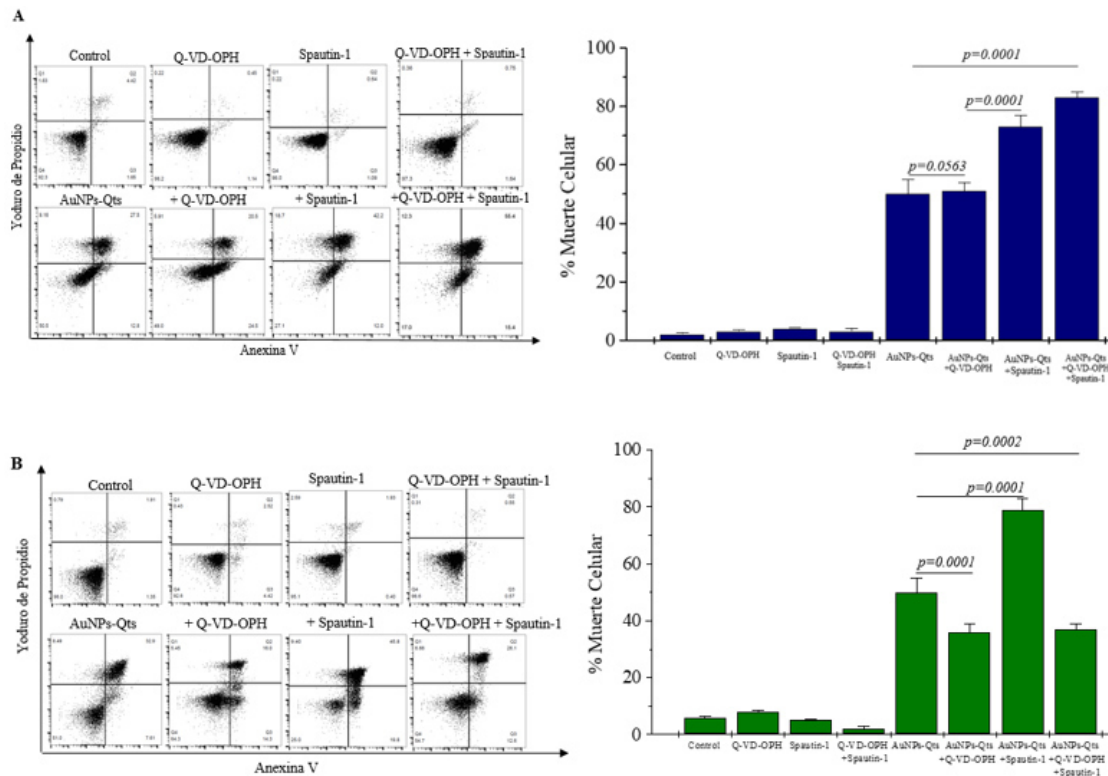


Figura 29. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de Q-VD-OPH y Spautin-1. El análisis se realizó utilizando al Q-VD-OPH como inhibidor de apoptosis y la spautin-1 como inhibidor de autofagia, mediante citometría de flujo, utilizando un marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio, los datos se analizaron mediante el software Flowjo. A) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células K562 tratadas con 25µM de AuNPs-Qts, durante 24h. B) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células CEM tratadas con 25µM de AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Análisis de la necroptosis en el mecanismo de muerte celular inducido por las AuNPs-Qts en células leucémicas K562 y CEM

Se ha demostrado, que las nanopartículas pueden inducir distintos mecanismos de muerte celular dependiendo de sus componentes y de la línea celular estudiada. Ya que se había descartado que la muerte celular que inducen las AuNPs-Qts en las células leucémicas fuera autofagia y se observó sólo en las células CEM un porcentaje de muerte es inhibido con el inhibidor de caspasas, se decidió analizar si la muerte celular podía involucrar a la necroptosis, un tipo de muerte celular regulada que se caracteriza por la formación del necrosoma, un complejo multiproteico que lleva a la MCR. Se ha descrito que cierto tipo de nanopartículas pueden inducir este mecanismo de muerte (Andón & Fadeel, 2012), por lo que se decidió analizar si las AuNPs-Qts inducen

necroptosis en las células K562 y CEM. Para ello, se utilizó un inhibidor específico del necrosoma (necrostatina-1) y se realizó un marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio. En la figura 30, podemos observar la muerte celular de células K562 y CEM tratadas con la CC_{50} de AuNPs-Qts y necrostatina-1. El porcentaje de muerte celular en las células K562 inducida por la CC_{50} es inhibida significativamente en presencia de la necrostatina-1, pasando de un 50% a un 40% (figura 30A). En la figura 30B, podemos observar la muerte celular inducida por las AuNPs-Qts en células CEM es potenciada significativamente de un 50% a cerca de un 60% de muerte celular. Este resultado indica, que el mecanismo de muerte celular que inducen las AuNPs-Qts en células K562 es necroptosis, pero no en células CEM.

Dado que en presencia de spautina-1 la muerte celular era potenciada, se decidió analizar si este incremento en la muerte era por la activación de un mecanismo dependiente del necrosoma. Para ello, se realizó una co-inhibición de células en presencia de spautina-1 y necrostatina-1. En la figura 31, podemos observar el porcentaje de muerte celular inducido por las AuNPs-Qts en presencia de la co-inhibición de autofagia y necroptosis (spautina-1 y necrostatina-1) de células K562 y CEM. Los resultados muestran que al utilizar simultáneamente ambos inhibidores (necrostatina-1 y spautina-1), el porcentaje de muerte celular disminuye significativamente de casi un 80% inducido por nanopartículas y spautina-1 solo, en presencia de necrostatina-1. Este resultado indica que el mecanismo de muerte celular potenciado por la spautina-1 en células K562 es necroptosis (figura 31A). Por otro lado, en las células CEM, no se observa disminución de la muerte celular al utilizar la co-inhibición (figura 31B). Este resultado muestra que en células CEM el mecanismo de muerte no es mediado por el necrosoma.

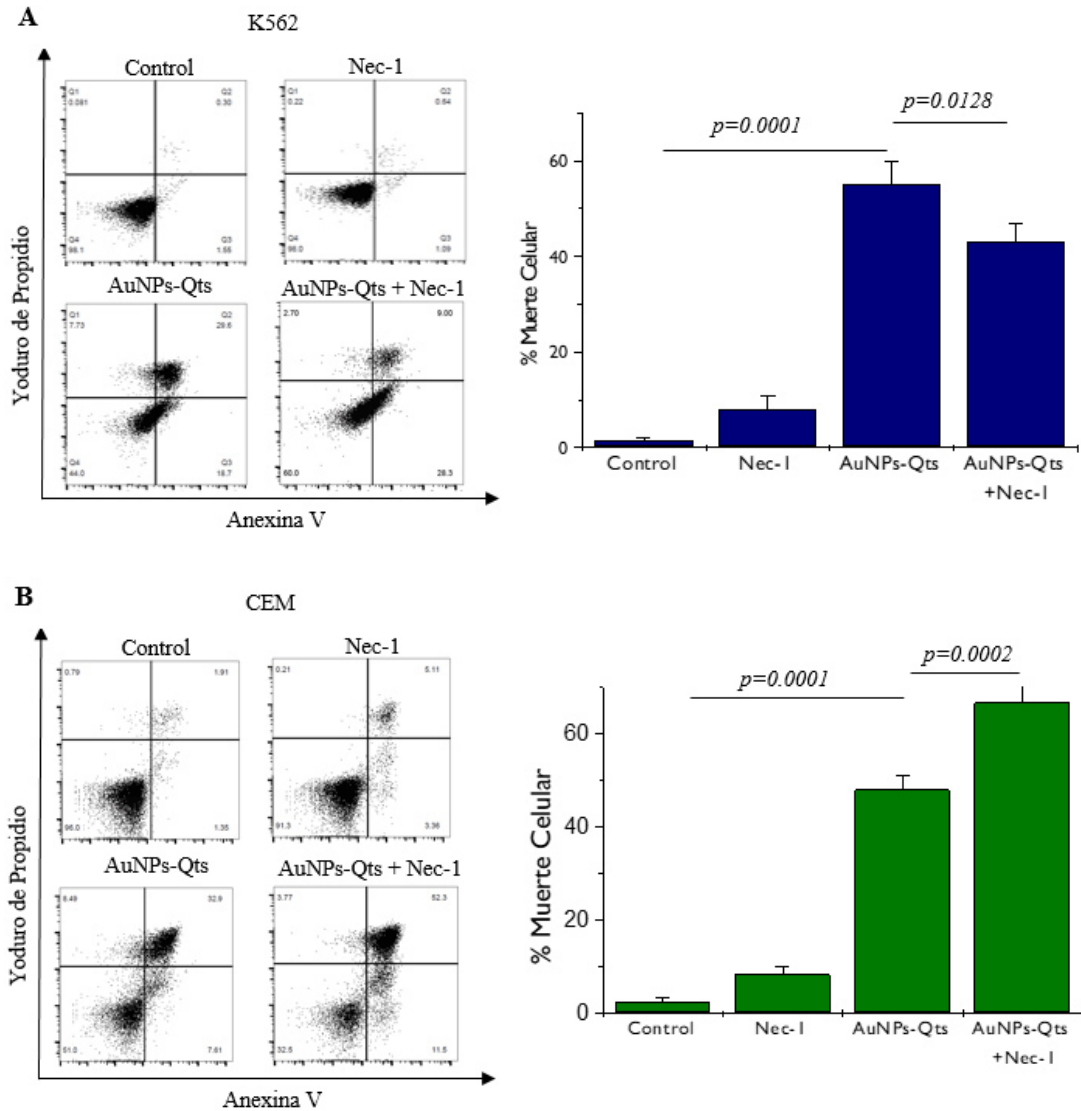


Figura 30. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de Nec-1. El análisis se realizó utilizando a la Nec-1 como inhibidor de necroptosis, mediante citometría de flujo, utilizando un marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio, los datos se analizaron mediante el software Flowjo. A) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células K562 tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. B) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células CEM tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

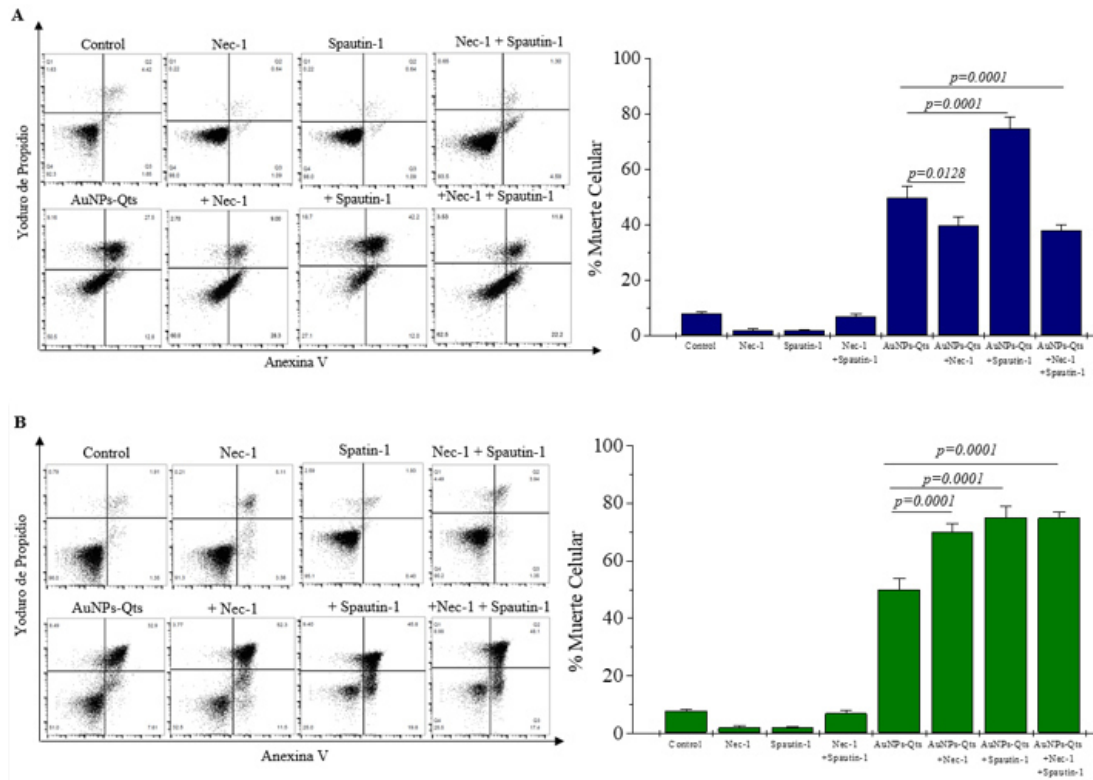


Figura 31. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de necrostatina-1 (nec-1) y spautina-1. El análisis se realizó utilizando a la Nec-1 como inhibidor de necroptosis y la spautina-1 como inhibidor de autofagia, mediante citometría de flujo, utilizando un marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio, los datos se analizaron mediante el software Flowjo. A) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células K562 tratadas con 25µM de AuNPs-Qts, durante 24h. B) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células CEM tratadas con 25µM de AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

Por último, dado que la necrostatina-1 induce un aumento en la muerte celular en células CEM tratadas con AuNPs-Qts, se decidió determinar si ésta promovía un aumento en la apoptosis inducida. Para ello se co-incubaron las células con necrostatina-1 y Q-VD-OPH y se analizó la muerte celular. Se observa que en células K562 no hay cambio en la inhibición inducida por la necrostatina-1 a un en presencia de Q-VD-OPH, esto indica que solo se induce necroptosis y esta no se aumenta en ausencia de la actividad de caspasas (figura 32A). Por otro lado, en células CEM se observa que en presencia de Q-VD-OPH, la muerte potenciada por la necrostatina-1 es inhibida. Esto indica que la inhibición del necrosoma promueve un aumento en la apoptosis mediada por las AuNPs-Qts en células CEM (figura 32B).

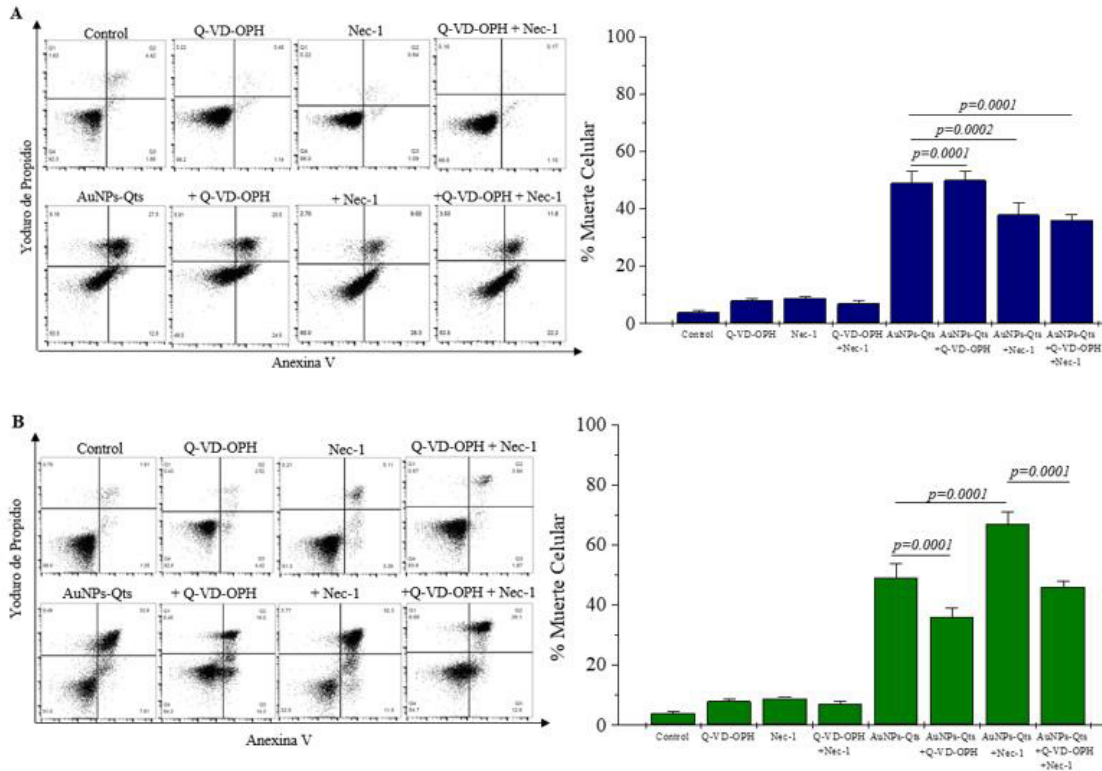


Figura 32. Análisis de la Muerte Celular inducida por las AuNPs-Qts en presencia de Nec-1 y Q-VD-OPH. El análisis se realizó utilizando a la Nec-1 como inhibidor de necroptosis y al Q-VD-OPH como inhibidor de apoptosis, mediante citometría de flujo, utilizando un marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio, los datos se analizaron mediante el software Flowjo. A) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células K562 tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. B) Dot plots (izq.) y promedio en gráfica de barras (der.) del porcentaje de muerte celular de células CEM tratadas con 25 μ M de AuNPs-Qts, durante 24h. Los promedios se obtuvieron de tres ensayos independientes realizados por triplicado.

DISCUSION

Las leucemias son un tipo de cáncer hematológico caracterizado por afectar a las células provenientes de médula ósea. A pesar de que se han realizado muchos esfuerzos en el desarrollo de terapias antitumorales aún sigue habiendo un alto porcentaje de resistencia y refractancia a los tratamientos. El fracaso en la efectividad de las terapias dirigidas es debido a las múltiples mutaciones que la célula adquiere para generar resistencia; por ello, es de gran importancia innovar con tratamientos que sean capaces de inducir muerte celular a pesar de las mutaciones de la célula. La nanotecnología es una plataforma de interés para el diseño de nanopartículas metálicas con capacidad antitumoral. Las cuales han demostrado tener una gran cantidad de funciones biológicas, entre las que se encuentra su capacidad de inducir muerte celular.

En esta investigación se sintetizaron nanopartículas de oro recubiertas con quitosano (AuNPs-Qts) para inducir muerte celular regulada (MCR) en células leucémicas. Ya que, en 2016, de León-Chávez, Rodríguez-Abrego y colaboradores demostraron que las AuNPs-Qts inducen MCR en células de cáncer cervicouterino HeLa, cáncer de mama MCF-7 y en cáncer de Pulmón A549, sin afectar a células sanas. También, García-Juárez en 2017, demostró que este efecto se podía observar en células leucémicas Jurkat y K562. Por lo tanto, en este trabajo de tesis, se analizó el mecanismo de MCR que inducen las AuNPs-Qts en células leucémicas K562 y CEM; así como la implicación de las ROS en el mecanismo de MCR.

Las AuNPs-Qts se sintetizaron mediante el método químico de Turkevich, basado en la oxidación-reducción de sus agentes precursores. Esta síntesis había sido previamente descrita por Álvarez-Cháirez, de León-Chávez, Rodríguez-Abrego, García-Juárez y colaboradores en 2016. Una vez concluida la síntesis, se caracterizó su plasmón de resonancia, una característica de los metales en estado nanométrico. Las AuNPs-Qts presentaron una absorbancia máxima en 520 nm de longitud de onda, lo cual corresponde al plasmón de resonancia del oro (Criado & Reséndez, 2013) (X. Huang & El-Sayed, 2016). Esta banda de 520 nm de longitud de onda se encuentra constante en nanoestructuras de forma esférica menores de 50nm en las que se utiliza el ácido cloroáurico como agente reductor (Namvar et al., 2015) (Wo et al., 2017)

(Creighton & Eadont, 1991) (Jain et al., 2012). Confirmando que la síntesis de las AuNPs-Qts sintetizadas en este trabajo se realizó de la forma correcta.

Se ha esclarecido que la citotoxicidad de las nanopartículas depende de su forma, superficie y su tamaño (Chomposor et al., 2010)(Wo et al., 2017). El tamaño de las nanopartículas es una de las características más estudiadas, ya que es un parámetro que repercute directamente en las funciones biológicas de las nanopartículas (Abadeer & Murphy, 2016). En previos estudios se ha observado que AuNPs menores a 25nm inducen mayor toxicidad comparado con AuNPs de mayor tamaño en células MCF-7 (Selim & Hendi, 2012). Otro reporte demostró que AuNPs de 2.2nm mostraron mejor toxicidad que las de 5.9 y 17nm en células K562 (Tsai et al., 2011). También, se reportó que las AuNPs-Qts de 1-10nm tienen un mayor efecto citotóxico que las de 50-100nm en células cancerosas HeLa (De León-Chávez, 2016). Nuestros resultados corresponden con estos autores, ya las AuNPs-Qts sintetizadas en este trabajo son de 1-10nm, por lo que están en el rango donde se ha demostrado que éstas poseen una mayor actividad citotóxica.

Otros autores describieron que la toxicidad y la aplicación biomédica de las AuNPs depende de su forma, en donde probaron diferentes AuNPs de forma esférica, forma ovalada, forma de flor, forma de prisma y en forma de estrella en células HeLa y HEK393T. Demostrando que las AuNPs con mayor toxicidad son las de forma ovalada y de forma de prisma; sin embargo, las de forma esférica son las que tienen mejor eficiencia de internalización y administración de fármacos y moléculas para entrega (Wo et al., 2017). Con el método de Turkevich empleado en la síntesis de las AuNPs-Qts se ha demostrado que las nanopartículas toman una forma esférica. Álvarez-Chairez y colaboradores, demostraron mediante microscopia electrónica de barrido, que las AuNPs-Qts de 1-10nm sintetizadas mediante el mismo método utilizado en este trabajo presentan forma esférica. Este resultado indica que las nanopartículas sintetizadas en este trabajo podrían ser un posible agente de transporte para la entrega de fármacos, ADN, ARN, anticuerpos, entre otras moléculas.

La superficie es una característica crucial en la efectividad de las nanopartículas (Alkilany & Murphy, 2010); por ello, se ha propuesto agregarles polímeros, péptidos,

proteínas o diferentes ligandos en su superficie que permitan estabilizar la nanopartícula de su agregación y aglomeración (Yah, 2013). El quitosano es un polisacárido natural obtenido de la desacetilación de la quitina (Rinaudo, 2006). En reportes previos el quitosano ha mostrado tener actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* (Tokoro A., et al., 1988; Gibot L., et al., 2015; Jiang Z., et al., 2015). También se reportó que el quitosano induce muerte celular regulada en células leucémicas K562 dependiente de tiempo y concentración. Mostrando un aumento de ROS, Ca^{2+} citoplasmático, permeabilidad de la membrana mitocondrial y fragmentación del ADN; indicando que de alguna forma el quitosano modula la muerte celular en células cancerosas (Luo, Li, & Chen, 2010). Por otro lado, ya se ha utilizado al quitosano como agente reductor en la síntesis de AuNPs (Bhumkar, Joshi, Sastry, & Pokharkar, 2007b). Por lo tanto, en este trabajo se utilizaron AuNPs recubiertas con quitosano para brindarle biocompatibilidad con células no tumorales y a su vez mejorar la toxicidad a las AuNPs, debido a la estructura y a las características químicas del quitosano ya que actúa como polielectrolito incrementando la permeabilidad celular.

Una vez que se sintetizaron y caracterizaron a las AuNPs-Qts, se decidió evaluar la citotoxicidad que inducen en células leucémicas K562 de leucemia mieloide crónica y en células CEM de leucemia linfocítica aguda de células T, debido a que se ha reportado que las AuNPs disminuyen la viabilidad celular e inducen muerte celular en varias líneas celulares cancerosas A549 (Patra, Banerjee, Chaudhuri, Lahiri, & Dasgupta, 2007), NCIH441 (Uboldi et al., 2009), HeLa (Y. Ma et al., 2011), HT29 (Alkilany & Murphy, 2010), HepG2 (Wei XL., et al., 2007), HaCaT (Wang C, et al., 2010), PC-3 (Arnold et al., 2010), y EGFR-1 (Glazer et al., 2010).

Para ello, se analizaron características de MCR como la exposición de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática, mediante citometría de flujo utilizando marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio. Los resultados demuestran que las células leucémicas que fueron tratadas con AuNPs-Qts durante 24h exponen fosfatidilserina y tienen la membrana plasmática comprometida, de forma dependiente de concentración de las AuNPs-Qts. Siendo la concentración citotóxica media (CC_{50}) de 25 μ M de AuNPs-Qts y la concentración citotóxica 100 (CC_{100}) de

75 μ M de AuNPs-Qts, en ambas líneas celulares leucémicas. Este resultado corresponde con lo reportado por (De León-Chávez, 2016) (Abrego-Rodriguez, 2016) que al igual que nuestro resultado mostraron que las AuNPs-Qts inducen muerte celular dependiente de la concentración en células MCF-7 y HeLa. Otras AuNPs recubiertas con monosulfonato de trifenilfosfina (TPPMS) de 15 nm inducen muerte celular dependiente de concentración células HeLa (Pan et al., 2009), en otro estudio se reportó que las AuNPs reducidas con AMT (aminopterín) inducen toxicidad celular dependiente de concentración en células K562, siendo la CC₅₀ de 5.2 ppm (Tsai et al., 2011). En 2015 Nanvar y colaboradores demostraron que AuNPs reducidas con un extracto metanólico inducen muerte celular dependiente de concentración en células leucémicas K562, HL-60, Jurkat y CEM; siendo las CC₅₀ de 4.2, 5.7, 6.5 y 7.2 μ g/ml, respectivamente (Namvar et al., 2015). Por lo que observamos que la citotoxicidad de las AuNPs depende de la concentración, el tipo celular, y el agente reductor empleado en la síntesis.

En un estudio reciente de nuestro grupo de investigación se demostró que las AuNPs-Qts inducen muerte celular selectiva dependiente del tiempo y la concentración en células leucémicas K562 y Jurkat, siendo las CC₅₀ 100 y 30 μ M, respectivamente (García-Juárez, 2017). Esta diferencia de toxicidad observada en las líneas celulares puede deberse a características moleculares específicas de cada línea celular, a las condiciones del cultivo celular en experimentación, al pH del medio de cultivo e inclusive a la aglomeración de las nanopartículas (Wo et al., 2017). Esto debido a que se ha descrito que nanopartículas esféricas tienden a agregarse y afectar la toxicidad celular. Sin embargo, a pesar de las diversas variantes, está esclarecido que el efecto citotóxico de las AuNPs es dependiente del tiempo, de la concentración, de la línea celular y del agente reductor empleado en la síntesis.

Debido a que las leucemias son un tipo de cáncer hematológico y los tratamientos convencionales son inespecíficos, es importante comparar la toxicidad de la AuNPs-Qts con células no tumorales. Para ello, se evaluó su efecto sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). A la CC₅₀ y a la CC₁₀₀ observadas con AuNPs-Qts en células leucémicas, en PBMCs se induce menos del 5% y menos del

10% de muerte celular, respectivamente, a las 24h de tratamiento, esto nos indica que las AuNPs-Qts inducen muerte celular selectiva en células cancerosas. Estos resultados también corresponden con otro estudio en el que se demostró que las AuNPs reducidas con un extracto metanólico no inducen toxicidad significativa en PBMCs a las 72h de tratamiento (Namvar et al., 2015). Además, en otro estudio de nuestro grupo de investigación se demostró que la citotoxicidad en PBMC es menor al 20%; aunque la población correspondiente a las células del linaje mieloide son las más sensibles al tratamiento, (Álvarez-Chairez, 2016; García-Juárez, 2017). Sin embargo, en otro estudio en el que utilizaron AuNPs con citrato de sodio y AuNPs con PAMAM (poliamidoamina) a una concentración de 50 μ M, se observó que inducen cerca del 30% de muerte celular en PBMCs a las 24h de tratamiento (Paino et al., 2012) Este porcentaje a pesar de ser menor al inducido en células cancerosas podría aumentar si el tratamiento se mantiene por más tiempo.

En los análisis morfológicos no reportados en esta tesis, pero también confirmados en trabajos anteriores (García Juárez, 2016) se observó que las AuNPs-Qts no entran a las células PBMCs pero sí en las células K562 y CEM. Así pues, se confirma que la toxicidad de las AuNPs es dependiente del tipo celular. La diferencia de citotoxicidad observada en las líneas celulares de cáncer y las PBMC sugieren que la diferencia en la sensibilidad al tratamiento de AuNPs-Qts podría deberse al mecanismo de entrada de las AuNPs a la célula, a proteínas asociadas al tipo celular, o a diferencias en el cultivo; ya que las PBMCs son cultivo primario y las células leucémicas son líneas celulares en constante proliferación. Por lo que sería interesante evaluar el efecto de las AuNPs en líneas celulares no tumorales y en cultivos primarios de leucemia, analizar si las AuNPs son internalizadas a las células leucémicas y a la vez el mecanismo de internalización de las AuNPs en células leucémicas y en PBMCs.

Para determinar el mecanismo de citotoxicidad de las AuNPs-Qts, se decidió analizar si estas inducen la producción de ROS, debido a que se ha reportado que otras AuNPs generan la producción de ROS (Chomposor et al., 2010) (Li et al., 2008) (Liu, Gu, Zhang, & Ding, 2013) (Y. Zhao et al., 2011) (Pradida et al., 2014) y que esta puede variar dependiendo del tipo de nanopartículas y del tipo celular. Los resultados de este

trabajo muestran que la CC_{50} de las AuNPs-Qts inducen un 40% de ROS en células K562 y un 35% en células CEM. Este resultado corresponde con García-Juárez que reportó que las AuNPs-Qts de 1-10nm también inducen la producción de ROS en células K562 y Jurkat a la concentración citotóxica media; siendo 30% en células K562 y 40% en células Jurkat y con otro reporte del mismo grupo de investigación que demostró que las AuNPs-Qts de 1-10 nm inducen producción de ROS en células HeLa 50% y MCF-7 45% (Rodríguez-Abrego 2016). En múltiples ocasiones se ha reportado que las AuNPs inducen producción de ROS, aun cuando son sintetizadas de forma diferente. Se demostró que AuNPs de 2nm funcionalizadas con amonio cuaternario con una cola de alquilo hidrofóbica, inducen un aumento en la producción de las ROS en células HeLa de cáncer de cérvix (Chompoosor et al., 2010). Otro estudio, demostró que AuNPs reducidas con un extracto metanólico (60uM), generan un aumento del 80% en la producción de ROS dosis y tiempo dependiente en células de linfoma de linfoma de linfocitos B (SUDHL-4) (Pradida et al., 2014). También se reportó que AuNPs-Borohidrato de sodio de 29 nm generan un aumento en la producción de ROS y que estas cumplen un rol importante en la señalización intracelular del mecanismo de muerte inducido por las AuNPs en células A549 (Ramalingan et al., 2017). Todos estos reportes al igual que el nuestro indican que las nanopartículas de oro inducen la producción de ROS intracelular en células tumorales, indicando que posiblemente la toxicidad de las AuNPs está mediada por la producción de ROS, independientemente del linaje celular, del agente reductor y del tamaño de las nanopartículas. Esto hace pensar que las AuNPs desencadenan un mecanismo de señalización intracelular importante mediado por la producción de ROS, ya que las ROS juegan un papel importante como segundos mensajeros en vías de señalización y son necesarios para el metabolismo celular. Sin embargo, un aumento desregulado en la cantidad de estos genera muerte celular. Por ello, se decidió analizar la implicación de las ROS en el mecanismo de MCR inducido por las AuNPs-Qts.

Si bien las ROS son subproducto del metabolismo aeróbico de las mitocondrias, un aumento en su producción puede ocasionar estrés oxidativo y muerte celular (Schieber & Chandel, 2014). Puesto que las AuNPs-Qts inducen la producción de ROS, se decidió analizar si podría inhibirse en presencia de un antioxidante N-Acetilcisteína

(NAC). NAC es un aminotiol y precursor sintético de la cisteína intracelular y de GSH y por lo tanto se considera un importante antioxidante (Shi-Yong, 2010). Los resultados de la utilización del NAC en coincubación muestran que los ROS producidos a partir del tratamiento con AuNPs-Qts pueden inhibirse en presencia del NAC, pasando de un 35% y 40% a un 3% y 5% en células K562 y CEM, respectivamente. Este resultado demuestra que el NAC inhiben los ROS producidos por las AuNPs-Qts. Debido a que la acción del NAC resulta de la eliminación de radicales libres y al aumento de los niveles de GSH intracelular; sería importante evaluar si la producción de ROS generado por el tratamiento con AuNPs-Qts puede inhibirse en presencia de otros antioxidantes como el hidroxianisol butilado (BHA), Trolox, manitol, entre otros descritos (Shi-Yong, et al., 2010), para determinar si la generación de los ROS se debe a su inhibición y no a la producción de GSH generados a causa del NAC. Por lo tanto, también sería interesante conocer si el aumento de los ROS conduce a la célula a un estrés oxidativo; para ello, sería importante conocer y cuantificar la cantidad de antioxidantes y de oxidantes generados por las AuNPs-Qts en las células.

Diversos estudios sugieren que la citotoxicidad de las AuNPs depende de ROS (Lison, & Kirsch-Volders, 2008; M. Liu et al., 2013Fu, Xia, Hwang, Ray, & Yu, 2014; González), lo que genera un estrés oxidativo en la célula que conlleva a una despolarización de la mitocondria. Para ello, se analizó si las AuNPs-Qts inducen daño mitocondrial en células K562 y CEM por ello, se midió el potencial de membrana mitocondrial. Los resultados demuestran que las AuNPs-Qts inducen la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en un 60% y 99%, respectivamente en células K562 y CEM. Este resultado sugiere que las AuNPs-Qts inducen daño mitocondrial y en el que las células CEM son más sensibles al tratamiento y le genera más daño mitocondrial, esto puede deberse a que tienen una mayor producción de ROS que las células K562. Esto concuerda con lo reportado por Lee y colaboradores en 2009, en donde demuestran que nanopartículas de PAMAM inducen pérdida del potencial de membrana mitocondrial en células WI-26 VA4, y con Hussain y colaboradores en 2010, que demostraron que nanopartículas de carbono y de dióxido de titanio inducen un aumento en la producción de ROS en células 16-HBE0. Por otro lado, Ma y colaboradores demostraron en 2011 que nanopartículas de germanio generaban ROS

que inducían a su vez la pérdida del potencial mitocondrial en células de cáncer de ovario de hámster (CHO K1). Sin embargo, las mitocondrias no son las únicas capaces de producir ROS en la célula; por lo tanto, es posible que las AuNPs-Qts no generen el daño mitocondrial, si no que aumentan la producción de ROS que puedan dañar la mitocondria al igual que en lo reportado por (Ma, et al., 2011).

Diversos estudios han demostrado que las ROS pueden dañar a diferentes organelos como núcleo y mitocondria (Schieber & Channel, 2014). Por lo tanto, se decidió analizar si los ROS generados a partir del tratamiento con AuNPs-Qts inducen daño mitocondrial o si las AuNPs-Qts generan daño mitocondrial que conlleva al aumento de las ROS intracelulares. Debido a que se demostró que el NAC inhibe las ROS, se analizó el potencial de membrana mitocondrial en presencia de NAC. Los resultados demuestran que el daño mitocondrial que inducen las AuNPs-Qts es generado por las ROS, dado que en presencia de NAC el potencial de membrana mitocondrial no se pierde; es decir, se mantiene igual que el control sin tratamiento. Este resultado concuerda con un estudio realizado por Ramalingan y colaboradores, que demostraron que AuNPs-Borohidrato de sodio de 29 nm generan un aumento en la producción de ROS y que generan la despolarización de la mitocondria en células A549 (Ramalingan et al., 2017). Otro estudio, demostró que AuNPs generan ROS en células de linfoma de linfocitos B (SUDHL-4) que conlleva a la generación de estrés oxidativo que despolariza la membrana mitocondrial de las células (Pradida et al., 2014). También las AuNPs cubiertas con monosulfonato de trifenilfosfina (TPPMS) de 15 nm inducen un aumento estrés oxidativo causando un aumento en la producción de ROS, disminuyendo los antioxidantes intracelulares, causando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en células HeLa (Pan et al., 2009).

Hasta aquí los resultados demuestran que las AuNPs-Qts inducen citotoxicidad dependiente de la producción de ROS y que estos generan daño mitocondrial, indicando que pueden provenir de otros reservorios celulares como el retículo endoplásmico o de enzimas NOX de la membrana. En un estudio se observó que AuNPs generan estrés en retículo endoplásmico, en células K562 (Tsai et al., 2011). Las AuNPs podrían entonces internalizarse a la célula generando proteínas mal

plegadas que generen un estrés en el retículo endoplásmico y así generar las ROS que dañan mitocondrias; o bien que los ROS generen la activación de enzimas NOX que generen aún más ROS en la célula y dañen mitocondria. Por ello, sería importante evaluar de que organelo o el origen de las ROS que se generan a partir del tratamiento con AuNPs-Qts.

Debido a que las ROS son agentes oxidantes que pueden dañar tanto a proteínas, lípidos y/o al ADN (Schieber y Chandel, 2014), un aumento de las ROS, puede generar estrés oxidativo causando daño en el ADN, y así promover la activación de p53 y la fosforilación de la variante de histona H2AX (γ -H2AX) (Wan et al., 2012). En previos reportes, se observó que la citotoxicidad de las AuNPs es dependiente de ROS (Lison, & Kirsch-Volders, 2008; M. Liu et al., 2013; Fu, Xia, Hwang, Ray, & Yu, 2014; Gonzalez,) y en nuestros resultados se confirmó que las AuNPs-Qts inducen un aumento de las ROS y que dañan a la mitocondria, se decidió analizar si las AuNPs-Qts generan daño nuclear o si las ROS producidas por las AuNPs-Qts generan daño nuclear, otro organelo crucial en el mecanismo de muerte celular. El daño en el ADN, puede generar roturas de doble cadena (DBSs) o de cadena sencilla (SBSs) y en respuesta, la histona H2A, concretamente la variante H2AX, es rápidamente fosforilada en el residuo serina 139 (γ -H2AX) por distintas quinasas activadas, formando focos discretos en los sitios del ADN lesionado. La fosforilación de esta histona es un paso esencial para la respuesta al daño en el ADN ya que sirve como señal de localización del daño (marcador epigenético) y por lo tanto ubica el lugar donde será ensamblado el foco de reparación. Sin embargo, un gran número de lesiones en el ADN puede llevar al aumento de los niveles de p53, así como a su activación. La proteína p53, a su vez al ser un factor de transcripción puede activar la expresión de p21, y por lo tanto bloquear la ciclina G1/cdk, llevando así a un arresto en el ciclo celular de la fase G1. Para ello, se decidió analizar la fosforilación de la variante de histona H2AX en su forma γ -H2AX, la activación de p53 y alteraciones en el ciclo celular.

Los resultados muestran que las AuNPs-Qts generan un daño en el ADN en ambas líneas celulares a las 24h de tratamiento, mostrando un aumento en γ -H2AX generado por la producción de las ROS. En las células K562 observamos que las

AuNPs-Qts inducen 54% de γ -H2AX; sin embargo, en presencia de NAC (inhibidor de ROS), se observa un 4% de γ -H2AX al igual que el control sin tratamiento, indicando que las ROS producidas por el tratamiento con AuNPs-Qts generan daño en el ADN. Es de notar que las células CEM de forma basal tienen un gran porcentaje de γ -H2AX (70%), que aumenta con el tratamiento de AuNPs-Qts (90%), y que es inhibido en presencia de NAC (73%), indicando que al igual que en las células K562, las ROS generadas por las AuNPs son los que causan el daño en el ADN. Esta diferencia de γ -H2AX en las líneas celulares puede deberse a mutaciones específicas, las células CEM tienen una mutación en p53, en PI3KCA que modulan mecanismos intracelulares que generan la fosforilación de H2AX, a diferencia con las células K562 que no genera esta fosforilación.

La demostración de que no son las nanopartículas sino las ROS que se generan en presencia de las nanopartículas las que dañan el ADN concuerda con otros reportes. Recientemente se demostró que nanopartículas de oro con BSO (que disminuye la cantidad de glutatión intracelular) inducen la fosforilación de H2AX (γ -H2AX) indicando que provocan daño en el ADN en células A549 (Liu et al., 2013). También se demostró que AuNPs de 2nm funcionalizadas con amonio cuaternario con una cola de alquilo hidrofóbica generan ROS que causan daño en el ADN en células HeLa (Chompoosor, et al., 2010).

El daño en el ADN puede activar rutas intracelulares, una de las más importantes es la activación de p53; por ello, se analizó la implicación de p53 en el tratamiento con AuNPs-Qts. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con AuNPs-Qts induce una activación ligera, pero significativa de p53 en las células K562. Por otro lado, en las células CEM se observó que de forma basal tienen una alta expresión de p53, debido al aumento de γ -H2AX, que además de ser un marcador de daño también se activa la replicación del ADN. Sin embargo, el tratamiento con AuNPs-Qts induce un aumento en la expresión de p53. Este resultado sugiere que la célula podría tener alteraciones en el ciclo celular debido a las ROS que generan las AuNPs-Qts, por ello decidimos analizar alteraciones en el ciclo celular. En el análisis del ciclo celular de las células leucémicas K562 y CEM tratadas con AuNPs-Qts,

podemos observar que las células K562 sufren un ligero arresto en el ciclo celular en la fase G1, ya que un 35% de células en estado control se encuentran en esta fase, mientras que el 52% se encuentran en esta fase después del tratamiento con AuNPs-Qts. En la fase de S no se observa alguna alteración significativa, en la fase G2, se observa una disminución del porcentaje, de las células tratadas con AuNPs-Qts, siendo un 18% las células control y un 9% las células tratadas con AuNPs-Qts; indicando que las células intentan reparar el daño causado frenando su crecimiento y a su vez inhibiendo la división celular. Este resultado concuerda con los resultados de García-Juárez que observó que las células K562 tratadas con AuNPs-Qts provocan un ligero arresto en el ciclo celular a las 24 h de tratamiento; sin embargo, la alteración se mostró en la fase S, es decir en la fase de síntesis de ADN, indicando que la célula intenta reparar el daño causado por el tratamiento con AuNPs-Qts (García-Juárez, 2016). En el trabajo de Namvar y colaboradores se demostró que AuNPs de síntesis verde con *Sargassum muticum* inducen arresto en el ciclo celular en la fase G2 en células K562 (Namvar et al., 2015). Aunque el arresto en el ciclo celular se ha visto en diferentes fases y al parecer depende del agente reductor de las AuNPs, es evidente que las células K562 tienen la capacidad de modular su ciclo celular cuando son expuestas a tratamiento con AuNPs, para evitar la muerte celular. Pero sería interesante conocer si el arresto en el ciclo celular de las células K562 es mediado por las ROS; ya que en resultados no publicados en esta tesis se observó que las AuNPs-Qts inducen degradación del ADN que no se observa en células pre tratadas con NAC.

Es importante notar que no se encontró que las células CEM presentaran una alteración en el ciclo celular en las células tratadas con AuNPs-Qts, dado que no hay diferencia significativa en las fases del ciclo celular de las células control y las células tratadas con AuNPs-Qts, pero al igual que las células K562 se observó un aumento en la degradación del ADN. Estos resultados indican que las AuNPs producen un daño en el ADN de las células CEM, pero no se induce arresto celular, esto puede deberse a las mutaciones que las células CEM tienen en las proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, como p53. Este resultado concuerda con un reporte anterior, en que se observó que las células HeLa y MCF-7 tratadas con AuNPs-Qts no muestran ninguna alteración en el ciclo celular a las 24, 48 y 72h de tratamiento (deLeón-Chávez,

2016). Nuestro resultado concuerda con otro estudio que reportó que las células Jurkat tratadas con AuNPs-Qts no causan alteración en su ciclo celular a las 24h de tratamiento (García-Juárez, 2016), ya que tanto las células CEM y las Jurkat son células de leucemia linfocítica aguda de células T y probablemente compartan mutaciones que no permiten regular su ciclo celular cuando son expuestas a un tratamiento. Esto también puede deberse a la producción de ROS generadas por las AuNPs-Qts ya que en comparación con las células K562 estas producen más ROS que generan más daño mitocondrial. Por lo que sería interesante conocer si hay alteraciones en ciclo celular a tiempos.

Ya que se observó que tanto el daño nuclear como al daño mitocondrial está mediado por las ROS, se analizó si las ROS median el mecanismo de muerte celular. Para ello, se utilizó al NAC como agente inhibidor de ROS, analizando características de MCR mediante citometría de flujo. Los resultados demuestran que la muerte celular inducida por las AuNPs-Qts es inhibida en presencia de NAC, sugiriendo que los ROS median el mecanismo de muerte celular inducido por las AuNPs-Qts. Esto se observó en ambas líneas celulares, tanto K562 como CEM. Lo que se correlaciona con estudios de citotoxicidad mediada por nanomateriales, donde se atribuye que la generación de ROS es el principal mecanismo asociado a MCR producida por las AuNPs (Hahm et al., 2011; Nair et al., 2009; Morgan & Liu, 2010), ya que estas debido a su tamaño, forma y carga presentan una gran facilidad de contacto e interacción con superficies biológicas, así como la capacidad de atravesar barreras biológicas que en última instancia causan una disfunción celular llevando a la muerte mediada por ROS (Fu et al., 2014). Confirmando que las ROS tienen un papel crucial en la toxicidad de las AuNPs-Qts. Esto concuerda con un estudio anterior, que demostró que las AuNPs-Qts de 1-10 nm inducen muerte celular dependiente de ROS en células HeLa y en células MCF-7 (Rodríguez-Abrego, 2016), y con otro estudio, que demostró que AuNPs reducidas con un extracto metanólico (60uM), generan un aumento del 80% en la producción de ROS dosis y tiempo dependiente en células de linfoma de linfoma de linfocitos B (SUDHL-4) (Pradida et al., 2014). Por lo que las AuNPs-Qts pueden generar daño en la membrana plasmática que de alguna forma activen enzimas NOX que generen ROS que dañan a núcleo y mitocondria de forma temprana y concluye en

la muerte celular de la célula. Otra hipótesis es que las AuNPs-Qts generen estrés en el retículo endoplásmico que genera la liberación de ROS que daña a la mitocondria y que esta libera más ROS que causan daño en el ADN que intenta repararse pero que con el paso del tiempo concluye en un mecanismo de muerte celular regulada. Ya que muerte celular que inducen las AuNPs-Qts es de tipo regulada porque se modula por la producción de ROS y como la producción de ROS es una característica que comparten los mecanismos de MCR como la autofagia y la necroptosis, muchos trabajos han publicado que las nanopartículas metálicas pueden inducir muerte celular regulada en células cancerosas (Pradida et al., 2014; Namvar et al., 2015; Ma et al., 2011). Los mecanismos de muerte celular mejor descritos actualmente son la autofagia, caracterizado por la formación de vacuolas, la apoptosis, caracterizado por la activación de caspasas y la necroptosis, caracterizado por la formación de un complejo proteico llamado necrosoma. Por tanto, decidimos analizar características generales de estos mecanismos de muerte celular; así como inhibidores específicos de cada uno para analizar el mecanismo de muerte celular regulada que inducen las AuNPs-Qts en células leucémicas K562 y CEM.

Se ha demostrado que la autofagia juega un papel importante en la modulación de muchas funciones fisiológicas importantes, como la supervivencia celular bajo condiciones de estrés, muerte celular y un control de calidad de los organelos (He & Klionsky, 2009). Sin embargo, la función principal de la autofagia es la degradación; sin embargo, modula otras funciones fisiológicas a través de la degradación. Por lo tanto, la inducción de autofagia y el bloqueo de autofagia basal tienen consecuencias fisiológicas muy diferentes. Por ello, decidimos analizar si las AuNPs-Qts inducen la formación de autofagosomas en células K562 y CEM, mediante citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con AuNPs-Qts induce la formación de autofagosomas. En los resultados, se observa que las células K562 de forma basal tienen cerca de un 40% de autofagosomas. En 2005, Fader & Colombo describieron que las células K562 al ser células provenientes de un linaje mieloide y precursoras de eritrocitos degradan sus organelos mediante autofagosomas para la maduración de eritrocitos. Por ello, es que en nuestros resultados observamos este alto porcentaje de autofagosomas en esta línea celular. A diferencia de las células CEM que de forma

normal no muestran la formación de autofagosomas de forma significativa, dado que estas células son de un linaje linfoide no tienen que eliminar organelos celulares a lo largo del proceso de su maduración. Los resultados muestran que al tratar a las células K562 con AuNPs-Qts hay un aumento de 85% en la cantidad de células para autofagia, al igual que en las células CEM aunque en este resultado la formación de autofagosomas es de un 30%, indicando que las AuNPs-Qts generan la formación de autofagosomas en células leucémicas. Sin embargo, en presencia de spautina-1 (inhibidor de autofagosomas), los autofagosomas no se forman. Elzinga et al., demostraron el eficaz uso de la spautina-1 como inhibidor de la formación de autofagosomas (Elzinga et al., 2013). Estos resultados concuerdan con otro reporte en donde se demostró que nanopartículas de oro de 10, 25 y 50 nm inducen la acumulación de autofagolisosomas en células K562; esto mediante microscopia confocal mediante la cuantificación de LC3-II, (proteína necesaria para la formación de autofagolisosomas) (Ma, et al., 2011). También, en otro estudio se demostró que nanopartículas de cadmio-selenio de 5nm inducen la formación de autofagosomas en células LLC-PK1 (células de riñón porcino) a las 6h de tratamiento, esto mediante la inmunodetección de la proteína LC3-II. (Stern et al., 2008). Estos resultados sugieren las AuNPs-Qts inducen MCR por autofagia en células cancerosas o que las células desencadenan un mecanismo pro-supervivencia en respuesta al tratamiento, debido al doble rol de la autofagia. Sin embargo, en otro reporte se observó que las AuNPs inducen la formación de autofagosomas como mecanismo prosupervivencia debido al estrés oxidativo generado por las AuNPs en células MRC-5 humanas (fibroblastos de pulmón) (Li et al., 2010). Por lo que sería importante evaluar si la formación de autofagosomas se debe a la producción de ROS o es un efecto directo de las AuNPs-Qts. Para analizar si la formación de autofagosomas es un mecanismo de muerte se analizó la muerte celular de las células K562 y CEM tratadas con AuNPs-Qts en presencia de spautina-1. Nuestros resultados muestran que en presencia de spautina-1, la muerte celular inducida por la AuNPs-Qts es potenciada en ambas líneas celulares. Mostrando así que tanto las células K562 como las CEM, modulan la formación de autofagosomas como mecanismo pro-supervivencia y no como mecanismo de muerte celular. En un reporte se observó que la muerte celular producida por el imatinib

mesilato en células K562 se veía potenciada en presencia de spautina-1, dado que estas tienen resistencia a la muerte apoptótica, esto también se reportó en muestras de pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica (Shao et al., 2013). Debido a que el tratamiento con AuNPs-Qts no mostró inducir autofagia como mecanismo de MCR; entonces, se decidió analizar características de apoptosis.

Las caspasa-3 activa es conocida por ser la caspasa efectora del mecanismo de MCR por apoptosis; por ello, fue el marcador que se decidió analizar. Los resultados muestran que las células K562 tratadas con AuNPs-Qts inducen una ligera activación (22%) de caspasa-3 mientras que en las células CEM hay un 35% de activación; esto nos indica que, el porcentaje de activación es dependiente de línea celular y por lo tanto, que el mecanismo de MCR es diferente en ambas líneas celulares, ya que las células CEM muestran un aumento mayor de caspasa-3 que las células K562. Sin embargo, ambas en presencia de un inhibidor general de activación de caspasas (Q-VD-OPH) y de NAC la caspasa-3 no se activa, sugiriendo que la activación de caspasa-3 es dependiente del daño intracelular generado por los ROS que generan las AuNPs-Qts en las células leucémicas, probablemente a causa del daño temprano que se genera en el ADN y en la mitocondria en donde se pueden liberar factores que activan la vía de muerte por apoptosis. Ya se ha demostrado que AuNPs pueden inducir la activación de caspasas; en un estudio se demostró que nanopartículas de poliamidamina involucra la activación de la caspasa efectora y de la caspasa 9, indicando que induce apoptosis vía intrínseca en células WI-26 VA4 de riñón humano de 45 nm (Lee et al., 2009), otro estudio demuestra que AuNPs con quitosano de entre 10-15 nm inducen toxicidad dependiente de concentración en células A549, causando la activación de la caspasa-8 y provocando la fragmentación del ADN, concluyendo que inducen apoptosis (Choi., et al., 2011). Rodríguez-Abrego 2016, demostró que la muerte celular inducida por las AuNPs-Qts inducen la activación de la caspasa 3, y que la muerte celular es dependiente de esta; indicando que el mecanismo de muerte celular que inducen las AuNPs-Qts en células HeLa es apoptosis. En otro reporte se vio que las AuNPs-Qts inducen la activación de las caspasas 8 y 9 en células leucémicas K562 y Jurkat; sin embargo, que estos no son indispensables para el mecanismo de muerte celular que inducen las AuNPs-Qts (García-Juárez, 2017). Dado que la activación de caspasa-3 no

nos indica que la muerte celular sea por apoptosis, se analizó la dependencia de las caspasas en el mecanismo de MCR, para ello se analizó la muerte celular en presencia de Q-VD-OPH mediante citometría de flujo. Los resultados indican que las células CEM inducen MCR por apoptosis no así las células K562. Las células K562 tienen una sobre expresión de Bcl-2 una proteína anti apoptótica y una sub expresión en Bax una proteína pro apoptótica, lo que provoca que tengan una resistencia a la apoptosis; esto explica que las AuNPs-Qts no induzcan apoptosis en esta línea celular. A pesar de que está descrito que las células CEM también tienen una mutación en Bcl-2, las AuNPs-Qts inducen apoptosis en esta línea celular. Esto corresponde con un estudio que demostró que AuNPs inducen apoptosis en células SDHL-4, involucrando la activación de las caspasas 3, 8 y 9, así como la producción de ROS y la liberación de BAX (Pradida, et al., 2014). Por lo que, sería importante conocer si la apoptosis se genera vía extrínseca o por vía intrínseca; por ello, sería importante valorar la activación de las caspasas 8 y 9; así como proteínas pro apoptótica como BAX y BAK.

Ya que se demostró que la muerte celular que inducen las AuNPs-Qts en las células leucémicas K562 y CEM no es autofagia, pero que en las células CEM es apoptosis, se decidió analizar si la muerte celular podía involucrar a la necroptosis. La necroptosis, es un tipo de MCR que se caracteriza por la formación del necrosoma, un complejo multi proteico que lleva a la MCR (Zu et al., 2016). Se ha descrito que cierto tipo de nanopartículas pueden inducir este mecanismo de muerte, por lo que se decidió analizar si las AuNPs-Qts inducen necroptosis en las células K562 y CEM. Para ello, se utilizó un inhibidor específico del necrosoma (necrostatina-1). Los resultados demuestran que el porcentaje de muerte celular en las células K562 inducida por las AuNPs-Qts es inhibida en presencia de la necrostatina-1 a un 40% de forma significativa. Sin embargo, en las células CEM, la MCR inducida por las AuNPs-Qts es potenciada de un 50% a cerca de un 60% de muerte celular. Lo que indica que el mecanismo de muerte celular que inducen las AuNPs-Qts en células K562 es necroptosis, pero no en células CEM. Esto concuerda con un estudio se demostró que nanopartículas de germanio de 1.25nm, inducen necrosis regulada en células CHO K1, generando un aumento de calcio intracelular, aumento de las ROS induciendo daño mitocondrial y que puede ser inhibido en presencia de necrostatina-1 (Ma et al., 2013).

El aumento del calcio intracelular es una característica propia de la necroptosis; por lo tanto, sería importante evaluar si las AuNPs-Qts inducen su liberación; así como también la fosforilación de RIPK1, RIPK3 y MLKL, para poder confirmar la formación del necrosoma en células K562.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que las AuNPs-Qts inducen la producción de ROS en células leucémicas, causando daño nuclear y mitocondrial que conduce a la activación de la casapasa-3 y concluye en apoptosis en células CEM y en necroptosis en células K562. A continuación, se enlistan las conclusiones particulares:

1. Las AuNPs-Qts inducen muerte celular con características de muerte celular regulada (exposición de la fosfatidilserina y permeabilidad de la membrana plasmática) en células leucémicas K562 y CEM.
2. Las AuNPs-Qts son poco citotóxicas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
3. Las AuNPs-Qts inducen la producción de especies reactivas de oxígeno en células leucémica K562 y CEM.
4. Las especies reactivas de oxígeno producidas por el tratamiento con AuNPs-Qts en células K562 y CEM generan daño mitocondrial.
5. Las especies reactivas de oxígeno producidas por el tratamiento con AuNPs-Qts generan daño nuclear; provocando la fosforilación de la variante de histona H2AX (γ -H2AX) e induciendo la activación de p53 en células K562 y CEM.
6. En células K562 el tratamiento con AuNPs-Qts induce un ligero arresto en el ciclo celular, que no se observa en células CEM.
7. Las AuNPs-Qts provocan muerte celular regulada dependiente de especies reactivas de oxígeno en células leucémicas K562 y CEM.
8. El tratamiento con AuNPs-Qts induce la formación de autofagosomas en células K562 y CEM como mecanismo pro-supervivencia.
9. Las AuNPs-Qts inducen la activación de la caspasa efectora 3 en las líneas celulares K562 y CEM.
10. Las AuNPs-Qts inducen apoptosis en célula CEM.
11. Las AuNPs-Qts inducen necroptosis en células K562.

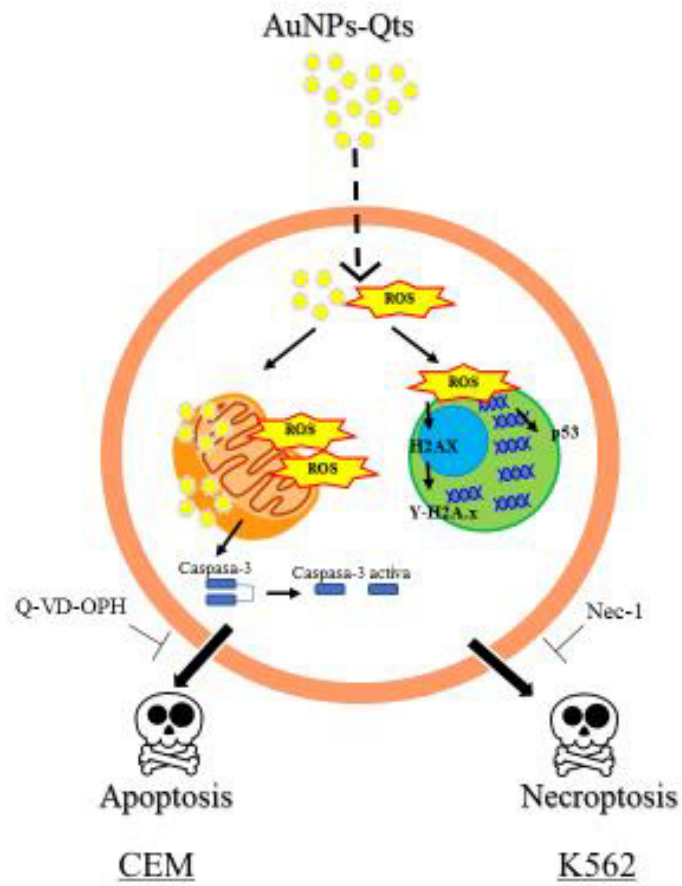


Figura 33. **Mecanismo propuesto de muerte celular inducido por AuNPs-Qts.** Las AuNPs-Qts inducen MCR dependiente de la línea celular; induciendo apoptosis en células CEM y necroptosis en células K562.

PERSPECTIVAS

1. Analizar la implicación de las especies reactivas de oxígeno inducidas por las AuNPs-Qts en presencia de otros antioxidantes.
2. Estudiar si las AuNPs-Qts provocan estrés oxidativo: medir la cantidad de agentes oxidantes y antioxidantes intracelulares.
3. Evaluar si la expresión de p53 inducida por las AuNPs-Qts es dependiente de la producción de especies reactivas de oxígeno.
4. Analizar la expresión de p21 en el mecanismo de muerte celular regulada que inducen las AuNPs-Qts.
5. Evaluar si las AuNPs-Qts provocan la condensación de la cromatina.
6. Estudiar si las ROS generadas por el tratamiento con AuNPs-Qts provienen de enzimas NOX o de retículo endoplásmico.
7. Analizar si las AuNPs-Qts son internalizadas en las células.
8. Evaluar la fosforilación de RIPK1, RIPK3 y MLKL en células K562.
9. Evaluar el efecto *in vivo* de las AuNPs-Qts.

BIBLIOGRAFIA

- Abadeer, N. S., & Murphy, C. J. (2016). Recent Progress in Cancer Thermal Therapy using Gold Nanoparticles. <http://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11232>
- Abrego-Rodriguez, C. (2016). *Análisis de la muerte celular inducida por nanopartículas de oro cubiertas con quitosano en las líneas celulares tumorales MCF-7 y HeLa.*
- Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. W. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14, 1–16. <http://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>
- Alkilany, A. M., & Murphy, C. J. (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles : what we have learned so far ?, 2313–2333. <http://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>
- Andón, F. T., & Fadeel, B. (2012). Programmed Cell Death: Molecular Mechanisms and Implications for Safety Assessment of Nanomaterials. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 733–742. <http://doi.org/10.1021/ar300020b>
- Arvizo, R. R., Giri, K., Moyano, D., Miranda, O. R., Madden, B., McCormick, D. J., ... Mukherjee, P. (2012). Identifying new therapeutic targets via modulation of protein corona formation by engineered nanoparticles. *PLoS ONE*, 7(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0033650>
- Baritaud, M., Cabon, L., Delavallée, L., Galán-Malo, P., Gilles, M.-E., Brunelle-Navas, M.-N., & Susin, S. a. (2012). AIF-mediated caspase-independent necroptosis requires ATM and DNA-PK-induced histone H2AX Ser139 phosphorylation. *Cell Death and Disease*, 3(9), e390. <http://doi.org/10.1038/cddis.2012.120>
- Barrio, J. V. (2012). *Síntesis de nanopartículas de oro y estudio de su deposición sobre nanoestructuras de base silíceas.*
- Belizario, J., Vieira-Cordeiro, L., & Enns, S. (2015). Necroptotic cell death signaling

- and execution pathway: Lessons from knockout mice. *Mediators of Inflammation*, 2015. <http://doi.org/10.1155/2015/128076>
- Belizário, J., Vieira-Cordeiro, L., & Enns, S. (2015). Necroptotic cell death signaling and execution pathway: Lessons from knockout mice. *Mediators of Inflammation*. <http://doi.org/10.1155/2015/128076>
- Bhattacharyya, D., Singh, S., & Satnalika, N. (2009). Nanotechnology , Big things from a Tiny World : a Review. *Science and Technology*, 2(3), 29–38.
- Bhumkar, D. R., Joshi, H. M., Sastry, M., & Pokharkar, V. B. (2007a). Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. *Pharmaceutical Research*, 24(8), 1415–1426. <http://doi.org/10.1007/s11095-007-9257-9>
- Bhumkar, D. R., Joshi, H. M., Sastry, M., & Pokharkar, V. B. (2007b). Chitosan Reduced Gold Nanoparticles as Novel Carriers for Transmucosal Delivery of Insulin, 24(8). <http://doi.org/10.1007/s11095-007-9257-9>
- Bhumkar, D. R., & Pokharkar, V. B. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. *AAPS PharmSciTech*, 7(2), E50. <http://doi.org/10.1208/pt070250>
- Birr, E., Nmeth, A. S., Sisak, C., Fecz, T., & Gyenis, J. (2008). Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(6), 1240–1246. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2007.11.005>
- Boyles, M. S. P., Kristl, T., Andosch, A., Zimmermann, M., Tran, N., Casals, E., ... Duschl, A. (2015). Chitosan functionalisation of gold nanoparticles encourages particle uptake and induces cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in phagocytic cells, as well as enhancing particle interactions with serum components. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 84. <http://doi.org/10.1186/s12951-015-0146-9>
- Cabon, L., Martinez-Torres, A. C., & Susin, S. A. (2013). La mort cellulaire

- programme ne manque pas de vocabulaire. *Medecine/Sciences*, 29(12), 1117–1124. <http://doi.org/10.1051/medsci/20132912015>
- Cheng, X., Tian, X., Wu, A., Li, J., Tian, J., Chong, Y., ... Ge, C. (2015). Protein Corona Influences Cellular Uptake of Gold Nanoparticles by Phagocytic and Nonphagocytic Cells in a Size-Dependent Manner. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(37), 20568–20575. <http://doi.org/10.1021/acsami.5b04290>
- Cheung, R. C. F., Ng, T. B., Wong, J. H., & Chan, W. Y. (2015). Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Marine Drugs*. <http://doi.org/10.3390/md13085156>
- Chompoosor, A., Saha, K., Ghosh, P. S., Macarthy, D. J., Miranda, O. R., Zhu, Z., ... Rotello, V. M. (2010). The Role of Surface Functionality on Acute Cytotoxicity, ROS Generation and DNA Damage by Cationic Gold Nanoparticles, (20), 2246–2249. <http://doi.org/10.1002/sml.201000463>
- Christofferson, D. E., & Yuan, J. (2010). Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.003>
- Chueh, P. J., Liang, R.-Y., Lee, Y.-H., Zeng, Z.-M., & Chuang, S.-M. (2014). Differential cytotoxic effects of gold nanoparticles in different mammalian cell lines. *Journal of Hazardous Materials*, 264(2014), 303–12. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.031>
- Cleaver, J. E. (2011). H2Ax: Biomarker of damage or functional participant in DNA repair “all that glitters is not gold!” *Photochemistry and Photobiology*, 87(6), 1230–1239. <http://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00995.x>
- Collado-González, M., Fernández Espín, V., Montalbán, M. G., Pamies, R., Hernández Cifre, J. G., Díaz Baños, F. G., ... García de la Torre, J. (2015). Aggregation behaviour of gold nanoparticles in presence of chitosan. *Journal of Nanoparticle Research*, 17, 268. <http://doi.org/10.1007/s11051-015-3069-3>
- Creighton, J. A., & Eadont, D. G. (1991). Ultraviolet-Visible Absorption Spectra of

- the Colloidal Metallic Elements, 87(24), 3881–3891.
- Criado, C. L., & Reséndez, R. M. (2013). Fenómenos físicos de las nanopartículas de oro.
- Cruz, N. C., & Toledo, A. M. (2009). La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico, 35(3).
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*.
[http://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00031-5](http://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00031-5)
- Dambies, L., Vincent, T., Domard, A., & Guibal, E. (2001). Preparation of chitosan gel beads by ionotropic molybdate gelation. *Biomacromolecules*, 2(4), 1198–1205. <http://doi.org/10.1021/bm010083r>
- De León-Chávez. (2016). *Estudio del efecto citotóxico inducido por nanopartículas de oro recubiertas de quitosano en células HeLa*.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <http://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 594, 57–72. http://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4
- Fuchs, Y., & Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.033>
- Fulda, S. (2013). The mechanism of necroptosis in normal and cancer cells. *Cancer Biology and Therapy*, 14(11), 999–1004. <http://doi.org/10.4161/cbt.26428>
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. a, Abrams, J. M., Adam, D., ... Kroemer, G. (2014). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, (2014), 1–16. <http://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. (2010). Autophagy: cellular and molecular

- mechanisms. *J Pathol*, 221(1), 3–12.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hongmei, Z. (2012). Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review Scientist. *Apoptosis and Medicine*, 3–22. <http://doi.org/10.5772/50129>
- Hsiao, Y., & Stewart, R. D. (2008). Monte Carlo simulation of DNA damage induction by x-rays and selected radioisotopes. *Physics in Medicine and Biology*, 53(1), 233–44. <http://doi.org/10.1088/0031-9155/53/1/016>
- INEGI. (2016). *Estadísticas a Propósito Del... Día Mundial Contra El Cáncer (4 De Febrero) - Datos Nacionales*.
- Irachela, A. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 101(2), 1–33. Retrieved from <http://www.rac.es/ficheros/doc/00553.pdf>
- J. Turkevich; P.C. Stevenson; J. Hiller. (1951). Synthesis of Gold Nanoparticles Turkevich method. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55–75.
- Jain, S., Hirst, D. G., & O'Sullivan, J. M. (2012). Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *The British Journal of Radiology*, 85(1010), 101–113. <http://doi.org/10.1259/bjr/59448833>
- Jeyaraj, M., Arun, R., Sathishkumar, G., Mubarakali, D., Rajesh, M., Sivanandhan, G., ... Ganapathi, A. (2014). An evidence on G2/M arrest, DNA damage and caspase mediated apoptotic effect of biosynthesized gold nanoparticles on human cervical carcinoma cells (HeLa). *Materials Research Bulletin*, 52, 15–24. <http://doi.org/10.1016/j.materresbull.2013.12.060>
- Kerr, J. F. R. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. [http://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00457-2](http://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00457-2)
- Klionsky, D. J. (2008). Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. *Autophagy*. <http://doi.org/6398> [pii]

- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., ... Melino, G. (2009). Classification of Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3–11. <http://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>. Classification
- Kurokawa, M., & Kornbluth, S. (2009). Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.021>
- Li, B. J. J., Zou, L., Hartono, D., Ong, C., Bay, B., & Yung, L. L. (2008). Gold Nanoparticles Induce Oxidative Damage in Lung Fibroblasts In Vitro **, 138–142. <http://doi.org/10.1002/adma.200701853>
- Lim, Z.-Z. J., Li, J.-E. J., Ng, C.-T., Yung, L.-Y. L., & Bay, B.-H. (2011). Gold nanoparticles in cancer therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(8), 983–90. <http://doi.org/10.1038/aps.2011.82>
- Liu, M., Gu, X., Zhang, K., & Ding, Y. (2013). Gold nanoparticles trigger apoptosis and necrosis in lung cancer cells with low intracellular glutathione. <http://doi.org/10.1007/s11051-013-1745-8>
- Luo, H., Li, J., & Chen, X. (2010). Antitumor effect of N-succinyl-chitosan nanoparticles on K562 cells. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 64(8), 521–526. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.09.002>
- Ma, X., Wu, Y., Jin, S., Tian, Y., Zhang, X., Zhao, Y., ... Liang, X. J. (2011). Gold nanoparticles induce autophagosome accumulation through size-dependent nanoparticle uptake and lysosome impairment. *ACS Nano*, 5(11), 8629–8639. <http://doi.org/10.1021/nn202155y>
- Ma, Y. H., Huang, C. P., Tsai, J. S., Shen, M. Y., Li, Y. K., & Lin, L. Y. (2011). Water-soluble germanium nanoparticles cause necrotic cell death and the damage can be attenuated by blocking the transduction of necrotic signaling pathway. *Toxicology Letters*, 207(3), 258–269. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.09.018>
- Ma, Y., Huang, C., Tsai, J., Shen, M., Li, Y., & Lin, L. (2011). Water-soluble germanium nanoparticles cause necrotic cell death and the damage can be

- attenuated by blocking the transduction of necrotic signaling pathway.
Toxicology Letters, 207(3), 258–269. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.09.018>
- Maiorano, G., Sabella, S., Sorce, B., Brunetti, V., Malvindi, M. A., Cingolani, R., & Pompa, P. P. (2010). Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS Nano*, 4(12), 7481–7491. <http://doi.org/10.1021/nn101557e>
- Marks, P., Rifkind, R. A., Richon, V. M., Breslow, R., Miller, T., & Kelly, W. K. (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Reviews. Cancer*, 1(3), 194–202. <http://doi.org/10.1038/35106079>
- Matmati, M., Jacques, P., Maelfait, J., Verheugen, E., Kool, M., Sze, M., ... Guire, C. M. (2011). A20 (TNFAIP3) deficiency in myeloid cells triggers erosive polyarthritis resembling rheumatoid arthritis. *Nature Genetics*, 43(9), 908–12. <http://doi.org/10.1038/ng.874>
- Miguel Angel Méndez-Rojas, José Luis Sánchez-Salas, A. A.-M. (2013). Environmental risks of nanotechnology: Evaluating the ecotoxicity of nanomaterials. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 53, pp. 1689–1699). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Münch, R. (2003). Microbes and infection. *Microbes and Infection*. [http://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)00053-9](http://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)00053-9)
- Namvar, F., Rahman, H. S., Mohamad, R., Rasedee, A., Yeap, S. K., Chartrand, M. S., ... Tahir, P. M. (2015). Apoptosis Induction in Human Leukemia Cell Lines by Gold Nanoparticles Synthesized Using the Green Biosynthetic Approach, 2015.
- Nikam, A. P., Ratnaparkhiand, M. P., & Chaudhari, S. P. (2014). NANOPARTICLES – AN OVERVIEW, 3(5), 1121–1127.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., & Bao, J. K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), 487–498.