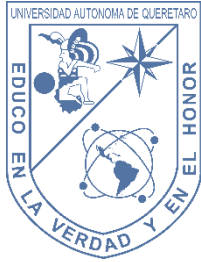


Fátima Selene Xocoyotl  
López

Síntesis de NPsAu antisentido y evaluación de  
su efecto inhibidor sobre *Tp53* sobre células  
cancerosas de colon SW480

2024



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina

## **Síntesis de NPsAu antisentido y evaluación de su efecto inhibidor sobre *Tp53* en células cancerosas de colon SW480**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestro en Ciencias en Biomedicina

Presenta

Fátima Selene Xocoyotl López

Dirigido por:

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Codirectora:

Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de medicina

Maestría en Ciencias en Biomedicina

**Síntesis de NPsAu antisentido y evaluación de su efecto inhibidor  
sobre *Tp53* en células cancerosas de colon SW480**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestro en Ciencias  
en Biomedicina

Presenta

Fátima Selene Xocoyotl López

Dirigido por:

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Codirectora:

Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández

Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda

Presidente

Dra. María de los Ángeles Cuán Hernández

Secretario

Dr. Rufino Nava Mendoza

Vocal

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga

Vocal

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusié

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Enero 2025

México

## Dedicatorias

*“Haz las cosas con amor, como si fueran para Dios y verás resultados increíbles”*

*-Colosenses 3:23*

A mi madre, por todo su apoyo durante este camino, lleno de retos desde inicio a fin, por creer y confiar en mí...espero seguir siendo motivo de orgullo para ti.

A mi padre, por enseñarme, no solo con palabras, sino con cada uno de sus actos, el valor del trabajo, la humildad y la integridad, pero sobre todo el amor por nuestra profesión.

A mis hermanas, Fernanda y Valeria, por su apoyo moral y porque a lo largo de este camino, ustedes han sido una fuente constante de apoyo, risas y amor.

A los Doctores y Doctoras que creyeron en mí y me apoyaron con este proyecto con sus conocimientos, paciencia y compromiso.

## Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Maestría en Ciencias en Biomedicina de la Facultad de Medicina del Campus Aeropuerto y al Laboratorio de Nanotecnología de la Facultad de Ingeniería.

A CONAHCYT por haber apoyado los proyectos Ciencia de Frontera 2019 número CF-2019/1560335 y Ciencia de Frontera clave 53395., con los cual se realizó esta tesis. Y por la beca ofrecida de maestría 2022-2024 (CVU: 1244379).

A mi comité sinodal:

A la Dra. Haydé Azeneth Vergara Castañeda, por abrirme las puertas de su grupo de trabajo, "las chicas del colon", y por darme la oportunidad de seguir explorando la nanotecnología, un campo no completamente nuevo para ambas, pero representaba un reto en el que aún teníamos mucho por descubrir y conocer.

Agradezco profundamente su valentía por atreverse a innovar conmigo, creyendo en mí y en mis locas ideas, incluso cuando apenas me conocía. Su confianza me impulsó a seguir adelante, y su sabiduría fue clave para darle forma y dirección a esas ideas, convirtiéndolas en algo mucho más sólido.

A la Dra. María de los Ángeles Cuan Hernández, quien ha estado a mi lado desde mis inicios en la licenciatura y ha sido una guía constante en mi camino hacia la maestría. Su apoyo incondicional no solo ha sido académico, sino que también se ha extendido a mi vida personal, siempre preocupándose por mi bienestar y alentándome a ser la mejor versión de mí misma.

Aprecio profundamente su ayuda en todo este proceso y por ser la primera en creer en mí, incluso en mis momentos de duda. Su confianza y amistad han sido fundamentales en mi desarrollo y crecimiento, y cada paso que doy en este camino es también un reflejo de su dedicación y amor por la enseñanza.

Gracias por estar siempre presente, por motivarme y por ser una amiga excepcional.

Al Dr. Rufino Nava Mendoza, por su apoyo y su inigualable alegría a lo largo de mi maestría. Su actitud positiva y su entusiasmo fueron una fuente de motivación que me impulsó a seguir adelante, incluso en los momentos más desafiantes. Gracias por siempre estar ahí con una sonrisa y palabras de aliento, por lo cual les tengo un cariño muy especial.

A la Dra. Ana Gabriela Hernández Puga, por su apoyo durante el desarrollo de mi tesis. Su disposición para investigar conmigo, resolver mis dudas y guiarme en el proceso de mi proyecto. Aprecio profundamente su amabilidad y su constante disponibilidad para escucharme, comprenderme y ofrecerme su tiempo, incluso en los momentos más ocupados.

A la Dra. Ana Alicia Sánchez Tusié, por su alegría contagiosa, que hicieron de sus clases de biología una experiencia inolvidable, compartiendo su amor por la biología de una manera tan auténtica y cercana. Gracias por ayudarme a resolver mis dudas y a ofrecerme su apoyo con una sonrisa. Aprecio su simpatía y la manera en que supo motivarme, no solo a nivel académico, sino también personal.

A la Dra. Guadalupe Soledad López Álvarez, por haber sido una pieza clave e importante en mi formación. Por su enorme paciencia, dedicación y disposición para guiarme en cada detalle de mis experimentos de biología, gracias por estar conmigo lado a lado, todo eso hizo que tuviera una experiencia invaluable.

Más allá de su impresionante trayectoria profesional, agradezco enormemente su calidez y amistad. Se convirtió no solo en una mentora, sino en alguien a quien admiro y respeto mucho, tanto por su conocimiento, como por la gran persona que es. Su apoyo y guía me ayudaron a crecer como estudiante y como persona.

Gracias, Doctora, por todo lo que me ha enseñado y por caminar conmigo en este proceso.

Al Dr. Jorge Mendiola Santibáñez, por su invaluable apoyo en la construcción del sistema de infrarrojo (IR). Su dedicación, disposición para explicarme con paciencia cada detalle y su constante ayuda en la resolución de mis dudas han sido

fundamentales para el avance de este proyecto y su gran disposición para estar siempre pendiente de mis complicaciones con el IR ha sido muy valioso para mi proyecto y para mí.

Al Dr. José Antonio Cervantes Chávez por abrirme las puertas de su Laboratorio de Microbiología Molecular de Microorganismos y apoyarme con el uso de sus equipos.

Al M en C. Salvador Ramírez Baltazar, del Laboratorio de Microbiología Molecular de Microorganismos, por todo su apoyo y porque siempre estuvo dispuesto a ayudarme, prestándome el equipo necesario y brindándome su asistencia con una actitud servicial y amable en cada ocasión.

A mis amigas “Las pelonas”, Cecy y Ere, por su compañía y sus constantes alientos en este camino. Juntas hemos pasado por momentos buenos y difíciles, siempre apoyándonos mutuamente y compartiendo tanto risas como retos. Su presencia hizo que este viaje fuera más llevadero y enriquecedor.

A mis amigos y amigas del posgrado de nanotecnología, Ireri, Fer, Marlu y Bren, por estar siempre a mi lado, por aconsejarme, cuidarme y, sobre todo, por hacerme reír en cada paso del camino. Su cariño y apoyo me ayudaron para enfrentar este reto y seguir adelante.

A Martín, quien ha sido una fuente constante de apoyo y motivación a lo largo de este proceso. Agradezco sinceramente que siempre creyeras en mí, tus palabras de aliento y ánimo que son invaluable para mí, incluso tú capacidad para hacerme reír y ayudarme en los momentos de estrés, gracias.

A mí familia, mi mamá, mi papá y mis hermanas Fer y Vale, porque sin su apoyo esto no hubiera sido posible, gracias por su confianza y apoyo en este camino que escogí y me hace muy feliz.

Por último y especialmente a mí, por lograr este gran reto, que aunque no fue fácil, e incluyo muchos sacrificios, lo tome, persistí y nunca me rendí, pero lo más importante “¡No le tuve miedo al éxito!”.

## Contenido

Dedicatorias .....	3
Agradecimientos.....	4
Índice de Figuras .....	9
Índice de tablas .....	13
Glosario de abreviaturas .....	14
Resumen.....	16
Abstract.....	17
1. Introducción .....	18
1.1 Definición del problema .....	19
2. Antecedentes .....	20
2.1 Cáncer.....	20
2.2 Etiología .....	20
2.2.1 Factores genéticos.....	20
2.2.2 Factores dietéticos .....	21
2.2.3 Enfermedades no cancerosas.....	21
2.2.4 Otros factores .....	21
2.3 Oncogenes y cáncer de colon .....	21
2.4 Mutación en <i>Tp53</i> .....	24
2.5 Terapias existentes .....	25
2.6 Oligonucleótidos Antisentido (ASOs) .....	27
2.7 Nanotecnología .....	30
2.8 Nanomedicina .....	31
2.9 Aplicaciones en modelos celulares .....	32
2.10 Sonoquímica .....	33
2.11 Nanopartículas de Au (NPsAu) .....	34
2.12 Polietilenglicol (PEG).....	35
2.13 Quercetina .....	36
3. Justificación .....	37
4. Hipótesis .....	38
5. Objetivo General .....	38



5.1	Objetivos Específicos .....	38
6.	Materiales y métodos .....	39
6.1	Material.....	39
6.2	Metodología.....	39
6.2.1	Síntesis de NPsAu antisentido .....	39
6.2.2	Espectroscopía UV-VIS .....	39
6.2.3	Microscopía Raman (RAMAN). .....	39
6.2.4	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). .....	40
6.2.5	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Espectroscopía de Dispersión de energía (EDS).....	40
6.2.6	Cultivo celular .....	41
6.2.7	Diseño de los oligonucleótidos antisentido (ASOs).....	42
6.2.8	Tratamiento de pruebas con NPsAu sobre las células SW480.....	43
6.2.9	Viabilidad celular por el método de MTS .....	45
7.	Resultados .....	46
7.1	Espectroscopía UV-VIS. ....	46
7.2	RAMAN .....	49
7.3	TEM.....	53
7.4	Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	56
7.5	Diseño de los ASOs antisentido (ASOs) .....	59
7.6	Ensayo de viabilidad MTS .....	60
8.	Conclusiones.....	66
9.	Referencias .....	67

## Índice de Figuras

Figura 1. Desarrollo del cáncer colorrectal y su base genética. La progresión del epitelio normal a metástasis. Cada etapa está asociada con mutaciones genéticas, como las alteraciones en el gen APC, KRAS, DCC, y la pérdida del gen supresor de tumores Tp53. Estos cambios moleculares impulsan el crecimiento descontrolado y la diseminación metastásica, característicos del cáncer colorrectal. Elaboración propia, Imagen adaptada de (Bhalla et al., 2018). .....	23
Figura 2. Función del gen Tp53 en la regulación del ciclo celular. Tp53, mejor conocido como "el guardián del genoma", juega un papel importante en la respuesta al daño del DNA. En condiciones de estrés celular, Tp53 se activa y regula los genes involucrados en la detención del ciclo celular, como lo es p21, reparando así del DNA o la inducción de apoptosis, evitando la proliferación de células dañadas y la formación de tumores. Imagen adaptada del texto Hakim, 2021 .....	24
Figura 3. La figura muestra la evolución de las modificaciones en las estructuras químicas y las características funcionales de los oligonucleótidos antisentido (ASOs) lo largo de tres generaciones. En la primera generación, con modificaciones en el enlace fosfodiéster, como el fosforotioato (PS) y el tiofosforamidato, sustituyendo un átomo de oxígeno por un átomo de azufre. La segunda generación introduce modificaciones en la posición 2' del azúcar (2'-O-metilo, 2'-MOE y 2'-Fluoro). La tercera generación incluye modificaciones más complejas, como el ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico peptídico (PNA) y morfolino. Estas modificaciones químicas buscan optimizar la eficacia y la inhibición del RNAm para aplicaciones terapéuticas.....	29
Figura 4. Las nanopartículas (NPs) se transportan pasivamente por medio del efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR), debido a que las NPs aprovechan la formación de vascularidad irregular con poros grandes y el drenaje linfático deficiente. Imagen adaptada de R. Acharya, (2019) .....	32
Figura 5. Sonoquímica y cavitación ultrasónica en la síntesis de nanopartículas (NPs). El proceso sonoquímico utiliza ultrasonido de alta frecuencia para inducir cavitación acústica, generando burbujas de gas en el líquido. La implosión de estas burbujas crea condiciones extremas de temperatura (miles de grados) y presión (varios cientos de atmósferas) en una escala nanométrica. Estas condiciones favorecen reacciones químicas rápidas y homogéneas, permitiendo la síntesis controlada de nanopartículas con alta pureza y uniformidad. La cavitación ultrasónica facilita la nucleación y el crecimiento de las NPs sin la necesidad de temperaturas elevadas o largos tiempos de reacción. Imagen adaptada de Martínez et al., (2021) .....	34

Figura 6. Estructura química de la quercetina, un flavonoide compuesto por un esqueleto de 15 átomos de carbono, en dos anillos bencénicos (A y B) conectados por una cadena de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico (C). .....	36
Figura 7. Página principal de Sfold, donde se presentan todas las opciones para el diseño de los oligonucleótidos antisentido (ASOs) de interferencia, entre ellos los antisentido. ....	42
Figura 8. Células SW480 a diferentes concentraciones de tratamiento con las NPsAu sin y con ASOs (1000, 500, 250, 50,5, 0.5 µg/ml) expuestas a luz IR de una longitud de onda de 600 nm, por 3 min a 37°C, el IR fue controlado por un termostato digital STC-1000, el cual detecta temperatura en medios acuosos y prende o apaga el IR cuando la temperatura es de 37°C o menor. Las células SW480 que se encuentran en una placa de 96 pozos es cubierta por un cono de aluminio para no disipar la energía del IR y se concentre en la placa. ....	44
Figura 9. Espectros de absorbancia de los diferentes controles medidos con espectrofotometría UV-Vis. Los espectros muestran las curvas de absorbancia para: a) H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> (ácido cloroáurico), con un pico característico a los 306 nm; b) Quercetina (QE), con longitudes de onda en 255 y 388nm; y c) Polietilenglicol y oro (Au+PEG). ....	46
Figura 10. Espectroscopía UV-Vis de los controles: a) PEG+ y b) PEG+Quercetina. Los espectros muestran la interacción de los ASOs y la quercetina con el polietilenglicol (PEG). En el control <b>a)</b> (PEG+ASOs), se observan picos de absorbancia característicos de los ASOs alrededor de 259 nm. En el control <b>b)</b> en PEG+Quercetina, se encuentran los picos de absorbancia que se sitúan en 260 y 380 nm, destacando las características de la quercetina. ....	47
Figura 11. Espectroscopía UV-Vis de la formación de coloides: a) NPsAu (nanopartículas de oro) y b) NPsAu+ASOs. El espectro <b>a)</b> muestra la longitud de onda de las NPsAu a los 526 nm, que corresponde al fenómeno de plasmones de superficie (PSR). El espectro <b>b)</b> representa las NPsAu recubiertas con los ASOs. ....	49
Figura 12. Espectroscopía Raman de la estructura química de PEG-4000, tomada con láser verde de 532 nm. ....	50
Figura 13. Espectroscopía Raman de la capa superficial de las nanopartículas de oro (NPsAu) recubiertas con PEG y quercetina, se usó láser verde de 532 nm....	51
Figura 14. Espectroscopía Raman de la capa superficial de la mezcla de nanopartículas de oro (NPsAu), ASOs y PEG, para este se utilizó el láser rojo a 633 nm. ....	52
Figura 15. Tamaño y morfología de las nanopartículas de oro (NPsAu) observadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersadas en celdas de cobre.	

Las imágenes a) y b) muestran NPsAu-PEG sin ASOs a una escala de 50 y 100 nm, respectivamente. Las imágenes c) y d) a escalas de 50 y 100 nm, respectivamente, son las NPsAu-PEG con ASOs.....53

Figura 16. Muestra el proceso para conocer el tipo de estructura cristalina de las NPsAu, mediante la adquisición de imágenes por HRTEM y el análisis de los patrones de difracción. ....55

Figura 17. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido SEM, montadas en láminas de cobre sobre cilindros de aluminio, en dónde la imagen a) muestra las NPsAu sin ASOs en modo STEM-SEM de mayor resolución y bajo las características de 30 kV, 8.0 mm, x300 k y una escala de 100 nm, para tomar la imagen, mientras que la b) fue tomada mediante la espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) y con las condiciones MAG:100000 x, HV: -1.0 kV, WD: -1.0 mm y Px: 3 nm, a escala de 300 nm, igual para NPsAu sin ASOs, únicamente con una capa de PEG en la cubierta. La imagen c) también fue tomada por STEM, bajo las características de 1 kV, 3.2 mm x, 6k, pero a una escala de 5  $\mu$ m, finalmente la imagen d) tomada por EDS y a una escala de 300 nm, ambas imágenes c) y d) para NPsAu con ASOs. ....56

Figura 18. El archivo de salida generado por el programa Sfold incluye un análisis detallado de los ASOs diseñados para los codones 309 y 273 de Tp53. En el archivo, se presentan los datos, como: cantidad de GC, energía de enlace y los ASOs sugeridos. ....59

Figura 19. Los ASOs diseñados por Sfold dirigidos a los codones 273 y 309 del RNA mensajero (RNAm) del gen Tp53 están orientados en la dirección 5' a 3'. Estos ASOs están diseñados para unirse de manera complementaria a las secuencias correspondientes de los codones específicos, con el objetivo de bloquear la traducción de Tp53 mutado. ....60

Figura 20. Viabilidad celular expresada en porcentaje  $\pm$  DE de los diferentes controles, tratadas con polietilenglicol (PEG), polietilenglicol bisaminado (PEG-BIS), quercetina y un control de células viables sin tratamiento. Cada tratamiento se realizó por triplicado y réplicas. ....61

Figura 21. Viabilidad de células SW480 tratadas con diferentes concentraciones de nanopartículas de oro (NPsAu) sin a) y b) con ASOs dirigidos al codón 273 del gen Tp53, a 1000, 500, 250, 50, 5 y 0.5  $\mu$ g/ml. Las células fueron incubadas a 37°C y expuestas a radiación ionizante (IR) durante 24 horas. Cada tratamiento fue por triplicado y se expresan como porcentaje  $\pm$  DE. ....62

Figura 22. Viabilidad de células SW480 tratadas con nanopartículas de oro (NPsAu) a) sin y b) con ASOs dirigidos al codón 309 del gen Tp53, a 1000, 500, 250, 50, 5 y 0.5  $\mu$ g/ml. Las células fueron incubadas a 37°C y expuestas a radiación ionizante (IR) durante 24 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTS, cada

tratamiento fue por triplicado. Cada tratamiento fue por triplicado y se expresan como porcentaje  $\pm$  DE. ....64

Índice de tablas

Tabla 1. Porcentajes en masa de los elementos detectados mediante espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) de las NPsAu sin ASOs, cubiertas con PEG .....57

Tabla 2. Porcentajes en masa de los elementos detectados mediante espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) en las NPsAu recubiertas con ASOs modificados con fosforotioato y PEG-Bisaminado. ....57

Glosario de abreviaturas

Nanopartícula (NP)

Oro (Au)

Nanopartículas de oro (NPsAu)

Polietilenglicol (PEG)

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Espectroscopia de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

MicroRaman (RAMAN)

Ácido ribonucleico (RNA)

Ácido ribonucleico mensajero (RNAm)

Mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC<sub>50</sub>)

Nanómetro (nm)

Centímetro recíproco (cm<sup>-1</sup>)

Unidad de absorción (u.a)

Ácido desoxirribonucleico (DNA)

Ácido desoxirribonucleico complementario (DNAc)

Microlitro (μl)

Hidrogeno (H)

Carbono (C)

Grado centígrado (°C)

Revoluciones por minuto (rpm)

Dodecil sulfato de sodio (SDS)

Fluoruro de polivinilideno (PVDF)

5-fluorouracilo (5-FU)

Cáncer de colon y recto (CCR)

Yodo (I)

Virus del Papiloma Humano (HPV)

Guanina (G)

Adenina (A)

Citosina (C)

Timina (T)

Uracilo (U)

Guanosín trifosfato (GTP)

Guanosín difosfato (GDP)

Wild type (WNT)

Adenomatous Polyposis coli (APC)

Poliposis adenomatosa familiar (PAF)

Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

Organización Mundial de la Salud (OMS)

Plasmón Superficial de Resonancia (PSR)

Oligonucleótidos antisentido (ASOs)



## Resumen

El cáncer de colon es el tercer cáncer más frecuente en el mundo y entre su genética molecular se involucra la sobreexpresión del oncogén *Tp53*, el cual reduce la eficacia de los tratamientos existentes, por lo que el uso de la nanotecnología y la terapia génica podría ser una alternativa para la disminución de la expresión de oncogenes como *Tp53* y con ello disminuir el crecimiento de las células cancerígenas. En este proyecto se diseñó un método para la síntesis de nanopartículas de oro (NPsAu) cargadas con oligonucleótidos antisentido (ASOs) por radiación ultrasónica, evaluando su efecto en la proliferación de la línea celular SW480 de cáncer de colon. Las NPsAu antisentido fueron evaluadas por técnicas como UV-VIS con una señal de  $\text{Au}^{3+}$  a los 526 nm que corresponde de acuerdo a la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) a un tamaño de 20 nm aproximadamente y con una morfología icosaédrica; mientras que con la técnica de MicroRaman se encontraron señales correspondientes a las bases nitrogenadas de los oligos antisentido en un rango de los 600-1700  $\text{cm}^{-1}$ , así como señales correspondientes al PEG en los 70 a los 3395  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los grupo CH y OH. Mientras que la microscopía electrónica de barrido (SEM) permitió, observar la morfología y su composición elemental. La viabilidad celular se determinó a través de un ensayo colorimétrico MTS en células SW480 a diferentes concentraciones, los resultados mostraron el efecto de las NPsAu sobre las células, observándose una disminución en la viabilidad celular del 20% aproximadamente, mientras que con las NPsAu antisentido (con oligonucleótidos antisentido dirigidos al gen de *Tp53*, *codón 273 y 309*) se observó hasta una disminución del 90%. Como perspectivas a futuro se realizará técnicas como RT-PCR, para conocer la inhibición del RNAm de *Tp53*, para concretar si podrán funcionar como vehículos de entrega de oligonucleótidos antisentido como inhibidores de RNAm, para un posible tratamiento en cáncer de colon.

## Abstract

Colon cancer is the third most common cancer in the worldwide and its molecular genetics involve the overexpression of the *Tp53* oncogene, which reduces the effectiveness of existing treatments. Therefore, the use of nanotechnology and gene therapy could be an alternative to decrease the expression of oncogenes such as *Tp53*, thus inhibiting the growth of cancer cells. In this project, a method was designed for the synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) loaded with antisense oligonucleotides (ASOs) by ultrasonic radiation, and their effect was evaluated on the proliferation of the SW480 colon cancer cell line. The antisense AuNPs were evaluated by techniques such as UV-VIS, showing an Au<sup>3+</sup> signal at 526 nm, which according to the transmission electron microscopy (TEM), corresponds to size of approximately 20 nm and with an icosahedral morphology. MicroRaman spectroscopy showed signals corresponding to the nitrogenous bases of the antisense oligos in a range of 600-1700 cm<sup>-1</sup> range, as well as signals corresponding to PEG at 70 cm<sup>-1</sup> to 3395 cm<sup>-1</sup>, associated with CH and OH groups. Scanning electron microscopy (SEM) allowed for the observation of morphology and elemental composition. Cell viability was determined through an MTS colorimetric assay in SW480 colon cancer cells at different concentrations. The results showed the effect of AuNPs on cells, with a decrease in cell viability of approximately 20%, whereas antisense AuNPs (loaded with antisense oligonucleotides targeting the *Tp53* gene, codon 273 and 309) there was a decrease of 90%, relatively. As future perspectives, techniques such as RT-PCR will be performed, to know the inhibition of the *Tp53* mRNA, to determine if these AuNPs can act as delivery vehicles for antisense oligonucleotides, potentially functioning as mRNA inhibitors, for a possible colon cancer treatment.

## 1. Introducción

El cáncer es una de las causas de muerte más frecuentes en México y el mundo. Actualmente el cáncer de colorrectal (CCR) es el tercer cáncer más común, en 2020 murieron alrededor 916 000 personas con CCR (OMS, 2020) y los tratamientos que existen para tratarlo son la cirugía, quimioterapia y radioterapia que pueden ser terapias muy agresivas para los pacientes, además de presentar limitaciones como la falta de especificidad entre células sanas y cancerígenas (Bunz, 2022; Ding et al., 2014; Engin et al., 2020; Ustun M & Ozgur T, 2020).

El CCR está relacionado en un 20% con factores genéticos en pacientes de primer grado familiar y aunque varios genes intervienen en el desarrollo de CCR, el gen *Tp53* es el primer gen involucrado en este cáncer, en gran medida en neoplasias malignas. Además de estar relacionado con la mayoría de los cánceres en humanos (Nakayama & Oshima, 2019).

La mutación de *Tp53* se encuentra de un 5-26% en adenomas, 53% en pólipos adenomatosos invasivos y en un 70% en adenocarcinomas (Hakim, 2021, Li et al., 2021, Bunz, 2022)

Se han buscado otras terapias alternativas que pueda favorecer al paciente con este padecimiento (CCR) como el uso de nanomateriales que pueden ser usados como vehículos de transporte y liberación controlada de ácidos nucleicos, para regular procesos genéticos (Ding et al., 2014)

Los nanomateriales, como las nanopartículas de oro (NPsAu), son una prometedora alternativa en la lucha contra el cáncer, ya que tienen la capacidad de unirse selectivamente a las células cancerosas. Aunque se busca minimizar el daño en las células sanas, estas también pueden resultar afectadas, aunque en menor medida que con los métodos tradicionales. Además, las NPsAu han demostrado tener una buena biocompatibilidad, son bioinertes, fáciles de sintetizar y funcionalizar, presentan una buena estabilidad físico-química y sus características ópticas pueden ser ajustables (Shakeri-Zadeh et al., 2014)

Las NPsAu tienen la característica de ser un metal noble que al aplicarle algún tipo de energía externa, se genera una resonancia de plasmón superficial (RPS), que puede aprovecharse como una vía para la liberación controlada de ácidos nucleicos, la liberación puede ser controlada por el tipo de unión de ácidos nucleicos a la superficie de la NPsAu, en donde la unión puede ser por fuerzas covalentes o tipo electrostáticas (Ding et al., 2014)

Una manera para obtener las NPsAu es a través de una síntesis verde, mediante el uso de agentes reductores naturales como lo es la quercetina y un agente estabilizante del nanobiosistema, estos agentes son variados, pero siempre se busca que sean polímeros orgánicos afines al organismo humano. El tamaño y la forma de los nanosistemas, se puede controlar con el método de síntesis. De esta manera, las NPsAu resultan ser versátiles en cuanto a tamaño, forma y características superficiales, dependiendo de la aplicación que se le quiera dar; por lo que en este proyecto se quieren probar como un inhibidor de *Tp53* sobre células cancerosas de colon (Bollella et al., 2017).

### 1.1 Definición del problema

En 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó el cáncer de colon como una de las principales causas de muerte en el mundo. Parte de la genética molecular del cáncer involucra la sobreexpresión de oncogenes, entre ellos *Tp53*, que disminuyen la efectividad de los tratamientos, por lo que la inhibición en la expresión de estos podría ser una alternativa para contrarrestar el cáncer. La nanotecnología ha emergido como terapia alternativa prometedora para este tipo de padecimientos, por lo que la síntesis de NPsAu antisentido es una opción para disminuir la expresión dirigida de oncogenes, y con ella disminuir la proliferación celular de células de cáncer.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Cáncer

El cáncer es un padecimiento que se caracteriza por la proliferación acelerada de células anormales, que se expanden y pueden invadir a diferentes órganos internos del cuerpo. Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, en 2020 la OMS atribuyó 10 millones de muertes en el mundo por esta enfermedad (Yin et al., 2021).

Los tipos de cáncer más frecuentes son de mamá, pulmón, colon y próstata. En el caso de cáncer de colon (CCR) se reportaron 1.93 millones de casos en el año 2020, de los cuales 916 000 personas murieron por este tipo de cáncer (OMS., 2022). De acuerdo con el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) cada año se detectan 15 mil casos de cáncer de colon y alrededor de 6500 defunciones por esta causa. El CCR es un cáncer que afecta al intestino grueso, causando el crecimiento anormal de las células en su revestimiento (IMSS,2019).

### 2.2 Etiología

De acuerdo a la publicación de Duan y col. (2022), algunos factores causantes del desarrollo de CCR son:

#### 2.2.1 Factores genéticos.

Aunque todavía no se conocen con exactitud las razones por las cuales algunas personas presentan un alto riesgo de padecer cáncer, se ha establecido una relación entre la presencia de factores genéticos y el cáncer colorrectal (CCR). De hecho, se estima que el 20% de los casos de CCR en pacientes de primer grado familiar pueden atribuirse a factores genéticos (Duan B et al., 2022).

Entre las condiciones genéticas heredadas que se asocian con un mayor riesgo de CCR se encuentra la poliposis adenomatosa familiar (*PAF*), que afecta al 1% de los pacientes con CCR. Esta afección se caracteriza por la proliferación anormal del tejido y puede detectarse desde edades tempranas, incluso a partir de los 12-15 años. Otro factor genético que se ha relacionado con una mayor

predisposición a desarrollar CCR es el gen de reparación del ADN *MMR*, según lo han demostrado estudios recientes (Duan B et al., 2022; Morgan G et al., 2008).

#### 2.2.2 Factores dietéticos

La ingesta excesiva carnes rojas incrementa el riesgo de contraer CCR, promoviendo la desintegración de ácidos biliares, el crecimiento de carcinógenos intestinales, la segregación de bilis y el movimiento bacteriano anaeróbico intestinal (Morgan G et al., 2008).

Una dieta saludable, rica en frutas, verduras, fibra y proteínas favorecen a la disminución de padecer CCR, asociados al contenido de compuestos antioxidantes y ácido fólico, vital para la renovación de metionina, que dona grupos metilo para la síntesis de purinas y pirimidinas y es reparador de DNA (Morgan G et al., 2008)

#### 2.2.3 Enfermedades no cancerosas

Enfermedades como colitis ulcerosa (del 3-5% de pacientes con CCR), pólipos colorrectales, adenomas colorrectales y la enfermedad de Crohn, conllevan a un alto riesgo de CCR. Los pólipos colónicos pueden ser el origen del CCR con un porcentaje del 15-40%, con un desarrollo de CCR de 2-5 años (Duan B et al., 2022)

#### 2.2.4 Otros factores

La exposición a radioactivos, falta de movilidad o ejercicio, el sobrepeso, excesos en tabaco y alcohol son factores que aumentan la probabilidad de contraer CCR en los pacientes (Duan B et al., 2022; Morgan G et al., 2008; IMSS, 2015)

#### 2.3 Oncogenes y cáncer de colon

En las células hay genes llamados protooncogenes que normalmente estimulan la división celular, pero pueden llegar a tener cambios estructurales como mutaciones, translocaciones y deleciones; los cuales provocan un crecimiento celular anormal acelerado, así como la diferenciación de estas, mejor conocido como cáncer, Figura 1 (Calvert & Frucht, 2002)

En cáncer de colon (CCR), las mutaciones inactivas que se observan mayormente son en los genes *APC*, *KRAS*, *Tp53*, *SMAD* o *PIK3CA* y los genes de reparación *MLH1*, *MSH2*, *POLE* y *APC*; tienen relación con el desarrollo de CCR en un 80% (Kahraman & Sayhan, 2020).

El gen *Adenomatous Polyposis coli (APC)*, mejor conocido como el gen “guardián” de carcinogénesis del colon, se localiza en el brazo largo del cromosoma 5, y la proteína derivada de este participa en la homeostasis epitelial del colon. Toma un papel muy importante en la regulación del ciclo celular, además de modular la vía de señalización de WNT. La ausencia de la función *APC* conduce a la acumulación de  $\beta$ -catenina, activando la transcripción del gen *MYC* y ciclina D1, estimulando la proliferación celular (Bhalla et al., 2018; Calvert & Frucht, 2002; Hakim, 2021).

La familia *KRAS* pertenece a las proteínas *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *BRAF*, de unión a guanina (G). *KRAS* alterna su estado inactivo, unido a guanosín difosfato (GDP) y el estado activo unido a guanosín trifosfato (GTP). El intercambio de nucleótidos como la guanina inicia vías de señalización que influyen directamente en procesos celulares como: proliferación celular, diferenciación, quimiotaxis, crecimiento y apoptosis, características de condiciones malignas como el cáncer (Negri et al., 2022).

En la evolución de adenoma a carcinoma la activación del oncogén *KRAS* interpreta el desarrollo de tumores en etapas intermedias como: 9% en pólipos, el 58% en adenomas de 1cm o más y el 47% en cánceres de colon (Hakim, 2021; Li et al., 2021)

El gen supresor de tumores de CCR (*DCC*), se encuentra en el cromosoma 18q. En la evolución de los adenomas, la carencia de la función del gen *DCC* tiene participación en etapas tardías de la progresión de los adenomas. En la etapa temprana de los adenomas la pérdida de 18q se contempla en un 10 a 30%, y un 60% en adenomas más prominentes (Hakim, 2021; Kirbiyik & Özyilmaz, 2021). La

sobreexpresión del gen *DCC* induce la apoptosis, inhibe la proliferación celular y la invasión a otros órganos cercanos (Forrest et al., 2016)

El gen *Tp53*, se ubica en el brazo corto de 17 cromosomas y la carencia alélica en 17p, tiene como consecuencia la aparición de carcinomas de colon. Las mutaciones en el gen *Tp53* en el cáncer, no solo altera los procesos de reparación de DNA, también el ciclo celular, provoca la inestabilidad de genes, descomposición de cromosomas, angiogénesis, apoptosis y supresión de tumores, es por esto que a *Tp53* se le conoce como “protector del genoma”. Esta proteína se activa cuando hay estrés genómico, específicamente cuando hay daño en el DNA, agotamiento de nucleótidos, hipoxia, activación de oncogenes e infecciones virales (Hakim, 2021; J. Li et al., 2021; Nakayama & Oshima, 2019)

Aunque *APC* es uno de los genes que se encuentra mayormente involucrado con la aparición temprana de CCR, *Tp53* es el primer gen involucrado en CCR, porque estos genes se encuentran mayormente en la mitad de los CCR y en gran medida en neoplasias malignas. El gen *Tp53* mutado están relacionados con la mayoría de los cánceres en humanos (Nakayama & Oshima, 2019).

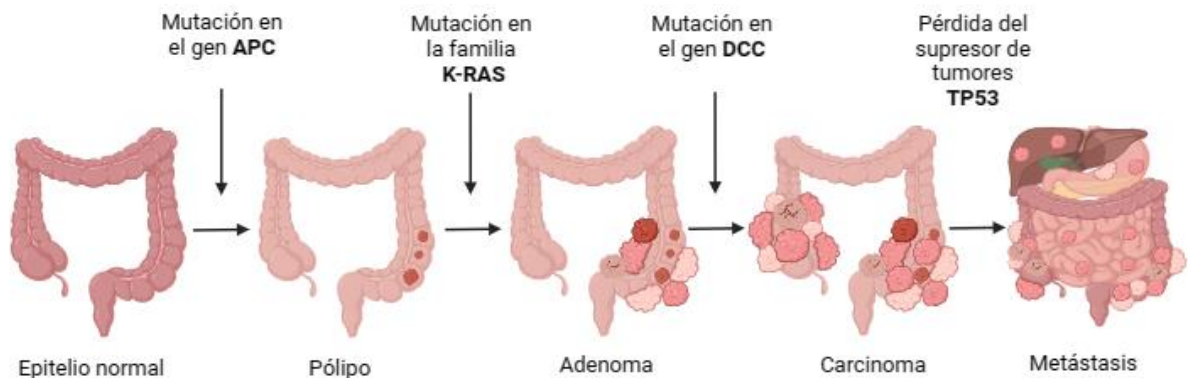


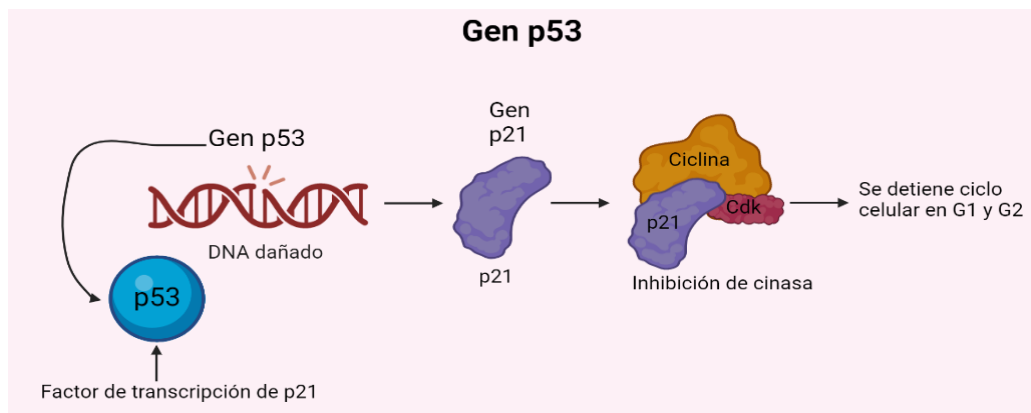
Figura 1. Desarrollo del cáncer colorrectal y su base genética. La progresión del epitelio normal a metástasis. Cada etapa está asociada con mutaciones genéticas, como las alteraciones en el gen *APC*, *KRAS*, *DCC*, y la pérdida del gen supresor de tumores *Tp53*. Estos cambios moleculares impulsan el crecimiento descontrolado y la diseminación metastásica, característicos del cáncer colorrectal. Elaboración propia, Imagen adaptada de (Bhalla et al., 2018).



## 2.4 Mutación en *Tp53*

La mutación de *Tp53* afecta las vías intracelulares que eliminan el desarrollo de tumores cancerígenos como la apoptosis (muerte programada), bloqueando la detención del ciclo celular en la fase G1-S cuando existe un daño en el DNA en el proceso de replicación, aportando el proceso de cancerización en células, como se muestra en la Figura 2 (Rangel-López et al., 2006).

Al no funcionar correctamente *Tp53*, provoca mutaciones de sentido erróneo en el DNA conocidas como missense, cuando ocurre cambio en el aminoácido codificado. La mutación en *Tp53* se debe con mayor frecuencia en CCR a la pérdida alélica de 17p y en estudios de secuencia completa en el DNA. Se ha observado que las mutaciones en *Tp53* se presentan en un rango del 5 al 26% en adenomas, un 53% en pólipos adenomatosos invasivos y un 70% en adenocarcinomas. Además, se ha encontrado durante la transición de adenoma a carcinoma, se produce una inactivación de *Tp53*, lo que no solo puede contribuir al desarrollo de muchos tipos de cáncer, sino que también puede favorecer la aparición de cánceres más agresivos en humanos (Hakim, 2021; J. Li et al., 2021; Nakayama & Oshima, 2019)



*Figura 2. Función del gen *Tp53* en la regulación del ciclo celular. *Tp53*, mejor conocido como "el guardián del genoma", juega un papel importante en la respuesta al daño del DNA. En condiciones de estrés celular, *Tp53* se activa y regula los genes involucrados en la detención del ciclo celular, como lo es *p21*, reparando así del DNA o la inducción de apoptosis, evitando la proliferación de células dañadas y la formación de tumores. Imagen adaptada del texto Hakim, 2021*

El gen *Tp53* es comúnmente mutado por la exposición al cigarrillo, radiación ultravioleta y toxinas por los alimentos. Aproximadamente el 20% de las mutaciones

somáticas alteran alguno de los puntos críticos mutacionales (3 codones) como: 175, 248 y 273 (Bunz, 2022)

Existen dos oncoproteínas que inhiben a *Tp53* y aumenta la tumorigénesis: (Bunz, 2022; Nakayama & Oshima, 2019)

En una célula sana, *Tp53* tiene sus funciones reguladas correctamente, como la interacción con la proteína MDM2. El protooncogén *MDM2* es una enzima que se encarga de modificar covalentemente proteínas a través de la agregación de ubiquitina por ligasas como MDM2, las cuales se dirigen a esas proteínas para degradarlas por el proteasoma y así mantener las concentraciones intracelulares en equilibrio de los niveles de *Tp53*. Por lo tanto, mientras mayor expresión del gen *MDM2*, disminuye la expresión de *Tp53* y por lo tanto el aumento de los niveles de *MDM2* se convierten en oncogénicos, provocando la mutación de *Tp53* (Bunz, 2022; Nakayama & Oshima, 2019).

La oncoproteína E6 de Virus del Papiloma Humano (*HPV E6*): es un gen viral que entra por la infección de VPH. La gran mayoría de los cánceres aparecen a partir de mutaciones genéticas de una línea germinal y/o adquiridas somáticamente, con exclusión de los cánceres en tejidos contagiados por VPH, como el cuello uterino, epitelios de la cabeza y cuello. En este tipo de cánceres, *Tp53* pierde sus funciones, por la unión inhibidora de E6 (proteína codificadora por VPH (Bunz, 2022; Nakayama & Oshima, 2019).

## 2.5 Terapias existentes

Todas las terapias existentes para tratar el cáncer buscan inhibir el crecimiento celular (replicación de DNA) de los pacientes. Por eso es el uso de los fármacos de quimioterapia y radiación ionizante son muy utilizados, se adaptaron para uso médico, pero carecen de discriminación entre células sanas y cancerosas (Aiello et al., 2019; Ding et al., 2014).

La quimioterapia es un tratamiento para el cáncer que ocupa de diversos fármacos como: agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores

de la topoisomerasa e inhibidores mitóticos, que pueden disminuir el tamaño de los tumores, pero también puede destruir el crecimiento de células sanas, provocando en el paciente efectos secundarios como náuseas, pérdida de cabello y en ocasiones llagas. En CCR es utilizado el 5-fluorouracilo (5-FU) vía intravenosa, capecitabina vía oral, y el irinotecan y el oxaliplatino vía intravenosa (Bunz, 2022; Duan B et al., 2022; Ustun M & Ozgur T, 2020)

Otra terapia que es utilizada para tratar CCR es la radioterapia y se basa en el uso de alta energía en forma de haz, dirigida hacia los tumores, desde un equipo externo al paciente, dañando el DNA de las células cancerosas, para ser desechadas por el cuerpo (Aiello et al., 2019).

También la radioterapia se basa en el uso de algún material radioactivo, que se aplica de manera directa al cuerpo, como por ejemplo el yodo radioactivo (I). El tiempo de la muerte celular de las células cancerosas puede variar, de semanas o meses, y así como en la quimioterapia también tiene sus efectos secundarios y es mayormente utilizada en la etapa IV de CCR (Aiello et al., 2019; Bunz, 2022)

La cirugía es una alternativa también para eliminar los tumores, extirpándolo del cuerpo del paciente, puede ser de manera completa o parcial y solo aplica para tumores sólidos, dependiente de la zona de localización del tumor es que la cirugía puede ser abierta o de invasión mínima usando laparoscopia y se usa en las 3 primeras etapas del cáncer 0 a III. Así como los dos tratamientos anteriormente mencionados, la cirugía implica riesgos como dolor o infecciones en la herida (Aiello et al., 2019; Engin et al., 2020).

Debido a la invasión y efectos secundarios que provocan los diferentes tratamientos convencionales para tratar el cáncer, desde hace algunos años se ha iniciado la búsqueda de tratamientos alternativos efectivos para tratar de los diferentes cánceres, tales como el CCR, y uno de ellos es el uso de la genética y la nanotecnología, que se puedan empalmar para conseguir una posible alternativa como tratamiento (Bayda et al., 2020).

Actualmente existen diferentes terapias dirigidas a la interferencia de RNA mensajero que se han ido estudiando con el tiempo su funcionamiento y efectividad en las células. Los ácidos nucleicos son instrumentos para terapias contra el cáncer, pero requieren de vehículos para su transporte y protección contra nucleasas y otros aspectos como la activación de respuestas inmunitarias, su baja estabilidad para no degradarse, que puede impedir la entrega de información a las células (R. Acharya, 2019; Ding et al., 2014).

En este contexto, el uso de nanopartículas (NPs) como vehículos de transporte ha sido considerado como una buena alternativa, por las ventajas que presenta, como son sus propiedades físicas y químicas, son bioinertes, no tóxicas, fáciles de sintetizar para controlar su tamaño, forma y funcionalización, además se pueden usar materiales biocompatibles con el cuerpo humano para uso médico (Alshareeda et al., 2022).

Hasta el momento existen muy pocos modelos y ensayos clínicos de estos nanosistemas, que se sigue estudiando *in vitro*, su citotoxicidad, internalización, selectividad y liberación de material genético hacia las células. Sin embargo, siguen siendo andamios prometedores para el transporte de ácidos nucleicos en enfermedades como el cáncer (Ding et al., 2014).

## 2.6 Oligonucleótidos Antisentido (ASOs)

Los oligonucleótidos antisentido (ASOs) con aquellos oligonucleótidos que contienen de 8 a 50 nucleótidos de longitud, pueden unirse en secciones o completamente al RNAm objetivo, a través del emparejamiento de las bases nitrogenadas de Watson-Crick para modular procesos genéticos en la célula (Bennett & Swayze, 2010).

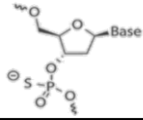
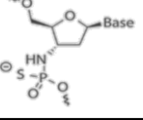
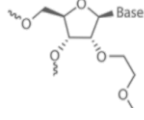
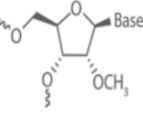
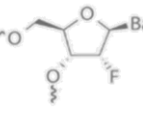
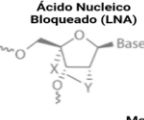
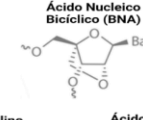
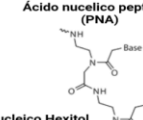
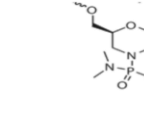
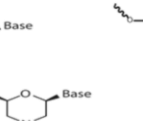
Estos ASOs se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de acción como: los que se unen e interfieren con el RNAm sin provocar su degradación o bien los que promueven su degradación por las RNAsas H. No todos los oligonucleótidos se pueden considerar antisentido existen sus excepciones como los que forman

estructuras de DNA de doble hebra o triple hélice con DNA, porque sirve como áptameros para las proteínas (Chan et al., 2006).

Actualmente todavía se desconoce cómo los ASOs encuentran su receptor (RNAm) dentro de la célula, pero se ha encontrado en varios ensayos una alta especificidad para distinguir discrepancias de un solo nucleotido (Monias et al., 1995; Schwarz et al., 2006). Ciertamente aún se necesitan varios estudios para comprender mejor la manera en la que funcionan los ASOs con el RNAm, dentro de la célula.

Los ácidos nucleicos por sí solos son inestables en sistemas biológicos, por su estructura de enlaces fosfodiéster que son degradados por enzimas (nucleasas). Esta inestabilidad limita su uso como fármacos, debido a a degradación que conlleva, antes de llegar a su receptor. Además de que se degradan, tiendes a unirse a a proteínas que se encuentran en la sangre, eliminandolos rapidamente por el riñon y por lo tanto expulsados por el organismo (Gheibi-Hayat & Jamialahmadi, 2021; Rook & Southwell, 2022).

Por lo que se ha propuesto el uso de modificaciones químicas en la estructura de los ácidos nucleicos que no solo se conserven, sino que también se mejoren sus capacidades para unirse a su receptor objetivo. Existen varias modificaciones para los ácidos nucleicos como los que se presentan en la Figura 3 (Chi et al., 2017).

	Modificaciones químicas	Características
Primera Generación	<p>Fosforotioato (PS)</p>  <p>Tiofosforamidato</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>Un átomo de azufre reemplazando a un átomo de oxígeno sin puente del enlace fosfodiéster</li> <li>Respaldan la actividad de la RNasa H.</li> </ul>
Segunda Generación	<p>2'-Metoxietilo (MOE)</p>  <p>2'-O-Metilo</p>  <p>2'-Fluoro</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>Modificación en la posición 2' del azúcar.</li> <li>Alta afinidad a la unión de RNA objetivo.</li> <li>Menor toxicidad, mayor estabilidad y semivida prolongada en el organismo.</li> <li>No permiten la escisión por la RNasa H.</li> </ul>
Tercera Generación	<p>Ácido Nucleico Bloqueado (LNA)</p>  <p>Ácido Nucleico Bicíclico (BNA)</p>  <p>Ácido nucleico peptídico (PNA)</p>  <p>Morfolino</p>  <p>Ácido Nucleico Hexitol</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estables en fluidos biológicos.</li> <li>Fuerte afinidad de hibridación con el RNAm.</li> <li>Detienen la traducción, pero no logran activar la RNasa H, ni unirse a proteínas séricas, debido a que son moléculas sin carga.</li> </ul>

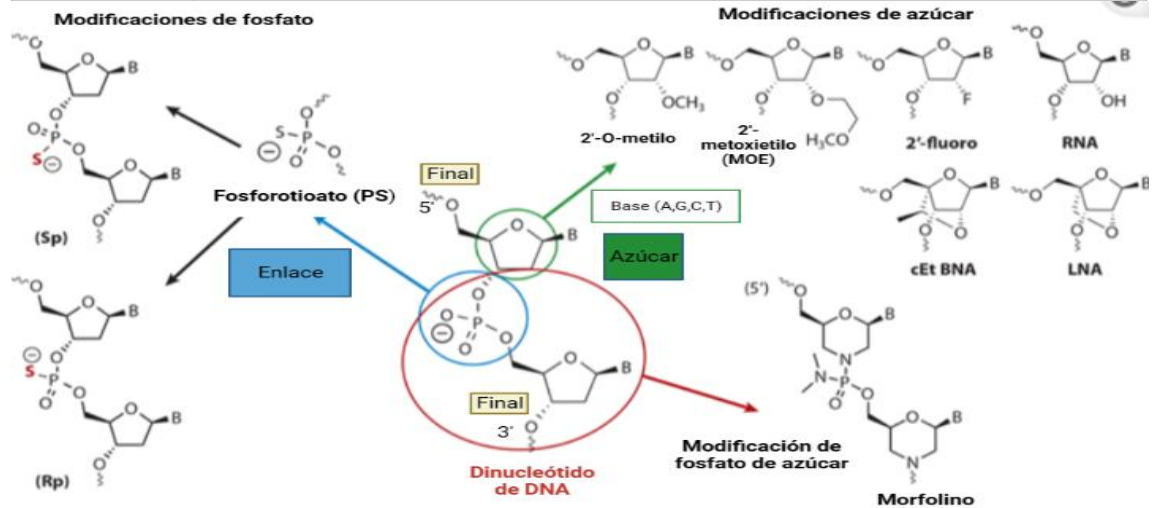


Figura 3. La figura muestra la evolución de las modificaciones en las estructuras químicas y las características funcionales de los oligonucleótidos antisentido (ASOs) lo largo de tres generaciones. En la primera generación, con modificaciones en el enlace fosfodiéster, como el fosforotioato (PS) y el tiofosforamidato, sustituyendo un átomo de oxígeno por un átomo de azufre. La segunda generación introduce modificaciones en la posición 2' del azúcar (2'-O-metilo, 2'-MOE y 2'-Fluoro). La tercera generación incluye modificaciones más complejas, como el ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico peptídico (PNA) y morfolino. Estas modificaciones químicas buscan optimizar la eficacia y la inhibición del RNAm para aplicaciones terapéuticas.

Para el caso de cáncer de colon, en la línea celular SW620, en la inhibición del gen *Tp53*, se ha usado la modificación química de fosforotioato (PS), en las tres primeras bases nitrogenadas de los oligonucleótidos antisentido (5'-3'), para el codon 175, de acuerdo al grupo de trabajo de Hirota et al., 1996.

Incluso los ASOs han sido aprobados por la FDA para tratar 10 trastornos genéticos como Nusinersen y Milasen, pero se busca que también tengan aplicaciones en enfermedades como el cáncer, pero su entrega a las células conlleva implicaciones por la exposición de nucleasas o agentes ambientales. Por lo que requieren de vehículos que aseguren su empaquetamiento, transporte y liberación a las células. El diseño de un buen nanosistema es importante para evitar efectos secundarios no deseados y entrega de los ASOs (Hill & Meisler, 2021).

Los vehículos de entrega que se han propuesto para la liberación controlado de los ASOs se dividen en biológicos y sintéticos. Los biológicos son vectores virales eficientes, pero presentan las desventajas de provocar inmunogenicidad, ccarcinogenicidad o inflamación. Mientras que los vectores sintéticos como los lípidos, catiónicos, polímeros y dendrímeros se han observado complicaciones en las aplicaciones clínicas (Ding et al., 2014; Pędziwiatr-Werbicka et al., 2021).

De los vectores sintéticos han emergido las nanopartículas inorgánicas, las cuales presentan una gran variedad de ventajas en comparación de los vectores sintéticos tradicionales, anteriormente mencionados. Las ventajas que poseen estas nanopartículas son sus propiedades ajustables fisicoquímicas, estructurales, tamaño y superficie, las más usadas son las nanopartículas de oro (NPsAu) cargadas con DNA o RNA (Ding et al., 2014; Hill & Meisler, 2021).

## 2.7 Nanotecnología

La nanotecnología es la ciencia que estudia los materiales que tienen tamaño entre 1-100 nm ( $1\text{nm}=10\times 10^{-9}\text{ m}$ ), tiene muchas aplicaciones como en la industria, ingeniería, ciencias genómicas, cómputo y medicina. Este término fue usado por primera vez en 1974 por Norio Tanigushi, pero quien planteo las bases de la

nanotecnología fue Richard Feynman desde 1965. La nanotecnología abarca el estudio de diseño, síntesis y aplicación de nanomateriales en las diferentes áreas, a nanoescala (Bayda et al., 2020).

La nanotecnología ha sido utilizada para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades, como el cáncer, para evitar la proliferación celular, a través del transporte de y/o liberación de fármacos, con el diseño de nanomateriales los cuales se pueden diseñar para el tratamiento del cáncer, se unan selectivamente a células cancerígenas y previniendo el daño a células sanas (Bayda et al., 2020; X. Zhang et al., 2012).

## 2.8 Nanomedicina

La nanomedicina es el área de la nanotecnología aplicado en la medicina, término usado por primera vez en 1999 por Robert A. Freitas en su libro *“nanomedicine”*. Entre los desarrollos más actuales está la funcionalización de nanomateriales, como las nanopartículas, las cuales son prometedoras por sus propiedades físicas y químicas, que permiten ajustar su tamaño, forma, materiales, biocompatibilidad y funcionalización. Todas estas características favorecen la administración de los nanomateriales, que son dirigidos específicamente a las células cancerígenas para su destrucción, al aplicar algún estímulo como luz infrarroja o campos magnéticos de baja intensidad y aunque aún no han alcanzado una selectividad completa hacia las células cancerígenas, si disminuyen el daño en un menor porcentaje en células sanas en comparación con los tratamientos convencionales (Ding et al., 2014; van der Meel et al., 2019; Y. Zhang et al., 2019).

El diseño de encapsulamiento de la nanopartícula favorece la liberación del fármaco, a través de los transportes pasivos o activos. Para el transporte pasivo se aprovecha el tamaño de las NPs por la retención y permeabilidad de los tumores, también conocido como “efecto de permeabilidad y retención aumentada” (EPR), previniendo los posibles efectos secundarios a las células sanas, debido al crecimiento acelerado de las células cancerígenas, no poseen un adecuado suministro de oxígeno y nutrientes. En tumores sólidos da como resultado una



extensa angiogénesis, dándoles una alta densidad vascular. El endotelio vascular defectuoso forma espacios grandes entre las uniones de las células (hiperpermeabilidad) y las NPs usan este efecto para transportarse de manera más selectiva a través de las fugas de los vasos sanguíneos de los tejidos tumorales, aglomerándose en las células cancerosas, como se observa en la Figura 4 (Acharya & Sahoo, 2011; Alshareeda et al., 2022).

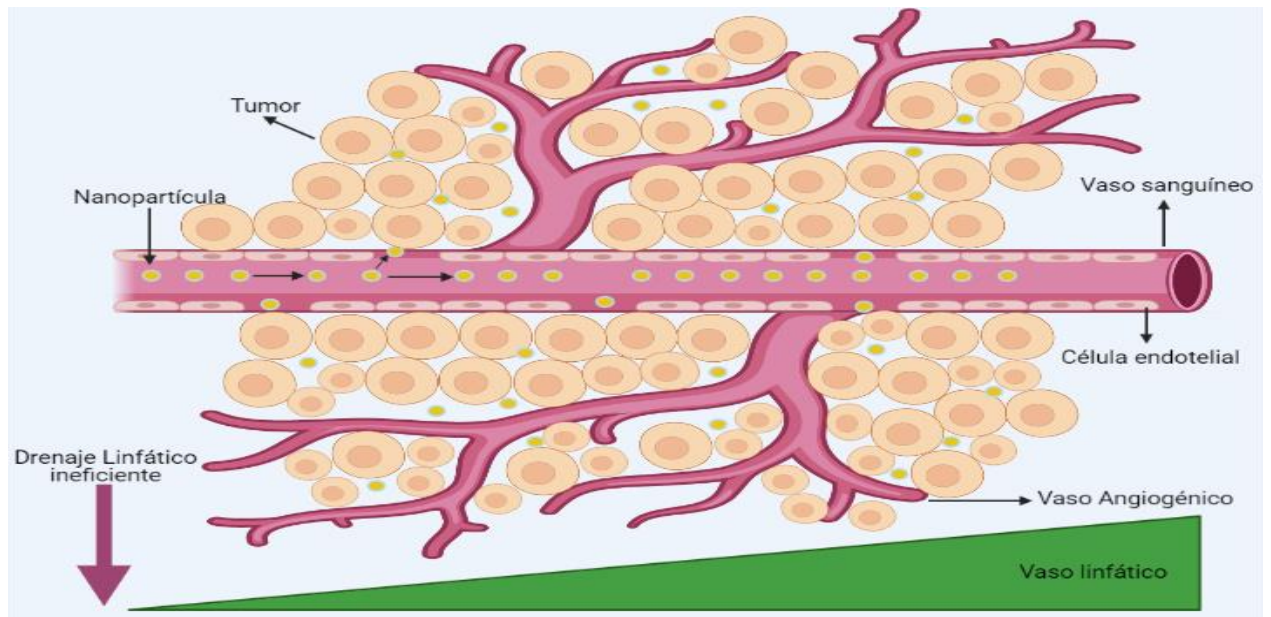


Figura 4. Las nanopartículas (NPs) se transportan pasivamente por medio del efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR), debido a que las NPs aprovechan la formación de vascularidad irregular con poros grandes y el drenaje linfático deficiente. Imagen adaptada de R. Acharya, (2019)

## 2.9 Aplicaciones en modelos celulares

Como se mencionó anteriormente los ácidos nucleicos son herramientas prometedoras para el tratamiento de diversas enfermedades, como el cáncer, que requieren de vehículos de transporte a los tejidos/células objetivo para ser liberados y cumplir su objetivo. Se han realizado diferentes pruebas *in vitro* en diferentes líneas celulares y en ratas, teniendo, como el trabajo que realizó Vinhas y col. (2017), con el desarrollo de NPs Au funcionalizadas con oligonucleótidos antisentido (ASOs) dirigidos a los genes BCR-ABL1 e imatinib, logrando un gran eficaz

silenciamiento génico que provocó la muerte en células de leucemia mieloide crónica (LMC).

El grupo de trabajo de Ryou y col. (2010), sintetizó shRNA dirigido específicamente para *Tp53* y *MCL-1*, cargadas en nanopartículas de oro (NPsAu) y de acuerdo a sus pruebas *in vitro*, lograron una transfección en células de riñón embrionario humano y en la línea celular HeLa. Demostraron que los nanosistemas cargados con shRNA tuvieron mejores resultados en comparación con los vehículos de administración basados en liposomas (Ryou et al., 2010).

El uso de nanosistemas cargados con RNAi, para fines de terapia antitumoral, son una propuesta alternativa para el silenciamiento de genes, apoyados de la ablación fototérmica. Algunos grupos de trabajo lo han desarrollado como Son y col. (2017) quienes demostraron que la fototermia favorece el escape endosomal, la captación celular, así como el aumento de la fluidez de la membrana celular y la liberación de los RNAi, con estimulaciones de láser de gran intensidad.

En otro artículo recientemente Daniels y col. (2019) sintetizaron NPsAu esféricas funcionalizadas con siRNA dirigidas para silenciar el gen *c-MYC* recubiertas de quitosano y PEG400 y 2000, para la protección del siRNA contra la degradación en la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF-7. En las pruebas de silenciamiento génico se observó un gran potencial para la reducción de más del 90% en la producción de la proteína MYC (Daniels & Singh, 2019).

### 2.10 Sonoquímica

Una alternativa para la síntesis de NPs es a través de la sonoquímica que se caracteriza por su efecto de cavitación que es cuando se forman burbujas en un medio acuoso por ondas de ultrasonido, por alteraciones de presión y temperatura (Figura 5), favoreciendo la división de las moléculas de H<sub>2</sub>O en radicales de H y OH. Es un método considerado como química verde por las ventajas que posee como la obtención de NPs con morfologías bien definidas y tamaños nanométricos, además

de que ocupa menores cantidades de energía y reactivos peligrosos, es fácil de usar y económico (Hansen et al., 2022).

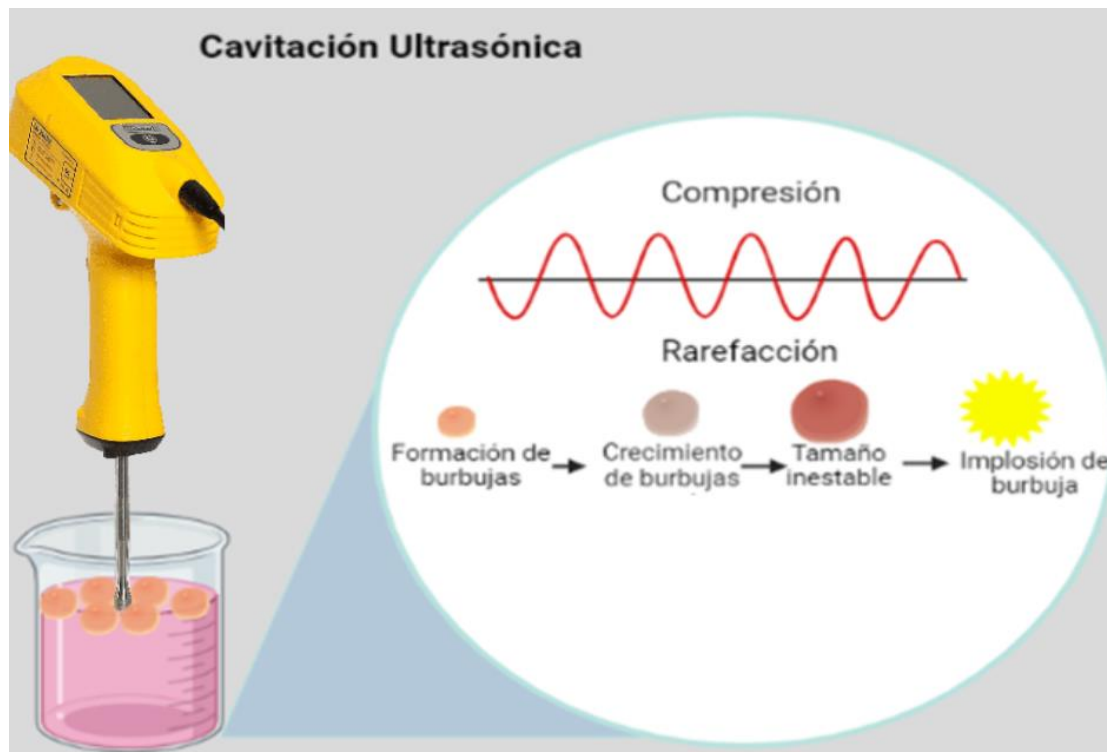


Figura 5. Sonoquímica y cavitación ultrasónica en la síntesis de nanopartículas (NPs). El proceso sonoquímico utiliza ultrasonido de alta frecuencia para inducir cavitación acústica, generando burbujas de gas en el líquido. La implosión de estas burbujas crea condiciones extremas de temperatura (miles de grados) y presión (varios cientos de atmósferas) en una escala nanométrica. Estas condiciones favorecen reacciones químicas rápidas y homogéneas, permitiendo la síntesis controlada de nanopartículas con alta pureza y uniformidad. La cavitación ultrasónica facilita la nucleación y el crecimiento de las NPs sin la necesidad de temperaturas elevadas o largos tiempos de reacción. Imagen adaptada de Martínez et al., (2021)

### 2.11 Nanopartículas de Au (NPsAu)

El Au es un metal noble de la tabla periódica, que es considerado como material para la síntesis de NPs y para combatir células cancerosas, porque posee excelentes propiedades ópticas y plasmónicas. Las NPs metálicas tienen la característica de que cuando se le aplica un pulso de algún tipo de energía, se genera la resonancia del plasmón superficial (RPS). Al generarse la oscilación del RPS los electrones de los metales, resuenan como resultado a la aplicación del

pulso de una radiación, produciendo la absorción y dispersión de la radiación electromagnética, como en el caso de las NPsAu, generando radiación en el rango de luz visible (Ding et al., 2014).

Debido a que las NPsAu metálicas tienen alta penetración en los tejidos corporales profundos, se usa el rango entre 800 y 1100 nm de luz de infrarrojo cercano (NIR) para aplicaciones terapéuticas fototérmicas y para fotoimagen (Singh et al., 2018; Wijaya et al., 2009). Otra característica muy importante de este efecto es que se puede usar para controlar la liberación de ácidos nucleicos, a través de un diseño de NPs con carga neta superficial y DNA cargado negativamente, se liberaba por repulsión electrostática a las células (Ding et al., 2014; Singh et al., 2018).

#### 2.12 Polietilenglicol (PEG)

Es un polímero hidrofílico de cadena larga por óxido de etileno ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), utilizado por ser un buen estabilizador de NPs que las protege de RNAsas, resiste la adsorción de proteínas, facilita el escape endosomal por el efecto de “esponja de protones”, es biocompatible, es inerte lo que evita los ataques por parte del sistema inmunológico, no tóxico (Benjaminsen et al., 2013; Pędziwiatr-Werbicka et al., 2021; Yang & May, 2008).

Las NPs pegiladas tienen las características de ser anti-inmunes, antigénicas, evitan la descomposición de enzimas proteolíticas y su estabilidad permite la alta penetración en los tejidos para su circulación por el organismo, durante tiempos más prolongados y por lo tanto cumplen con su objetivo de pasar desapercibido lo que lleva en su interior, porque se puede aplicar para la liberación de fármacos, el transporte pasivo, y tiene la ventaja de que reduce los efectos secundarios que causan los tratamientos convencionales, brinda estabilidad a las NPs y sirve como una cubierta protectora del cargo de fármacos como los ácidos nucleicos. Los nanobiosistemas al ser recubiertos con polímeros como el PEG, tienen la característica de no agregarse y mantener su estabilidad en ácido o bases, así como en altas temperaturas (Ding et al., 2014; Hsing et al., 2022; Suk et al., 2016).

El PEG está aprobado por United States (U.S) Food and Drug Administration (FDA), como un polímero seguro para consumo humano.

### 2.13 Quercetina

La quercetina es un fitoquímico flavonoide proveniente de los pigmentos de los frutos, vegetales y flores, se caracteriza por ser antioxidante, su estructura representada en la Figura 6 es de flavona C6 (anillo A)-C3(anillo c)-C6(anillo B), posee un peso molecular de 302.2 g/mol, es de color amarillo, tiene poca solubilidad en agua, pero si una mayor solubilidad en alcoholes y alcalinos. Tiene la ventaja de tener poca toxicidad en exposición oral en LD50 161 mg/kg (Neamtu et al., 2022).

Gracias a sus características antioxidantes, tienen la capacidad de eliminar radicales libres y actuar como agente quelante de iones metálicos. La eliminación de radicales ocurre con la donación de H de OH libres o bien de electrones, mientras que la quelación es por su grupo catecol u O-dihidroxi (sistema cinamoilo), pero también depende del pH y de la asociación metal-ligando, por lo que es utilizado como agente reductor en síntesis de NPs metálicas, para aplicaciones en cáncer. (Bollella et al., 2017).

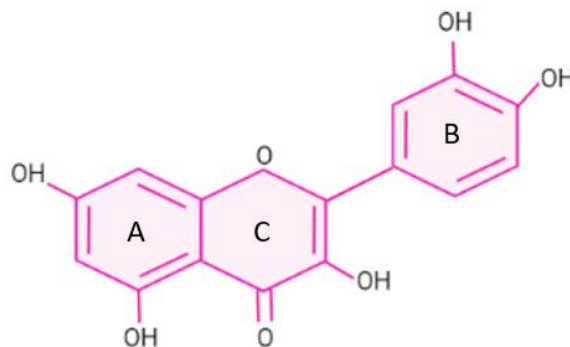


Figura 6. Estructura química de la quercetina, un flavonoide compuesto por un esqueleto de 15 átomos de carbono, en dos anillos bencénicos (A y B) conectados por una cadena de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico (C).

### 3. Justificación

El cáncer de colon es uno de los más frecuentes en el mundo, causando miles de muertes por año, debido a la proliferación anormal de las células en colon y recto. En México se reportan alrededor de 15 mil casos nuevos al año y aproximadamente 6500 muertes, a causa de esta enfermedad. Las principales causas de riesgo en contraer ese padecimiento son por herencia familiar, obesidad, malos hábitos alimenticios, consumo de alcohol o por la nula actividad física.

Actualmente se están estudiando diferentes terapias dirigidas a tratar el cáncer, entre ellos la interferencia del RNA mensajero, cuyas herramientas destacan el uso de oligonucleótidos antisentido (ASOs), mecanismos de RNAi, ribozimas y riboconmutadores, encaminados a la regulación de la expresión génica en la célula mutada.

Recientemente, se ha propuesto la utilización de ácidos nucleicos como instrumentos para terapias contra el cáncer, debido a su capacidad para interferir con el transcrito de genes, inhibiendo su función, y de esta manera regular procesos celulares importantes. Sin embargo, aunque se especula como una alternativa promisoriosa, requieren de vehículos para su transporte y protección contra nucleasas y otros aspectos como la activación de respuestas inmunitarias. Debido a su baja estabilidad, la entrega de información a las células puede ser interrumpida.

Las NPsAu antisentido, llamadas así por encapsular ácidos nucleicos antisentido se han utilizado para la inhibición de la traducción de RNA mensajero (RNAm) de diferentes genes, han sido objeto de estudio debido a su eficiente aplicación en la liberación controlada de fármacos. Son candidatos para su transporte de ácidos nucleicos por sus propiedades fisicoquímicas, su eficiente funcionalización, por su baja toxicidad celular y la facilidad de síntesis y control de parámetros como tamaño, forma y grado de funcionalización. En este sentido en el desarrollo del proyecto se tomará este nombre para nuestro sistema híbrido de NPsAu-QUER/PEG-ASOs-antisentido.

Actualmente existen pocos estudios que evalúen la citotoxicidad de estos sistemas liberando ácidos nucleicos sobre líneas celulares de cáncer de colon. Por lo que resulta importante desarrollarlos y evaluarlos, para en un futuro poder proponerlos como andamios prometedores para el transporte de ácidos nucleicos en enfermedades como el cáncer.

#### 4. Hipótesis

Las NPsAu antisentido sintetizadas con sonoquímica, disminuyen la viabilidad celular de SW480 y la expresión de *Tp53*.

#### 5. Objetivo General

Sintetizar NPsAu antisentido y evaluar su efecto antiproliferativo e inhibidor de *Tp53* sobre células cancerosas de colon SW480.

##### 5.1 Objetivos Específicos

Diseñar la metodología experimental para la preparación de las NPsAu antisentido (con tamaño y forma homogénea) a través de síntesis asistida por ultrasonido estables al pH fisiológico.

Determinar las propiedades ópticas, electrónicas, estructurales, morfológicas, de carga y de tamaño de las NPsAu con y sin ensamblar.

Evaluar el efecto de las NPsAu sobre la viabilidad celular de la línea SW480.

Analizar la expresión transcripcional de *Tp53* y la cuantificación de su proteína en células de cáncer de colon SW480.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Material

Ácido Cloroaúrico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )  $\geq 49.0$  % Au, 393.83 g/mol, Sigma Aldrich, 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA.

Quercetina Hidratada  $\geq 95.0$  %, 302.24 g/mol, Sigma Aldrich, 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA.

SH-PEG2K-NH<sub>2</sub> ( $\text{HS}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HCl}$ ), 2000 g/mol, Sigma Aldrich.

Medios de cultivo Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (ATCC, Rockville, MD, EUA), suero fetal bovino (FBS) de la marca Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA); penicilina, estreptomina, tripsina, MTS de la marca Sigma (St. Louis, MO, EUA).

### 6.2 Metodología

#### 6.2.1 Síntesis de NPsAu antisentido

La síntesis se preparó con la solución de  $\text{HAuCl}_4\text{H}_2\text{O}$  a una concentración de 1mM y se le adicionó posteriormente la solución de quercetina como agente reductor de 1mM y SH-PEG2K-NH<sub>2</sub> ( $\text{HS}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HCl}$ ) de 1M. Una vez preparadas las NPsAu se agregaron los ASOs dirigido a *Tp53* y se almacenó a 4°C.

#### 6.2.2 Espectroscopía UV-VIS

Para la medición de la cuantificación de la radiación absorbida por las moléculas en las regiones visibles del ultravioleta cercano (UV) y del infrarrojo cercano (NIR) del espectro electromagnético de las NPsAu antisentido en coloide y sus bandas características de Au, quercetina y ASOs, las muestras fueron disueltas en agua desionizada (controles previos a la síntesis) y colocadas en una celda de cuarzo para ser medidas en un espectrómetro Agilent Technologies en un rango de 200 a 800 nm a temperatura ambiente.

#### 6.2.3 Microscopía Raman (RAMAN).

Esta técnica de análisis espectroscópico combina la espectroscopía Raman con la microscopía óptica para obtener información química y estructural de una muestra



con alta resolución espacial, el espectro resultante muestra los desplazamientos de energía que corresponden a las vibraciones moleculares específicas de la muestra, proporcionando una "huella dactilar" única para cada sustancia. En este caso se empleó un haz de luz monocromáticas verde a 532 nm y roja a 633 nm, con una potencia láser de 6 mW, cada una de las muestras tanto de NPsAu con y sin ASOs, como de PEG y ASOs se colocaron en un portaobjetos y ajustando el microscopio para la medición de los materiales se analizaron tres veces cada una, con una exposición de 10 segundos para observar la superficie de las NPsAu, su constitución y fijación al PEG y ASOs. El equipo que se utilizó fue un microespectrómetro Raman modelo DRX II Termoscientific.

#### 6.2.4 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Las imágenes de los nanomateriales (NPsAu antisentido) se obtuvieron por medio de un microscopio JEOL JEM-1010 que funciona a 80 kV con una cámara digital ORIUS de GATAN, el microscopio trabaja mediante la emisión de un haz de electrones acelerados a altas energías que interactúan con la muestra generando contrastes que forman la imagen, la diferenciación entre compuestos se puede realizar debido a su densidad electrónica, de esta manera, utiliza la interferencia de electrones que han atravesado diferentes partes de la muestra, proporcionando información sobre la estructura interna a nivel atómico. Los materiales en coloide se dispersaron en celdas de cobre a temperatura ambiente, para la captación de las imágenes.

#### 6.2.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Espectroscopía de Dispersión de energía (EDS).

La obtención de imágenes con SEM y la composición química, con EDS, de las NPsAu se obtuvieron a partir de un microscopio HITACHI SU8200, mediante la dispersión de un haz de electrones de alta energía la cual incide sobre la muestra, interactuando con los átomos de la superficie. Las muestras se montaron en láminas de cobre sobre cilindros de aluminio. Esta técnica se utilizó para obtener imágenes

de alta resolución de la superficie de muestras, esto es, análisis de la microestructura, topografía y composición de materiales.

#### 6.2.6 Cultivo celular

Para la evaluación biológica de las NPsAu antisentido se utilizaron las células SW480, mismas que son de adenocarcinoma humano, tipo B en la escala de Dukes, y que presentan mutación en el gen *Tp53* en los codones 273 y 309, en el brazo corto del cromosoma 17 (17p1.3) (ATCC, 2020; Rochette et al., 2005). Las células SW480 se cultivaron con medio DMEM con suero fetal bovino (SBF) al 10% y antibióticos-antimicóticos al 1%, CO<sub>2</sub> al 5% a una temperatura de 37 °C mantenidas en una cámara de bioseguridad. El medio de cultivo se cambió por DMEM nuevo, cada 48 horas hasta conseguir una confluencia de aproximadamente 80%, y se realizaron subcultivos por medio de tripsina.

Tratamiento: Se usaron 7 diferentes concentraciones de dosis-respuesta de las NPsAu antisentido y se calculará la IC<sub>50</sub>, usando un grupo control negativo de células SW480 sin tratamiento y otros grupos control de células SW480 de quercetina, PEG, NPsAu sin ASOs y de NPsAu antisentido con ASOs a una concentración de 1M.

### 6.2.7 Diseño de los oligonucleótidos antisentido (ASOs)

Para el diseño de los oligonucleótidos antisentido se usó la página web [Sfold - Software for Statistical Folding and Studies of Regulatory RNAs \(wadsworth.org\)](http://Sfold-Software-for-Statistical-Folding-and-Studies-of-Regulatory-RNAs.wadsworth.org), (Figura 7) reportada en los artículos de Dai et al., 2006 y Xie et al., 2011.

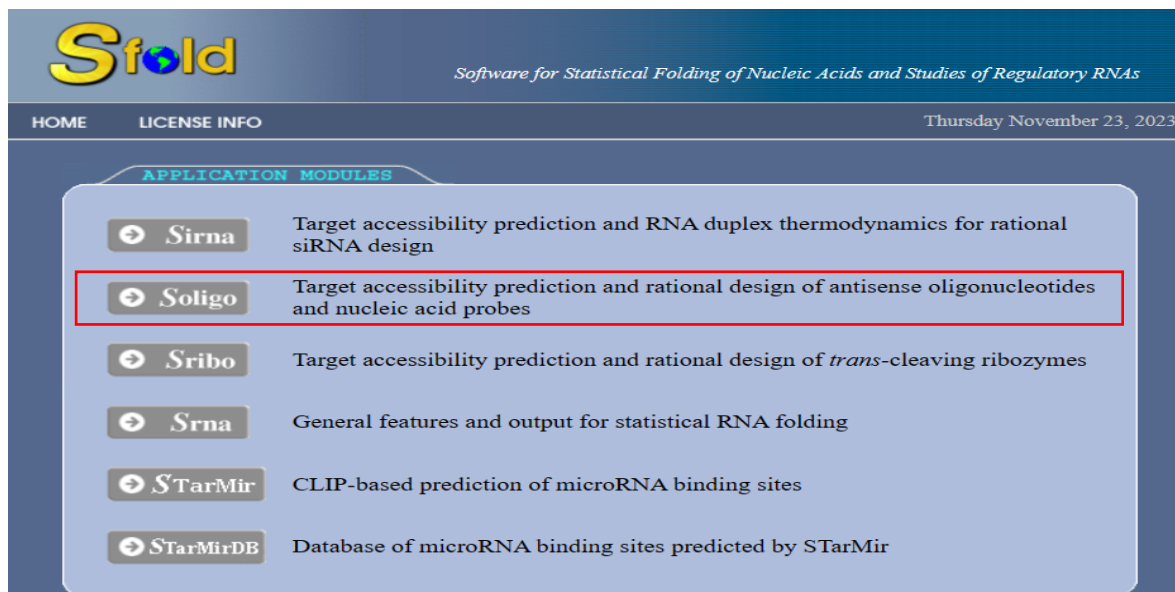


Figura 7. Página principal de Sfold, donde se presentan todas las opciones para el diseño de los oligonucleótidos antisentido (ASOs) de interferencia, entre ellos los antisentido.

Para el diseño de los oligonucleótidos antisentido se tomó el FASTA de la proteína tumoral Tp53 del Homo sapiens (*Tp53*), variante de transcripción 1, RNAm (NCBI Referencia Secuencia: NM\_000546.6), que corresponde a las mutaciones de la línea celular SW480, que presenta mutaciones en los codones 273 (Dominio de unión al DNA) y 309 (Señal de localización nuclear). En el codón 273 presenta el cambio de nucleótido de base G a A (CGT a CAT), lo que hace el cambio de aminoácidos de arginina (Arg) a histidina (Hist) (X. L. Li et al., 2015). Por lo que para el codón 309 el cambio de base es de C a T (CCC a ICC), lo que corresponde en aminoácidos de serina (Ser) a prolina (Pro) (Rochette et al., 2005b)

El programa de sfold se basa en los algoritmos de sus creadores Ding y Lawrence, los cuales se basan en el plegamiento de las estructuras secundarias del RNAm de

Boltzmann, predicción de accesibilidad del RNAm diana y el diseño de la orientación del RNA (Ding et al., 2004; Ding & Lawrence, 2001, 2003).

Estos algoritmos, junto con algunas reglas empíricas como la energía de unión, contenido de G-C o bien la eliminación de sitios con 4 guaninas consecutivas, son características para la selección óptima del oligonucleótido antisentido.

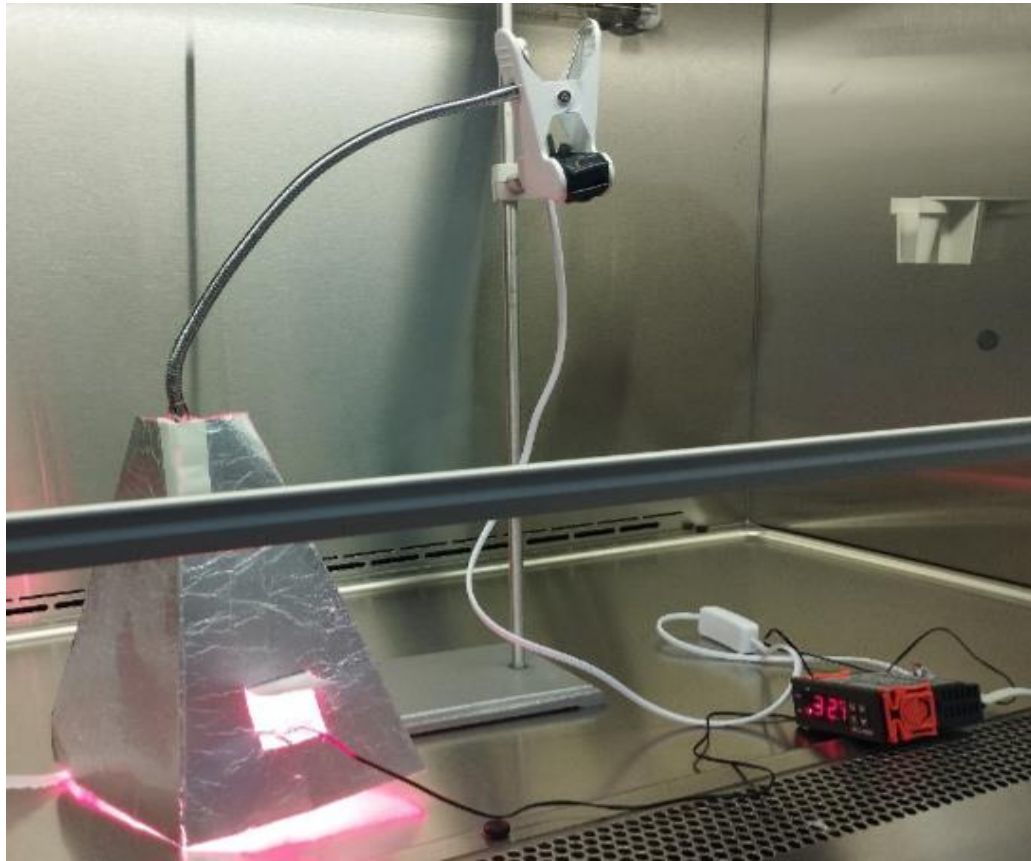
1. Evitar cuatro residuos contiguos de Guaninas.
2. Energía de unión de oligos antisentido  $\leq -8$  Kcal/mol.
3. Eliminar los sitios con contenido de GC inferior al 40% o superior al 65%.

#### 6.2.8 Tratamiento de pruebas con NPsAu sobre las células SW480.

Para las pruebas de citotoxicidad de las NPsAu sobre las células de cáncer de colon SW480, se requirió de la centrifugación, secado y resuspensión de las NPsAu en medio de cultivo DMEM. En los primeros experimentos las células fueron incubadas a diferentes concentraciones de NPsAu sin y con oligonucleótidos (secuencia invertida de 3' a 5' dirigidos al codón 273 de *Tp53*), estos últimos recubiertos con PEG-4000 estándar, para proteger a los ASOs de enzimas endonucleasas, ambas muestras de NPsAu se diluyeron a concentraciones de 1000, 500, 250, 50, 5 y 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , por 24 h, a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% y con luz Infrarroja (IR), como se observa en la Figura 8.

Posteriormente para los siguientes experimentos las células SW480 fueron tratadas con NPsAu sin y con carga de ASOs de 3' a 5' dirigidos al codón 309 de *Tp53* y un recubrimiento de PEG-3000 bisaminado, para mejorar la adhesión de los ASOs a la superficie de las NPsAu y la carga y finalmente ser diluidas en medio DMEM al 2% con SBF. Después de 3 horas de incubación, las células con tratamiento se expusieron a luz IR de una longitud de onda de 600 nm, durante 3 minutos a 37°C (las NPsAu expuestas a 37°C fueron disueltas en PBS, para después agregar el PEG y los ASOs).

En los experimentos finales se siguió el mismo procedimiento que con los segundos, con las diferencias de que en estos últimos experimentos, las NPsAu cargadas de ASOs (condón 309, *Tp53*) y el PEG-3000 bisaminado, se centrifugaron para retirar excesos (donde se pierde concentración de NPsAu) y se disuelve en PBS y en medio DMEM al 2% de SBF. Después de 3 h de incubación también se expusieron a luz IR, cada 20 segundos, por 2 minutos a 37 y 38°C.



*Figura 8. Células SW480 a diferentes concentraciones de tratamiento con las NPsAu sin y con ASOs (1000, 500, 250, 50,5, 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) expuestas a luz IR de una longitud de onda de 600 nm, por 3 min a 37°C, el IR fue controlado por un termostato digital STC-1000, el cual detecta temperatura en medios acuosos y prende o apaga el IR cuando la temperatura es de 37°C o menor. Las células SW480 que se encuentran en una placa de 96 pozos es cubierta por un cono de aluminio para no disipar la energía del IR y se concentre en la placa.*

### 6.2.9 Viabilidad celular por el método de MTS

- 1- La viabilidad celular se analizó mediante con un ensayo colorimétrico, con la reducción de las sales de tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio. Posteriormente, las células se sembraron en una microplaca de 96 pozos ( $5 \times 10^3$  células/pozo) en DMEM con SBF al 10%, con 24 h de incubación.
- 2- El medio DMEM se cambia por los tratamientos a diferentes concentraciones en DEMEM con SBF (2%), incluyendo controles positivos y negativos.
- 3- Después de 24 h de tratamiento se retiró DMEM con tratamiento y se realizaron lavados con PBS, posteriormente se colocó 100  $\mu$ l de DMEM nuevo y agregó 20  $\mu$ l de solución MTS a cada pozo y la incubación continua a 37°C por 1h.
- 4- El valor de densidad óptica de cada pozo se detectó a una longitud de onda de 490 nm en espectrofotómetro de ELISA.
- 5- Para encontrar la dosis inhibitoria media se gráfíco el porcentaje de viabilidad contra concentración del tratamiento (Merck KGaA y/o cualquiera de sus filiales, 2022).

El cálculo del porcentaje de viabilidad se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de viabilidad (respecto al control negativo)} = (DO_t/DO_c) * 100.$$

Donde la interpretación es:

DOT: Densidad óptica promedio de los cultivos tratados

DOC: Densidad óptica promedio del control negativo

La concentración inhibitoria cincuenta ( $IC_{50}$ ) se refiere a la concentración de tratamiento necesaria para inhibir la supervivencia del 50% de la población de células tratadas.

## 7. Resultados

### 7.1 Espectroscopía UV-VIS.

En la Figura 9 se muestra los espectros de los controles de UV-VIS de las soluciones previas a la síntesis de NPsAu como del  $\text{HAuCl}_4$ , QE y Au+PEG. En la Figura 9 (a) se presenta el espectro de la solución de  $\text{HAuCl}_4$ , dónde se observa una banda de baja intensidad a los 295 nm que pertenece a las especies de  $\text{Au}^{3+}$ . El espectro de la Figura 9 (b) se visualizan las bandas características de la QE a los 255 nm perteneciente al sistema cinamolio del anillo B y otra a los 388 nm del sistema benzoilo del anillo A (Catauro et al., 2015).

Por otro lado, en la Figura 9 (c) se muestra el espectro de las bandas de la mezcla de  $\text{HAuCl}_4$  y PEG ( $\text{HAuCl}_4$ +PEG), predominando más la banda del  $\text{HAuCl}_4$  con un ligero desplazamiento a la derecha de los 295 nm que se puede atribuir a la interacción entre el PEG y las especies del  $\text{Au}^{3+}$ .

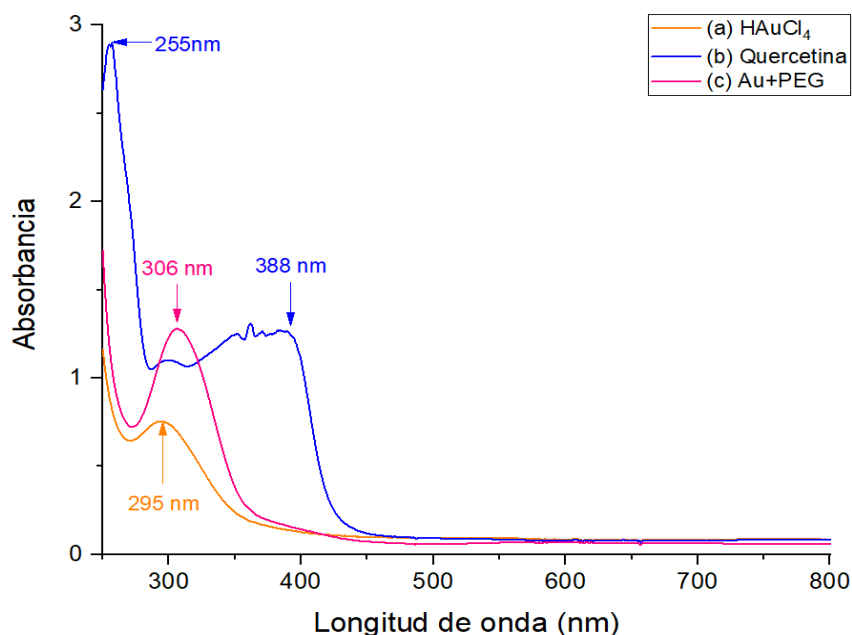


Figura 9. Espectros de absorción de los diferentes controles medidos con espectrofotometría UV-Vis. Los espectros muestran las curvas de absorción para: a)  $\text{HAuCl}_4$  (ácido cloroáurico), con un pico característico a los 295 nm; b) Quercetina (QE), con longitudes de onda en 255 y 388 nm; y c) Polietilenglicol y oro (Au+PEG).

En la Figura 10 (a) se visualiza los espectros de los controles de la mezcla de PEG y ASOs, se conoce que la banda característica de los ácidos nucleicos es a los 260 nm y la absorción va de 1.8 a 2.5, lo cual coincide con la banda que aparece a los 259 nm con una absorción en 2, lo que se le atribuye la banda de 259 nm con una absorbancia en 2 indicando la presencia de ASOs mezclados con el PEG (Porterfield & Zlotnick, 2010). Mientras que en el espectro Figura 10 (b) predomina las bandas de la QE pero con menor intensidad, una a los 259 nm con menor intensidad del sistema cinamolio anillo B y otra a los 380 nm correspondientes al sistema benzoilo anillo A. En este caso, se ve un cambio en las bandas de absorción de la QE, tanto en forma como en intensidad, esto se puede atribuir a que existe una fuerte interacción entre ambos compuestos, tal que, algunas excitaciones electrónicas han sido inhibidas.

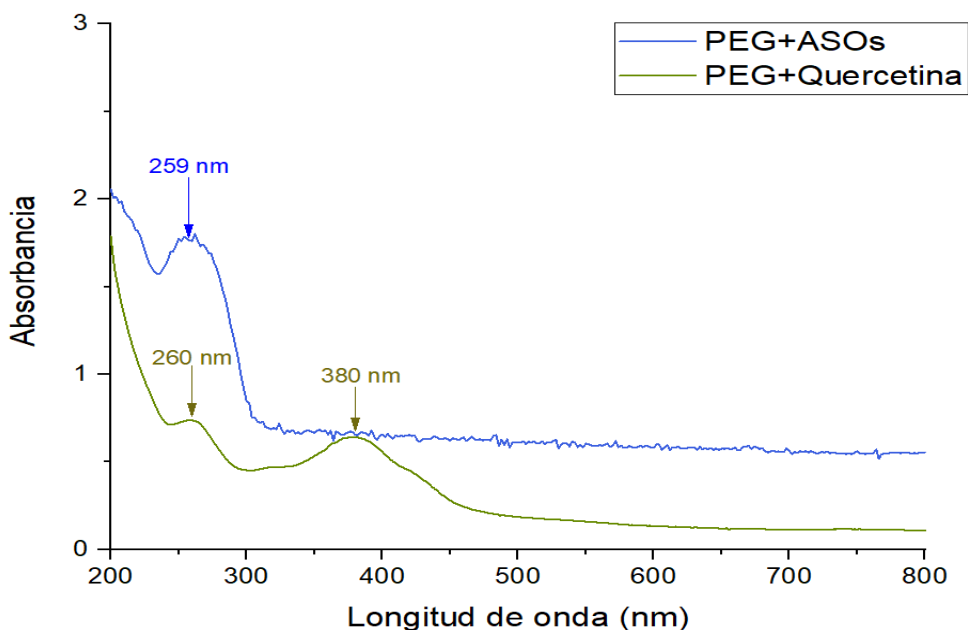


Figura 10. Espectroscopía UV-Vis de los controles: a) PEG+ y b) PEG+Quercetina. Los espectros muestran la interacción de los ASOs y la quercetina con el polietilenglicol (PEG). En el control a) (PEG+ASOs), se observan picos de absorción característicos de los ASOs alrededor de 259 nm. En el control b) en PEG+Quercetina, se encuentran los picos de absorción que se sitúan en 260 y 380 nm, destacando las características de la quercetina.



En la Figura 11 se exhibe los espectros de los PSR de la Figura 11 (a) NPsAu (únicamente con QE y PEG) sin ASOs con una banda de absorción a los 526 nm lo que nos indica la formación de las NPsAu por el método de síntesis de sonoquímica. Mientras que en el espectro mostrado en la Figura 11 (b), el cual corresponde a las NPsAu cubiertas con los ASOs que muestra una banda a los 259 nm con una absorción de 1.8 que se puede atribuir a la interacción de los ASOs con los núcleos de las NPsAu. que se observa un desplazamiento a la derecha a los 540 nm, esto se puede discutir debido la aglomeración de las NPsAu al agregar los ASOs.

Si se comparan ambos espectros, Figura 11 (a) y 11 (b), se puede observar un desplazamiento y un aumento de absorción del nanobiosistema. El desplazamiento se muestra a la izquierda en el nanobiosistema con respecto a las NPsAu que va de los 540 nm a los 526 nm, esto se puede atribuir al crecimiento de las NPsAu por la adición de los ASOs, modificando así la banda de absorción. Cabe mencionar que también se observó un cambio de manera directa en el color emitido de las diferentes muestras, que es un color rojizo para la NPsAu, mientras que para el nanobiosistema es de una tonalidad morada. En algunos trabajos reportados, observan el mismo fenómeno (Moitra et al., 2020). Este resultado nos indica que si se están obteniendo cambios significativos en las diferentes muestras, que apuntan a la formación del nanobiosistema de NPsAu con los ASOs.

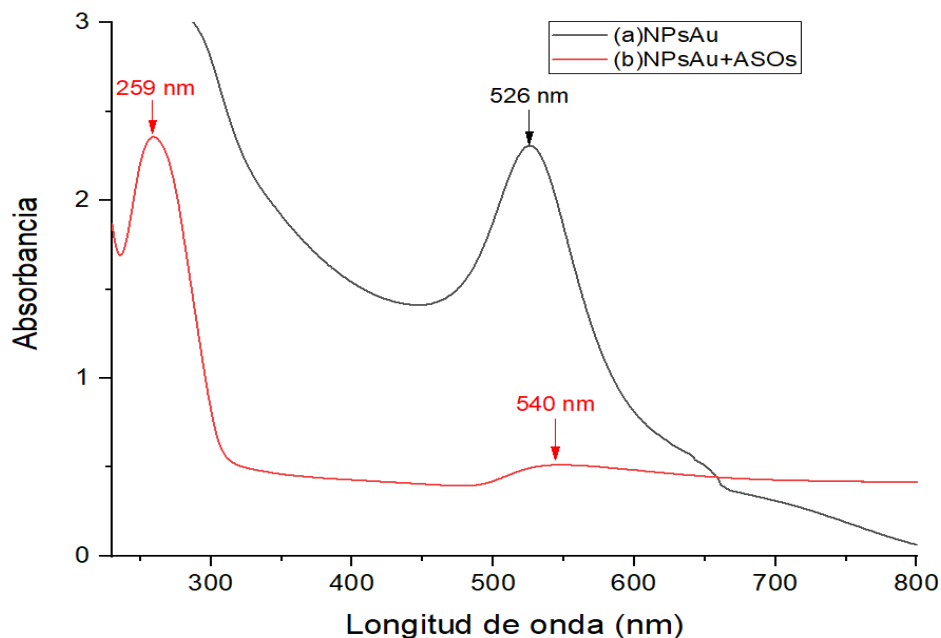


Figura 11. Espectroscopía UV-Vis de la formación de coloides: a) NPsAu (nanopartículas de oro) y b) NPsAu+ASOs. El espectro a) muestra la longitud de onda de las NPsAu a los 526 nm, que corresponde al fenómeno de plasmones de superficie (PSR). El espectro b) representa las NPsAu recubiertas con los ASOs.

## 7.2 RAMAN

A continuación, se muestran los espectros de los modos vibracionales RAMAN de las NPsAu con y sin ASOs, como del PEG, los resultados se compararon con los espectros reportados con la literatura.

En la Figura 12, se encuentra el espectro RAMAN de la estructura química del PEG, en dónde se puede encontrar el grupo C-C-O en 71, 356 y 528  $\text{cm}^{-1}$  con movimiento de torsión, además del modo vibracional esqueleto en las regiones de 217, 272 y 575  $\text{cm}^{-1}$  (Kuzmin et al., 2020). Mientras que las vibraciones de C-O estiramiento se encuentran acopladas en 836 y de 927-1390  $\text{cm}^{-1}$ . Por otro lado, los modos de vibración de C-C estiramiento se observan en 855 y 1133  $\text{cm}^{-1}$ , y las bandas de 927 y de 1225 a 1477  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al modo de deformación torsión. Finalmente, los grupos de estiramiento de OH y CH aparecen de 2565-1678  $\text{cm}^{-1}$  y de 2746-2937  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (Yamini et al., 2014).

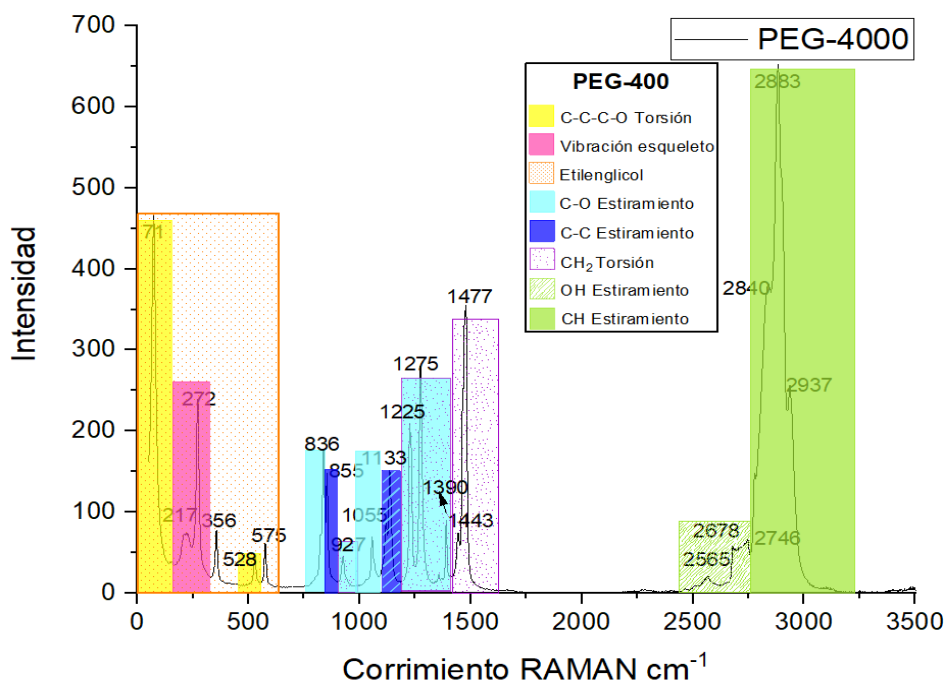


Figura 12. Espectroscopía Raman de la estructura química de PEG-4000, tomada con láser verde de 532 nm.

Analizando los espectros de las NPsAu sin ASOs centrifugadas y secas en la Figura 13, se pudo observar los modos vibracionales característicos del PEG como el grupo C-O con estiramiento de los 844-1285  $\text{cm}^{-1}$ , C-C estiramiento en 1113  $\text{cm}^{-1}$ , la vibración de torsión del grupo  $\text{CH}_2$  en 1469  $\text{cm}^{-1}$ , así como los modos vibracionales de los grupos CH y OH en 2919 y 3240  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente. Finalmente, un grupo perteneciente a la quercetina ubicado a los 1560  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde al modo vibracional de estiramiento y su grupo C=O de la molécula de la quercetina (Kuzmin et al., 2020; Numata & Tanaka, 2011; Yamini et al., 2014).

Comparando las Figuras 12 y 13, es evidente que la forma y las intensidades de las señales cambiaron para el caso de las NPsAu recubiertas con Quercetina y PEG; pero en el caso del PEG, las vibraciones relacionadas con el esqueleto y las flexiones relacionadas los enlaces C-C-O ya no aparecen en la NPsAu, lo que indica que estos modos vibracionales han perdido movilidad, sugiriendo que son los que se encuentran anclados hacia el interior de la NPsAu.

Los grupos funcionales encontrados en la capa superficial de las NPsAu nos indican un recubrimiento del PEG con la Quercetina hacia el núcleo de la NPAu, en este caso la Quercetina, el agente reductor que se utilizó para reducir las sales del HAuCl<sub>4</sub>.

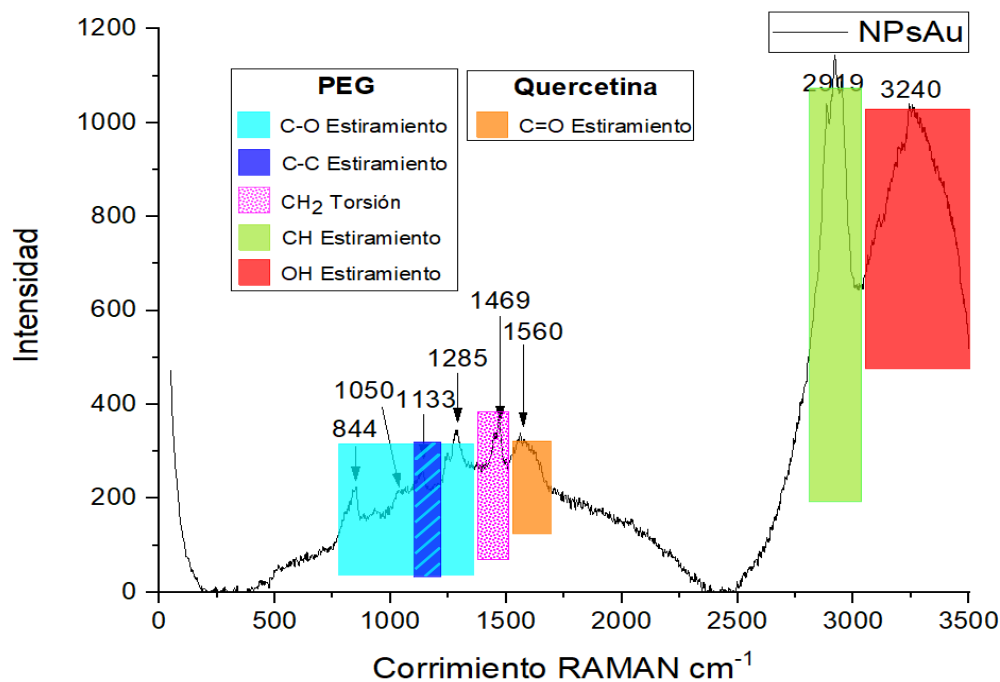


Figura 13. Espectroscopía Raman de la capa superficial de las nanopartículas de oro (NPsAu) recubiertas con PEG y quercetina, se usó láser verde de 532 nm.

A continuación, en la Figura 14 se presentan los modos vibracionales de las NPsAu con ASOs y PEG. En la primera sección de 205 a 556 cm<sup>-1</sup> se encuentra el grupo C-C-O del PEG (Yamini et al., 2014), con corrimientos hacia la derecha, lo que sugeriría la interacción de entre el PEG y los ASOs. Del rango de 610-1611 cm<sup>-1</sup> se aprecian las purinas y pirimidinas de los (Gong et al., 2009). Las adeninas (A) son la base nitrogenada con mayor visibilidad en el espectro RAMAN y esto se puede deber a que tanto las adeninas como las guaninas (G) son las que contienen mayor cantidad de grupos amino (NH<sub>2</sub>), el cual le otorga cargas positivas a estas purinas que funcionan como interacción con los grupos OH negativos del PEG, que podrían estarse uniendo por fuerzas electrostáticas, junto con las G que se encuentran de

los 610-674  $\text{cm}^{-1}$  (He et al., 2020; Liu & Liu, 2019). Ambas purinas se encuentran en la región de 1584  $\text{cm}^{-1}$ .

Las pirimidinas en el espectro RAMAN (Figura 14) se visualizan en 1168-1290  $\text{cm}^{-1}$  el uracilo (U), junto con la citosina (C), pero específicamente la C se observa en 1530  $\text{cm}^{-1}$  (He et al., 2021). Las moléculas como la ribosa y el grupo fosfato (P-O-P), se encuentran de 850-1085  $\text{cm}^{-1}$  y en 801  $\text{cm}^{-1}$ . Mientras que los grupos C=O y C-H (anillo), se ven acopladas en 1611 y de 1452-1469  $\text{cm}^{-1}$  (Gong et al., 2009). Aunque el grupo de las pirimidinas contienen menor cantidad de grupos amino en su estructura, según lo reportado por (Liu & Liu, 2019) indica que existe una interacción directamente con el PEG en 1290  $\text{cm}^{-1}$  con su grupo C-O estiramiento y  $\text{CH}_2$  torsión. Otro grupo de interés que se aprecia en el espectro RAMAN es el grupo CH estiramiento después de las bandas de los ASOs, lo que podría estar indicando que la capa superficial de las NPsAu posee un recubrimiento tanto de ASOs como del PEG.

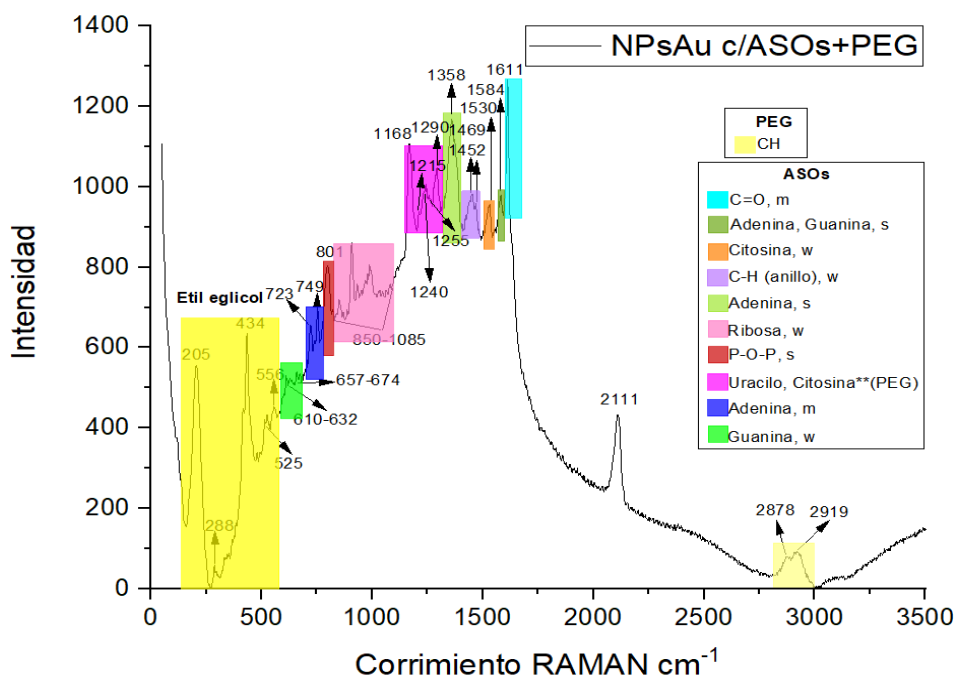
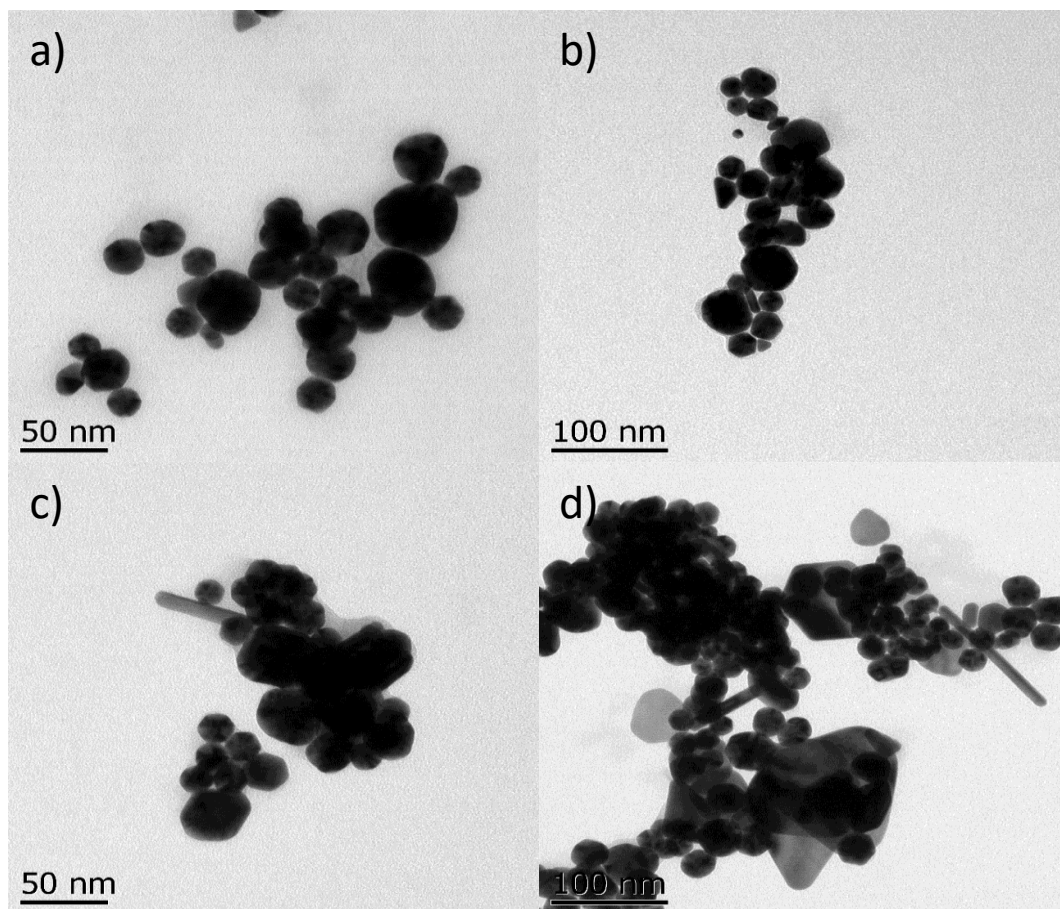


Figura 14. Espectroscopía Raman de la capa superficial de la mezcla de nanopartículas de oro (NPsAu), ASOs y PEG, para este se utilizó el láser rojo a 633 nm.

Con la comparación y el análisis de los 3 grupos de espectros RAMAN (PEG, NPsAu, NPsAu + ASOs) se puede observar un recubrimiento por parte de los compuestos orgánicos en la superficie de la NPAu, como también se observó en los resultados de TEM/EDS y SEM, que a continuación se discuten.

### 7.3 TEM

El tamaño y la morfología se analizaron mediante la técnica de TEM, como se muestra en la Figura 15.



*Figura 15. Tamaño y morfología de las nanopartículas de oro (NPsAu) observadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersadas en celdas de cobre. Las imágenes a) y b) muestran NPsAu-PEG sin ASOs a una escala de 50 y 100 nm, respectivamente. Las imágenes c) y d) a escalas de 50 y 100 nm, respectivamente, son las NPsAu-PEG con ASOs.*

En la Figura 15 a) y b) se presenta NPsAu recubiertas con una capa superficial orgánica, éstas corresponden al contraste más claro en las micrografías, que de acuerdo a los análisis RAMAN correspondería al PEG, el cual se midió dando un valor en promedio de 4 nm, en las micrografías se aprecian NPsAu con morfología icosaédrica, que oscilan entre los tamaños de 20-25 nm aproximadamente, las más pequeñas y las de mayor tamaño poseen tamaños entre los 45-48 nm.

De la Figura 15 c)-d) se muestran las NPsAu con el PEG y ASOs en la cubierta de las NPsAu, de acuerdo con los RAMAN presentados anteriormente, en las micrografías c) y d) no solo se observan NPsAu icosaédricas, también se pueden observar algunas nanovarillas, nanotriángulos e icosaedros con tamaños entre los 80-134 nm. Estas NPsAu contienen una capa superficial orgánica entre los 6-10 nm correspondientes a los ASOs y PEG adheridos

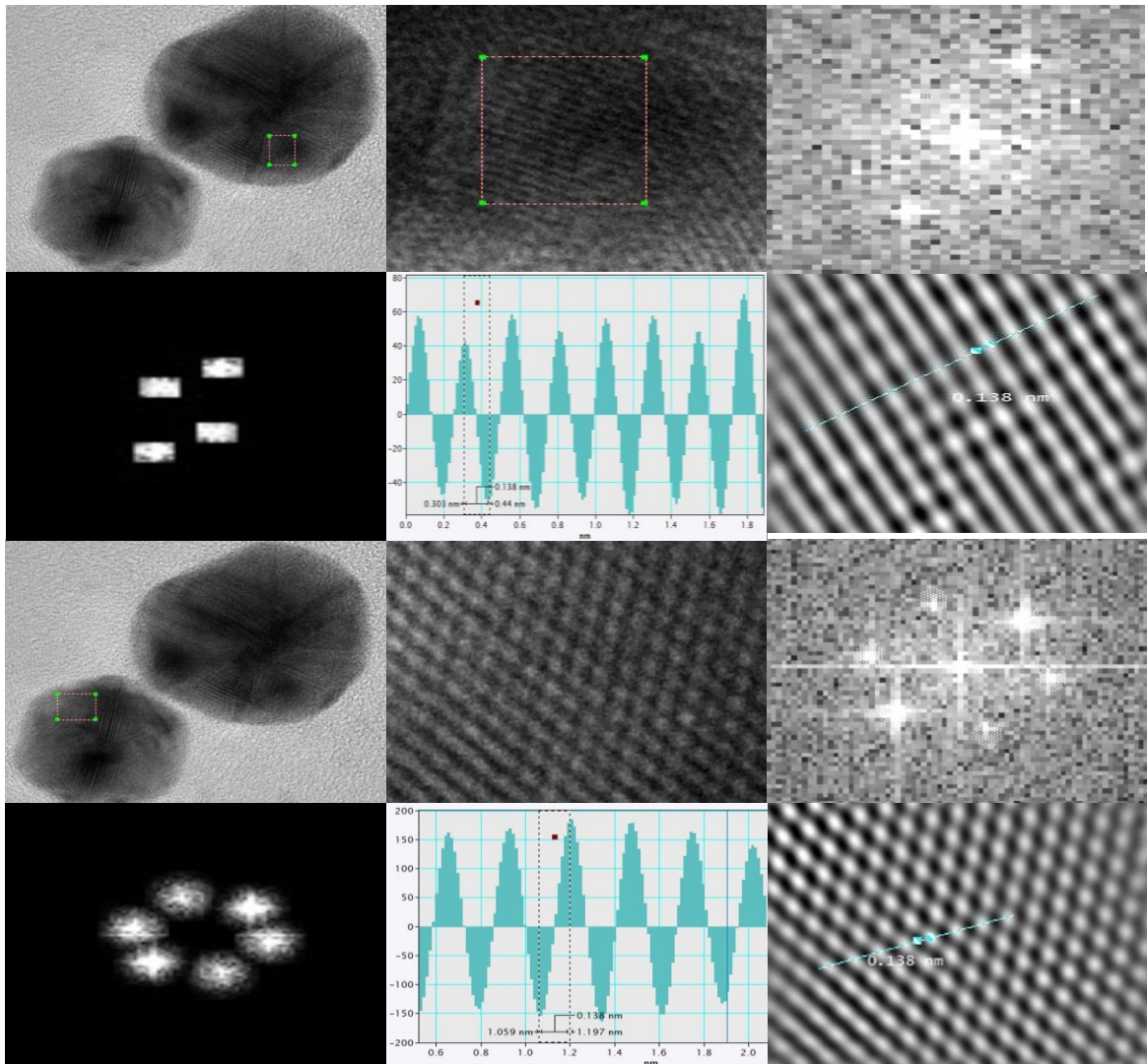


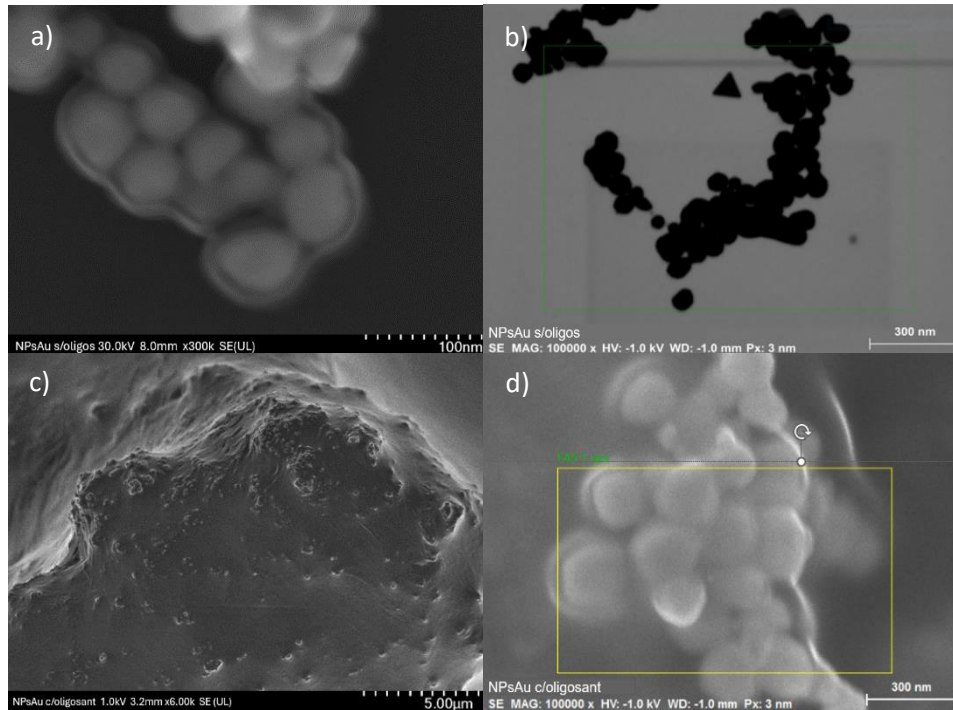
Figura 16. Muestra el proceso para conocer el tipo de estructura cristalina de las NPsAu, mediante la adquisición de imágenes por HRTEM y el análisis de los patrones de difracción.

En la Figura 16 se observan las imágenes que se obtuvieron por HRTEM de diferentes zonas de las NPsAu, que nos indica que nuestros nanomateriales poseen una estructura cristalina cúbica de cara centrada (FCC), y que los átomos de Au están de colocados de manera ordenada cada 0.138 nm, lo que nos indica que el método de síntesis por sonoquímica favoreció en el crecimiento homogéneo de las NPsAu.



#### 7.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con esta técnica no sólo obtuvimos la morfología, sino que también la composición química de la superficie de las NPsAu, como se muestra a continuación, en la Figura 17:



*Figura 17. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido SEM, montadas en láminas de cobre sobre cilindros de aluminio, en dónde la imagen a) muestra las NPsAu sin ASOs en modo STEM-SEM de mayor resolución y bajo las características de 30 kV, 8.0 mm, x300 k y una escala de 100 nm, para tomar la imagen, mientras que la b) fue tomada mediante la espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) y con las condiciones MAG:100000 x, HV: -1.0 kV, WD: -1.0 mm y Px: 3 nm, a escala de 300 nm, igual para NPsAu sin ASOs, únicamente con una capa de PEG en la cubierta. La imagen c) también fue tomada por STEM, bajo las características de 1 kV, 3.2 mm x, 6k, pero a una escala de 5 μm, finalmente la imagen d) tomada por EDS y a una escala de 300 nm, ambas imágenes c) y d) para NPsAu con ASOs.*

*Tabla 1. Porcentajes en masa de los elementos detectados mediante espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) de las NPsAu sin ASOs, cubiertas con PEG*

<b>NPsAu sin ASOs</b>	
<b>Elemento Químico</b>	<b>% Porcentaje en masa</b>
C	61.26
O	9.08
Au	29.66

*Tabla 2. Porcentajes en masa de los elementos detectados mediante espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) en las NPsAu recubiertas con ASOs modificados con fosforotioato y PEG-Bisaminado.*

<b>NPsAu con ASOs</b>	
<b>Elemento Químico</b>	<b>% Porcentaje en masa</b>
C	29.23
O	5.47
Au	63.21
N	1.18
S	0.89

En la Figura 17 a) se puede observar el STEM-SEM (combinación de TEM y SEM) de las NPsAu recubiertas por una capa, estas NPsAu tienen una forma icosaédrica y de acuerdo con la técnica por RAMAN (Figura 14) la cubierta que se observa alrededor de las NPsAu son correspondientes al PEG-4000. Esta información se corroboró con el mapeo de elementos químicos tomados de una determinada región de la muestra (Figura 17 b), los elementos químicos que se encontraron fueron (tabla 1) carbono (C), oxígeno (O) y oro (Au) correspondientes a los porcentajes en peso al 61.26, 9.08% y 29.66% respectivamente.

Por otro lado, en la Figura 17 c) se puede observar el HRSEM (microscopía de mayor resolución) de las NPsAu con una capa más densa (Figura 17 d); los resultados por RAMAN (Figura 14) indicaron que corresponden a los ASOs, recubiertos por una capa de PEG. De acuerdo con lo obtenido del mapeo (Tabla 2) de elementos químicos de la Figura 17 d), se observó C en un 29.23%, O en un 10.66% y N en un 1.18%, estos elementos corresponden al PEG-3000 bisaminado, mientras que el N no sólo corresponde al PEG-3000 bisaminado, sino que también a la modificación química de los ASOs (fosforotioato), una modificación química en el grupo fosfato de los ASOs con un azufre (S), también se encontró sobre las NPsAu en un 0.89%, y finalmente el porcentaje que se encontró de Au fue de 63.21%. A pesar de ser una técnica con aplicación de alta energía si se pudo capturar las imágenes y otra información como el mapeo de elementos químicos (EDS), que nos confirmó la existencia de los ácidos nucleicos y del PEG alrededor de las NPsAu.

## 7.5 Diseño de los ASOs antisentido (ASOs)

De acuerdo a los resultados Sfold y después de tomar los filtros a consideración arrojó los siguientes resultados para los codones 273 y 309:

```
~~~~~Filtered output for design of antisense oligos~~~~~

Column 1: target position (starting - ending)
Column 2: target sequence (5p --> 3p)
Column 3: antisense oligo (5p --> 3p)
Column 4: GC content
Column 5: oligo binding energy (kcal/mol)

FILTER CRITERIA: ("<=": less than or equal to)

A) 40% <= GC % <= 60%;
B) Antisense oligo binding energy <= -8 kcal/mol;
C) No GGGG in the target sequence.

-----

1- 20 CCCAACAAACACCAGCUCCUC GAGGAGCTGGTGTGTTGGG 60.0% -26.5 ← 309
1- 20 CGUGUUUGGCCUGUCCUGG CCAGGACAGGCACAAACACG 60.0% -19.1 ← 273
```

Figura 18. El archivo de salida generado por el programa Sfold incluye un análisis detallado de los ASOs diseñados para los codones 309 y 273 de Tp53. En el archivo, se presentan los datos, como: cantidad de GC, energía de enlace y los ASOs sugeridos.

Como se puede observar los ASOs (Figura 18 y 19) tanto para los codones 309 y 273 cumplen con las reglas empíricas del programa Sfold, para el diseño de los ASOs, los cuales se usaron para el tratamiento junto con las NPsAu como prueba en las células SW480.

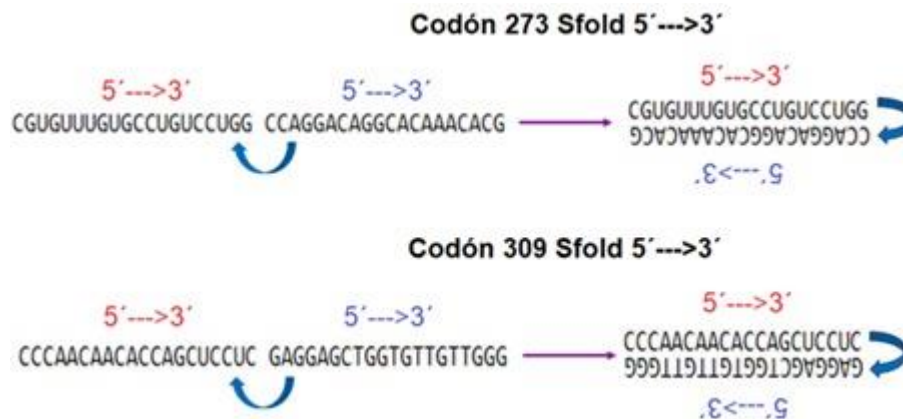


Figura 19. Los ASOs diseñados por Sfold dirigidos a los codones 273 y 309 del RNA mensajero (RNAm) del gen *Tp53* están orientados en la dirección 5' a 3'. Estos ASOs están diseñados para unirse de manera complementaria a las secuencias correspondientes de los codones específicos, con el objetivo de bloquear la traducción de *Tp53* mutado.

## 7.6 Ensayo de viabilidad MTS

Para los ensayos de viabilidad celular MTS (Figura 20, 21 y 22) se consideró agregar controles negativos, como el de medio DMEM preparado con SBF al 2% sin células, para retirar la posible interferencia entre el rojo fenol del medio DMEM. Además del control de referencia de células viables sin ningún tratamiento más que el medio DEMEM preparado, que se consideró como el 100% y a partir de este se normalizó las demás células con sus respectivos tratamientos.

A continuación, se presenta los gráficos de los tratamientos de NPsAu sobre la línea celular SW480, mediante el ensayo de viabilidad celular MTS con IR a 37°C durante 3 minutos. En la Figura 21 y 22 a) se observó un menor efecto sobre la viabilidad celular con las NPsAu sin ASOs, especialmente en la concentración de 50 µg/ml con un 77% de viabilidad celular y en algunas otras como en las concentraciones como de 1000, 500, 250 y 5 µg/ml hubo una muerte celular aproximada del 20%, mientras que la más baja de 0.5 µg/ml fue la que mostró menor efecto en las células con una viabilidad celular del 99%, por lo que no se consideró relevante para provocar un daño significativo en las células SW480, al igual que las demás concentraciones de 5 a 1000 µg/m con sus DE que oscilaban en el mismo rango y en general que no se observó un efecto dosis-respuesta importante en viabilidad celular.

En la Figura 20, se aprecian los controles de células con PEG (barra verde), PEG-Bisaminado (PEG-BIS) (barra amarilla) y Quercetina con DMEM y SBF al 2% (barra morada), en ninguno de los tres controles se observó que causaran un daño severo en la viabilidad celular. También entre los controles, como en los demás tratamientos de células con NPsAu se observan las células sin tratamiento, sólo DMEM y SBF al 2% (barra rosa), y de acuerdo a sus DE que oscilan de  $\pm 0.1573$  a  $\pm 0.4972$ , nos indicó que los componentes con los que las NPsAu fueron sintetizadas no causan citotoxicidad severa sobre las células SW480, teniendo viabilidades incluso del 100% o más.

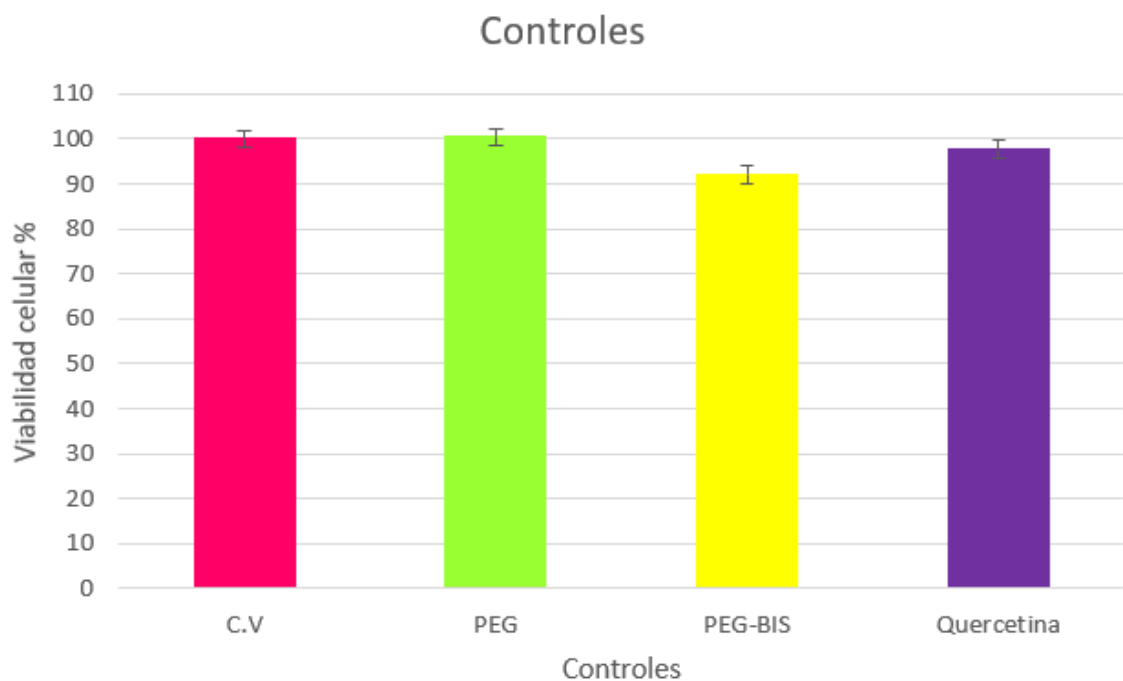
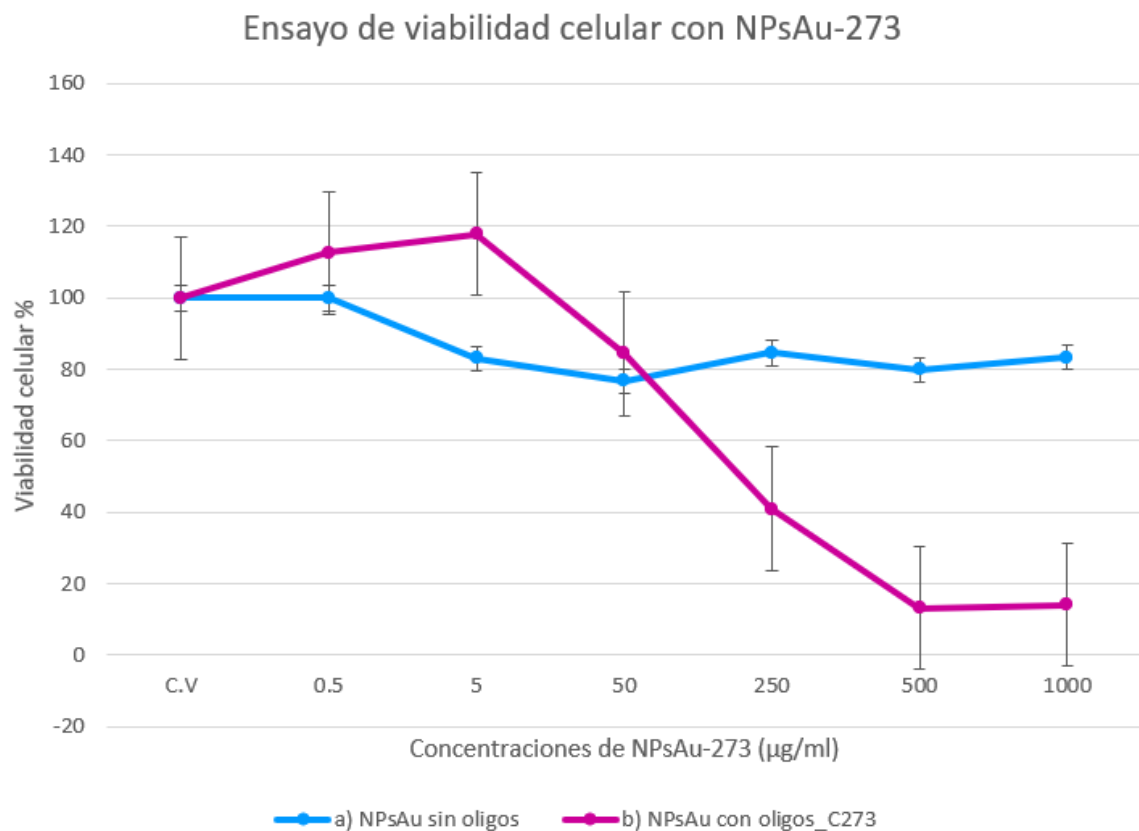


Figura 20. Viabilidad celular expresada en porcentaje  $\pm$  DE de los diferentes controles, tratadas con polietilenglicol (PEG), polietilenglicol bisaminado (PEG-BIS), quercetina y un control de células viables sin tratamiento. Cada tratamiento se realizó por triplicado y réplicas.

Por otro lado, las células tratadas con NPsAu recubiertas de ASOs dirigido al codón 273 (NPsAu con ASOs\_C273) Figura 21 b), si se observó una tendencia más definida de dosis-respuesta, indicando que a mayor concentración mayor muerte celular. En la concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$  se apreció una disminución celular del 87% aproximadamente, mientras que en las concentraciones más bajas de 5 y 0.5

µg/ml, no se observó una disminución en la viabilidad celular. Por otro lado, el valor de IC<sub>50</sub> indicó que se requiere de una concentración de 134.7 µg/ml para reducir la viabilidad celular al 50%. Comparado con el IC<sub>50</sub> de las NPsAu con ASOs\_C309 (527.922 µg/ml) que se discutirá más adelante, el IC<sub>50</sub> de las NPsAu con ASOs\_C273 es más bajo, lo que sugirió que este tratamiento es más tóxico para las células, pero con una menor concentración para reducir la viabilidad en un 50%.



*Figura 21. Viabilidad de células SW480 tratadas con diferentes concentraciones de nanopartículas de oro (NPsAu) sin a) y b) con ASOs dirigidos al codón 273 del gen Tp53, a 1000, 500, 250, 50, 5 y 0.5 µg/ml. Las células fueron incubadas a 37°C y expuestas a radiación ionizante (IR) durante 24 horas. Cada tratamiento fue por triplicado y se expresan como porcentaje ± DE.*

En la siguiente Figura 22, se muestran los resultados de los tratamientos con NPsAu, con las mismas características que en las anteriores, pero con la excepción que las NPsAu recubiertas con ASOs fueron para el codón 309 del gen de Tp53 (NPsAu con ASOs\_C309) Figura 22 b).

Los tratamientos de células con las NPsAu con ASOs\_C309 Figura 22(b), mostró una mayor muerte celular entre el 80 y 40%, con las concentraciones 1000 y 500  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, al igual que con las NPsAu con ASOs\_C273, pero con la diferencia que estas últimas NPsAu con ASOs\_C309 provocaron una menor muerte celular con la misma cantidad de NPsAu recubiertas de ASOs\_C309 que las anteriores. El valor de  $\text{IC}_{50}$  indicó que se necesita una concentración de 527.922  $\mu\text{g/ml}$  del tratamiento para reducir la viabilidad celular en un 50%; este valor se consideró alto, debido a que las NPsAu con ASOs\_C309, no son lo suficientemente efectivo para generar una muerte celular, porque como se puede ver en las viabilidades requiere una concentración relativamente elevada para lograr una inhibición del 50% en las células, que son las concentraciones de 1000 y 500  $\mu\text{g/ml}$ , con DS de  $\pm 0.0290$  y  $\pm 0.1590$ , respectivamente, lo que coincide los resultados de viabilidad baja, pero conforme las concentraciones van bajando a partir de 250 a 5  $\mu\text{g/ml}$ , las variaciones de DS ( $\pm 0.146$ , 0.074, y 0.179, sucesivamente) y las viabilidad altas, mostró que pierde eficacia rápidamente conforme la concentración disminuye.

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos decir que fueron más efectivas las NPsAu recubiertas con de ASOs dirigidos a inhibir el codón 273 que las que iban dirigidas al codón 309 del gen de *Tp53* en células de cáncer de colon SW480.

Quedando como perspectiva expandir la curva de 1000 a 250  $\mu\text{g/ml}$ , para obtener mayor información sobre el efecto-dosis del uso de ASOs dirigidos al codón 309 del gen de *Tp53*.



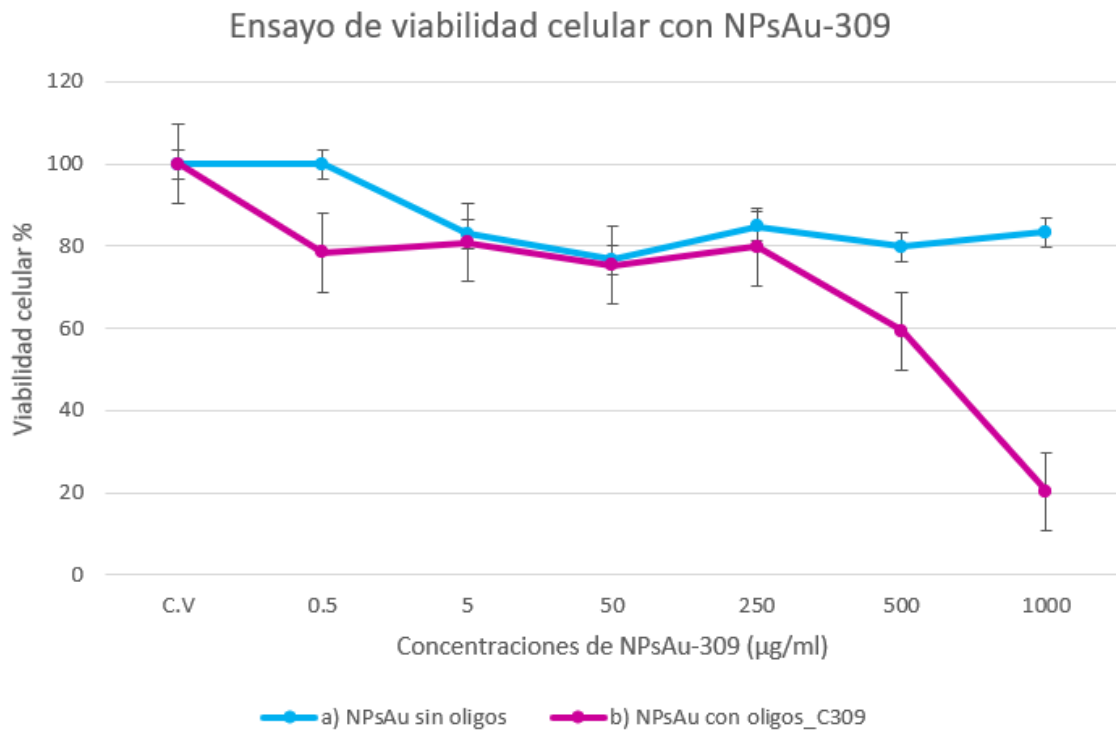


Figura 22. Viabilidad de células SW480 tratadas con nanopartículas de oro (NPsAu) a) sin y b) con ASOs dirigidos al codón 309 del gen *Tp53*, a 1000, 500, 250, 50, 5 y 0.5 µg/ml. Las células fueron incubadas a 37°C y expuestas a radiación ionizante (IR) durante 24 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTS, cada tratamiento fue por triplicado. Cada tratamiento fue por triplicado y se expresan como porcentaje ± DE.

Un factor que puede estar influenciando de acuerdo al creador del programa sfold, Ding et al., (2004), es que estructuras como el RNAm que no son moléculas lineales y se encuentran en estructuras secundarias formando hélices, horquillas o bucles por el mismo emparejamiento de sus bases entre sí mismas, provoca que existan menos zonas de accesibilidad para la unión del ASO, mientras que regiones donde sus bases nitrogenadas están desemparejadas o que adoptan formas de bucles, son más accesibles para los ASOs entrar en hibridación con el RNAm de interés, para cumplir su función terapéutica.

En este caso de acuerdo a los resultados obtenidos por MTS, la región dónde se encuentra el codón 273 del gen de *Tp53* (dominio de unión al DNA), es la que se encuentra con más acceso para unirse, que la zona del codón 309 del gen de *Tp53*

(no se encuentra en ningún dominio importante o bien conservado de *Tp53*, sino más bien en la zona de “señal de localización nuclear”), en la línea celular SW480 de cáncer de colon (Rochette et al., 2005).

También tiene influencia la sobreexpresión de esta mutación en específico del codón 273, ya que se encuentra con mayor frecuencia en este tipo de cáncer y es capaz de acelerar el progreso de este cáncer (CCR) a etapas avanzadas. Hassin et al., (2022), analizaron mediante western blot las diferentes mutaciones que presentaba la línea celular SW480 y observaron una mayor sobreexpresión de la proteína de *Tp53* en este codón de 273 en comparación de otros sitios con mutación que presenta *Tp53*. En el estudio menciona que las mutaciones en los codones 273 y 175 son relevantes en el CCR, ya que juntas representan más del 20% de todos los tumores de este tipo que poseen mutaciones en *Tp53*, pero la mutación de 273 es considerada por los autores con mayor potencial metastásico y con menor supervivencia en los pacientes que los que tienen mutación en el codón 175.

En el estudio realizado por Xie et al., (2011), se emplearon ASOs con modificación química de fosforotioato (PS) para inhibir el RNAm del gen de *Tp53* en diversas líneas celulares, como SNU-449 (hepatoma), SK-BR (adenocarcinoma de mama), PLC/PFR/5 (hepatoma) y HepG2 (hepatoma). Para determinar la viabilidad celular, se utilizó el ensayo colorimétrico MTS, en el cual se aplicaron concentraciones de ASOs de 50, 100, 150 y 250 nM, incubando las células durante 48 horas. Se emplearon diferentes concentraciones de ASOs dirigidos a diferentes mutaciones de *Tp53*; sin embargo, solo el ASO dirigido al codón 161 mostró un efecto significativo en SNU-449, resultando en una disminución de la viabilidad celular del 60 al 90%. En la línea celular SK-BR, el ASO eficaz en muerte celular fue el que se dirigió al codón 175, con una viabilidad que osciló entre el 70 y el 85%. Para la línea PLC/PFR/5, el ASO que demostró efectividad sobre el crecimiento celular fue el que se orientó al codón 249, logrando una viabilidad celular del 70 al 98%. En contraste, ninguno de los ASOs probados inhibió el gen *Tp53* en la línea celular HepG2. Los

autores mencionan que para detener el crecimiento celular a través de la inhibición del gen de *Tp53* depende de las mutantes presentes en cada línea celular.

En nuestro estudio, usamos la misma modificación química de fosforotioato (PS) para nuestros ASOs y las mismas condiciones de temperatura y humificación, así como el mismo ensayo de viabilidad MTS, con la diferencia que por menos tiempo de exposición al tratamiento y con luz IR para la liberación controlada de los ASOs a través de las NPsAu, observamos un mayor impacto sobre la viabilidad celular con bajas concentraciones de ASOs. Por ejemplo nuestra concentración más alta de 1000 µg/ml de nanopartículas de oro (NPsAu) con una concentración de ASOs de 100 µmol/ml, se observó una viabilidad celular del 14% sobre la línea celular SW480, dirigido a la mutante del codón 273 de *Tp53* y esto se puede deber no sólo a lo que mencionan los autores de Xie et al., (2011), sino que también por el encapsulamiento de estos ASOs que los protege de enzimas degradativas, lo que les permite llegar a su objetivo para cumplir sus funciones terapéuticas en las células.

## 8. Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron que el método de síntesis por sonoquímica resultó ser efectivo para la obtención de NPsAu a partir de una reacción REDOX, logrando obtener NPsAu homogéneas en tamaño y forma. Además, el PEG utilizado se confirmó como un encapsulador adecuado para los ASOs, de acuerdo a lo observado por las técnicas de análisis RAMAN y SEM.

En el ensayo de viabilidad celular mediante MTS, se observó que las NPsAu sin ASOs no presentan toxicidad significativa al aplicar radiación IR. Sin embargo, NPsAu cargadas de ASOs al codón 273 de *Tp53* mostraron una mayor toxicidad en las células de la línea SW480, mientras que las NPsAu con ASOs dirigidos al codón 309 de *Tp53* también presentaron toxicidad, aunque en menor medida y con las mismas concentraciones. Estos hallazgos destacan el potencial de las NPsAu

funcionalizadas con ASOs específicos para afectar selectivamente la viabilidad celular en tratamientos dirigidos.

## 9. Referencias

- Acharya, R. (2019). The recent progresses in shRNA-nanoparticle conjugate as a therapeutic approach. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 104). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109928>
- Acharya, S., & Sahoo, S. K. (2011). PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 63, Issue 3, pp. 170–183). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.10.008>
- Aiello, P., Sharghi, M., Mansourkhani, S. M., Ardekan, A. P., Jouybari, L., Daraei, N., Peiro, K., Mohamadian, S., Rezaei, M., Heidari, M., Peluso, I., Ghorat, F., Bishayee, A., & Kooti, W. (2019). Medicinal plants in the prevention and treatment of colon cancer. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/2075614>
- Alshareeda, A. T., Nur Khatijah, M. Z., & Al-Sowayan, B. S. (2022). Nanotechnology: A revolutionary approach to prevent breast cancer recurrence. In *Asian Journal of Surgery* (Vol. 46, Issue 1, pp. 13–17). Elsevier (Singapore) Pte Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2022.03.002>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2020). The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Benjaminsen, R. V., Matthebjerg, M. A., Henriksen, J. R., Moghimi, S. M., & Andresen, T. L. (2013). The possible "proton sponge" effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. *Molecular Therapy*, 21(1), 149–157. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.185>
- Bennett, C. F., & Swayze, E. E. (2010). RNA targeting therapeutics: Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 50, pp. 259–293). <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654>
- Bhalla, A., Zulfiqar, M., & Bluth, M. H. (2018). Molecular Diagnostics in Colorectal Carcinoma: Advances and Applications for 2018. In *Clinics in Laboratory Medicine* (Vol. 38, Issue 2, pp. 311–342). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.02.008>

- Bollella, P., Schulz, C., Favero, G., Mazzei, F., Ludwig, R., Gorton, L., & Antiochia, R. (2017). Green Synthesis and Characterization of Gold and Silver Nanoparticles and their Application for Development of a Third Generation Lactose Biosensor. *Electroanalysis*, 29(1), 77–86. <https://doi.org/10.1002/elan.201600476>
- Bunz, F. (2022). *Principles of Cancer Genetics*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-99387-0>
- Calvert, P. M., & Frucht, H. (2002). *The Genetics of Colorectal Cancer*. [www.annals.org](http://www.annals.org)
- Catauro, M., Papale, F., Bollino, F., Piccolella, S., Marciano, S., Nocera, P., & Pacifico, S. (2015). Silica/quercetin sol-gel hybrids as antioxidant dental implant materials. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(3). <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/3/035001>
- Chan, J. H., Lim, S., & Fred Wong, W. (2006). ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: FROM DESIGN TO THERAPEUTIC APPLICATION. In *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (Vol. 33). <http://sfold.wardsworth.org/index.pl>
- Chi, X., Gatti, P., & Papoian, T. (2017). Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics. In *Drug Discovery Today* (Vol. 22, Issue 5, pp. 823–833). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.013>
- Dai, L. C., Wang, X., Yao, X., Min, L. S., Qian, F. C., & He, J. F. (2006). Antisense oligonucleotide targeting Tp53 increased apoptosis of MCF-7 cells induced by ionizing radiation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(11), 1453–1458. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00405.x>
- Daniels, A. N., & Singh, M. (2019). Sterically stabilized siRNA:gold nanocomplexes enhance c-MYC silencing in a breast cancer cell model. *Nanomedicine*, 14(11), 1387–1401. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0462>
- Ding, Y., Chan, C. Y., & Lawrence, C. E. (2004). Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.). <https://doi.org/10.1093/nar/gkh449>
- Ding, Y., Jiang, Z., Saha, K., Kim, C. S., Kim, S. T., Landis, R. F., & Rotello, V. M. (2014). Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. In *Molecular Therapy* (Vol. 22, Issue 6, pp. 1075–1083). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.30>
- Ding, Y., & Lawrence, C. E. (2001). Statistical prediction of single-stranded regions in RNA secondary structure and application to predicting effective antisense

- target sites and beyond. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 29, Issue 5). <http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/>
- Ding, Y., & Lawrence, C. E. (2003). A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Research*, *31*(24), 7280–7301. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg938>
- Duan B, Zhao Y, Bai J, Wang J, Duan X, Luo X, Zhang R, Pu Y, Kou M, Lei J, & Yang S. (2022). *Gastrointestinal Cancers* (J. Andres Morgado-Diaz, Ed.). Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/exon-publications-gastrointestinal-cancers>
- Engin, O., Kilinc, G., & Sunamak, O. (2020). Colonoscopy. In *Colon Polyps and Colorectal Cancer: Second Edition* (pp. 45–74). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-57273-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-57273-0_3)
- Forrest, C. M., McNair, K., Vincenten, M. C. J., Darlington, L. G., & Stone, T. W. (2016). Selective depletion of tumour suppressors Deleted in Colorectal Cancer (DCC) and neogenin by environmental and endogenous serine proteases: Linking diet and cancer. *BMC Cancer*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2795-y>
- Gheibi-Hayat, S. M., & Jamialahmadi, K. (2021). Antisense Oligonucleotide (AS-ODN) Technology: Principle, Mechanism and Challenges. In *Biotechnology and Applied Biochemistry* (Vol. 68, Issue 5, pp. 1086–1094). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/bab.2028>
- Gong, B., Chen, J. H., Yajima, R., Chen, Y., Chase, E., Chadalavada, D. M., Golden, B. L., Carey, P. R., & Bevilacqua, P. C. (2009a). Raman crystallography of RNA. *Methods*, *49*(2), 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.04.016>
- Gong, B., Chen, J. H., Yajima, R., Chen, Y., Chase, E., Chadalavada, D. M., Golden, B. L., Carey, P. R., & Bevilacqua, P. C. (2009b). Raman crystallography of RNA. *Methods*, *49*(2), 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.04.016>
- Hakim, G. D. (2021). Information on colon polyps in terms of gastroenterology. In *Colon Polyps and Colorectal Cancer: Second Edition* (pp. 93–121). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-57273-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-57273-0_6)
- Hansen, H. E., Seland, F., Sunde, S., Burheim, O. S., & Pollet, B. G. (2022). Frequency controlled agglomeration of pt-nanoparticles in sonochemical synthesis. *Ultrasonics Sonochemistry*, *85*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105991>
- Hassin, O., Nataraj, N. B., Shreberk-Shaked, M., Aylon, Y., Yaeger, R., Fontemaggi, G., Mukherjee, S., Maddalena, M., Avioz, A., Iancu, O., Mallel, G., Gershoni, A.,

- Grosheva, I., Feldmesser, E., Ben-Dor, S., Golani, O., Hendel, A., Blandino, G., Kelsen, D., ... Oren, M. (2022). Different hotspot Tp53 mutants exert distinct phenotypes and predict outcome of colorectal cancer patients. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30481-7>
- He, Z., Qiu, W., Kizer, M. E., Wang, J., Chen, W., Sokolov, A. V., Wang, X., Hu, J., & Scully, M. O. (2021). Resolving the Sequence of RNA Strands by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy. *ACS Photonics*, 8(2), 424–430. <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.0c01486>
- He, Z., Yin, H., Chang, C. C., Wang, G., & Liang, X. (2020). Interfacing DNA with Gold Nanoparticles for Heavy Metal Detection. In *Biosensors* (Vol. 10, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/BIOS10110167>
- Hill, S. F., & Meisler, M. H. (2021). Antisense Oligonucleotide Therapy for Neurodevelopmental Disorders. In *Developmental Neuroscience* (Vol. 43, Issues 3–4, pp. 247–252). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000517686>
- Hirota, Y., Horiuchi, T., & Akahane, K. (1996). Tp53 antisense oligonucleotide inhibits growth of human colon tumor and normal cell lines. *Japanese Journal of Cancer Research*, 87(7), 735–742. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1996.tb00286.x>
- Hsing, M. T., Hsu, H. T., Chang, C. H., Chang, K. B., Cheng, C. Y., Lee, J. H., Huang, C. L., Yang, M. Y., Yang, Y. C., Liu, S. Y., Yen, C. M., Yang, S. F., & Hung, H. S. (2022). Improved Delivery Performance of n-Butylidene-phthalide-Polyethylene Glycol-Gold Nanoparticles Efficient for Enhanced Anti-Cancer Activity in Brain Tumor. *Cells*, 11(14). <https://doi.org/10.3390/cells11142172>
- Kahraman, D. S., & Sayhan, S. (2021). Colon polyps and their pathologic characteristics. In *Colon Polyps and Colorectal Cancer: Second Edition* (pp. 167–211). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-57273-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-57273-0_9)
- Kirbiyik, O., & Özyilmaz, B. (2021). Genetic knowledge of colorectal cancer. In *Colon Polyps and Colorectal Cancer: Second Edition* (pp. 481–514). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-57273-0\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-030-57273-0_24)
- Kuzmin, V. V., Novikov, V. S., Ustynyuk, L. Y., Prokhorov, K. A., Sagitova, E. A., & Nikolaeva, G. Y. (2020). Raman spectra of polyethylene glycols: Comparative experimental and DFT study. *Journal of Molecular Structure*, 1217. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128331>
- Li, J., Ma, X., Chakravarti, D., Shalpour, S., & Depinho, R. A. (2021). *Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer*. <https://doi.org/10.1101/gad.348226>

- Li, X. L., Zhou, J., Chen, Z. R., & Chng, W. J. (2015). TP53 mutations in colorectal cancer- Molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World Journal of Gastroenterology*, 21(1), 84–93. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.84>
- Liu, B., & Liu, J. (2019). Interface-Driven Hybrid Materials Based on DNA-Functionalized Gold Nanoparticles. In *Matter* (Vol. 1, Issue 4, pp. 825–847). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2019.08.008>
- Martínez, R. F., Cravotto, G., & Cintas, P. (2021). Organic Sonochemistry: A Chemist's Timely Perspective on Mechanisms and Reactivity. In *Journal of Organic Chemistry* (Vol. 86, Issue 20, pp. 13833–13856). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c00805>
- Moitra, P., Alafeef, M., Alafeef, M., Alafeef, M., Dighe, K., Frieman, M. B., Pan, D., Pan, D., & Pan, D. (2020). Selective Naked-Eye Detection of SARS-CoV-2 Mediated by N Gene Targeted Antisense Oligonucleotide Capped Plasmonic Nanoparticles. *ACS Nano*, 14(6), 7617–7627. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03822>
- Monias, B. P., Johnston\$, J. F., Eckers, D. J., Zounesn, M. A., Lima&, W. F., & Freierq, S. M. (1995). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Selective Inhibition of Mutant Ha-ras mRNA Expression by Antisense Oligonucleotides\** (Vol. 267, Issue 28).
- Morgan G, Silva A, & Sat D. (2008). Factores de riesgo para cáncer colorrectal Colorectal risk factors. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 7, 12–15. [www.smeo.org.mx](http://www.smeo.org.mx)
- Nakayama, M., & Oshima, M. (2019). Mutant Tp53 in colon cancer. In *Journal of Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 4, pp. 267–276). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy075>
- Neamtu, A. A., Maghiar, T. A., Alaya, A., Olah, N. K., Turcus, V., Pelea, D., Totolici, B. D., Neamtu, C., Maghiar, A. M., & Mathe, E. (2022). A Comprehensive View on the Quercetin Impact on Colorectal Cancer. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27061873>
- Negri, F., Bottarelli, L., De' Angelis, G. L., & Gnetti, L. (2022). KRAS: A Druggable Target in Colon Cancer Patients. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23084120>
- Numata, Y., & Tanaka, H. (2011). Quantitative analysis of quercetin using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 126(2), 751–755. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.059>



- Pędziwiatr-Werbicka, E., Gorzkiewicz, M., Horodecka, K., Lach, D., Barrios-Gumiel, A., Sánchez-Nieves, J., Gómez, R., De La Mata, F. J., & Bryszewska, M. (2021). PEGylation of Dendronized Gold Nanoparticles Affects Their Interaction with Thrombin and siRNA. *Journal of Physical Chemistry B*, 125(4), 1196–1206. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.0c10177>
- Porterfield, J. Z., & Zlotnick, A. (2010). A simple and general method for determining the protein and nucleic acid content of viruses by UV absorbance. *Virology*, 407(2), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.015>
- Rangel-López, A., Piña-Sánchez, P., & Salcedo, M. (2006). Variaciones genéticas del gen supresor de tumores TP53: relevancia y estrategias de análisis RINCÓN DEL RESIDENTE. In *Revista de Investigación Clínica* (Vol. 58). [www.imbiomed.com.mx](http://www.imbiomed.com.mx)
- Rochette, P. J., Bastien, N., Lavoie, J., Guérin, S. L., & Drouin, R. (2005a). SW480, a Tp53 double-mutant cell line retains proficiency for some Tp53 functions. *Journal of Molecular Biology*, 352(1), 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.033>
- Rochette, P. J., Bastien, N., Lavoie, J., Guérin, S. L., & Drouin, R. (2005b). SW480, a Tp53 double-mutant cell line retains proficiency for some Tp53 functions. *Journal of Molecular Biology*, 352(1), 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.033>
- Rook, M. E., & Southwell, A. L. (2022). Antisense Oligonucleotide Therapy: From Design to the Huntington Disease Clinic. *BioDrugs*, 36(2), 105–119. <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00519-9>
- Ryou, S. M., Kim, S., Jang, H. H., Kim, J. H., Yeom, J. H., Eom, M. S., Bae, J., Han, M. S., & Lee, K. (2010). Delivery of shRNA using gold nanoparticle-DNA oligonucleotide conjugates as a universal carrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(3), 542–546. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.115>
- Schwarz, D. S., Ding, H., Kennington, L., Moore, J. T., Schelter, J., Burchard, J., Linsley, P. S., Aronin, N., Xu, Z., & Zamore, P. D. (2006). *Designing siRNA That Distinguish between Genes That Differ by a Single Nucleotide*. [www.plosgenetics.org](http://www.plosgenetics.org)
- Shakeri-Zadeh, A., Kamrava, S. K., Farhadi, M., Hajikarimi, Z., Maleki, S., & Ahmadi, A. (2014). A scientific paradigm for targeted nanophotothermolysis; the potential for nanosurgery of cancer. In *Lasers in Medical Science* (Vol. 29, Issue 2, pp. 847–853). Springer-Verlag London Ltd. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1399-x>

- Singh, P., Pandit, S., Mokkapati, V. R. S. S., Garg, A., Ravikumar, V., & Mijakovic, I. (2018). Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>
- Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., & Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 99, pp. 28–51). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
- Ustun M, & Ozgur T. (2020). Cyto-reductive Surgery with Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) in the Treatment of Colorectal Peritoneal Carcinomatosis. In *Colon Polyps and Colorectal Cancer: Second Edition*. Springer International Publishing. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-57273-0\\_20](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-57273-0_20)
- van der Meel, R., Sulheim, E., Shi, Y., Kiessling, F., Mulder, W. J. M., & Lammers, T. (2019). Smart cancer nanomedicine. *Nature Nanotechnology*, 14(11), 1007–1017. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0567-y>
- Wijaya, A., Schaffer, S. B., Pallares, I. G., & Hamad-Schifferli, K. (2009). Selective release of multiple DNA oligonucleotides from gold nanorods. *ACS Nano*, 3(1), 80–86. <https://doi.org/10.1021/nn800702n>
- Xie, Z., Chng, W. J., Tay, K. G., Liu, S. C., Zhou, J., & Chen, C. S. (2011). Therapeutic potential of antisense oligodeoxynucleotides in downregulating Tp53 oncogenic mutations in cancers. *Biotechnology Letters*, 33(2), 221–228. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0423-5>
- Yamini, D., Devanand Venkatasubbu, G., Kumar, J., & Ramakrishnan, V. (2014). Raman scattering studies on PEG functionalized hydroxyapatite nanoparticles. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117, 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.07.064>
- Yang, S., & May, S. (2008). Release of cationic polymer-DNA complexes from the endosome: A theoretical investigation of the proton sponge hypothesis. *Journal of Chemical Physics*, 129(18). <https://doi.org/10.1063/1.3009263>
- Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 246, Issue 16, pp. 1791–1801). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/15353702211005390>
- Zhang, X., Huang, P. J. J., Servos, M. R., & Liu, J. (2012). Effects of polyethylene glycol on DNA adsorption and hybridization on gold nanoparticles and graphene oxide. *Langmuir*, 28(40), 14330–14337. <https://doi.org/10.1021/la302799s>

Zhang, Y., Li, M., Gao, X., Chen, Y., & Liu, T. (2019). Nanotechnology in cancer diagnosis: Progress, challenges and opportunities. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0833-3>