

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“BIOCONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
LUMINISCENTES CON AGLUTININA DE GERMEN
DE TRIGO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JOANNA RAMÍREZ RAMÍREZ

**DIRIGIDA
DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA**

**CODIRIGIDA
DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2025.

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 licenciatario 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 licenciatario.

 **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 QUÍMICA

**“BIOCONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
LUMINISCENTES CON AGLUTININA DE GERMEN
DE TRIGO”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

JOANNA RAMÍREZ RAMÍREZ

**DIRIGIDA POR
DRA. Laura Cristina Berumen Segura
CODIRIGIDA POR
DRA. Luz María López Marín**

**SINODALES
DRA.LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
DIRECTORA**

**DRA.LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN
CO-DIRECTORA**

**DR.PEDRO SALAS CASTILLO
SINODAL**

**DR.JORGE NOEL GRACIDA RODRÍGUEZ
SINODAL**

**DRA.MINERVA RAMOS GÓMEZ
SINODAL**

Dedicatorias

A mis papás, Absalón y Juana, y a mi hermano, Emanuel. Son los amores de mi vida. Gracias por su amor incondicional y por creer en mí incluso en los momentos en que yo dudaba. Este logro también es suyo.

A Dios, por poner en mi camino a las personas correctas en el momento justo, y por darme la fuerza para seguir.

A mi Lunita, que siempre vive en mi corazón. Tu luz me acompaña todos los días.

Agradecimientos

A la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, por brindarme una formación sólida, integral y de calidad. Agradezco profundamente a cada uno de mis maestros, quienes no solo compartieron sus conocimientos, sino que también dejaron una huella imborrable en mi formación personal y profesional.

En especial, expreso mi gratitud al Mtro. David, a las Dras. Rosalía, Evelyn, Mine, Dulce, Sandra, y a los Dres. Gracida, Juan, Víctor y José Luis. Su manera de enseñar, su compromiso con la educación y, sobre todo, la calidad humana que los distingue, hace que el impacto que han tenido en sus estudiantes perdure más allá del aula.

A la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, gracias por su confianza, dirección y apoyo durante este proyecto. Su guía en la redacción y su enorme corazón fueron fundamentales para concretar este trabajo.

A la Dra. Luz María López Marín (Laboratorio de Nanomedicina y Nanotoxicología, Centro de Física y Tecnología Avanzada, UNAM), por recibirme en su laboratorio con los brazos abiertos. Gracias por su apoyo, por compartir su experiencia y por la dirección brindada en este proyecto. La vida de Henrietta sigue siendo inmortal con nosotras.

Al Laboratorio de Nanomedicina y nanotoxicología (Centro de Física y Tecnología Avanzada, UNAM) Armando, Alex, Diego, Juan, María y Mariana, por enseñarme protocolos, hacer más ameno el tiempo en el laboratorio y darme su amistad, soy afortunada de haberlos conocido.

Al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, por albergar el proyecto de investigación.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM, por el financiamiento para las investigaciones de este proyecto y por las becas de conclusión de estudios y de titulación recibidas a través de los proyectos IT200421 e IT202324.

A la SECIHTI, por el financiamiento recibido para la realización del proyecto, a través del proyecto CF2019-53395.

Al Laboratorio Nacional de Caracterización de Materiales (LaNCaM) del CFATA (por análisis de SEM, EDS).

A la Mtra. Lourdes Palma (Laboratorio de Microscopía, Instituto de Neurobiología, UNAM) por los análisis de TEM.

A la M. en C. Adriana González Gallardo (Unidad de Proteogenómica del INB, UNAM) por siempre ayudarnos cuando lo necesitamos.

Al Dr. Carlos Lozano (Instituto de Neurobiología, UNAM) por apoyarme con mis tinciones.

Al Dr. Pedro Salas Castillo y a su estudiante Miguel Ángel Yáñez Padrón (Centro de Física y Tecnología Avanzada, UNAM) por sintetizar las nanopartículas que se utilizaron en este estudio.

A Liz, Tani, Erik, Dany, JC y Karlita, gracias por estar siempre, por escucharme y por brindarme su amistad incondicional. Su compañía hizo más ligeros los momentos difíciles y más memorables los logros.

Agradezco profundamente la oportunidad de haberme formado como biotecnóloga, una disciplina que me enseñó a ver la ciencia como una herramienta para entender y transformar el mundo con responsabilidad y empatía. Esta tesis representa la culminación de ese camino: un proyecto que reúne lo aprendido en el aula, en el laboratorio y en cada experiencia que me desafió a crecer. Trabajar con nanopartículas luminiscentes recubiertas con aglutinina de germen de trigo no solo me permitió aplicar mis conocimientos, sino también reafirmar mi vocación por la investigación orientada a la salud y al bienestar humano. Haber recorrido este camino me hace sentir profundamente agradecida y orgullosa de ser biotecnóloga.

ÍNDICE GENERAL

| Contenido | Página |
|---|--------|
| ÍNDICE GENERAL | i |
| ÍNDICE DE CUADROS | iv |
| ÍNDICE DE FIGURAS | v |
| ABREVIACIONES | viii |
| RESUMEN | |
| I. INTRODUCCIÓN | 10 |
| II. ANTECEDENTES | 12 |
| II.1. Nanotecnología y sus aplicaciones en biomedicina | 12 |
| II.1.1. Nanopartículas de conversión ascendente en bioimagen | 13 |
| II.1.2. Encapsulación de nanopartículas de conversión ascendente con sílice | 15 |
| II.2. Lectinas en detección de cáncer | 16 |
| II.2.1. Aglutinina de germen de trigo (WGA) | 18 |
| II.3. Biocorona | 20 |
| II.4. Líneas celulares | 21 |
| II.4.1. Línea celular MCF-7 | 22 |
| II.4.2. Línea celular MCF-12A | 23 |
| II.5. Ensayo del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) | 23 |
| II.6. Métodos de caracterización y cuantificación | 25 |
| II.6.1. Método del ácido bicinconílico (BCA) | 25 |
| II.6.2. SDS-PAGE | 26 |
| II.6.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier | 28 |
| II.6.4. Microscopía Electrónica de Transmisión | 30 |
| II.6.5. Microscopía Electrónica de Barrido | 31 |
| II.6.6. Microscopía confocal | 32 |
| II.6.7. Espectroscopía por dispersión de energía | 33 |

| | |
|--|----|
| III. HIPÓTESIS | 34 |
| IV. OBJETIVOS | 35 |
| IV.1. General | 35 |
| IV.2. Específicos | 35 |
| V. METODOLOGÍA | 36 |
| V.1. Materiales | 36 |
| V.1.1. Material biológico | 36 |
| V.1.2. Reactivos y materiales | 36 |
| V.2. Métodos | 39 |
| V.2.1. Preparación de muestras para microscopía | 39 |
| V.2.1.1. Preparación de muestras para MET | 39 |
| V.2.1.2. Preparación de muestras para MEB | 40 |
| V.2.2. Adsorción de proteínas en nanopartículas | 41 |
| V.2.2.1. Adsorción y remoción de corona suave | 41 |
| V.2.2.2. Extracción de corona dura | 42 |
| V.2.2.3. Método del ácido bicinconílico | 42 |
| V.2.2.4. Electroforesis SDS-PAGE | 43 |
| V.2.2.5. Preparación de muestras para FTIR | 45 |
| V.2.3. Cultivo celular | 46 |
| V.2.3.1. Cinética de crecimiento de líneas celulares en cajas de 96 pozos | 47 |
| V.2.4. Evaluación de la biocompatibilidad | 48 |
| VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 49 |
| VI.1. Nanopartículas y caracterización estructural | 49 |
| VI.1.1. Bioconjugación de nanopartículas con proteínas | 50 |
| VI.1.2. Biocompatibilidad de nanopartículas | 57 |
| VI.1.3. El recubrimiento de UCNPs con proteínas disminuye los efectos tóxicos en células epiteliales normales. | 59 |

| | |
|---|----|
| VI.1.4. El recubrimiento de UCNPs con proteína inerte, y con WGA induce efectos diferenciales en células neoplásicas. | 62 |
| VI.1.5 Ensayos de internalización celular | 67 |
| VII. CONCLUSIÓN | 71 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA | 72 |
| IX. ANEXOS | 79 |
| IX.1. Dictamen de bioética | 79 |

| ÍNDICE DE CUADROS | Página 2 |
|--|-----------------|
| Cuadro | |
| 1. Líneas celulares empleadas en los ensayos | 36 |
| 2. Reactivos y materiales utilizados | 37 |
| 3. Reactivos para la preparación del gel separador para electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) | 44 |
| 4. Reactivos para la preparación del gel concentrador para SDS-PAGE | 44 |
| 5. Bandas características de las nanopartículas JCS12 nativas y las bioconjugadas, analizadas por FTIR | 53 |
| 6. Concentración de corona dura de proteínas presentes en las nanopartículas JCS12 | 57 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

| | Página |
|--|--------|
| 1. Representación de estructuras con tallas en la escala nanométrica | 12 |
| 2. Representación de la arquitectura de una nanopartícula de conversión ascendente | 15 |
| 3. Representación de la hipersialilación en el cáncer. | 19 |
| 4. Representación de la unión de la corona suave y la corona dura a una nanopartícula | 20 |
| 5. Morfología de línea celular de la Fundación de Cáncer de Michigan correspondiente al aislado no.7 (MCF-7) | 22 |
| 6. Morfología de línea celular de la Fundación de Cáncer de Michigan correspondiente al aislado no.12A (MCF-12A) | 23 |
| 7. Reacción química que ocurre cuando se agrega la solución de MTT a las células viables. | 24 |
| 8. Esquema de los elementos necesarios para el desarrollo de la electroforesis SDS-PAGE | 27 |
| 9. Representación de la de reacción de polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida | 28 |
| 10. Intervalo de frecuencia respecto a los grupos funcionales que se asocian a las bandas de estiramiento espectroscópica IR | 29 |
| 11. Esquema de un microscopio electrónico de transmisión (MET) | 30 |
| 12. Esquema de un microscopio electrónico de barrido (MEB) | 31 |
| 13. Esquema de la preparación de muestras para MET | 40 |
| 14. Esquema de la adsorción de proteínas en MCM-41 luminiscentes con BSA o WGA | 41 |

| | |
|--|----|
| 15. Esquema de pasos para la remoción de la corona dura | 42 |
| 16. Representación de caja de 96 pozos con las diferentes densidades celulares. | 47 |
| 17. Esquema de tratamientos y sus variantes de concentración correspondientes para la evaluación de la biocompatibilidad. | 48 |
| 18. Imágenes obtenidas por MEB y MET de las nanopartículas JCS12 | 50 |
| 19. Estrategia para la bioconjugación de las nanopartículas luminiscentes JCS12 con aglutinina de germen de trigo mediante fisisorción | 51 |
| 20. Espectro FTIR de nanopartículas JCS12 nativas y bioconjugadas. | 53 |
| 21. Imágenes obtenidas por MET de las partículas JCS12 bioconjugadas con BSA (JCS12@BSA) en distintos campos | 54 |
| 22. Imágenes obtenidas por MET de las partículas JCS12 bioconjugadas con WGA (JCS12@WGA) en distintos campos | 54 |
| 23. Curva patrón de proteínas obtenida por el método del ácido bicinconílico (BCA) | 55 |
| 24. Análisis de proteínas extraídas de la corona dura de nanopartículas funcionalizadas | 56 |
| 25. Resultados del ensayo de biocompatibilidad de la línea MCF-12A a diferentes tiempos de exposición | 60 |
| 26. Resultados del ensayo de biocompatibilidad de la línea MCF-12A expuesta a una concentración de 0.1 mg/ml | 61 |
| 27. Resultados del ensayo de biocompatibilidad de la línea MCF-7 a diferentes tiempos de exposición | 64 |

| | |
|---|----|
| 28. Resultados del ensayo de biocompatibilidad de la línea MCF-7 expuesta a una concentración de 0.1 mg/ml | 65 |
| 29. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de células MCF-12A después de 5 horas de exposición a una dosis de 0.05 mg/ml de nanopartículas JCS12 | 68 |
| 30. Imágenes obtenidas por mapeo de análisis elemental de las partículas JCS12 nativas | 70 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|--|
| UCNPs | Nanopartículas de conversión ascendente |
| WGA | Aglutinina de germen de trigo |
| MCM-41 JCS12 luminiscentes | Nanopartículas MCM-41 dopadas con lantánidos sintetizadas por Padrón, 2024 |
| TEMED | Tetrametiletilendiamina |
| MTT | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| PNA | Aglutinina de maní |
| Neu5Ac | Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico |
| ATCC | Colección americana de cultivos tipo |
| MCF-7 | Aislado no.7 de la Fundación de cáncer de Michigan |
| MCF-12 | Aislado no.12 de la Fundación de cáncer de Michigan |
| FTIR | Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier |
| MET | Microscopía electrónica de transmisión |
| MEB | Microscopía electrónica de barrido |
| DMEM | Medio Eagle Modificado por Dulbecco |
| FBS | Suero fetal bovino |
| PBS | Solución tamponada de fosfato |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| BCA | Ácido bicinconínico |

RESUMEN

El cáncer es un problema de salud pública que tiene un alto índice de mortalidad, por lo que un diagnóstico temprano es clave. En la actualidad, se investigan los patrones de glicosilación como posibles biomarcadores para la detección del cáncer, ya que se ha descrito que alteraciones en dichos patrones están asociadas con la presencia de células tumorales. Se ha reportado que existe una sobreexpresión de ácido siálico en la superficie de células tumorales, lo que permite su identificación como biomarcador. La *aglutinina de germen de trigo* (WGA) es una lectina que tiene selectividad hacia el ácido siálico. El presente trabajo se enmarcó dentro de la adsorción de la WGA sobre nanopartículas de sílice mesoporosa luminiscentes, para explorar su potencial de aplicación como herramienta de detección y tratamiento dirigido hacia células cancerosas. Se caracterizó la nanoestructura mediante microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. Además, se evaluó su biocompatibilidad en la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) y su control no cancerígeno (MCF-12A) mediante el ensayo MTT. En la línea no cancerosa MCF-12A, las nanopartículas recubiertas con proteínas, mejoraron la biocompatibilidad, ya que el porcentaje de índice de densidad óptica se mantuvo por encima del 50% aún en la dosis más alta, que corresponde a 0.3 mg/ml. Por el contrario, en células tumorales MCF-7, las nanopartículas recubiertas con WGA exhibieron un comportamiento estadísticamente significativo respecto a las recubiertas con BSA, sugiriendo un efecto selectivo citotóxico. Estos resultados coinciden con estudios previos que resaltan la capacidad de la WGA para dirigir nanopartículas hacia células cancerosas. Así, la decoración con WGA ofrece un potencial para tratamientos dirigidos y específicos contra tumores.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a nivel global y tiene un alto índice de mortalidad. En 2022 se reportaron 20 millones de casos nuevos y 10 millones de muertes por esta enfermedad (Bray y col., 2024).

El diagnóstico temprano es clave para mejorar la tasa de éxito de los tratamientos y por esta razón los biomarcadores son esenciales. Hoy en día existen diversos tipos de marcadores, como los biomarcadores de ARN y los autoanticuerpos. Los primeros se asocian a alteraciones de los niveles de ARNm durante la progresión tumoral; por otro lado, los autoanticuerpos se presentan como respuesta del sistema inmunológico frente a la tumorigénesis (Lino y col., 2022).

El uso de biomarcadores en diagnóstico de cáncer presenta limitaciones debido a la falta de especificidad. A causa de esta inespecificidad se están estudiando biomarcadores alternativos, como biomarcadores de proteínas (Lino y col., 2022).

Se ha mostrado que las alteraciones en los patrones de glicosilación están relacionadas con la presencia de cáncer. Aproximadamente el 50% de las proteínas del cuerpo están glicosiladas. La mayoría de estas modificaciones ocurren en la superficie celular, donde desempeñan un papel clave en la comunicación de las células con su entorno (Adamczyk y col., 2012). Por ello, las alteraciones en los patrones de glicosilación representan herramientas valiosas para la detección de enfermedades (Li y Liu, 2024), las lectinas, proteínas que presentan una unión específica hacia glicanos son herramientas prometedoras para su detección (Gupta, 2020).

El biorreconocimiento de células tumorales con lectinas acopladas a nanoplataformas ha presentado resultados positivos en el biorreconocimiento de células de cáncer de mama, colon y próstata. Dentro de las lectinas empleadas en estos biosensores se encuentra la aglutinina de germe de trigo (Abrantes y col., 2021). La aglutinina de germe de trigo (WGA, del inglés Wheat

germ agglutinin) es una lectina que presenta selectividad hacia el ácido siálico y la *N*-acetilglucosamina, que corresponden a componentes clave de la superficie celular. La sobreexpresión de ácido siálico en la superficie celular es una característica distintiva de células tumorales, les brinda protección frente a la apoptosis y estimula la metástasis (Ghosh y col., 2023).

Por otro lado, las limitaciones de especificidad en quimioterapia han promovido el desarrollo de nanopartículas para la administración dirigida de fármacos. Las nanopartículas de sílice mesoporosa luminiscentes son plataformas con potencial para su aplicación en bioimagen, así como en administración de fármacos debido a su estabilidad, área superficial, biocompatibilidad y funcionalización. La aplicación de nanomateriales como agentes de diagnóstico y terapia se denomina teranóstica (Samhadaneh y col., 2020). La teranóstica implica el análisis *in vivo* de la distribución y orientación de los nanomateriales que transportan los agentes terapéuticos. En este contexto, se requiere que los nanomateriales empleados posean ciertas propiedades que permitan su seguimiento y visualización. Por ejemplo, las nanopartículas de conversión ascendente dopadas con lantánidos (UCNPs, del inglés up-conversion nanoparticles) se utilizan en teranóstica debido a que mejoran la relación señal-ruido para la obtención de imágenes. Gracias a su capacidad de conversión ascendente, las UCNPs pueden ser excitadas con luz infrarroja de baja energía, lo que ofrece ventajas como mayor penetración en los tejidos, menor autofluorescencia y baja fototoxicidad. Su excitación con luz infrarroja permite la emisión de luz en el espectro visible, en el infrarrojo cercano y la región ultravioleta (UV), facilitando así su visualización. Además, si se realiza la bioconjugación de estas nanopartículas con alguna molécula, se puede dirigir su acción de manera específica (Chen y col., 2014; Jiang y col., 2021).

En este trabajo se realizó la caracterización y evaluación de la biocompatibilidad de nanopartículas de sílice mesoporosa UCNPs modificadas con WGA, con el objetivo de sentar las bases para la producción de un sistema nanoparticulado con capacidad de encapsulamiento de fármacos y direccionamiento a células

neoplásicas, es decir con potencial para aplicaciones teranósticas.

II. ANTECEDENTES

II.1. Nanotecnología y sus aplicaciones en medicina

La nanotecnología surge como concepto en 1959 con el físico Richard Feynman, que en su discurso durante la reunión anual de la Sociedad Física Americana presentó el cuestionamiento: “¿Por qué no podemos escribir los 24 volúmenes de la Enciclopedia Británica en la cabeza de un alfiler?”, exponiendo el hecho de que la naturaleza no limita nuestra capacidad de desempeñarse a nivel molecular, sino la falta de equipos que tenemos para trabajar. Se considera entonces a la nanotecnología como la aplicación de tecnologías a escala nanométrica que integran la fabricación y la aplicación de sistemas químicos, físicos y biológicos que pueden interactuar individualmente o en sistemas de mayor tamaño, en la Figura 1 se muestran algunas estructuras con tallas en la escala nanométrica (Nasrollahzadeh y col., 2019; Baig y col., 2021).

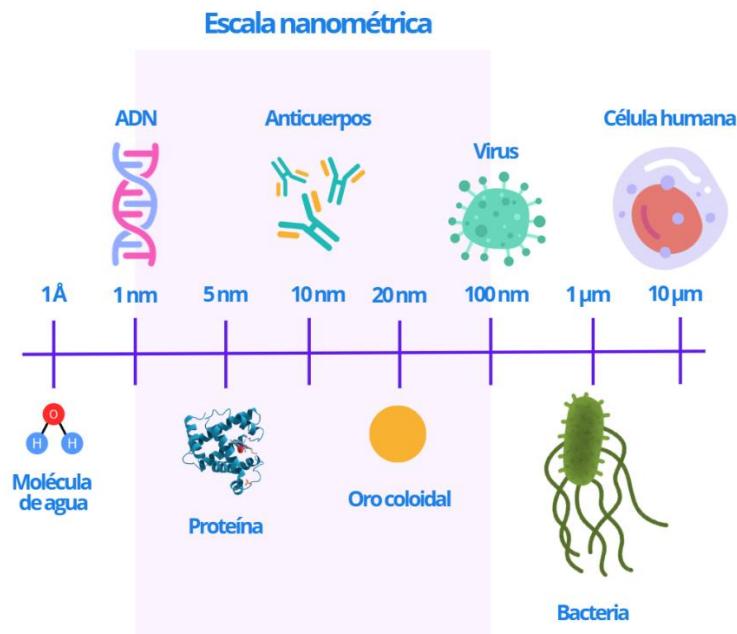


Figura 1. Representación de estructuras con tallas en la escala nanométrica
(Adaptado de Nasrollahzadeh y col., 2019). Imagen creada en Canva.

La aplicación de la nanotecnología en biomedicina incluye el uso de nanopartículas en nuevos métodos de diagnóstico, bioimagen, entrega inteligente de fármacos, implantes biomédicos e ingeniería de tejidos. Dentro de las ventajas de los nanomateriales está su capacidad de entrega de medicamentos de alta toxicidad, de manera controlada y selectiva (Haleem y col., 2023). Además, en cuanto al área de diagnóstico los nanomateriales presentan versatilidad, ya que tienen la capacidad de responder a estímulos externos como la luz, calor y sonido (Jiang y col., 2021).

La activación de las nanoplataformas con luz tiene ciertas ventajas, por ejemplo, el uso de nanopartículas luminiscentes que se pueden excitar en la segunda ventana del infrarrojo. La excitación de estas nanopartículas luminiscentes con luz infrarroja permite que la luz penetre en los tejidos, genere contraste de imagen y disminuya la fototoxicidad, ya que es menos dañina que la luz ultravioleta. Dentro de las modalidades de imagen empleadas en la región de la segunda ventana del infrarrojo se encuentra la resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés), que se utiliza en investigación y en clínicas. Los nanomateriales usados para la obtención de este tipo de imágenes son nanotubos de carbono, puntos cuánticos, nanopartículas dopadas con lantánidos y tintes orgánicos (Jiang y col., 2021).

II.1.1. Nanopartículas de conversión ascendente en bioimagen

Existen sondas de imágenes que se dirigen a moléculas u órganos que permiten la visualización de procesos biológicos; sin embargo, las sondas que se emplean actualmente presentan ciertas limitaciones, como el fotoblanqueo, un bajo contraste y tiempo corto de circulación, lo que dificulta la focalización y calidad de las imágenes (Kim y col., 2018).

Las UCNPs se consideran fluoróforos de nueva generación, con una amplia vida de luminiscencia, diferentes bandas de emisión y fotoestabilidad, características que les otorgan la capacidad de detectar y mejorar el contraste de imágenes en tejidos profundos (Jethva y col., 2022). La conversión ascendente sigue un mecanismo de procesos de emisión anti-Stokes (Kim y col., 2018). Este proceso anti-Stokes corresponde a un proceso óptico no lineal, en el que una especie se excita con fotones de baja energía y emite un fotón de alta energía en rangos que corresponden a UV, luz visible y luz en el infrarrojo cercano (Loo y col., 2019).

La composición de las nanopartículas de conversión ascendente requiere de un ion sensibilizador como el iterbio, de un emisor, como el holmio, erbio o tulio, además de una matriz huésped (Loo y col., 2019). El color de emisión y el intervalo de luminiscencia se pueden ajustar aplicando diferentes tipos y porcentajes de dopantes (Kim y col., 2018). El empleo de un sólo ion lantánido en su síntesis induce la conversión ascendente, mientras que, el codopaje aumenta su eficiencia (Jethva y col., 2022). Debido al potencial que presentan para biosensado, las nanopartículas de conversión ascendente se pueden funcionalizar con grupos amina, carboxilo o con distintas cargas. Además, se puede llevar a cabo su encapsulación con sílice, lo que propicia que almacenen cargas más altas de fármacos. A su vez la conjugación de UCNPs con biomoléculas posibilita la sensibilidad y seguimiento específico para su aplicación en terapia y en diagnóstico. Esta bioconjugación puede ser no covalente, por adsorción física, a través de fuerzas de Van der Waals, por autoensamblaje electrostático (que se basa en interacciones carga-carga) o por apilamiento aromático (Loo y col., 2019).

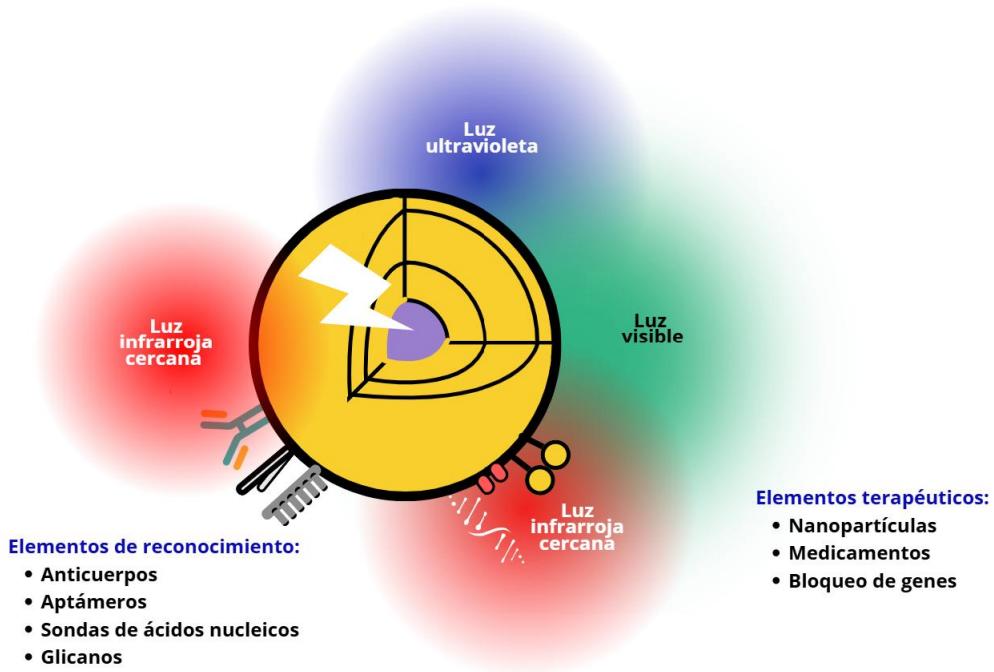


Figura 2. Representación de la arquitectura de una nanopartícula de conversión ascendente (Adaptado de Loo y col., 2019).

Estas partículas presentan la absorción de la luz de excitación (luz infrarroja cercana) por la coraza de Yb^{+3} y la transferencia de energía al núcleo codopado Er^{+3}/Yb^{+3} lo que origina emisiones azules, verdes y rojas ascendentes o emisiones en el infrarrojo cercano reducidas. Se puede bioconjugar su superficie con elementos de reconocimiento y elementos terapéuticos para su aplicación en biofotónica y nanomedicina (Loo y col., 2019).

II.1.2. Encapsulación de nanopartículas de conversión ascendente con sílice

La modificación de la superficie de las UCNPs mediante encapsulación con sílice mejora su dispersión en agua gracias a la presencia de grupos silanol. Además, la sílice es estable y, por sus características ópticas, es transparente, lo que resulta fundamental para no interferir con la señal de las UCNPs. Se ha reportado que el recubrimiento de sílice en las UCNPs presenta sensibilidad a

interacciones no específicas y favorece la formación de una biocorona de proteínas sobre la superficie de las nanopartículas. De este modo, la encapsulación con sílice no solo permite una mejor dispersabilidad de las UCNPs, sino también una mayor fuerza de unión entre los ligandos o el recubrimiento y la superficie de las nanopartículas (Hlaváček y col., 2022).

Por otro lado, las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN, del inglés Mesoporous silica nanoparticles) son nanotransportadores biocompatibles que destacan por su gran área superficial y su facilidad de modificación. Al recubrir las UCNPs con sílice es posible combinar las ventajas de las UCNPs y las MSN, potenciando sus propiedades para su aplicación en teránostica (Yan y col., 2021).

Un sistema ideal de administración de fármacos debe ser capaz de controlar la carga, la velocidad y el periodo de liberación del fármaco, además de dirigirlo específicamente a la célula o tejido diana. Las MSN poseen propiedades clave para esta aplicación, como su estructura de poros ordenada, la distribución uniforme del tamaño de los poros, su gran área superficial y su alta densidad de grupos silanol, que facilitan la unión de grupos orgánicos. El diámetro de los poros desempeña un papel crucial en la regulación de la velocidad de liberación del fármaco, mientras que el área superficial es determinante para cargar una mayor cantidad de este. Asimismo, el ajuste del tamaño de los poros permite incrementar la cantidad de fármaco que puede ser cargada en los nanomateriales, optimizando su funcionalidad en aplicaciones terapéuticas (Vallet y col., 2022).

II.2. Lectinas en detección de cáncer

El término lectina viene del latín *legere* y fue acuñado por Boyd en 1954, significa escoger o elegir. Estas proteínas se caracterizan por su origen no inmune y presentan actividades biológicas diversas como su función antiviral, antifúngica, mitogénica y anticancerígena. Las lectinas corresponden a un grupo de

glicoproteínas que se encuentran biológicamente activas en tejidos vegetales. Las lectinas también están presentes en vertebrados, invertebrados, bacterias y virus. Tienen la capacidad de aglutinar células debido a la especificidad y afinidad por carbohidratos de la superficie celular, por lo que se emplean en métodos diagnósticos y terapias en la investigación del cáncer (Reyes y Gallegos, 2009; Gautam y col., 2019).

Alteraciones en la glicosilación son distintivas de la transformación oncogénica y se encuentran involucradas en señalización celular, angiogénesis, modulación inmunitaria y metástasis que son procesos de evolución del cáncer; por consiguiente, estos glicanos y sus perturbaciones se pueden seguir mediante el uso de lectinas (Gupta, 2020).

Las lectinas de clasifican en cuatro grupos principales según su especificidad de unión a azúcares, están las que se unen a la glucosa/manosa, aquellas que se unen a la galactosa y *N*-acetil-D-galactosamina, a L-fucosa y las que tienen preferencia hacia los ácidos siálicos. Además de su afinidad por carbohidratos, las lectinas son proteínas estables y resistentes, muestran un comportamiento citotóxico hacia células cancerosas por su capacidad de diferenciar cambios en los glicanos que expresan las células tumorales, tales como la ramificación y expresión de secuencias terminales inusuales. Algunas de las lectinas que se han empleado en la administración de fármacos son: la aglutinina de maní (PNA), la aglutinina de germen de trigo (WGA) y aquellas que se unen a la manosa. La WGA presenta especificidad hacia la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y hacia el ácido siálico. La expresión abundante de GlcNAc ramificada β (1-6) en cánceres metastásicos permite la aplicación de la aglutinina-L4 de *Phaseolus vulgaris* y la WGA para el diagnóstico de cáncer, debido a su afinidad. Se han desarrollado bionanocápsulas con lectinas cubiertas por bicapas lipídicas para la administración de fármacos, que tuvieron la capacidad de transportar ADN a células tumorales, por lo que estos avances sugieren la posibilidad de emplear

lectinas para la administración inteligente de fármacos y la bioimagen de tumores (Gupta, 2020).

La hipersialilación tumoral es el aumento de residuos de ácido siálico en la superficie de células cancerígenas, se relaciona con una regulación positiva de sialiltransferasas y la regulación negativa de neuraminidasas, lo que trae consigo un incremento de ácido siálico con carga negativa en la superficie de las células. Esta hipersialilación promueve la metástasis, estimulando la invasión y migración tumoral, inhibe la apoptosis y evade la inmunovigilancia. Se han desarrollado diversos biomarcadores que aprovechan la hipersialilación de las células tumorales, por ejemplo, el marcador de cáncer de páncreas, de cáncer de ovario y cáncer de mama. Estos marcadores se basan en la detección de enzimas, genes relacionados a las sialiltransferasas o productos sialilados (Dobie y Skropeta, 2021).

Las lectinas, debido a su especificidad estrecha hacia ciertos carbohidratos tienen una captura menor de proteínas plasmáticas, lo que permite que sean más selectivas hacia sus ligandos. Algunos ejemplos son la concanavalina A, la lectina de *Aleuria aurantia* y la aglutinina de *Lens culinaris*, que se ha reportado por absorber porcentajes bajos de proteoma plasmático (Drake y col., 2010).

II.2.1. Aglutinina de germen de trigo

La WGA es una de las primeras lectinas descritas y consiste en la mezcla de tres isoformas WGA1, WGA2 y WGA3, las cuales forman un homodímero de cadena polipeptídica de 18.0 kDa que se encuentra estable en un tamaño de 36.0 kDa con una simetría de doble eje. Dentro de las características de esta lectina destaca su afinidad por la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y el ácido *N*-acetilneuramínico. La WGA tiene actividad citotóxica y fungicida, además de presentar monómeros resistentes a pH ácido. A diferencia de otras lectinas,

tiene cantidades altas de glicina y media cistina, es rica en puentes disulfuro que le otorgan estabilidad a pH ácido (Balčiūnaitė y Dzikaras, 2021). La WGA puede unirse a la sialil lactosa, que por su estructura cristalina permite obtener información sobre cómo reconoce al ácido siálico. Por otra parte, se reporta que la WGA reconoce a la *N*-acetilglucosamina, ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) y *N*-acetilgalactosamina debido a que estos poseen características topográficas parecidas. Su similitud se encuentra en el carbono 2 y 3 respectivamente con un grupo acetamida y un hidroxilo del anillo de piranosa de las dos hexosaminas con las que tiene el ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) en el carbono 5 y 4 (Dam y Brewer, 2007).

El ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) es el ácido siálico que predomina en los seres humanos, permite interacciones celulares, vigilancia inmunológica y transducción de señales; alteraciones en su metabolismo se relacionan con enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer (Wu y col., 2024).

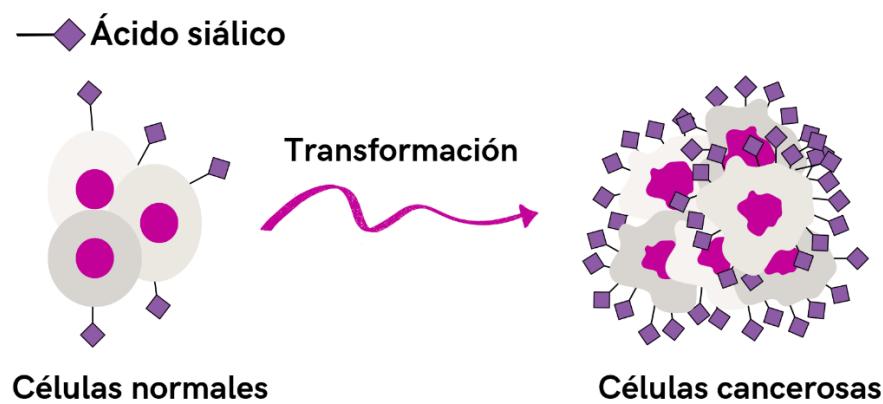


Figura 3. Representación de la hipersialilación en el cáncer.

La sobreexpresión de ácido siálico en células transformadas promueve el desarrollo y supervivencia del tumor (Adaptado de Rodrigues y Macauley, 2018).

Se ha reportado en estudios previos que WGA ejerce efectos inhibidores en el crecimiento de células tumorales, induce la condensación de cromatina, fragmentación nuclear y liberación de ADN que se relacionan con la apoptosis (Liu y col., 2010).

II.3. Biocorona

Al introducir nanopartículas en un biofluido, las proteínas presentes en el biofluido comienzan a unirse al azar a la superficie de las nanopartículas. A esta unión se le conoce como corona de proteína, esta unión ocurre de dos maneras. La corona dura que corresponde a la proteína que se une de manera estable a la nanopartícula, y la corona suave, que como su nombre lo indica es aquella corona formada por proteínas que no establecieron una interacción fuerte con el material (Visalakshan y col., 2020).

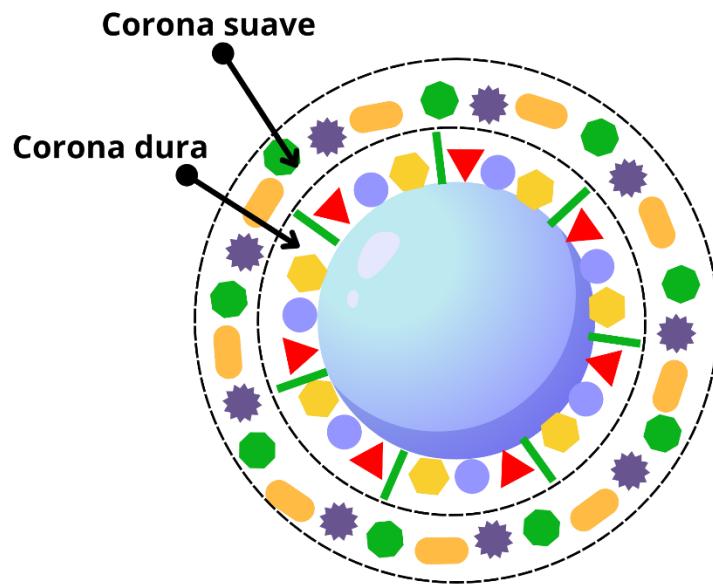


Figura 4. Representación de la unión de la corona suave y la corona dura a una nanopartícula (Adaptado de Shannahan, 2016).

La formación de la biocorona dura puede brindarle a la nanopartícula especificidad hacia cierto compuesto, por lo que el estudio de este fenómeno se ha enfocado principalmente en tres ejes: que las nanopartículas puedan pasar desapercibidas por el sistema inmune, que tengan una buena focalización y obtención de materiales biocompatibles. Los dominios hidrofóbicos e hidrofílicos de las proteínas permiten que estas se reorganicen para interaccionar con la superficie de los nanomateriales, cambiando su carácter hidrofóbico o hidrofílico según sea el caso (Bilardo y col., 2022).

La biocorona tiene la capacidad de controlar la dirección de las nanopartículas *in vivo*, por lo que se estudia su focalización para aplicaciones tanto de bioimagen como de terapia (Mahmoudi y col., 2016).

II.4. Líneas celulares

El cultivo celular comprende procedimientos dentro del laboratorio que propician el crecimiento de células eucariotas o procariotas en determinadas condiciones que simulan las condiciones fisiológicas del organismo de donde se aislaron las células. Su aplicación en investigación ha propiciado la reducción del uso de animales como modelo. El origen del cultivo celular ocurre a principios del siglo XX con el establecimiento de la línea celular HeLa. Esta línea celular se aisló de una mujer afroamericana que padecía cáncer de cuello uterino. El establecimiento de la línea celular HeLa permitió sentar las bases de la esterilidad para el manejo del cultivo celular, lo que a su vez facilitó avances en el estudio del crecimiento, maduración de tejidos, biología de los virus, desarrollo de vacunas y producción farmacéutica a nivel industrial (Skloot, 2017).

Los cultivos celulares son sumamente útiles para el estudio de mecanismos moleculares, biocompatibilidad de nuevos materiales, toxicidad de compuestos y producción de agentes farmacológicos. Son cultivos que se encuentran bien definidos, lo que facilita la obtención de datos con alta reproducibilidad. Hoy en

Actualmente existen diversas líneas celulares establecidas y se pueden adquirir en biorepositorios, como en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC por sus siglas en inglés), que proporciona un catálogo de diversas líneas celulares, cepas de hongos y bacterias, así como hojas de seguridad para el manejo adecuado (Segeritz y Vallier, 2017).

II.4.1. Línea celular MCF-7

La línea celular MCF-7 fue establecida por la Fundación de Cáncer de Michigan, de donde deriva su nombre. Se aisló del derrame pleural de una mujer de 69 años que presentaba adenocarcinoma de mama. Es una de las líneas celulares de cáncer de mama que responde a hormonas, presenta receptores de estrógeno, progesterona y glucocorticoides (Bronowicka-Adamska y col., 2024).

Es una línea celular modelo en el estudio de cáncer de mama y su cultivo se puede realizar en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con antibiótico/antimicótico y 10% de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés). La línea MCF-7 exhibe una morfología epitelial, como se puede observar en la Figura 5 (Comşa y col., 2015).

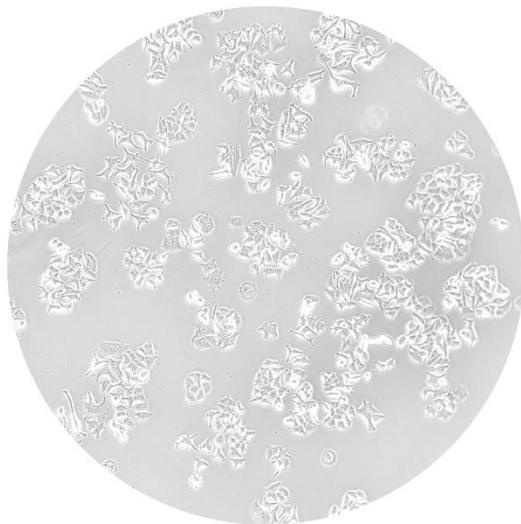


Figura 5. Morfología de línea celular de la Fundación de Cáncer de Michigan correspondiente al aislado no.7 (MCF-7).

II.4.2. Línea celular MCF-12A

Las células MCF-12A se establecieron por la Fundación de Cáncer de Michigan y corresponden a un cultivo de células humanas no tumorales que se derivan de la mamoplastia de reducción de una mujer de 60 años, cuyos tejidos presentaban una enfermedad fibroquística benigna que permitió su establecimiento; esta línea celular presenta una morfología epitelial y es adherente con crecimiento en monocapa, tal como se observa en la Figura 6. Se utiliza como control negativo de modelo *in vitro* del cáncer de mama (Bronowicka-Adamska y col., 2024).

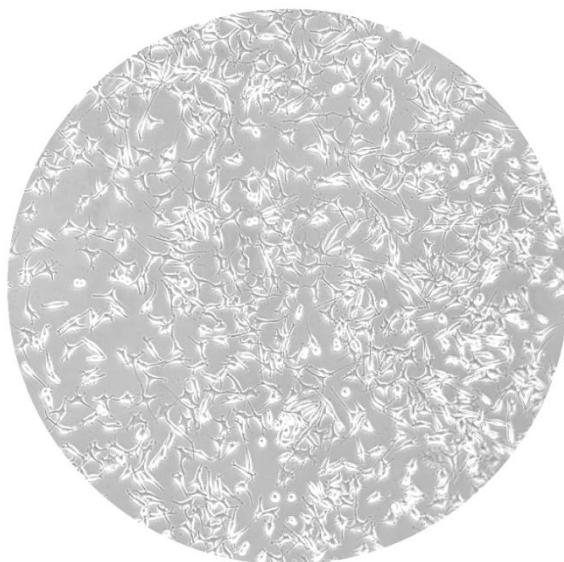


Figura 6. Morfología de línea celular de la Fundación de Cáncer de Michigan correspondiente al aislado no.12A (MCF-12A).

II.5. Ensayo del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)

El ensayo del MTT se utiliza como herramienta para medir la proliferación y viabilidad celular, así como para evaluar la toxicidad de fármacos y la actividad metabólica de las células. El reactivo empleado en este ensayo es el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio, una sal de tetrazolio. La

reducción de esta sal ocurre si existe actividad mitocondrial, es decir únicamente en células viables, generando formazán. El formazán es una molécula insoluble en agua de color violeta. Debido a su carga positiva y su estructura lipofílica, el reactivo MTT, puede atravesar tanto la membrana celular como la membrana mitocondrial de las células viables. Así, las células metabólicamente activas tienen la capacidad de reducir el MTT. El formazán se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO), para posteriormente medir su absorbancia en un lector de microplacas a 570 nm. Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos reflejan la concentración de formazán, lo que indica la reducción intracelular del MTT. La reacción química que ocurre se representa en la Figura 7 (Ghasemi y col., 2021).

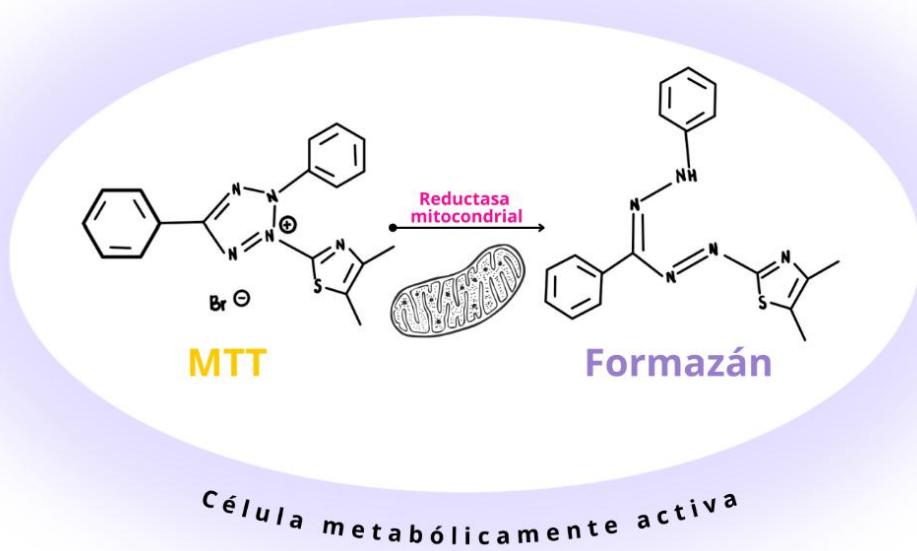


Figura 7. Reacción química que ocurre cuando se agrega la solución de MTT a las células viables. Las mitocondrias reducen el MTT para formar cristales de formazán (Karumuri y Tech, 2013).

La reducción del MTT a formazán se lleva a cabo por la actividad de las reductasas mitocondriales, no mitocondriales y de la membrana plasmática de células metabólicamente activas (Nga y col., 2020).

II.6. Métodos de caracterización y cuantificación

II.6.1. Método del ácido bicinconínico (BCA)

El ensayo del ácido bicinconínico fue propuesto en 1985 por Smith y colaboradores, es un método colorimétrico simple, sensible y con alta reproducibilidad que se utiliza para estimar la concentración de proteína que contiene una muestra. El valor de la concentración se obtiene realizando la medición de la absorbancia del cromóforo púrpura Cu^{+1} a $\lambda_{max} = 562$ nm que se produce a partir de la reacción que ocurre en un medio alcalino entre el Cu^{2+} y los enlaces peptídicos de la muestra. La relación que existe entre la concentración de proteína y la absorbancia presenta un comportamiento aproximadamente lineal en rangos de 0.02 a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, este método de cuantificación de proteínas se puede emplear aunque la muestra contenga detergente, su presencia no afecta significativamente, además se puede realizar en volúmenes bajos si la cantidad de muestra que se está analizando es limitada, se puede adecuar el ensayo para que su práctica se realice en tubos de ensayo o en placas de 96 pozos según sea el caso (Bainor y col., 2011; Cortés-Ríos y col., 2020).

Para la cuantificación de proteínas de mezclas complejas, las metodologías deben cumplir ciertos requerimientos: que sean fáciles, rápidas y que el material necesario pueda conseguirse fácilmente, además de ser reproducible y amigable, sin interferencias ni reacciones secundarias. Es así que el BCA satisface las características por lo que se usa ampliamente para determinar la concentración de proteínas en muestras que van desde extractos de cultivo celular, muestras de leche, alimentos, entre otras muestras (Cortés-Ríos y col., 2020).

II.6.2. SDS-PAGE

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) se emplea para estimar pesos moleculares de proteínas de las cuales no se tiene información, verificar su pureza e identificarlas. La separación por corriente eléctrica se lleva a cabo bajo la aplicación externa de un campo eléctrico, donde el gel actúa como matriz de las partículas, por lo que la interacción entre la fuerza eléctrica y el gel permiten la migración diferencial de las proteínas que conforman una muestra. La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS otorga cargas uniformes y características hidrodinámicas a las proteínas; el SDS les brinda una carga negativa y propicia su despliegue, además el tratamiento con un agente reductor logra una mayor desnaturización. La migración de las muestras dependerá del peso de las proteínas presentes, ya que las de bajo peso molecular se desplazarán más rápido que aquellas que presentan un tamaño más grande. Esta migración permite estimar el peso molecular de la proteína al comparar la movilidad de la proteína en el gel con la escalera de peso molecular, la presencia de una sola banda se toma como un criterio de pureza. Este tipo de electroforesis se lleva a cabo en cámaras verticales; el espesor del gel se elige según las características adecuadas para el análisis de las muestras: comúnmente su espesor es de 0.75 - 1 mm, aunque también existen de 0.5 y 3 mm. Se pueden correr hasta 15 muestras en cada gel y su corrimiento se puede completar en 1 hora (Garfin, 2009).

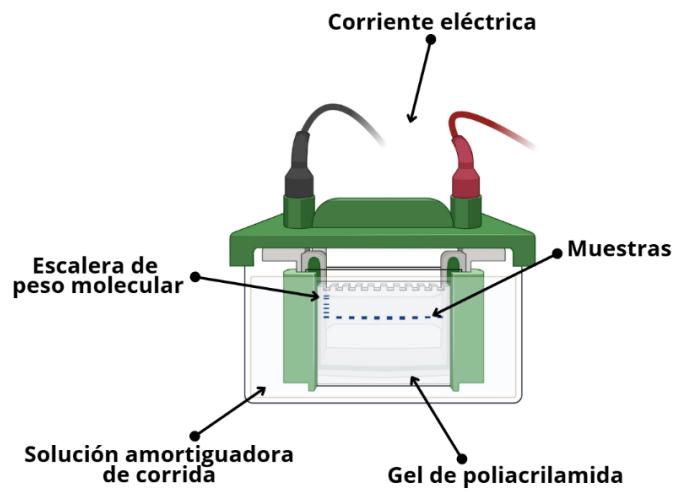


Figura 8. Esquema de los elementos necesarios para el desarrollo de la electroforesis SDS-PAGE. Imagen creada en Biorender.

Los geles se obtienen a partir de la polimerización de la acrilamida y bisacrilamida, cuyo mecanismo incluye la adición de vinilo y se cataliza por un generador de radicales libres, como el persulfato de amonio que actúa como iniciador y un acelerador como la tetrametilendiamina (TEMED). Se debe desgasificar la solución para eliminar el oxígeno, ya que este interfiere con la polimerización. Su tamaño de poro se relaciona con la concentración de acrilamida ya que entre mayor sea, el tamaño de poro es menor. Para que se obtengan geles de alta calidad y reproducibles se deben emplear reactivos de alta calidad. El principio de este tipo de electroforesis es que se compone de un sistema discontinuo que tiene dos geles, el gel separador que se coloca en la parte inferior, y el concentrador que se prepara en la parte superior; ambos geles exhiben diferentes porosidades, pH y fuerza iónica que permiten la separación de las proteínas. Mientras que uno actúa como el concentrador el otro permite la resolución de manera uniforme de las muestras (Garfin, 2009).

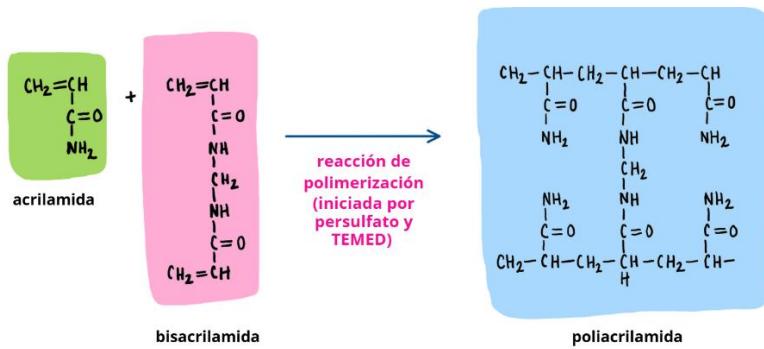


Figura 9. Representación de la reacción de polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida. Reacción iniciada por el persulfato de amonio y la tetrametiletilendiamina (TEMED) (Garfin, 2009).

II.6.3. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

La técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, del inglés Fourier-transform infrared spectroscopy) se basa en la vibración de los átomos que componen una molécula mientras estudia la interacción de la luz infrarroja con la materia, por lo que es una herramienta empleada en la caracterización de materiales, ya que de acuerdo a los modos vibracionales se puede inferir la disposición de los elementos y enlaces que lo constituyen (Baudot y col., 2010).

Al analizar las vibraciones moleculares se pueden identificar los grupos funcionales, ya que se asocian a bandas de absorción infrarrojas características. En esta técnica se detectan las vibraciones asimétricas de las moléculas, por lo tanto, el que no sea selectivo propicia la investigación de diversos grupos funcionales en muestras. Por ejemplo, a diferencia de otros tipos de espectroscopía permite la observación de aminoácidos y moléculas de agua. Se aplica en el estudio de grupos polares y la identificación de compuestos orgánicos, las muestras pueden ser sólidas o líquidas. Las frecuencias vibracionales que exhibe un grupo funcional son específicas dependiendo de los átomos que se encuentran involucrados y sus enlaces, debido a esto ya se han

establecido a que frecuencias absorben los principales grupos químicos (Berthomieu y Hienerwadel, 2009; Leng y col., 2023).

La espectroscopía FTIR es muy útil en el estudio estructural de proteínas, ya que permite la detección de cambios en la orientación y los enlaces de hidrógeno correspondientes a péptidos. Se centra principalmente en el análisis de la estructura secundaria de las proteínas, donde las bandas amida se asocian a frecuencias que corresponden a bucles, hélices α o láminas β . La ventaja de este tipo de espectroscopia es una reducción en el tiempo de análisis y un bajo costo comparado con otras técnicas (Terpugov, 2020).

El espectro que se obtiene del análisis por FTIR relaciona la absorbancia con las longitudes de onda dependiendo de la absorción de energía de los compuestos, por lo que habrá más vibraciones dependiendo de la geometría, este patrón del espectro de absorción funciona como una huella digital que permite la identificación de moléculas, lo que posibilita el análisis cualitativo y cuantitativo de la muestra. Existen diferencias entre la frecuencia de absorción y la intensidad: mientras que una depende de los modos vibracionales la otra está relacionada con la capacidad de transferencia de energía, por lo que cada compuesto covalente tiene un espectro infrarrojo característico, tal como se observa en la Figura 10 (Guerrero-Pérez y Patience, 2020).

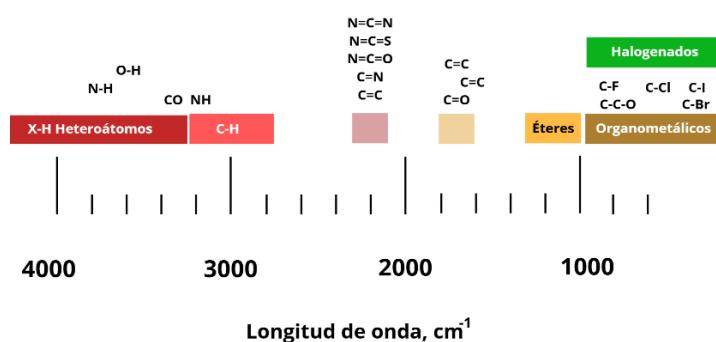


Figura 10. Intervalo de frecuencia respecto a los grupos funcionales que se asocian a las bandas de estiramiento espectroscópica IR (Guerrero-Pérez y Patience, 2019).

II.6.4. Microscopía Electrónica de Transmisión

El microscopio electrónico de transmisión se desarrolló en 1930 por Ernst Ruska al observar que podía manipular haces de electrones con una bobina magnética. A diferencia de los fotones los electrones exhiben una longitud de onda corta y una interacción fuerte con la materia lo que propicia que estos equipos puedan obtener una resolución atómica. La microscopía electrónica de transmisión o MET brinda imágenes que son fáciles de interpretar, permiten identificar características como distribución de tamaño de partículas y morfologías, lo que es una ventaja ya que se pueden analizar partículas a escala nanométrica (Rizvi y col., 2021).

El sistema funciona con un haz de electrones que ilumina la muestra, luego estos forman un patrón con la difracción de los electrones y dan lugar a una imagen en el plano focal posterior y el plano de imagen del lente objetivo que se puede visualizar y registrar con una cámara. En la Figura 11 se presenta el esquema de un microscopio electrónico de transmisión (Li y col., 2023).

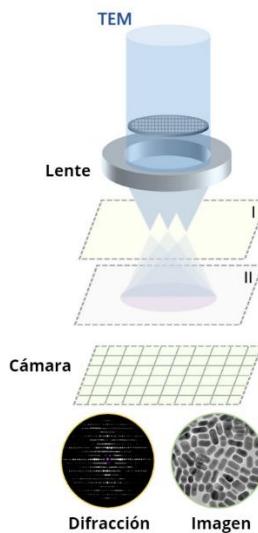


Figura 11. Esquema de un microscopio electrónico de transmisión. (Tomado de Li y col., 2023).

II.6.5. Microscopía Electrónica de Barrido

Esta técnica se emplea en la caracterización de materiales debido a la capacidad de proporcionar imágenes topográficas de superficie con alta resolución, siendo así que propicia la caracterización de la morfología que presenta la muestra, su estructura y composición química superficial al incidir la superficie con un haz de electrones (Na y col., 2021).

El sistema se compone de una fuente de iluminación, una lente condensadora y objetivo que son campos magnéticos que se disponen de manera convergente. El microscopio electrónico de barrido (MEB) funciona con lentes electrostáticas. Las bases para su desarrollo se establecieron en 1942 por Zworykin, Hiller y Snijder, ya que ellos observaron que los electrones secundarios son los encargados del contraste topográfico. Es un instrumento que se basa en el barrido de superficie de una muestra a través de un haz de electrones que presenta una disminución en su diámetro por la interacción con lentes electromagnéticas que se forman por el paso de corriente por medio de solenoides. Una vez que el haz interactúa con la muestra genera señales que se recolectan en un detector que produce una imagen (Mancera y Amaya, 2024).

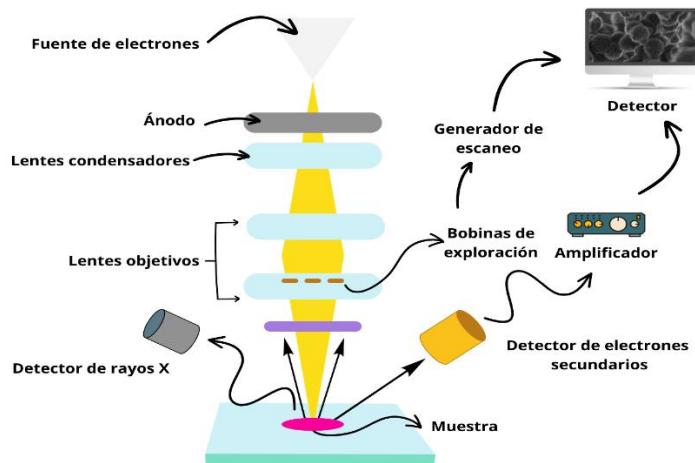


Figura 12. Esquema de un microscopio electrónico de barrido (Adaptado de Nanoscience Instruments, s.f.).

II.6.6. Microscopía confocal

La microscopía confocal puede generar imágenes con un contraste alto mediante el seccionamiento óptico, el lente objetivo tiene una alta resolución lo que permite generar cortes muy delgados que pueden ser de hasta $1 \mu\text{m}$ sin que se corte la muestra físicamente, por lo que se utiliza para cuantificar e investigar la distribución de moléculas fluorescentes. Una imagen o corte se puede emplear para cuantificar si es representativa del espesor de la muestra que se está analizando. A su vez, también se pueden tomar diversas imágenes cambiando el foco para generar datos 3D que permitan la reconstrucción y cuantificación por completo de la muestra. Este tipo de microscopio presenta aberturas estenopeicas, se enfoca un láser en la muestra que excita moléculas fluorescentes lo que provoca que estas moléculas emiten fluorescencia que es captada por la lente objetivo y se enfoca hacia una segunda lente pasando por un orificio estenopeico, el paso por este orificio garantiza que solo la fluorescencia que se genera en el punto focal sea captada por el detector y de ahí deriva su nombre, confocal se refiere a la posición en que se encuentra el orificio estenopeico ya que debe estar en un plano focal conjugado. Debido a que solo puede recoger la fluorescencia de un punto focal a un tiempo, el microscopio confocal emplea espejos de barrido para que el láser incida en la muestra y genere de esta manera las imágenes (Jonkman y col., 2020).

La microscopía confocal exhibe una linealidad en cuanto a su detección por lo que tiene ventajas en el estudio de tejidos, células y proteínas (Shihan y col., 2021).

II.6.7. Espectroscopía por dispersión de energía

La espectroscopía por dispersión de energía (EDS) es una técnica analítica que se basa en el uso de cristales de difracción, los cuales permiten seleccionar una longitud de onda a la vez en función del ángulo de incidencia de los rayos X. Esta técnica se emplea para identificar los elementos presentes en una muestra problema, con una sensibilidad de hasta 1000 ppm y tiempos de análisis muy reducidos. Para su funcionamiento, la EDS requiere un microscopio electrónico de barrido (MEB) acoplado a un detector de estado sólido, que permite la detección de los rayos X emitidos por la muestra. Dicho detector incorpora ventanas removibles que facilitan el análisis de los elementos (Mancera y Amaya., 2024).

En resumen, la revisión de antecedentes ha permitido comprender mejor el desarrollo y la aplicación de las nanopartículas luminiscentes (UCNPs) en el campo de la teranóstica, que combina diagnóstico y tratamiento en una sola plataforma. Además, se destacó la importancia de las técnicas utilizadas para analizar sus propiedades, como el tamaño, la forma, la composición y su comportamiento. Estos aspectos son fundamentales para este trabajo, que se centra en el uso de nanopartículas de sílice luminiscentes recubiertas con aglutinina de germen de trigo (WGA), una lectina con la capacidad de reconocer de manera específica células cancerosas. Gracias a esta característica, estas nanopartículas tienen un gran potencial para ser utilizadas en la visualización de células tumorales mediante técnicas de imagenología, así como también en el tratamiento, al permitir la entrega dirigida de medicamentos. Todo lo revisado en este capítulo proporciona una base sólida para el desarrollo experimental que se abordará en los siguientes apartados de esta investigación.

III. HIPÓTESIS

La modificación superficial de nanopartículas luminiscentes de conversión ascendente (UCNPs) con la lectina WGA permitirá la interacción específica de las partículas con células que presentan procesos neoplásicos, a la vez que mantendrá un carácter biocompatible.

IV. OBJETIVOS

IV.1. General

Modificar la superficie de nanopartículas de sílice mesoporosa dopadas con lantánidos mediante su recubrimiento con aglutinina de germen de trigo (WGA), y evaluar la capacidad del sistema para reconocer células con procesos neoplásicos, e interaccionar en condiciones que aseguren la biocompatibilidad.

IV.2. Específicos

- Modificar la superficie de nanopartículas con aglutinina de germen de trigo (WGA), y con seroalbúmina bovina (BSA), proteína inerte utilizada como control.
- Caracterizar el patrón fisicoquímico, morfológico y textural de los nanosistemas, así como evaluar su biocompatibilidad en cultivos celulares.

V. METODOLOGÍA

V.1. Materiales

V.1.1. Material biológico

Las líneas celulares que se utilizaron en el presente estudio fueron obtenidas a partir de la ATCC que es la Colección Americana de Cultivos Tipo y se describen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Líneas celulares empleadas en los ensayos.

| Línea celular | Tipo de célula | Origen y año de aislamiento |
|----------------------|-----------------------|---|
| MCF-12A | Epitelial | Células de glándula mamaria de mujer de 60 años no tumorales aisladas por la Fundación de Cáncer de Michigan. |
| MCF-7 | Epitelial | Células de glándula mamaria de mujer de 69 años con adenocarcinoma aisladas en 1970 por la Fundación de Cáncer de Michigan. |

V.1.2. Reactivos y materiales

En el Cuadro 2 se listan los reactivos y materiales utilizados.

Cuadro 2. Reactivos y materiales utilizados.

| Reactivos | |
|-------------------------------------|--|
| Reactivos | Descripción |
| DMEM | Medio de Dulbecco Modificado por Eagle (Gibco REF 11995-065) |
| FBS | Suero fetal bovino (Gibco REF 16999-044) |
| Tripsina | Tripsina 0.25 % (Cat.L0931500 de Biowest) |
| Pen-strep | Penicilina estreptomicina (Cat.1514022 de Gibco) |
| Poli-D-lisina | Matriz extracelular sintetizada (Cat.A3890401 de Gibco) |
| WGA | Lectina de <i>Triticum vulgaris</i> 10 mg (Cat.L9640 de Sigma Aldrich) |
| BSA | Seroalbúmina bovina (Cat.A7906 de Sigma Aldrich) |
| SDS | Dodecil sulfato sódico (Cat.436143 de Sigma Aldrich) |
| BCA | Solución de ácido bicinconílico (Cat.B9643 de Sigma Aldrich) |
| Solución de sulfato cúprico | Solución de sulfato cúprico al 4% (Cat.C2284 de Sigma Aldrich) |
| Tris-HCl | Trisaminometano (Cat.1610719 de Bio-Rad) |
| Acrilamida/Bis 29:1 Solución 30% | Acrilamida/Bisacrilamida (Cat.1610156 de Bio-Rad) |

Cuadro 2. Continuación de reactivos y materiales utilizados.

| | |
|---|---|
| Tampón de carga cian/naranja TrackIT | Tampón de carga (Cat.10482028 de Invitrogen) |
| MTT | Azul de tiazolil Bromuro de tetrazolio (Cat.M5655 de Sigma Aldrich) |
| TEMED | Tetrametiletilendiamina (Cat.1610801 de Bio-Rad) |
| Glicina | Ácido aminoacético (Cat.G8898 de Sigma) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido (Cat.472301 de Sigma Aldrich) |
| Fosfato de potasio monobásico | KH_2PO_4 (Cat.P5655 de Sigma) |
| Cloruro de potasio | KCl (Cat.304001 de J.T. Baker) |
| Fosfato de sodio dibásico heptahidratado | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Cat.S9390) |
| Cloruro de sodio | NaCl (Cat.S7653 de Sigma Aldrich) |
| Nanopartículas MCM-41 luminiscentes (JCS12) | Material sinterizado en el laboratorio del Dr. Pedro Salas (Padrón, 2024) |

Material

| Material | Descripción |
|------------------------|---|
| Microplaca de 96 pozos | Microplacas de 96 pozos para cultivo celular, estériles (Cat. 701011 de NEST) |
| Placa de 24 pozos | Placas de 24 pozos para cultivo celular, estériles (Cat. 702011 de NEST) |

Cuadro 2. Continuación de reactivos y materiales utilizados.

| | |
|-------------------|---|
| Caja de cultivo | Caja de cultivo celular 100 mm x 20 mm tratada con poliestireno, estéril (Cat.704004 de NEST) |
| Rejillas para TEM | Rejillas de soporte Formvar/Carbon, malla 200, de cobre (Cat. 01800-F de Ted Pella) |
| Membrana porosa | Filtro de jeringa estéril 0.20 μm (Cat.431224 de Corning Incorporated) |

V.2. Métodos

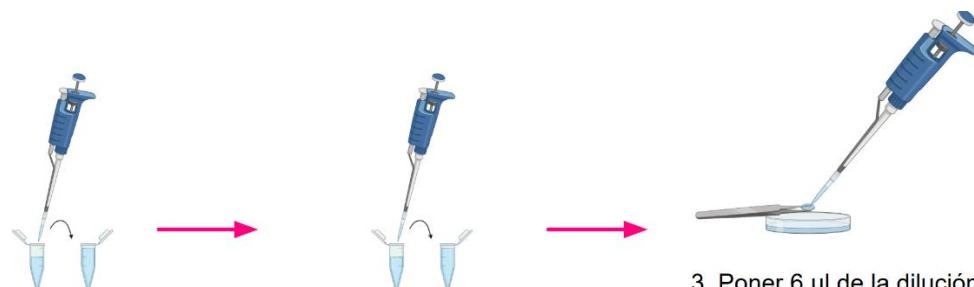
V.2.1. Preparación de muestras para microscopía

V.2.1.1. Preparación de muestras para MET

Las nanopartículas JCS12 son nanopartículas luminiscentes de sílice, corresponden a nanopartículas de sílice MCM-41 por lo que presentan una estructura mesoporosa y una morfología esférica.

- Para MCM-41 luminiscentes

Se pesaron 1 mg de nanopartículas de sílice mesoporosas luminiscentes, a las cuales se agregó 1 ml de agua. Se suspendieron las partículas en una dilución 1:250 vol/vol. Se tomaron 6 μl , que se colocaron sobre la rejilla para MET. La preparación se dejó secar en la campana y se resguardó a 4 °C hasta su observación.



1. Tomar 40 μl de la solución de 1mg/ml de las nanopartículas + 960 μl de agua de Pisa para obtener una dilución 1:25

2. Realizar otra dilución, ahora tomando 100 μl de la dilución de 1:25 + 900 μl de agua de pisa

3. Poner 6 μl de la dilución 1:250 en la rejilla para TEM en el lado más brillante (es el que tiene el recubrimiento)
NOTA: Poner una caja petri con papel filtro de soporte por si la muestra se cae

Figura 13. Esquema de la preparación de muestras para MET

- Para MCM-41 luminiscentes bioconjugadas con BSA o WGA

Se centrifugaron las nanopartículas a 13,000 rpm en centrifugadora SIGMA 1-14K refrigerada, durante 30 minutos a 4 °C, y se retiró el sobrenadante. Se utilizó agua para ajustar la concentración a 1 mg/ml. Las nanopartículas se resuspendieron y se preparó una dilución 1:250. Se tomaron 6 μl , que se colocaron sobre una rejilla para MET. La muestra se dejó secar en la campana y se tiñó con acetato de uranilo al 2%, el acetato de uranilo tiñe el material orgánico.

V.2.1.2. Preparación de muestras para MEB

Se pesaron 2 mg de nanopartículas de sílice mesoporosas luminiscentes, a las cuales se les agregó 1 ml de agua. Se resuspendió la solución y se tomaron 5 μl , que se colocaron sobre una rejilla para MET. La muestra se dejó secar en la campana y se resguardó a 4 °C hasta el momento de su observación.

V.2.2. Adsorción de proteínas en nanopartículas

V.2.2.1. Adsorción y remoción de corona suave

Se pesaron 2 mg de nanopartículas estériles en tubos estériles y se incubaron durante 24 h bajo agitación a 4 °C, con 1 ml de una solución estéril de proteína a una concentración de 1 mg/ml. Una vez transcurrido este tiempo, se detuvo la incubación y se centrifugaron las nanopartículas a 13,000 rpm en una centrifugadora SIGMA 1-14K refrigerada, durante 30 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante para su cuantificación mediante el método del ácido bicinchonílico.

Posteriormente, se realizó un segundo lavado de las nanopartículas con PBS 1X para lograr la remoción total de la corona suave; asimismo, el sobrenadante se resguardó para su posterior cuantificación. Finalmente, se resuspendió el concentrado de nanopartículas en 1 ml de PBS 1X y ambas muestras de proteínas se resguardaron a 4 °C hasta su uso.

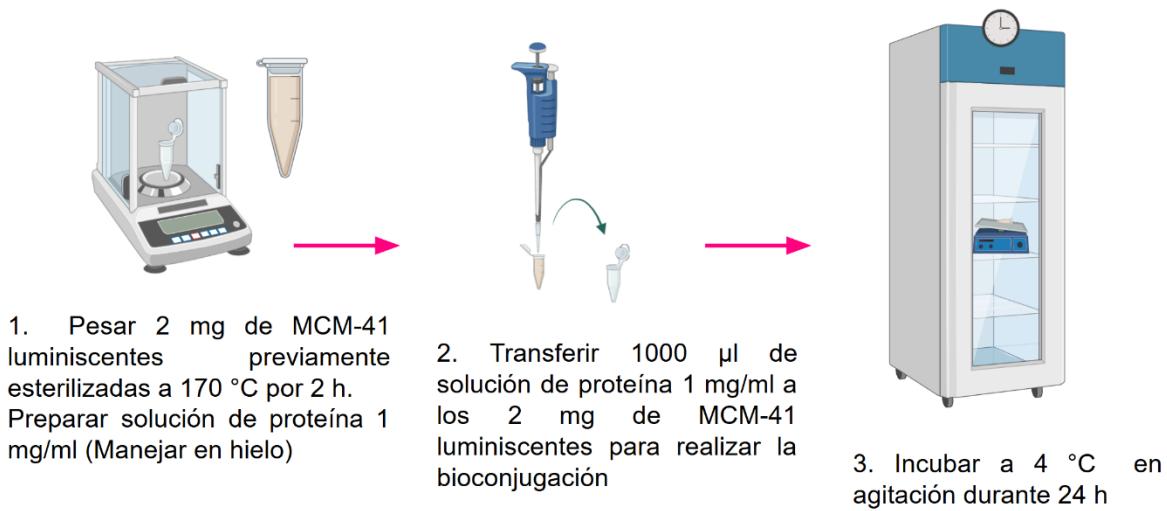


Figura 14. Esquema de la adsorción de proteínas en MCM-41 luminiscentes con BSA o WGA

V.2.2.2. Extracción de corona dura

Para fines de cuantificación, se extrajo la corona dura de las nanopartículas siguiendo la metodología descrita por Visalakshan y colaboradores (2020), con algunas modificaciones. En breve, se centrifugaron las nanopartículas bioconjugadas a 13,000 rpm en una centrifugadora SIGMA 1-14K refrigerada, durante 30 min a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. El concentrado se resuspendió en 200 μ l de PBS 1X y se incubó a 95 °C en un baño de agua Buchi B-491, con 150 μ l de una solución de extracción compuesta por Tris-HCl, SDS y agua durante 15 min.

Una vez transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción inmediatamente con hielo y se llevó a cabo una centrifugación a 13,000 rpm durante 1 h a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante que contiene la corona dura, el cual se resguardó a 4 °C hasta su cuantificación.

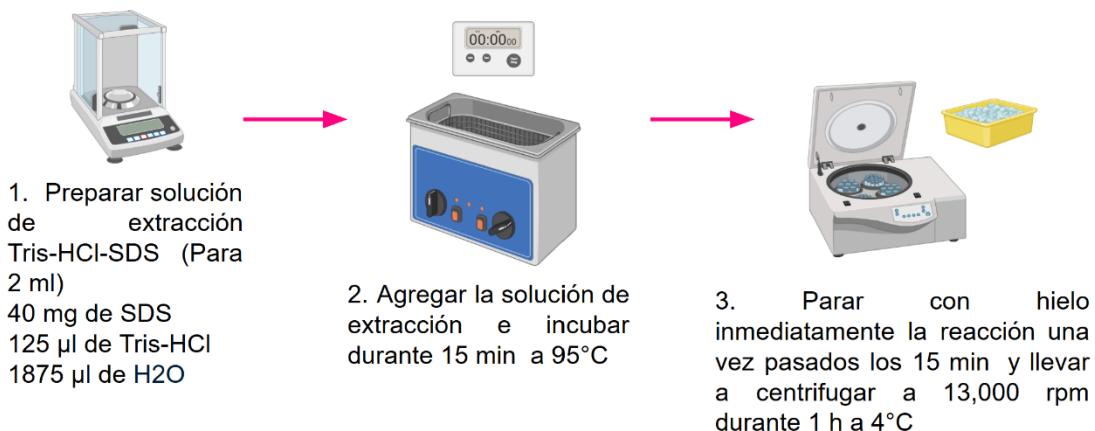


Figura 15. Esquema de pasos para la remoción de corona dura

V.2.2.3. Método del ácido bicinconílico

El reactivo de trabajo se preparó mezclando una solución de Cu²⁺ al 4% con 4.9 ml de una solución de ácido bicinconílico. Se mezcló suavemente hasta obtener una solución de color verde translúcida. Se preparó una solución madre

de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 2 mg/ml en solución salina isotónica (NaCl) y se realizaron diluciones seriadas de BSA en concentraciones de 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 mg/ml.

En una microplaca de 96 pozos se añadieron 10 μ l de cada solución estándar o de la muestra problema por triplicado, seguido de la adición de 200 μ l de reactivo de trabajo en cada pozo. La microplaca se cubrió con papel aluminio y se incubó durante 30 min a 37 °C en un agitador. Una vez transcurrido el tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia en un lector de placas a 562 nm, según la metodología de Smith (1985).

V.2.2.4. Electroforesis SDS-PAGE

Se prepararon los geles para la electroforesis siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970), con algunas modificaciones. Para el montaje del molde se necesitaron dos placas de vidrio. Dependiendo del grosor deseado, se seleccionaron las placas y el peine correspondiente. La concentración del gel separador fue de 12%, por lo que se realizó la mezcla de los reactivos indicados en el Cuadro 3, excepto el TEMED.

La solución se desgasificó a través de una membrana de 0.22 μ m. Una vez desgasificada, se añadió el TEMED y se vertió la solución entre las placas de vidrio hasta alcanzar una altura aproximada de 4.5 cm. Para asegurar la uniformidad de la superficie del gel, se añadieron 3 ml de isopropanol. El gel se dejó polimerizar durante 20-25 min.

Una vez que el gel separador se polimerizó, se preparó el gel concentrador siguiendo el mismo procedimiento, pero utilizando los reactivos indicados en el Cuadro 4. El gel concentrador se dejó polimerizar y, una vez transcurrido el tiempo, se almacenó en una solución de corrida 1X a 4 °C hasta su uso.

Cuadro 3. Reactivos para la preparación del gel separador para electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

| Reactivos | 12% |
|-----------------------------|-------------|
| Agua destilada | 3.35 ml |
| TRIS 1.5M pH 8.8 | 2.5 ml |
| SDS al 10% | 100 μ l |
| Acrilamida/bisacrilamida | 4 ml |
| Persulfato de amonio al 20% | 50 μ l |
| TEMED* | 7 μ l |

Cuadro 4. Reactivos para la preparación del gel concentrador para SDS-PAGE.

| Reactivos | |
|--------------------------|------------|
| Agua destilada | 3.05 ml |
| TRIS 0.125M pH 6.8 | 1.25 ml |
| SDS 10% (W/W) | 50 μ l |
| Acrilamida/bisacrilamida | 0.65 ml |
| Persulfato de amonio 10% | 25 μ l |
| TEMED* | 7 μ l |

Para la corrida del gel, se llenó la cámara con una solución amortiguadora 1X compuesta por Tris-HCl, glicina y SDS a un pH de 8.3, y se colocó el gel en la cámara. Las muestras se prepararon para que el volumen final correspondiera a 30 μ l. La solución de carga se encontraba en una relación 6X, por lo que se calculó la relación adecuada según la cantidad de proteína a cargar.

Se mezcló el volumen correspondiente de la muestra a una concentración de 6 μ g/ μ l para lectina o 3 μ g/ μ l para BSA con la solución de carga. Estas cantidades permitieron observar bandas claras en el gel. Las muestras se incubaron en baño María durante 5 min y, posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura

ambiente.

Una vez frías, las muestras se cargaron cuidadosamente en el gel. En el primer carril se cargó la escalera de peso molecular, en los carriles restantes se cargaron las muestras correspondientes a las soluciones de incubación y las coronas extraídas de las nanopartículas bioconjugadas. Finalmente, se conectó la cámara a la fuente de poder y se dejó correr la electroforesis.

V.2.2.5. Preparación de muestras para FTIR

- Para MCM-41 luminiscentes

Se mezcló 1 mg de nanopartículas con 1 ml de agua de PISA, se resuspendió la solución y se tomaron 50 μ l, que se depositaron sobre un aluminio fijado a un portaobjetos. La preparación se dejó secar en vacío y se almacenó en un tubo cónico hasta su análisis.

- Para MCM-41 luminiscentes bioconjugadas con BSA o WGA

Se tomaron 500 μ l de la solución de 2 mg/ml correspondiente a las nanopartículas bioconjugadas y se añadieron 500 μ l de agua para obtener una concentración de 1 mg/ml. De esta solución, 50 μ l se depositaron sobre un aluminio fijado a un portaobjetos. La preparación se dejó secar en vacío y se almacenó en un tubo cónico a 4 °C hasta su análisis.

V.2.3. Cultivo celular

Para el cultivo de las líneas celulares MCF-7 y MCF-12A respectivamente se empleó medio DMEM suplementado con 10 % de FBS y 1% de penicilina-estreptomicina y se dejó en incubación a 5% de dióxido de carbono (CO₂) y 37 °C. Su subcultivo se realizó cada dos días o hasta alcanzar una confluencia del 70%.

Protocolo general para realizar un subcultivo celular:

1. Preparar medio de cultivo suplementado al 10% de FBS (vol/vol) y 1% de antibiótico (vol/vol).
2. Retirar medio de la caja de cultivo y enjuagar con 10 ml de PBS 1X.
3. Agregar solución de tripsina: La tripsina es una enzima proteolítica, que permite que las células se despeguen de la caja de cultivo.
4. Agregar medio de cultivo y recuperar el contenido.
5. Centrifugar el contenido.
6. Retirar el sobrenadante y suspender el sedimento de células en medio de cultivo suplementado.
7. Contar las células utilizando la cámara de Neubauer. Hacer los cálculos necesarios para determinar cuánto volumen se debe tomar del tubo que contiene las células para realizar el subcultivo.
8. Agregar medio de cultivo y el volumen de células correspondiente a los cálculos que se realizaron en el paso anterior, etiquetar la caja con fecha, línea celular y nombre del usuario que la maneja.

V.2.3.1. Cinética de crecimiento de líneas celulares en cajas de 96 pozos

Se exploró la densidad celular ideal para realizar pruebas de biocompatibilidad. Estas pruebas consistieron en comparar cuantitativamente el crecimiento celular de un cultivo control y otro sometido a concentraciones crecientes de partículas. El objetivo es contar con condiciones de cultivo que permitan mostrar la presencia de inhibidores o activadores del crecimiento celular. Es decir, se evitaron puntos de crecimiento muy bajos donde las diferencias en cuanto a velocidades de crecimiento fueron muy pequeñas, o por el contrario puntos de crecimiento donde la confluencia sature el límite de respuesta del ensayo.

Las células se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos a distintas densidades celulares, en triplicado para cada condición, utilizando medio DMEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) y un 1 % de antibiótico. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de MTT a las 48, 72 y 96 horas posteriores a la siembra.

Para la realización del ensayo MTT, se añadió al medio de cultivo una solución de MTT a una concentración de 0.5 mg/ml. Las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂. Finalizado el periodo de incubación, se retiró el medio y se agregó dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales de formazán formados. Finalmente, la absorbancia se midió a 550 nm utilizando un lector de microplacas.

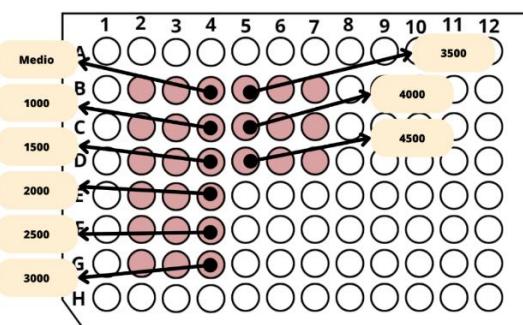


Figura 16. Representación de caja de 96 pozos con las diferentes densidades celulares.

V.2.4. Evaluación de biocompatibilidad

Se sembró la densidad celular adecuada para las pruebas de biocompatibilidad en placas de microtitulación de 96 pocillos. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂.

Tras la incubación inicial, se retiró el medio de cultivo y se añadieron los tratamientos correspondientes. Una vez administrados los tratamientos, las placas se mantuvieron en incubación a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT a las 24, 48 y 72 horas de exposición a las nanopartículas:

- Biocompatibilidad de MCM-41 luminiscentes
- Biocompatibilidad de MCM-41 luminiscentes@WGA (JCS12@WGA)
- Biocompatibilidad de MCM-41 luminiscentes@BSA (JCS12@BSA)

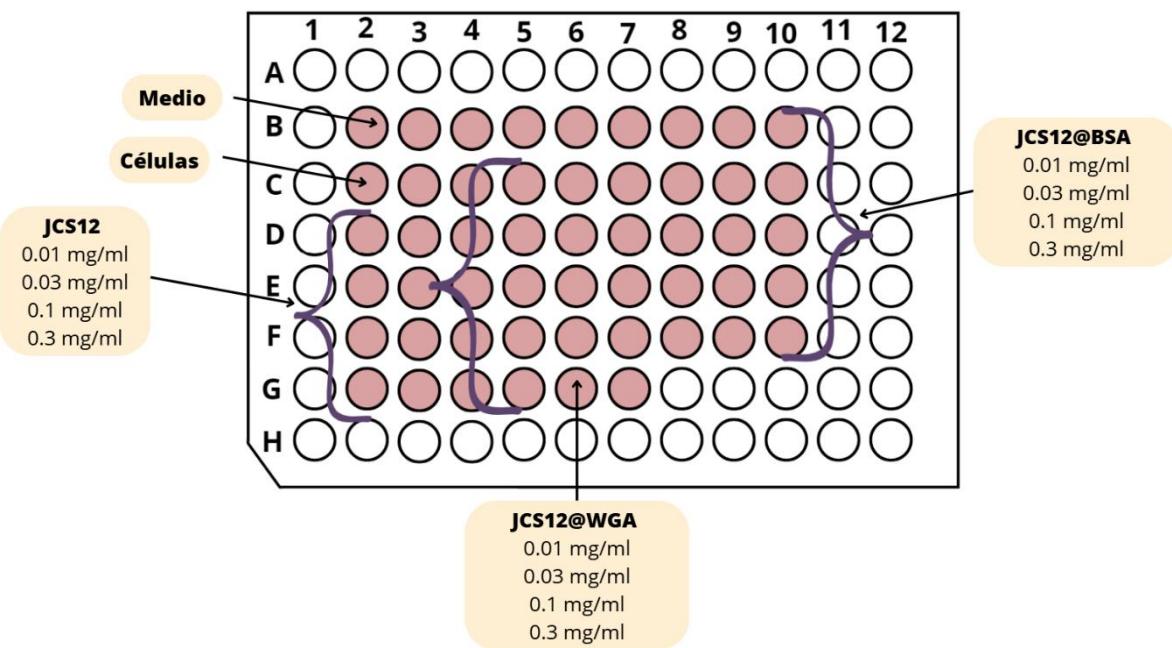


Figura 17. Esquema de tratamientos y sus variantes de concentración correspondientes para la evaluación de la biocompatibilidad.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

VI.1. Nanopartículas y caracterización estructural

Las nanopartículas MCM-41 son estructuras mesoporosas, que se caracterizan por presentar una morfología esférica y una estructura de poro hexagonal. La distribución estrecha de sus poros y su gran área superficial permiten su aplicación como acarreadores de fármacos (Fatima y col., 2025).

Las nanopartículas utilizadas en este estudio fueron sintetizadas por el Dr. Pedro Salas, del CFATA-UNAM, colaborador del proyecto. Para determinar las características precisas de tamaño y morfología se realizaron análisis por MEB y MET.

Ambas microscopías se emplean en la caracterización de materiales debido a que mediante MEB se puede visualizar la homogeneidad de talla y la morfología de las nanopartículas, mientras que la MET permite observar de manera más detallada el arreglo de la estructura y la distribución de los poros. Los resultados se muestran en la Figura 18, donde se observan partículas esféricas y con un tamaño aproximado de 200-400 nm (Figura 18 a y b). También se observa la presencia de poros, como se esperaba para la estructura típica de las nanopartículas MCM-41 (Figura 18 c y d).

El tamaño de las nanopartículas se relaciona directamente con el tiempo de circulación, la distribución, la acumulación tisular y la captación celular. El tamaño óptimo para su aplicación biológica es de 10 a 300 nm; sin embargo, aquellas que van de 100 a 200 nm tienen una mayor acumulación tumoral, por lo que el tamaño de las nanopartículas empleadas en este estudio se encuentra dentro de los rangos óptimos para su aplicación en células con procesos neoplásicos. La morfología es otro factor que influye en la focalización, las nanopartículas presentaron una morfología esférica lo que favorece la internalización celular (Fatima y col., 2025).

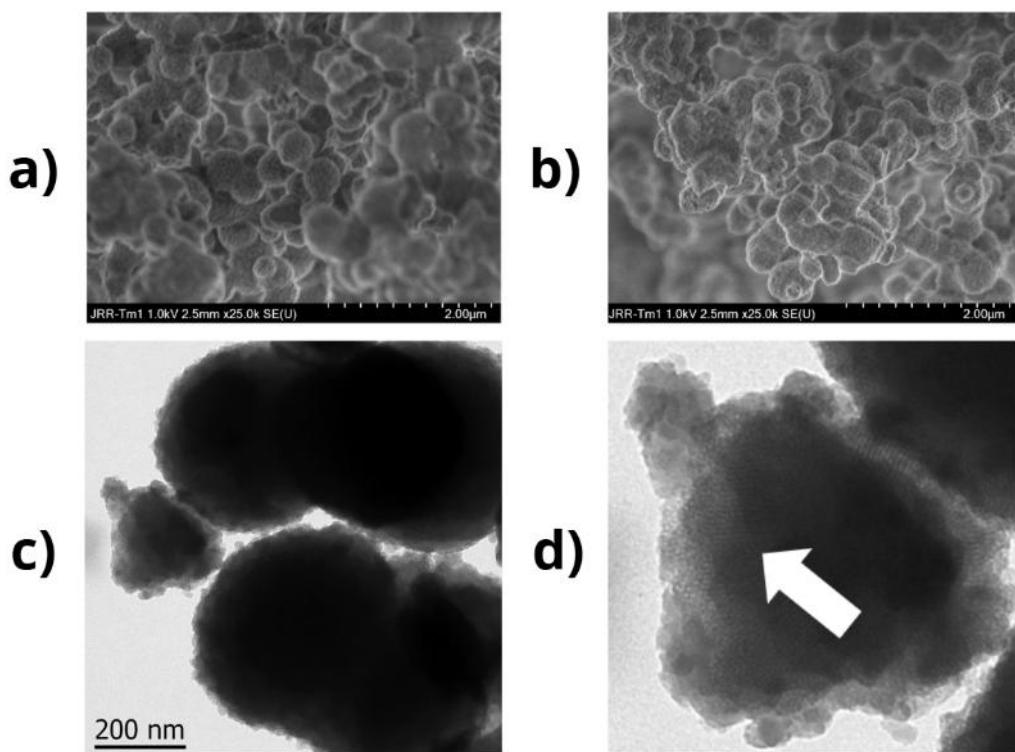


Figura 18. Imágenes obtenidas por MEB y MET de las nanopartículas JCS12. a y b) Imágenes obtenidas por MEB de las partículas JCS12, c) Imagen obtenida por MET de las partículas JCS12, y d) Ampliación de la imagen para la visualización de los poros

VI.1.1. Bioconjugación de nanopartículas con proteínas

Las nanoestructuras bioconjugadas fueron producidas a partir de la formación de una corona de proteína sobre las nanopartículas de sílice luminiscentes JCS12, mediante fisisorción, fenómeno esquematizado en la Figura 19. Esta bioconjugación ocurre debido a la interacción inespecífica de los enlaces silanol de la superficie de las nanopartículas de sílice con las proteínas; esta unión se presenta a partir de interacciones no covalentes e interacciones débiles. Sin embargo, aunque las interacciones son débiles, las proteínas que a través de motivos interactúan directamente con la nanopartícula presentan un mayor

número de enlaces respecto a las que no interactúan directamente con el material, favoreciendo la formación de una corona dura sobre la sílice (Visalakshan y col., 2020).

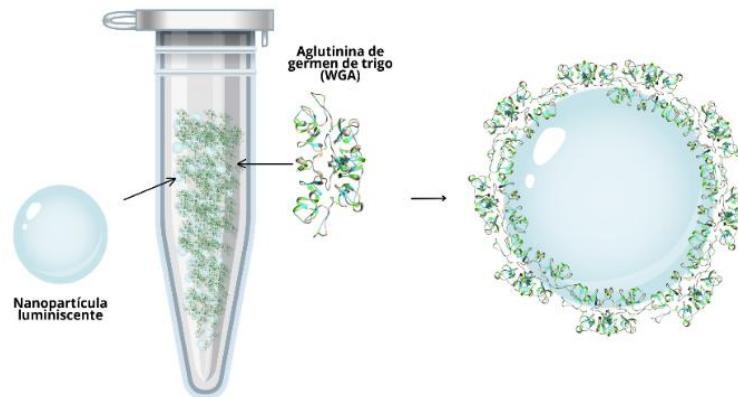


Figura 19. Estrategia para la bioconjugación de las nanopartículas luminiscentes JCS12 con aglutinina de germen de trigo mediante fisisorción. Imagen creada con Canva.

Se removió la corona suave mediante centrifugación y lavados de la nanoestructura bioconjugada. Para confirmar la obtención de la nanoestructura híbrida, es decir la formación de la corona dura de proteína en la superficie de las nanopartículas, se realizó la caracterización de la nanoestructura mediante FTIR y MET.

En la Figura 20 se presenta el espectro FTIR de nanopartículas JCS12 nativas, nanopartículas JCS12 bioconjugadas con aglutinina de germen de trigo (JCS12@WGA) y nanopartículas JCS12 bioconjugadas con seroalbúmina bovina (JCS12@BSA). Esta técnica emplea radiación infrarroja (RI) que se hace incidir sobre la muestra, la absorción de luz es transformada en vibraciones moleculares. Con esta técnica se pueden identificar los grupos funcionales presentes en la muestra, ya que cada uno se asocia a bandas de absorción infrarrojas características, generándose un espectro. Como se muestra en la

Figura 20, se observó que tanto las partículas nativas como las bioconjugadas generan bandas características de la sílice; mientras que las nanopartículas bioconjugadas presentaron además bandas correspondientes a los enlaces amida de las proteínas, sugiriendo la formación de la biocorona en las nanopartículas. En el Cuadro 5 se muestra la interpretación de las bandas obtenidas.

Cuadro 5. Bandas características de las nanopartículas JCS12 nativas y las bioconjugadas, analizadas por FTIR.

| Nanopartículas | Bandas | Tipo de vibración |
|----------------|-----------|-----------------------|
| JCS12 | 1632 | -OH Grupos hidroxilo |
| JCS@BSA | 1073 | Si-O-Si |
| JCS12@WGA | 804 | Enlaces siloxano |
| | 967 | Si-OH Enlaces silanol |
| | 2981 | -CH ₂ |
| | 1600-1700 | -Amida I |
| | 1480-1580 | -Amida II |
| | 1220-1400 | -Amida III |
| JCS12@BSA | 625-770 | -Amida IV |
| JCS12@WGA | 640-800 | -Amida V |
| | 540-600 | -Amida VI |

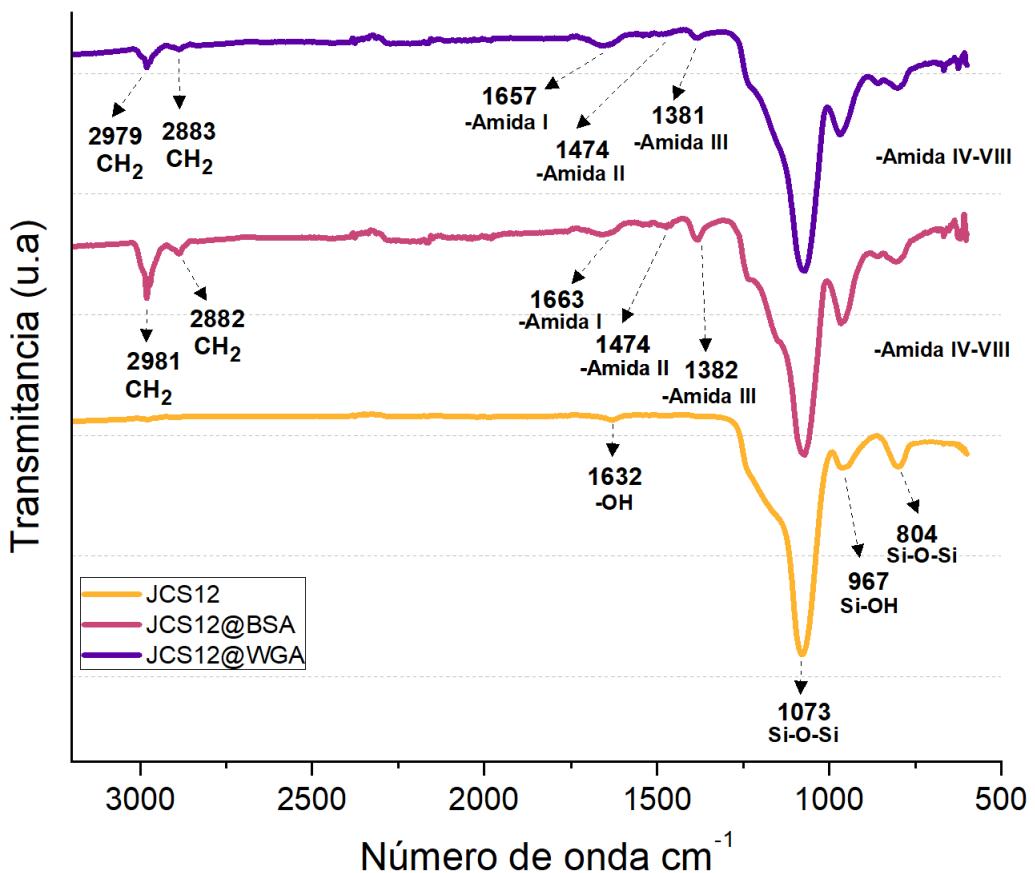


Figura 20. Espectro FTIR de nanopartículas JCS12 nativas y bioconjugadas. El espectro de absorción de las nanopartículas bioconjugadas muestra las bandas correspondientes a los grupos funcionales de la estructura inorgánica (sílice) y de las proteínas.

Además del análisis por FTIR, se examinaron las nanopartículas bioconjugadas mediante MET. A diferencia de las nanopartículas nativas que permitían la visualización de los poros, las bioconjugadas presentan materia orgánica en su superficie, lo que indica la presencia de la corona de proteína en las nanopartículas bioconjugadas con BSA (Figura 21) y con WGA (Figura 22).

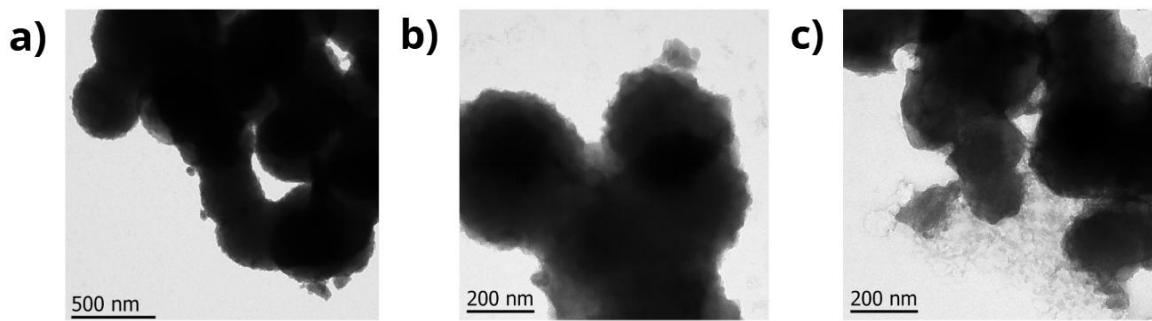


Figura 21. a), b) y c) Imágenes obtenidas por MET de las partículas JCS12 bioconjugadas con BSA (JCS12@BSA) en distintos campos.

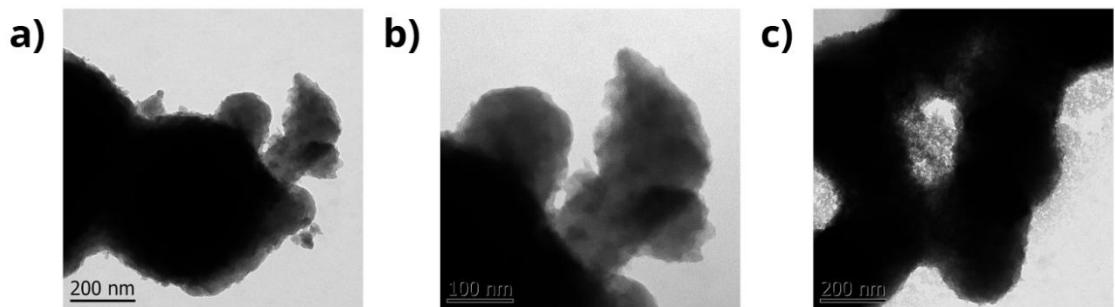


Figura 22. a), b) y c) Imágenes obtenidas por MET de las partículas JCS12 bioconjugadas con WGA (JCS12@WGA) en distintos campos.

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE para confirmar la presencia de proteína en las nanopartículas bioconjugadas. Previo a su análisis en gel de electroforesis, se llevó a cabo la extracción de la corona dura de las nanopartículas bioconjugadas y se cuantificó su concentración mediante el método del ácido bicinchonílico .

La Figura 23 corresponde a la curva patrón que se realizó mediante el ensayo de BCA, en el Cuadro 6 se despejó la ecuación que se obtuvo de la ecuación de la curva patrón de proteínas, $y = 0.3631x + 0.1045$ en función de x, para obtener la concentración de corona dura de proteína presente en las nanopartículas bioconjugadas. De acuerdo a este análisis, las nanopartículas bioconjugadas contenían 0.2354 mg/ml de WGA y 0.1087 mg/ml de BSA.

Una vez que se cuantificó la concentración de corona dura presente en las nanopartículas bioconjugadas se realizó el gel de electroforesis. En la Figura 24 se muestran los resultados. Como puede verse, ambas coronas de proteína corresponden a las proteínas empleadas en la bioconjugación, debido a que muestran las bandas características en los pesos moleculares reportados en la literatura, siendo 18 kDa para la WGA (Rice y Etzler, 1974) y 66 kDa para la BSA (Balkani y col., 2016).

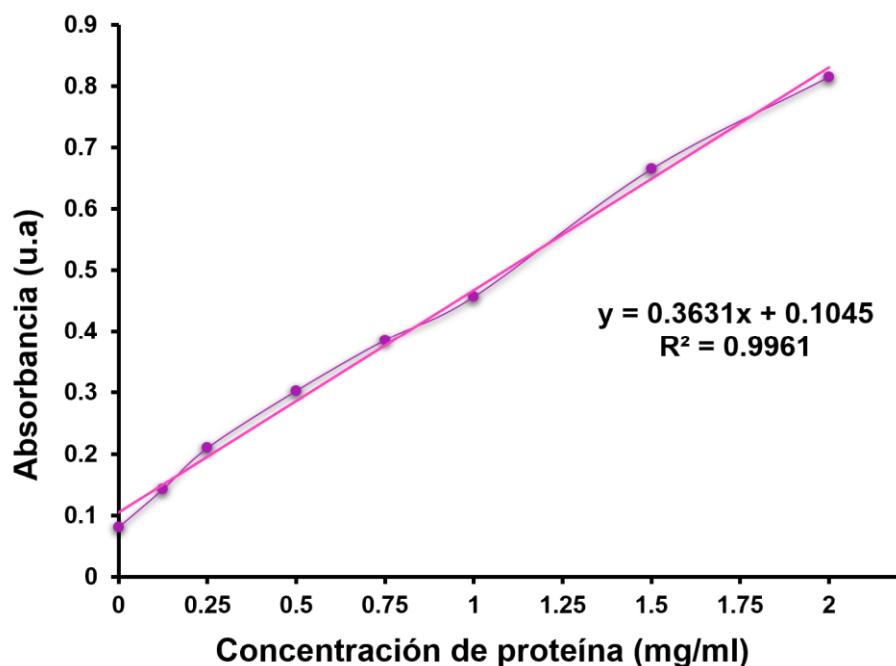


Figura 23. Curva patrón de proteínas obtenida por el método del ácido bicinchonílico (BCA).

Cuadro 6. Concentración de corona dura de proteínas presentes en las nanopartículas JCS12.

| Corona dura de proteína de nanopartículas bioconjugadas | Absorbancia (u.a) | Concentración (mg/ml) |
|---|-------------------|-----------------------|
| JCS12@WGA | 0.189 | 0.2354 |
| JCS12@BSA | 0.143 | 0.1087 |

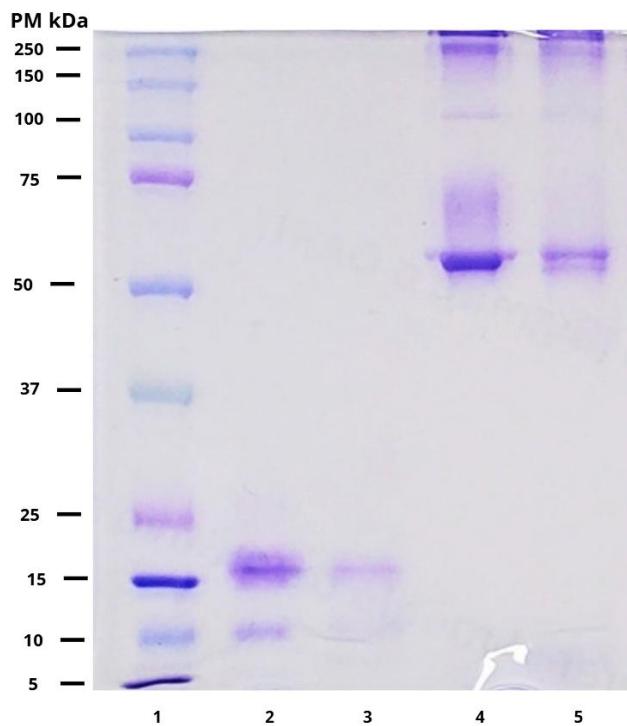


Figura 24. Análisis de proteínas extraídas de la corona dura de nanopartículas funcionalizadas. 1) Escalera de peso molecular, 2) Solución de WGA, 3) Corona dura de nanopartículas bioconjugadas con WGA ,4) Solución de BSA, y 5) Corona dura de nanopartículas bioconjugadas con BSA. Gel de electroforesis revelado con azul de Coomassie.

VI.1.2. Biocompatibilidad de nanopartículas

Para la aplicación biomédica *in vivo* de cualquier tipo de nanomaterial es fundamental evaluar su biocompatibilidad. En el caso de las UCNPs, algunos estudios señalan que pueden presentar citotoxicidad, ya que generan especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) e inducen apoptosis por estrés oxidativo, lo cual depende tanto de la dosis como del tiempo de exposición celular (Li y Liu., 2024).

Sin embargo, se ha reportado que el recubrimiento de las UCNPs con biomoléculas u otros materiales puede mejorar su biocompatibilidad. Por ejemplo, se reportó que UCNPs recubiertas de polietilenimina conjugadas con doxorrubicina, presentaron más del 90 % de viabilidad celular en las líneas celulares L929 y NIH/3T3, ambas líneas celulares de fibroblastos derivadas de ratones. Estas líneas celulares se emplean para pruebas de transfección, toxicidad y estudios de transformación celular (Khan y col., 2024). En otro estudio se incubaron concentraciones crecientes de hasta 125 µg/ml de UCNPs recubiertas con quitosano que mostraron viabilidad en fibroblastos de ratón L929 (Zong y col., 2022). También se ha mencionado que recubrir a las UCNPs con sílice mejora su biocompatibilidad y su eficiencia de carga; por ejemplo, la tasa de supervivencia de las células HSC-4 después de 48 horas de exposición se mantuvo alta aún en una concentración máxima de 1000 µg/ml de UCNPs (Song y col., 2025). En otro estudio se comparó la viabilidad de fibroblastos y queratinocitos expuestos a UCNPs, encontrándose que los queratinocitos redujeron su viabilidad en un 76% y mostraron una captación celular inespecífica, al contrario de las UCNPs recubiertas que exhibieron una menor citotoxicidad y una mejor internalización celular (Guller y col., 2015).

En este trabajo se evaluó la biocompatibilidad de nanopartículas de conversión ascendente recubiertas con sílice y el efecto de su decoración con proteínas.

Se evaluó la biocompatibilidad de nanopartículas JCS12, nanopartículas JCS12@BSA y nanopartículas JCS12@WGA a diferentes concentraciones mediante el ensayo colorimétrico con sales de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio) MTT, para evaluar la viabilidad celular.

Como un primer paso se identificó la densidad celular óptima para las pruebas de biocompatibilidad, estableciendo condiciones de cultivo que permitieran detectar tanto un aumento como una disminución del crecimiento celular. Se procuró evitar tanto densidades demasiado bajas, en las que las diferencias en las tasas de crecimiento eran mínimas, como densidades excesivamente altas, que conducían a una confluencia superior a los niveles aceptables.

Se utilizaron dos líneas celulares: MCF-7, derivada de un adenocarcinoma de tejido mamario, y MCF-12A, procedente de tejido mamario sano, empleada como línea control. La elección de estas líneas celulares respondió al objetivo de evaluar la interacción de las nanopartículas decoradas con aglutinina de germen de trigo en células tumorales, y compararla con su comportamiento en células no tumorales.

Tras realizar los estudios cinéticos se establecieron las cantidades óptimas de células a sembrar en placas de 96 pozos para las pruebas de biocompatibilidad: 3,500 células por pozo para la línea MCF-12A y 8,000 células por pozo para la línea MCF-7. Esta diferencia en la densidad entre las dos líneas se debió a sus distintas velocidades y condiciones de crecimiento.

Las células fueron sometidas a distintos tratamientos con concentraciones de 0.01, 0.03, 0.1 y 0.3 mg/ml de nanopartículas. Estas concentraciones fueron seleccionadas con base en estudios previos, en los que se ha informado que las nanopartículas de sílice no presentan efectos citotóxicos significativos hasta alcanzar una dosis de 0.3 mg/ml (Valdemar-Aguilar y col., 2020).

VI.1.3. El recubrimiento de UCNPs con proteínas disminuye los efectos tóxicos en células epiteliales normales.

Al analizar los datos obtenidos de los experimentos de biocompatibilidad se observó un comportamiento dependiente de la dosis, en el que el aumento de la concentración de nanopartículas se correlacionó con una disminución de la supervivencia relativa de las células frente al tratamiento. Asimismo, la decoración con proteínas en la línea MCF-12A mejoró notablemente la biocompatibilidad de las nanopartículas. En concreto, la supervivencia relativa de las células MCF-12A expuestas a nanopartículas recubiertas con BSA, tras 72 horas de exposición, mostró un porcentaje de densidad óptica del 72.88 % en la dosis más alta (0.3 mg/ml), como se muestra en la Figura 25. Por su parte, las células tratadas con nanopartículas recubiertas con WGA presentaron una supervivencia del 66.35 %. En contraste, las nanopartículas sin recubrimiento alcanzaron un índice de densidad óptica de solo un 49.16 %. Estos resultados coinciden con lo reportado previamente, ya que se ha demostrado que la decoración de nanopartículas con proteínas mejora la biocompatibilidad de las UCNPs (Bilardo y col., 2022). La BSA se utiliza ampliamente en el recubrimiento de nanopartículas debido a su reconocida biocompatibilidad. Diversos estudios han demostrado que su presencia en la superficie de las nanopartículas puede actuar como un factor suplementario para el crecimiento celular (Sun y col., 2024). Por otro lado, también se ha descrito que el recubrimiento con WGA presenta un comportamiento biocompatible. No obstante, este compuesto ha mostrado citotoxicidad selectiva hacia líneas celulares tumorales, como la MCF-7 (Derakhshandeh y col., 2024).

En la Figura 25a se muestran los resultados del ensayo MTT tras 24 horas de exposición de la línea celular MCF-12A a los distintos tratamientos. De acuerdo con el análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados.

En la Figura 25b se presentan los resultados correspondientes a las 48 horas de exposición. En este caso, el análisis estadístico reveló que, a medida que aumenta la concentración de nanopartículas, se incrementan las diferencias entre los tratamientos. A una concentración de 0.3 mg/ml, se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos con JCS12 y JCS12@WGA respecto a JCS12@BSA, lo que sugiere que, a concentraciones elevadas, las nanopartículas interactúan de manera diferencial con las células, según sus propiedades superficiales.

Por último, en la Figura 25c se muestran los resultados obtenidos tras 72 horas de exposición. En este punto, tanto la concentración como el tipo de nanopartícula tuvieron efectos significativos sobre el índice de densidad óptica. Las mayores toxicidades se observaron en las concentraciones de 0.1 mg/ml y 0.3 mg/ml, especialmente con nanopartículas nativas. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con nanopartículas bioconjugadas.

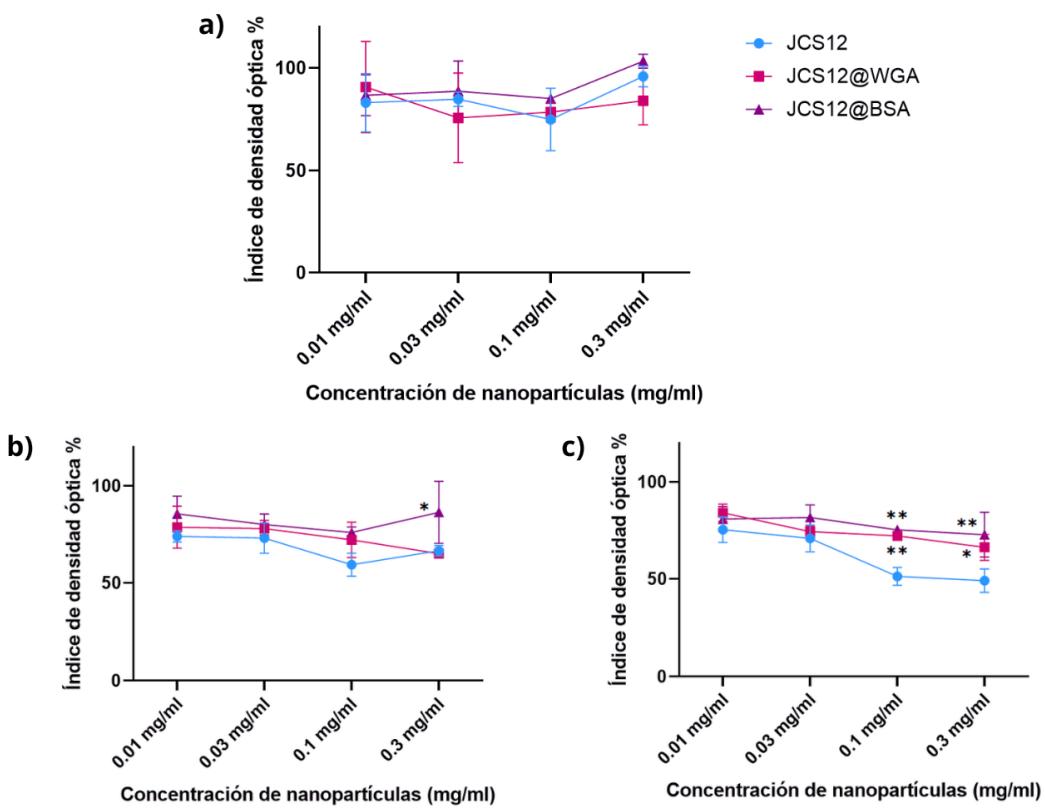


Figura 25. Resultados del ensayo de biocompatibilidad de la línea MCF-12A a diferentes tiempos de exposición. Ensayo colorimétrico MTT. Índice de densidad óptica a) 24 horas de exposición, b) 48 horas de exposición y c) 72 horas de exposición. Los datos son el promedio de 2 experimentos independientes expresados como media \pm SEM. Análisis por ANOVA de dos vías.

* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$

En la Figura 26 se presentan los resultados del ensayo MTT en la línea celular MCF-12A a distintos tiempos de exposición. Tanto el tiempo de exposición como el tipo de nanopartícula mostraron efectos significativos en la respuesta celular. Las diferencias más notables se observaron entre las 48 y 72 horas, destacando

especialmente la respuesta diferencial entre las nanopartículas decoradas y las nativas.

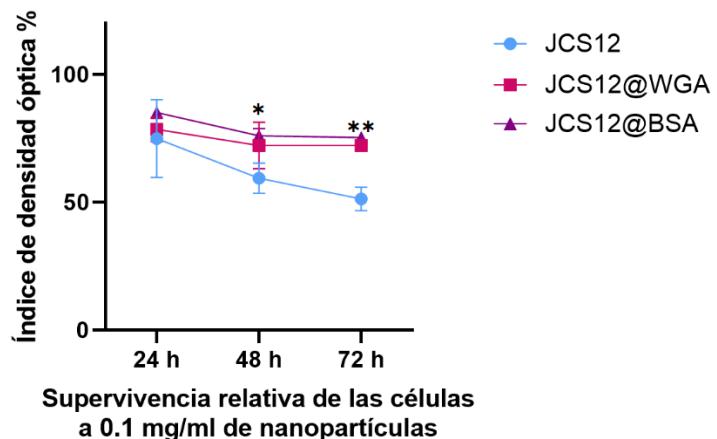


Figura 26. Resultados del ensayo de biocompatibilidad de la línea MCF-12A expuesta a una concentración de 0.1 mg/ml. Ensayo colorimétrico MTT. Índice de densidad óptica del cultivo a distintos tiempos de exposición. Los datos son el promedio de 2 experimentos independientes expresados como media \pm SEM. Análisis por ANOVA de dos vías.

* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$

VI.1.4. El recubrimiento de UCNPs con proteína inerte, y con WGA induce efectos diferenciales en células neoplásicas.

Probablemente, y debido a la selectividad que presenta la aglutinina de germen de trigo (WGA) hacia células con procesos neoplásicos, los resultados de las pruebas de biocompatibilidad en la línea MCF-7 frente a los distintos tratamientos mostraron un comportamiento diferenciado en comparación con la línea MCF-12A. En la Figura 27, las células MCF-7 incubadas con nanopartículas sin decorar, a una concentración de 0.3 mg/ml, presentaron una

densidad óptica del 58.65 % a las 72 horas. Aquellas decoradas con WGA mostraron una supervivencia relativa del 61.80 %, mientras que las recubiertas con BSA alcanzaron un 75.30 % de densidad óptica. Las nanopartículas bioconjugadas con WGA mostraron diferencias significativas respecto al tratamiento con BSA. Estos resultados podrían indicar que las nanopartículas decoradas con WGA ejercen un efecto citotóxico sobre esta línea celular tumoral, lo que concuerda con algunos reportes previos en la literatura. Incluso a bajas concentraciones, la WGA ha demostrado toxicidad frente a células cancerosas, lo que ha motivado su uso frecuente en la decoración de nanopartículas, dada su capacidad para favorecer la selectividad hacia células tumorales (Prabhu y col., 2024).

Aunque estos datos de biocompatibilidad *in vitro* sugieren que las nanopartículas decoradas con WGA tienen afinidad por células tumorales, es necesario emplear otras técnicas de análisis masivos de los cultivos, como citometría de flujo o ICP-OES (Plasma de acoplamiento inductivo-Espectroscopía de emisión óptica) para evaluar el direccionamiento de las nanopartículas JCS12 hacia las células con procesos neoplásicos.

La citometría de flujo es una técnica que permite medir las características físicas y químicas individuales de las células suspendidas en una solución, lo que favorece la medición de parámetros múltiples de manera simultánea. La conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos ha posibilitado la detección y la cuantificación de receptores de la superficie, del citoplasma celular y la detección de procesos bioquímicos (Patiño y col., 2022). Mientras que la espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, por sus siglas en inglés) es una técnica que permite determinar trazas de elementos en diversas matrices (Heinert y col., 2020). Ambas técnicas son capaces de analizar miles de células en una corrida.

En la Figura 27a se presentan los resultados obtenidos tras 24 horas de exposición de las células a diferentes concentraciones de nanopartículas. Los datos indican que el tipo de nanopartícula tuvo un efecto significativo. Según el análisis post hoc mediante la prueba de Tukey, las nanopartículas decoradas con BSA mostraron diferencias significativas en comparación con los demás tratamientos, lo que sugiere que las nanopartículas recubiertas con WGA tienen un comportamiento igual de tóxico que las nanopartículas nativas.

En la Figura 27b se muestran los resultados del ensayo MTT obtenidos a las 48 horas. De acuerdo a los resultados de viabilidad celular, la toxicidad de UCNPs a células MCF-7 puede ser revertida con un recubrimiento de BSA (una proteína inerte), pero no con WGA, molécula reportada por tener una toxicidad intrínseca en células neoplásicas.

Por último, la Figura 27c presenta los resultados del ensayo MTT en la línea celular MCF-7 tras 72 horas de exposición. En este caso, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con JCS12, JCS12@WGA y JCS12@BSA.

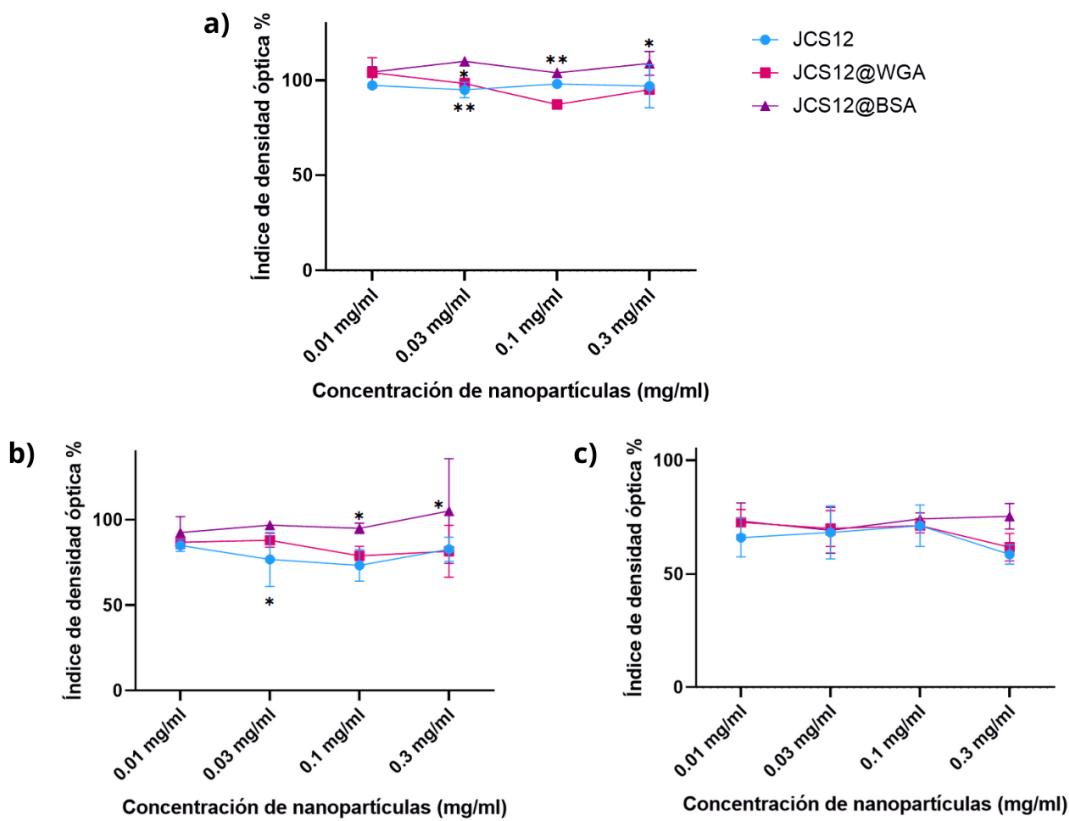


Figura 27. Resultados del ensayo de biocompatibilidad de la línea MCF-7 a diferentes tiempos de exposición. Ensayo colorimétrico MTT. Índice de densidad óptica a) 24 horas de exposición, b) 48 horas de exposición y c) 72 horas de exposición. Los datos son el promedio de 2 experimentos independientes expresados como media \pm SEM. Análisis por ANOVA de dos vías

* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$

En la Figura 28 se presentan los resultados obtenidos tras la exposición de la línea celular MCF-7 a 0.1 mg/ml de nanopartículas durante distintos tiempos de incubación. Se observó un efecto significativo tanto del tiempo de exposición como del tipo de nanopartícula sobre el índice de densidad óptica.

La prueba de Tukey reveló diferencias significativas entre las nanopartículas

decoradas con WGA y las decoradas con BSA a las 24 horas. A las 48 horas se identificaron diferencias significativas entre JCS12 y JCS12@BSA, así como entre JCS12@WGA y JCS12@BSA. Sin embargo, a las 72 horas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos.

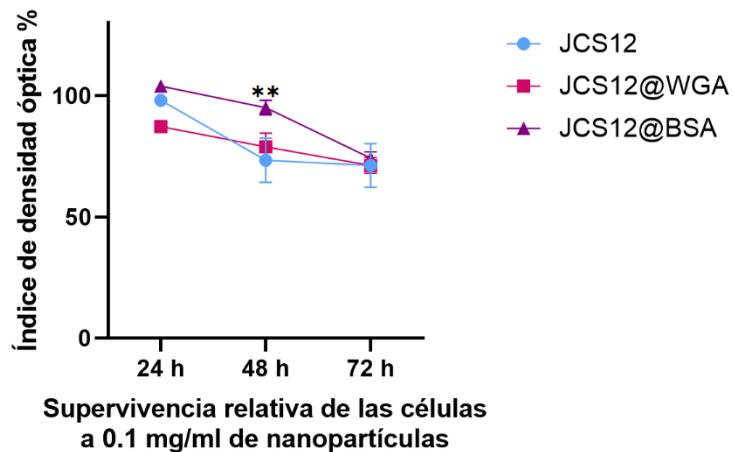


Figura 28. Resultados del ensayo de biocompatibilidad de la línea MCF-7 expuesta a una concentración de 0.1 mg/ml. Ensayo colorimétrico MTT. Índice de densidad óptica del cultivo a distintos tiempos de exposición. Los datos son el promedio de 2 experimentos independientes expresados como media \pm SEM. Análisis por ANOVA de dos vías.

* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$

En general, aunque la decoración con proteínas mejoró la biocompatibilidad, el porcentaje de viabilidad celular sigue siendo inferior al 90 %, valor que ha sido reportado en otros estudios que emplean concentraciones de hasta 2.3 mg/ml de nanopartículas de sílice (Razavi y col., 2020). Esta diferencia podría atribuirse a la naturaleza del tipo de nanopartícula utilizada. En este caso, se están estudiando UCNPs, que, si bien están recubiertas con sílice, presentan propiedades distintas debido a la presencia de iones lantánidos.

Por otro lado, los valores de biocompatibilidad inferiores al 90 % podrían estar asociados a problemas físicos de obstrucción de la respiración celular del cultivo, así como también a la agregación de nanopartículas. Se ha reportado que la interacción entre el medio de cultivo y las nanopartículas puede provocar la agregación de las nanopartículas, a causa de la presencia de grupos silanol desprotonados que interactúan con el pH del medio (Nguyen y col., 2024). Se han descrito los factores principales que influyen en la citotoxicidad de las nanopartículas de sílice, tales como: el método de síntesis, la agregación de nanopartículas, las condiciones experimentales y el método que se emplea para evaluar la citotoxicidad, explicando que las dosis, el tiempo de exposición, el tipo de línea celular en la que se llevan a cabo los ensayos y la presencia de componentes del medio de cultivo, como el suero, pueden afectar la toxicidad de las nanopartículas. Otro factor a considerar es el tipo de estudio, un sistema *in vivo* es más complejo y permite analizar a detalle la relación entre la toxicidad de las nanopartículas con el entorno biológico, además de evitar el problema físico de la evaluación de la citotoxicidad *in vitro*, ya que debido a la sedimentación de nanopartículas en la monocapa celular, aunque la sílice sea biocompatible, el diseño experimental no permite el recambio de medio para evitar la obstrucción de la respiración celular, tal como ocurriría *in vivo* (Miao y col., 2024).

VI.1.5. Ensayos de internalización celular

Tras el análisis de los resultados de biocompatibilidad, se procedió a realizar pruebas de internalización celular de las UCNPs.

Se intentó visualizar la señal lumínica de las UCNPs utilizando un microscopio confocal, considerando que estas nanopartículas no solo presentan luminiscencia al ser excitadas con luz infrarroja, sino que también presentan señal al excitarse con luz ultravioleta. En la Figura 29 se muestran las imágenes confocales obtenidas de la línea MCF-12A expuesta durante 5 horas a una

concentración de 0.05 mg de UCNPs y se puede observar, que no fue posible visualizar la señal de las nanopartículas.

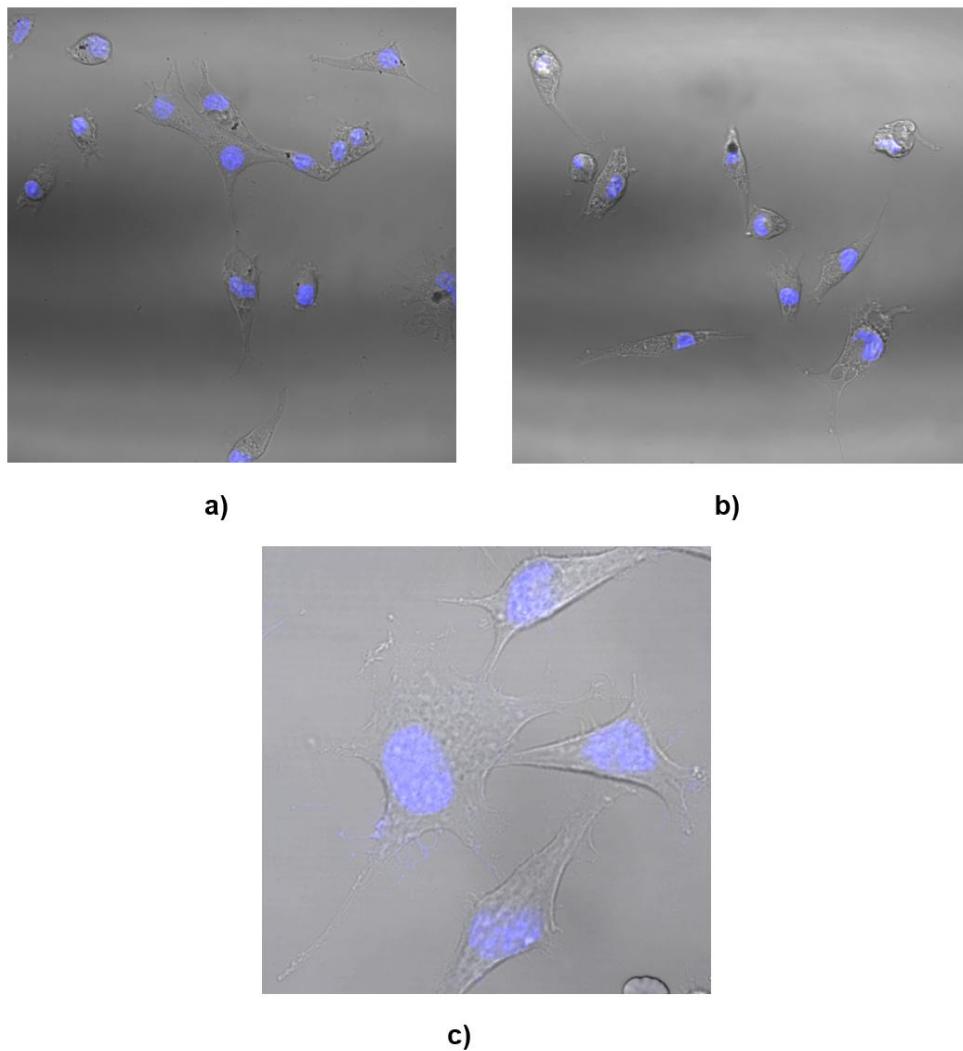


Figura 29. a y b) Imágenes obtenidas por microscopía confocal de células MCF-12A después de 5 horas de exposición a una dosis de 0.05 mg/ml de nanopartículas JCS12. c) Imagen obtenida por microscopía confocal de células MCF-12. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

La luminiscencia de las UCNPs puede lograrse mediante la incorporación de un único ion lantánido; no obstante, el co-dopaje con otros iones lantánidos mejora

notablemente su eficiencia. La síntesis de este tipo de nanopartículas requiere considerar diversos factores, entre los que se encuentra la concentración óptima de los dopantes. Asimismo, para lograr una elevada eficiencia luminiscente, es fundamental que la técnica de síntesis permita un control preciso del tamaño, la morfología y la composición de las partículas (Jethva y col., 2022).

Dado que no se obtuvo señal de luminiscencia en las imágenes adquiridas mediante microscopía confocal, como se muestra en la Figura 29, se procedió a realizar un análisis por espectroscopía de dispersión de energía (EDS, por sus siglas en inglés) de las nanopartículas. Los resultados del análisis EDS se presentan en la Figura 30 y muestran, una falta de homogeneidad en el lote de nanopartículas: en algunas zonas se detectó la presencia de tulio, mientras que en otras no; lo mismo ocurrió con el iterbio. Ambos iones corresponden a los lantánidos responsables de la luminiscencia de estas nanopartículas.

Esta heterogeneidad en la composición elemental, concretamente en cuanto a la distribución de los lantánidos, podría explicar la baja luminiscencia observada. Dicha falta de uniformidad resulta inadecuada para aplicaciones de bioimagen que requieren análisis puntuales a nivel celular. Por esta razón, no se pudo visualizar la internalización celular de las nanopartículas en las pruebas de microscopía.

Para aplicaciones de bioimagen, las UCNPs deben dirigirse específicamente hacia células o tejidos diana, donde su presencia permita mejorar el contraste y la sensibilidad de la imagen. Por tanto, se requiere seguir investigando y probando diferentes condiciones que permitan obtener UCNPs homogéneas y con alta eficiencia luminiscente (Jethva y col, 2022).

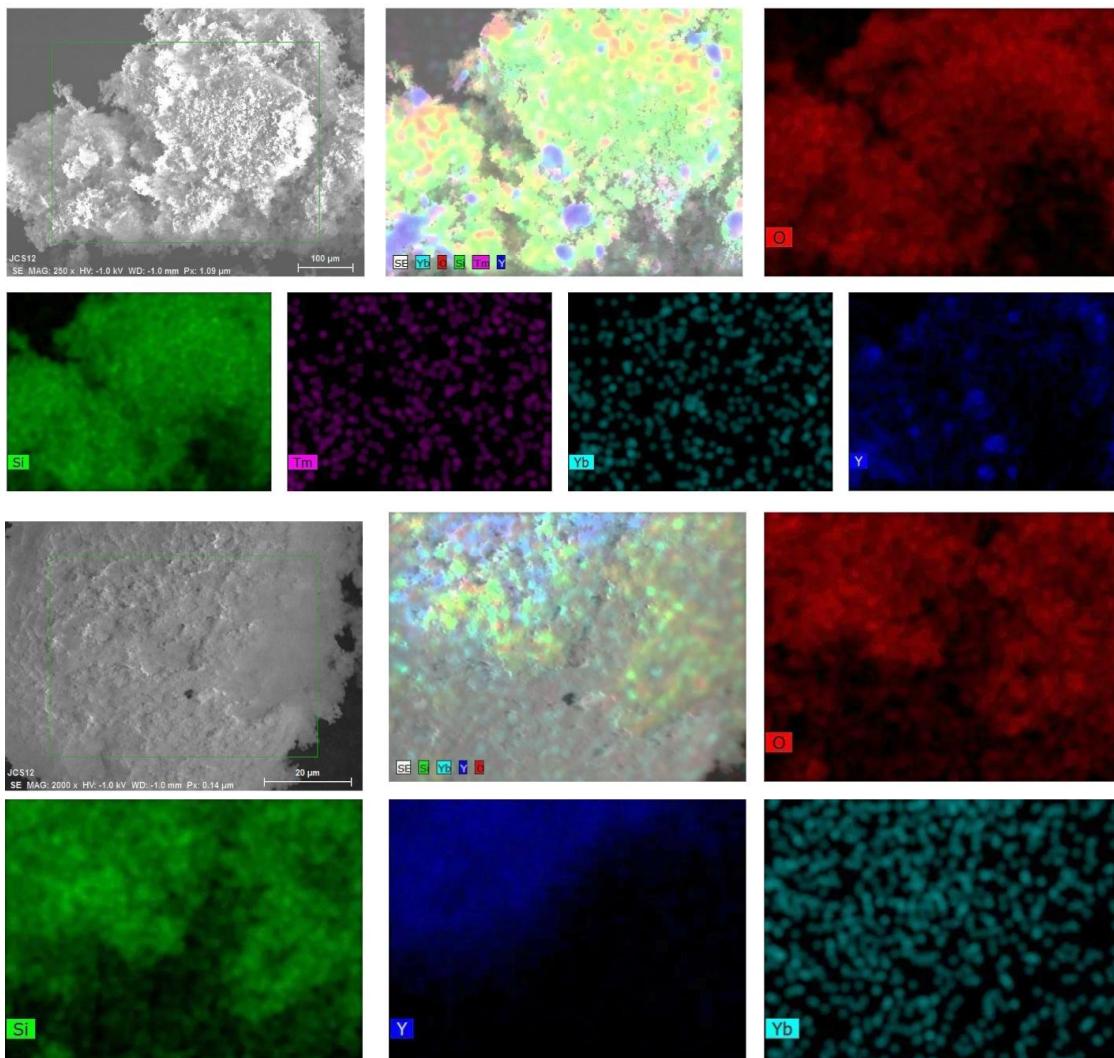


Figura 30. Imágenes obtenidas por mapeo de análisis elemental de las partículas JCS12 nativas. El análisis se realizó en zonas diferentes de las nanopartículas y, los resultados mostraron la falta de homogeneidad de los lantánidos presentes en las nanopartículas.

VII. CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que el recubrimiento de las UCNPs JCS12 mediante fisisorción con biomoléculas como la seroalbúmina bovina (BSA) y la aglutinina de germen de trigo (WGA) fue exitoso, como lo evidenciaron las pruebas de caracterización del material. Las microscopías electrónicas de barrido (SEM) y de transmisión (TEM), junto con el análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), confirmaron la presencia del recubrimiento superficial. Este hallazgo respalda la aplicabilidad de esta técnica de funcionalización para dirigir nanomateriales hacia células o tejidos específicos. En cuanto a los ensayos de biocompatibilidad, las nanopartículas decoradas con BSA mostraron un mayor porcentaje de supervivencia relativa en la línea celular MCF-7, en comparación con los demás tratamientos. En cambio, en la línea MCF-12A no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las nanopartículas decoradas con BSA y las funcionalizadas con WGA, en relación con las nanopartículas sin decorar. Este comportamiento diferencial entre ambas líneas celulares sugiere un posible direccionamiento selectivo de las nanopartículas recubiertas con WGA hacia células tumorales. Dado que no fue posible visualizar la internalización celular ni el direccionamiento de las nanopartículas mediante microscopía confocal, se recomienda el uso de técnicas complementarias como la citometría de flujo o la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Estas metodologías permiten un análisis individualizado de las células, lo que proporciona una evaluación más precisa y cuantitativa de la interacción entre las nanopartículas y las células. Por último, en relación con la falta de homogeneidad en la distribución de los lantánidos en las nanopartículas JCS12, es importante considerar que dicha variabilidad puede afectar directamente su aplicación. En el caso de aplicaciones en bioimagen, es fundamental asegurar durante la síntesis de las nanopartículas la homogeneidad en el dopado de las mismas, ya que todas deben emitir con la misma intensidad y luminiscencia para garantizar resultados confiables y reproducibles.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abrantes-Coutinho, V. E., Santos, A. O., Moura, R. B., Pereira-Junior, F. N., Mascaro, L. H., Morais, S., & Oliveira, T. M. (2021). Systematic review on lectin-based electrochemical biosensors for clinically relevant carbohydrates and glycoconjugates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 112148.
- Adamczyk, B., Tharmalingam, T., & Rudd, P. M. (2012). Glycans as cancer biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(9), 1347-1353.
- Baig, N., Kammakakam, I., & Falath, W. (2021). Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials advances*, 2(6), 1821-1871.
- Bainor, A., Chang, L., McQuade, T. J., Webb, B., & Gestwicki, J. E. (2011). Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Analytical Biochemistry*, 410(2), 310-312.
- Balčiūnaitė-Murzienė, G., & Dzikaras, M. (2021). Wheat germ agglutinin—From toxicity to biomedical applications. *Applied Sciences*, 11(2), 884.
- Balkani, S., Shamekhi, S., Raoufinia, R., Parvan, R., & Abdolalizadeh, J. (2016). Purification and characterization of bovine serum albumin using chromatographic method. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(4), 651.
- Baudot, C., Tan, C. M., & Kong, J. C. (2010). FTIR spectroscopy as a tool for nano-material characterization. *Infrared Physics & Technology*, 53(6), 434-438.
- Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 101, 157-170.
- Bilardo, R., Traldi, F., Vdovchenko, A., & Resmini, M. (2022). Influence of surface chemistry and morphology of nanoparticles on protein corona formation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 14(4), e1788.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229-263.
- Bronowicka-Adamska, P., Kaczor-Kamińska, M., Wróbel, M., & Bentke-Imiołek, A. (2024). Differences in nonoxidative sulfur metabolism between normal human breast MCF-12A and adenocarcinoma MCF-7 cell lines. *Analytical Biochemistry*, 687, 115434.

- Comşa, Ş., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147-3154.
- Cortés-Ríos, J., Zárate, A. M., Figueroa, J. D., Medina, J., Fuentes-Lemus, E., Rodríguez-Fernández, M., ... & López-Alarcón, C. (2020). Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Analytical Biochemistry*, 608, 113904.
- Dam, T. K., & Brewer, C. F. (2007). Fundamentals of lectin-carbohydrate interactions. In *Biochemistry of Glycoconjugate Glycans; Carbohydrate-Mediated Interactions* (pp. 397-452). Elsevier.
- Derakhshandeh, K., Ghalei, P. M., Aryaeinejad, S., & Hoseini, S. A. (2024). Wheat germ agglutinin conjugated chitosan nanoparticles for gemcitabine delivery in MCF-7 cells; synthesis, characterisation and in vitro cytotoxicity studies. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 20(1), 167-175.
- Dobie, C., & Skropeta, D. (2021). Insights into the role of sialylation in cancer progression and metastasis. *British Journal of Cancer*, 124(1), 76-90.
- Drake, P. M., Cho, W., Li, B., Prakobphol, A., Johansen, E., Anderson, N. L., & Fisher, S. J. (2010). Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation. *Clinical Chemistry*, 56(2), 223-236.
- Fatima, R., Katiyar, P., & Kushwaha, K. (2025). Recent advances in mesoporous silica nanoparticle: synthesis, drug loading, release mechanisms, and diverse applications. *Frontiers in Nanotechnology*, 7, 1564188.
- Garfin, D. E. (2009). One-dimensional gel electrophoresis. In *Methods in Enzymology* (Vol. 463, pp. 497-513). Academic Press.
- Gautam, A. K., Sharma, D., Sharma, J., & Saini, K. C. (2020). Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 142, 474-483.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827.
- Ghosh, M., Hazarika, P., Dhanya, S. J., Pooja, D., & Kulhari, H. (2023). Exploration of sialic acid receptors as a potential target for cancer treatment: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128415.
- Gupta, A. (2020). Emerging applications of lectins in cancer detection and biomedicine. *Materials Today: Proceedings*, 31, 651-661.

- Guerrero-Pérez, M. O., & Patience, G. S. (2020). Experimental methods in chemical engineering: Fourier transform infrared spectroscopy—FTIR. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98(1), 25-33.
- Guller, A. E., Generalova, A. N., Petersen, E. V., Nechaev, A. V., Trusova, I. A., Landyshev, N. N., ... & Zvyagin, A. V. (2015). Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells. *Nano Research*, 8, 1546-1562.
- Haleem, A., Javaid, M., Singh, R. P., Rab, S., & Suman, R. (2023). Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global Health Journal*, 7(2), 70-77.
- Heinert, M. E. J., Endara, A. D. L. M. G., & Solórzano, H. X. P. (2020). Plasma acoplado inductivamente en espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES). *Recimundo*, 4(4), 4-12.
- Hlaváček, A., Farka, Z., Mickert, M. J., Kostiv, U., Brandmeier, J. C., Horák, D., ... & Gorris, H. H. (2022). Bioconjugates of photon-upconversion nanoparticles for cancer biomarker detection and imaging. *Nature Protocols*, 17(4), 1028-1072.
- Jethva, P., Momin, M., Khan, T., & Omri, A. (2022). Lanthanide-doped upconversion luminescent nanoparticles—Evolving role in bioimaging, biosensing, and drug delivery. *Materials*, 15(7), 2374.
- Jiang, S., Huang, K., Qu, J., Lin, J., & Huang, P. (2021). Cancer nanotheranostics in the second near-infrared window. *View*, 2(1), 20200075.
- Jonkman, J., Brown, C. M., Wright, G. D., Anderson, K. I., & North, A. J. (2020). Tutorial: guidance for quantitative confocal microscopy. *Nature protocols*, 15(5), 1585-1611.
- Karumuri, B. K. R., & Tech, B. (2013). *Metabolic assay-based validation of cell viability to inflammatory stimuli and anti-cancer drugs in normal and tumor brain glia* (Doctoral dissertation, Louisiana Tech University).
- Khan, A., Tripathi, A., Gandhi, M., Bellare, J., & Srivastava, R. (2024). Development of injectable upconversion nanoparticle-conjugated doxorubicin theranostics electrospun nanostructure for targeted photochemotherapy in breast cancer. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 112(9), 1612-1626.

- Kim, D., Kim, J., Park, Y. I., Lee, N., & Hyeon, T. (2018). Recent development of inorganic nanoparticles for biomedical imaging. *ACS Central Science*, 4(3), 324-336.
- Leng, H., Chen, C., Chen, C., Chen, F., Du, Z., Chen, J., ... & Liu, P. (2023). Raman spectroscopy and FTIR spectroscopy fusion technology combined with deep learning: A novel cancer prediction method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 285, 121839.
- Li, G., Zhang, H., & Han, Y. (2023). Applications of Transmission Electron Microscopy in Phase Engineering of Nanomaterials. *Chemical Reviews*, 123(17), 10728-10749.
- Li, P., & Liu, Z. (2024). Glycan-specific molecularly imprinted polymers towards cancer diagnostics: merits, applications, and future perspectives. *Chemical Society Reviews*.
- Lino, C., Barrias, S., Chaves, R., Adega, F., Martins-Lopes, P., & Fernandes, J. R. (2022). Biosensors as diagnostic tools in clinical applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1877(3), 188726.
- Liu, B., Bian, H. J., & Bao, J. K. (2010). Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer letters*, 287(1), 1-12.
- Loo, J. F. C., Chien, Y. H., Yin, F., Kong, S. K., Ho, H. P., & Yong, K. T. (2019). Upconversion and downconversion nanoparticles for biophotonics and nanomedicine. *Coordination Chemistry Reviews*, 400, 213042
- Mahmoudi, M., Bertrand, N., Zope, H., & Farokhzad, O. C. (2016). Emerging understanding of the protein corona at the nano-bio interfaces. *Nano Today*, 11(6), 817-832.
- Mancera, G. G., & Amaya, M. E. N. (2024). *Principios de microscopía electrónica de barrido y microanálisis por rayos X característicos*. UNAM, Facultad de Química.
- Miao, C., Jia, P., Luo, C., Pang, J., Xiao, L., Zhang, T., ... & Sun, Z. (2024). The size-dependent in vivo toxicity of amorphous silica nanoparticles: A systematic review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 271, 115910.
- Na, J., Kim, G., Kang, S. H., Kim, S. J., & Lee, S. (2021). Deep learning-based discriminative refocusing of scanning electron microscopy images for materials science. *Acta Materialia*, 214, 116987.

- Nanoscience Instruments. (n.d.). Nanoscience Instruments. <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/>
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Sajjadi, M., & Issaabadi, Z. (2019). An introduction to nanotechnology. In *Interface science and technology* (Vol. 28, pp. 1-27). Elsevier.
- Nga, N. T. H., Ngoc, T. T. B., Trinh, N. T. M., Thuoc, T. L., & Thao, D. T. P. (2020). Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Analytical biochemistry*, 610, 113937.
- Nguyen, T. T., Nguyen, H. N., Nghiem, T. H. L., Do, X. H., To, T. T., Do, T. X. P., ... & Hoang, T. M. N. (2024). High biocompatible FITC-conjugated silica nanoparticles for cell labeling in both in vitro and in vivo models. *Scientific Reports*, 14(1), 6969.
- Padrón, M. (2024). Nanopartículas luminiscentes de $Y_2O_3 : Yb, Er$ embebidas en esferas mesoporosas de SiO_2 . Universidad Nacional Autónoma de México.
- Patiño Uriostegui, L. N., & Velazquez Cruz, R. (2022). Fundamentos de citometría de flujo. *Mensaje Bioquímico*, 46, 67-77.
- Prabhu, M. R., Colaco, V., Bandi, S. P., Hebbar, S., Datta, D., Dhas, N., ... & Madhyastha, H. K. (2024). Demystifying Multipronged Approaches of Wheat Germ Agglutinin-Mediated Drug Delivery, Targeting, and Imaging: An Explicative Review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 106307.
- Razavi, M., Primavera, R., Kevadiya, B. D., Wang, J., Ullah, M., Buchwald, P., & Thakor, A. S. (2020). Controlled nutrient delivery to pancreatic islets using polydopamine-coated mesoporous silica nanoparticles. *Nano letters*, 20(10), 7220-7229.
- Reyes Rocha, B. L., & Gallegos-Torres, R. M. (2009). Lectinas Vegetales: Una alternativa terapéutica para el cáncer. *Desarrollo Científico de Enfermería*, 19(5), 179-82.
- Rice, R. H., & Etzler, M. E. (1974). Subunit structure of wheat germ agglutinin. *Biochemical and biophysical research communications*, 59(1), 414-419.
- Rizvi, A., Mulvey, J. T., Carpenter, B. P., Talosig, R., & Patterson, J. P. (2021). A close look at molecular self-assembly with the transmission electron microscope. *Chemical Reviews*, 121(22), 14232-14280.

- Rodrigues, E., & Macauley, M. S. (2018). Hypersialylation in cancer: modulation of inflammation and therapeutic opportunities. *Cancers*, 10(6), 207.
- Samhadaneh, D. M., Mandl, G. A., Han, Z., Mahjoob, M., Weber, S. C., Tuznik, M., ... & Stochaj, U. (2020). Evaluation of lanthanide-doped upconverting nanoparticles for in vitro and in vivo applications. *ACS Applied Bio Materials*, 3(7), 4358-4369.
- Segeritz, C. P., & Vallier, L. (2017). Cell culture: Growing cells as model systems *in vitro*. In *Basic science methods for clinical researchers* (pp. 151-172). Academic Press.
- Shannahan, J.H. (2016). Nanoparticle–Biocorona. In: Bhushan, B. (eds) Encyclopedia of Nanotechnology. Springer, Dordrecht.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-9780-1_100903
- Shihan, M. H., Novo, S. G., Le Marchand, S. J., Wang, Y., & Duncan, M. K. (2021). A simple method for quantitating confocal fluorescent images. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 25, 100916.
- Skloot, R. (2017). *The immortal life of Henrietta Lacks*. Broadway Paperbacks.
- Smith, P. E. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Song, S., Sun, X., Wang, Y., Wang, M., Shi, Z., Sun, D., ... & Wang, C. (2025). Sodium alginate hydrogel loaded with upconversion nanoparticles and magnesium ions enhances bone regeneration and photodynamic tumor therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 16, 1543678.
- Sun, X., & Kou, B. (2024). Biocompatibility and potential anticancer activity of gadolinium oxide (Gd₂O₃) nanoparticles against nasal squamous cell carcinoma. *BMC Biotechnology*, 24(1), 53.
- Terpugov, E. L. (2020). Fourier Transform Infrared Emission Spectroscopy in the Study of Biological Molecules. *Biophysics*, 65(1), 1-11.
- Valdemar-Aguilar, C. M., Manisekaran, R., Avila, R., Compeán-García, V. D., Nava-Mendoza, R., & Lopez-Marin, L. M. (2020). Pathogen associated molecular pattern-decorated mesoporous silica—A colloidal model for studying bacterial-host cell interactions. *Biointerphases*, 15(4).

- Vallet-Regí, M., Schüth, F., Lozano, D., Colilla, M., & Manzano, M. (2022). Engineering mesoporous silica nanoparticles for drug delivery: where are we after two decades?. *Chemical Society Reviews*, 51(13), 5365-5451.
- Visalakshan, R., González García, L. E., Benzigar, M. R., Ghazaryan, A., Simon, J., Mierczynska-Vasilev, A., ... & Vasilev, K. (2020). The influence of nanoparticle shape on protein corona formation. *Small*, 16(25), 2000285.
- Wu, L., Deng, Q., Isah, M. B., Dang, M., & Zhang, X. (2024). Development and evaluation of an immunoassay for the quantification of N-acetylneurameric acid (Neu5Ac) in foods and biosamples. *Food Chemistry*, 461, 140929.
- Yan, H., Dong, J., Huang, X., & Du, X. (2021). Protein-gated upconversion nanoparticle-embedded mesoporous silica nanovehicles via diselenide linkages for drug release tracking in real time and tumor chemotherapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(24), 29070-29082.
- Zong, B., Li, X., Xu, Q., Wang, D., Gao, P., & Zhou, Q. (2022). Enhanced eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by quaternized chitosan-coated upconversion nanoparticles for photodynamic therapy in persistent endodontic infections. *Frontiers in Microbiology*, 13, 909492.

IX. ANEXOS

IX.1. Dictamen de bioética



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA



C.U., Querétaro, enero 15, 2025
No. de oficio. CBQ25/003

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Dra. Luz María López Marín

Investigadoras responsables

Joanna Ramírez Ramírez

Estudiante responsable

Dr. Pedro Salas Castillo

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez

Dra. Minerva Ramos Gómez

Colaboradores

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de memorias de trabajo titulado **“Bioconjugación de nanopartículas luminiscentes con aglutinina de germen de trigo”**, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **exento de dictamen ético** debido a que el proyecto no incluye estudios con animales de experimentación ni sujetos humanos.

Cabe mencionar que ningún integrante del Comité declaró conflicto de interés para la evaluación del protocolo de investigación. Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Iza Fernanda Pérez Ramírez

Presidente

Comité de Bioética de la Facultad de Química

Universidad Autónoma de Querétaro



CRECER EN LA
DIVERSIDAD

facquim@uq.mx

442 192 12 00 EXT. 5501 y 5505

Centro Universitario, Cerro de los Campanos s/n,
Santiago de Querétaro, Qro. México. C.P. 76010.