

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROAPOPTÓTICA DE  
NANOPARTÍCULAS DE ORO CON EXTRACTOS DE *Annona  
cherimola* EN CÉLULAS HEPG2"**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**MARÍA FERNANDA ROMERO VIZCAYA**

**DIRIGIDA POR:**

**DRA. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023**



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROAPOPTÓTICA DE  
NANOPARTÍCULAS DE ORO CON EXTRACTOS DE  
Annona cherimola EN CÉLULAS HEPG2

por

María Fernanda Romero Vizcaya

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons](#)  
[Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0](#)  
[Internacional.](#)

**Clave RI:** FQLIN-267703



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
PROAPOPTÓTICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO  
CON EXTRACTOS DE *Annona cherimola* EN  
CÉLULAS HEPG2”

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

MARÍA FERNANDA ROMERO VIZCAYA

DIRIGIDA POR:

DRA. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SINODALES

DRA. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

DIRECTOR

---

MC. ALMA DELIA BERTADILLO JIOTE

SINODAL

---

MIM. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ

SINODAL

---

DRA. MIRIAM R. ESTÉVEZ GONZÁLEZ

SINODAL

---

*A mis padres, por enseñarme el verdadero significado de amor.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Universidad Autónoma de Querétaro por la formación en mi preparación profesional.

Al proyecto FONDEC-2021-UAQ y al Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de colaborar con ustedes.

A mis padres; Beatriz y Fernando, y hermanos; Mauricio y María José les agradezco de corazón por ser mi fuente inagotable de inspiración y apoyo durante toda mi carrera académica. Su dedicación y sacrificio han sido ejemplares, siempre brindándome las herramientas y oportunidades para crecer y alcanzar mis metas.

A la Dra. Angelina Rodríguez Torres por transmitirme todos sus conocimientos e instituirme en cada etapa de este trabajo. Gracias por todos sus consejos desde el primer día. Gracias por su cariño.

Un agradecimiento especial a la M. Alma Delia, MIM. David Gustavo y Dra. Miriam por sus revisiones y correcciones en esta tesis.

A los amigos que conocí en esta gran etapa; Ame, Gabriel, Vale, Chyntia, Martina, Alma, Gus y Edwin. Gracias por compartir su conocimiento, por responder a mis dudas y sobre todo por llevar este proceso más llevadero.

También quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis grandes amigos químicos; Montse, Fer, Xime, Nat, Alexa, Caro, Odalis, Guadalupe, Rebe, Moni, Julia, Blanca, Juan, Edson, Jorge, Neri, Diego, Abraham, Néstor, Joaquín y Sergio. Durante toda mi licenciatura, fueron mi apoyo incondicional para culminar mis estudios, gracias por todas las aventuras que compartimos juntos.

Por último, a mis queridas roomies; Fer, Katya, Emma, Luisa, Ale, Lupita, Fifi, Charles, Tornel, Alo, Tania y Fati, les agradezco de todo corazón por ser mi refugio y lugar seguro cuando me encontraba lejos de casa, ha sido un placer vernos crecer juntas y compartir esta experiencia única en la vida.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURA	v
RESUMEN	
I. ANTECEDENTES	1
I.1 Cáncer	1
I.2 Cáncer de Hígado	2
I.2.1 Tratamiento para cáncer de hígado.	5
I.3 Muerte celular	6
I.4 Annona cherimola	9
I.5 Nanotecnología	12
II. HIPÓTESIS	15
III. OBJETIVOS	16
III.1 General	16
III.2 Específicos	16
IV. METODOLOGÍA	16
IV.1 Materiales.	17
IV.2 Métodos	17
IV.2.1 Extractos enriquecidos en acetogeninas de Annona cherimola.	17
IV.2.2 Elaboración de AuNps-Ch.	17
IV.2.3 Ensayos fisicoquímicos del extracto de Annona cherimola y de AuNps-Ch.	18
IV.2.3.1 Determinación de fenoles totales.	18
IV.2.3.2 Obtención de potencial Z.	18
IV.2.3.3 Análisis del tamaño de partícula.	19
IV.2.4 Cultivo celular.	19

IV.2.5	Ensayos de viabilidad	19
IV.2.6	Tratamientos experimentales.	20
IV.2.7	Extracción de proteínas	21
IV.2.7.1	Cuantificación de muestra proteica.	21
IV.2.7.2	Preparación de muestras con extractos proteicos	21
IV.2.8	Electroforesis de gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.	22
IV.2.9	Transferencia húmeda.	22
IV.2.10	Evaluación de marcadores apoptóticos por inmunodetección de fase sólida.	23
IV.2.11	Bioseguridad y aspectos bioéticos.	23
IV.2.12	Análisis estadístico.	24
IV.3	Diseño experimental.	25
V.	RESULTADOS	26
V.1	Extracción de acetogeninas.	26
V.2	Elaboración de AuNps-Ch.	26
V.3	Ensayos fisicoquímicos de las AuNps-Ch y Ext-Ch	26
V.3.1	Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.	26
V.3.2	Cuantificación de AuNps-C	28
V.3.3	Caracterización mediante Uv-Vis de AuNps-Ch	29
V.3.4	Tamaño de nanopartícula y potencial Zeta	30
V.4	Ensayos de viabilidad celular mediante azul de tripano	33
V.5	Evaluación de marcadores apoptóticos.	36
VI	DISCUSIÓN	39
VII	CONCLUSIONES	46
VIII	BIBLIOGRAFIA	47

## **ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro	Página
Cuadro 1. Clasificación del cáncer de hígado (AJCC, 2022)	5
Cuadro 2. Tratamientos experimentales.	22
Cuadro 3. Determinación de la concentración del ExtCh y AuNps-Ch	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estructura general de las acetogeninas.	12
Figura 2. Diagrama de diseño experimental.	27
Figura 3. Curva de calibración de fenoles totales.	29
Figura 4. Gráfica del análisis termogravimétrico de AuNps-Ch.	31
Figura 5. Espectro Uv-Vis de las AuNps-Ch.	32
Figura 6. Histograma de tamaño de nanopartícula en agua.	34
Figura 7. Histograma del análisis de tamaño de partícula en medio de cultivo	35
Figura 8. Ensayo de viabilidad celular.	37
Figura 9. Determinación de la concentración letal media de AuNps-Ch en HepG2	38
Figura 10. Análisis de la activación de caspasa 9 en células HepG2	40

## **RESUMEN**

El cáncer, es una patología causada por alteraciones en el genoma de las células, produciendo modificaciones en la síntesis o función de proteínas, mismas que alterar procesos como: proliferación, metástasis y apoptosis. Uno de los cánceres con mayor mortalidad para el ser humano, es el de hígado. El tratamiento más usado para este cáncer es la quimioterapia. No obstante, los efectos secundarios indeseables son muy negativos en el paciente. Por lo que se han realizado distintas propuestas terapéuticas para poder minimizarlos, una de ellas es el uso de extractos de plantas como agentes terapéuticos. Los extractos obtenidos de *Annona cherimola* han sido unos de los más estudiadas por su particular composición de fitoquímicos, siendo las acetogeninas las moléculas con mayor concentración y variedad. Estas moléculas han mostrado tener una importante actividad antitumoral, antiparasitarias y antioxidantes. Sin embargo, por sus características fisicoquímicas, es difícil mantener su actividad y estabilidad, por lo que se han buscado vehículos para mantener sus propiedades y mejorar su distribución. El anclar molecularmente estos extractos a nanopartículas de oro es una alternativa plausible, ya que estos nanomateriales poseen excelentes características de biocompatibilidad y ópticas, con capacidad para cargar compuestos, lo que las posiciona como vehículos idóneos para la dosificación de principios activos. Por lo tanto, en este proyecto se diseñaron unas nanopartículas de oro sintetizado por método verde, utilizando como agente reductor extractos de *Annona cherimola* al que se le denominó (AuNps-Ch), a las que se les evaluó su efecto citotóxico como inductor de apoptosis en células HepG2 mediante inmunodetección en fase sólida. Los resultados obtenidos arrojan datos muy prometedores, ya que observamos que, en ensayos de viabilidad, que las células HepG2 son más susceptibles a morir que las células de origen no tumoral. Aunado a ello, observamos la activación de caspasa 9 en las células HepG2, lo que indica el inicio de la inducción de la apoptosis por la vía intrínseca.

## **I. ANTECEDENTES**

### **I.1 Cáncer**

El cáncer es un término utilizado para aludir a un conjunto de enfermedades que tiene como factor común el crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo, con potencial de diseminación a cualquier otra parte del cuerpo (OMS., 2022).

La etiología del cáncer no es única, ya que se deriva de distintas modificaciones a nivel genético. Estas modificaciones están asociadas a un aumento, pérdida o mutación en la secuencia nucleotídica, teniendo un origen hereditario o espontáneo, confiriéndole a las células la capacidad de producir variantes proteicas que alteran procesos celulares como: a) Muerte celular, al evadir la eliminación regulada de las células, b) Metástasis, favoreciendo la capacidad de permear a vasos sanguíneos o linfáticos, viajar a través de la circulación y lograr que las células cancerígenas crezcan en otro órgano o tejido, c) Proliferación, al tener una división excesiva y descontrolada, entre otros (Montes y col., 2013; OMS., 2021, Rady y col., 2018; Runel G., 2021).

El tiempo y la intensidad de exposición a factores de riesgo potencian modificaciones en el ADN. Algunos de estos factores son: el aumento en la expectativa de vida, la sobreexposición a contaminantes ambientales, aditivos en alimentos como conservadores y colorantes, la alteración en la capa de ozono, que aumenta la penetrabilidad de la radiación solar, etc. Todos ellos, han aumentado significativamente en los últimos años, asociados al estilo de vida, por lo tanto, han incrementado los casos de esta patología posicionando al cáncer en el 2022 como la tercera causa de muerte a nivel mundial, solo debajo de enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus (Latournerie y col., 2012; Rady y col., 2018, OMS., 2022).

De acuerdo a los últimos reportes de la OMS, los tipos de cáncer que causan mayor mortalidad en seres humanos son: el de mama, pulmonar, colorrectal, próstata y

hepático. Este último presenta un reto para la investigación actual, debido al rápido deterioro en la calidad de vida de los pacientes y a la baja efectividad de los tratamientos farmacológicos disponibles (OMS., 2022).

## I.2 Cáncer de Hígado

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo, está ubicado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, debajo del diafragma y encima del estómago, el riñón derecho y los intestinos (Feng y col., 2021). Sus funciones son producir bilis y metabolizar todos los nutrientes que requiere el cuerpo (Motola-Kuba y col., 2016).

El hígado consta de dos lóbulos principales, el derecho y el izquierdo, los cuales se integran por miles de lobulillos. Estos lobulillos histológicamente están formados por: las células de Kupffer que tienen una función inmunológica, las células de Ito que almacenan vitaminas, las células ductales que le dan estructura a los conductos y los hepatocitos que realizan el metabolismo de nutrientes, fármacos y sustancias tóxicas (Reig, 2021).

Las enfermedades hepáticas más comunes están asociadas a las alteraciones funcionales de los hepatocitos. Dentro de los agentes causales de estas patologías están, la sobreexposición a compuestos tóxicos como fármacos, aditivos químicos en los alimentos o componentes de la dieta, que al ser consumidos en exceso como el alcohol puede desarrollar cirrosis hepática, misma que podría degenerar a cáncer hepático (Feng y col., 2021).

Existen otros causales de cáncer hepático como, infección por los virus de la hepatitis B y C, así como la acumulación de mutaciones esporádicas en el genoma de las células hepáticas que propician en un primer paso la aparición de células malignas y posteriormente originarán tumores, mismos que podrían desarrollar capacidad metastásica y desencadenar en cáncer hepático (Cisneros-Garza, 2022).

Existen muchas clasificaciones del cáncer, la más común es, primario y secundario. El primario se define como el tumor original o el primero en el cuerpo. Las células de este cáncer pueden diseminarse a otras regiones del mismo órgano o hacia órganos

vecinos generando tumores secundarios cuyas células ya tienen capacidad metastásica (NIH, 2022).

El cáncer de hígado más común es el carcinoma hepatocelular que representa el 90% del total de casos registrados y es el segundo tumor maligno más letal (Cisneros-Garza, 2022).

La alta tasa de mortalidad del carcinoma hepatocelular se relaciona con una detección tardía, debido a que en sus fases iniciales son asintomáticas. Hasta que se encuentra en etapas avanzadas y se ha diseminado a órganos adyacentes, es que los síntomas comienzan a aparecer. Evidenciando una pérdida de peso repentina, dolor en la parte alta del abdomen, ictericia y heces blancas (Sala, 2005).

Para poder diagnosticar el cáncer de hígado es necesario realizar exámenes que demuestren la presencia de tumores malignos en el órgano. Para ello se realizan estudios de laboratorio e imagen. Los más comunes son la ecografía y la resonancia magnética, que muestran imágenes del órgano con el fin de encontrar la presencia del tumor. Otras técnicas se basan en la identificación de marcadores tumorales, que son sustancias que producen las células dañadas y se analizan en la propia célula o son liberadas al torrente sanguíneo que es donde se detectan. El estudio más utilizado es el análisis de una biopsia del tejido para determinar si este es maligno (AJCC, 2022).

Determinar el estadio del cáncer una vez diagnosticado, es crucial para determinar la idoneidad entre los posibles tratamientos a seguir, intentando mejorar el pronóstico y calidad de vida del paciente. La estadificación más común es el sistema TNM donde se toman en cuenta tres nomenclaturas de información: la extensión del tumor (T), la propagación a los nódulos linfáticos adyacentes (N) y la propagación metastásica a sitios distantes (M). Los números y las letras después de la T, N y M proporcionan información más detallada de cada uno de estos estratos como se muestra en el Cuadro 1. La estadificación va del I al IV, entre más bajo sea el número menor ha sido la propagación (Cofre y col., 2017).

Cuadro 1. Clasificación del cáncer de hígado (AJCC, 2022)

<b>Etapa</b>	<b>Agrupación por etapas</b>	<b>Descripción</b>
IA	T1a	Un solo tumor de 2 cm o menor que no ha crecido a los vasos sanguíneos.
	N0	No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes.
	M0	No se ha propagado a sitios distantes.
IB	T1b	Un solo tumor de más de 2 cm que no ha crecido a los vasos sanguíneos.
	N0	No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes.
	M0	No se ha propagado a sitios distantes.
II	T2	Un solo tumor que mide más de 2 cm y que ha crecido hacia los vasos sanguíneos, o más de un tumor que no mida más de 5 cm.
	N0	No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes.
	M0	No se ha propagado a sitios distantes.
III A	T3	Más de un tumor que mida más de 5 cm de ancho.
	N0	No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes.
	M0	No se ha propagado a sitios distantes.

		T 4	Hay al menos un tumor que ha crecido hacia una vena grande del hígado
		N0	No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes.
		M0	No se ha propagado a sitios distantes.
		T 1,2,3,4	Un solo tumor o muchos tumores de cualquier tamaño.
		N1	Se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes.
		M0	No se ha propagado a sitios distantes.
		T 1,2,3,4,5	Un solo tumor o varios de diferentes tamaños
		N0 y N1	Se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes.
		M1	Se ha propagado a sitios distantes.
IIIB			
IV A			
IVB			

### I.2.1 Tratamiento para cáncer de hígado.

Para tratar el carcinoma hepatocelular se utilizan terapias solas o combinadas. Entre las más comunes se encuentran: 1) Cirugía, en donde se extirpa el tumor y parte del tejido sano circundante, 2) Inyección percutánea de etanol, que se basa en inyectar alcohol en el tumor hepático, 3) Radioterapia, que es el uso de radiaciones ionizantes en la zona afectada, 4) Inmunoterapia, que tiene como propósito la administración de medicamentos para estimular al propio sistema inmune y así atacar al tumor cancerígeno y 5) La quimioterapia, que es un tratamiento con distintas mezclas de medicamentos que inducen la muerte de las células (Ferreiro y col., 2020; Rodríguez-Galindo y col., 2000). La quimioterapia es la terapia más utilizada actualmente. Su

mecanismo de acción se basa en provocar una alteración celular actuando sobre una o varias fases del ciclo celular, modificando los mecanismos de control de la proliferación y muerte celular (Feng y col., 2021; Ferreiro y col., 2000; Schirrmacher, 2019). Sin embargo, la quimioterapia tiene importantes limitaciones como, ser poco específica ya que sus efectos no distinguen entre células sanas y cancerígenas. Aunado a ello se ha descrito que, con el tiempo, este tratamiento genera resistencia a los medicamentos neutralizando los efectos deseados, manteniendo los efectos adversos severos como: la supresión de la médula ósea, perdida de cabello, lesiones gastrointestinales, mareo y vómito (Feng y col., 2021).

Para poder contrarrestar estos efectos adversos se han buscado alternativas que mejoren la especificidad de los fármacos (Hong Z y col., 2021). Sin embargo, alcanzar estas características idóneas en cualquier tratamiento para el cáncer no ha sido fácil, debido a que su etiología y los procesos celulares afectados son muy diversos. Por lo que, específicamente la evasión a la muerte celular y la hiperseñalización hacia la proliferación, acaparan los esfuerzos en investigación (Moghadamtousi, 2014).

### I.3 Muerte celular

La muerte celular es un proceso que casi siempre se asocia con una condición patológica, sin embargo, se activa más comúnmente en condiciones fisiológicas. Este proceso es necesario para mantener la homeostasis de los organismos. Su activación puede darse por varios mecanismos, como consecuencia de alteraciones acumuladas en el ADN con incapacidad de reparación o por el propio envejecimiento celular, asociado a una ineficiencia funcional de varias enzimas. También se presenta ante contingencias espontáneas exógenas, como exposición a agentes tóxicos, cortes del tejido o abruptos cambios de temperatura. Hay varios tipos de muerte celular, los tres más comunes son: la autofagia, la necrosis y apoptosis (Carranza Aguilar y col., 2020).

La autofagia es un mecanismo catabólico regulado de autodegradación. Este proceso permite que las células mantengan su homeostasis, degradando proteínas

mal plegadas, orgánulos dañados y en algunos casos son capaces de eliminar vesículas con las que se invaginaron bacterias o virus como un mecanismo de defensa. Este proceso se lleva a cabo a través de la interacción de vesículas conteniendo los materiales antes descritos, fusionándose con lisosomas conformando una estructura denominada autofagolisosoma. Este orgánulo tiene la capacidad de degradar el contenido mediante el uso de enzimas hidrolíticas y reciclarlo como monómeros a través de transportadores de membrana hacia el citosol para su reutilización en la célula (Salimi-Jeda A y col.,2022).

La necrosis es un tipo de muerte celular no regulada, que es desencadenada por exposición a toxinas, hipoxia, cambios críticos de temperatura, descompensación celular abrupta que genera una caída masiva del ATP, entre otros. Esto genera cambios morfológicos caracterizados por una desorganización y lisis del citoplasma, con dilatación del retículo endoplasmático y las mitocondrias, provocando que las células se hinchen liberando el material intracelular y activando la respuesta inflamatoria (Ketelut-Carneiro N y col.,2022).

La apoptosis también conocida como muerte programada, es un proceso celular fisiológico, regulado. Se requiere en todas las etapas de la vida del ser humano. Por ejemplo, en las fases embrionarias, es crítico en la separación de los dedos, al inducir la muerte dirigida de las células que conforman las membranas interdigitales en el feto. El crecimiento de los huesos es dependiente de la degradación de algunos tipos celulares de este tejido para estimular la proliferación del mismo y en el recambio continuo de células de forma regulada es la base del funcionamiento fisiológico en todos los tejidos (Silverthorn, 2019).

La apoptosis por el tipo de activación se divide en extrínseca e intrínseca. La extrínseca se induce por moléculas externas a la célula denominadas ligandos, que son moléculas reconocidas por una familia de receptores llamados “receptores de muerte celular”. Estas proteínas están constituidas estructuralmente por tres secciones, domino extracelular, cuya función es reconocer específicamente a la molécula ligando. Una vez unido el ligando a su receptor, este tiene la capacidad de

moverse en la membrana gracias a la segunda sección del receptor denominada, dominio transmembranal, quien favorece su dimerización. La dimerización promueve que la tercera sección del receptor, el dominio citoplasmático, se autofosforila, generando un cambio conformacional y reclutando a proteínas adaptadoras tales como el dominio de muerte asociado a Fas (FADD). Estas proteínas adaptadoras se unen a las procaspasas con el fin de activarlas mediante una escisión y reconformación, generando las caspasas activas, que son un tipo de proteasa requerida para activar a otras procaspasas y comenzar con la desarticulación funcional y estructural de la célula hasta formar los cuerpos apoptóticos, que son fragmentos de la célula que finalmente serán fagocitados por macrófagos para su destrucción (Ketelut-Carneiro N y col., 2022).

La apoptosis intrínseca, es iniciada por estímulos intracelulares como daños genéticos irreparables, concentraciones altas de calcio citosólico, desequilibrio del metabolismo energético, entre otros. Estos estímulos provocan estrés, activando a un conjunto de proteínas denominadas Bcl pro- y anti-apoptóticas. El desequilibrio en la concentración y función de estas proteínas genera un cambio en la permeabilidad mitocondrial provocando la liberación del citocromo C hacia el citoplasma y uniéndose a las proteínas Apaf-1 y procaspasa 9, conformando el apoptosoma cuyo objetivo es activar a la procaspasa 9, convirtiéndola en caspasa 9, induciendo la maduración de otras las caspasas ejecutoras, que desencadenarán el desacople celular, formando cuerpos apoptóticos que serán reconocidos por macrófagos para su eliminación (Bhagya N y col., 2022).

De todos los tipos de muerte celular, la apoptosis es el mecanismo que se intenta activar a través de las terapias contra el cáncer, debido a que es capaz de detectar daños celulares de forma específica y selectiva, sin dañar a las células circundantes ni exacerbar una respuesta inmunitaria (Pazo Cid y col., 2020). Sin embargo, nos enfrentamos ante la problemática de que las células tumorales, esquivan las señales para la inducción de este proceso. (Wang y col., 2014). Por lo que, se han incrementado los esfuerzos por encontrar un tipo de terapia alternativa, que induzca la muerte celular programada, disminuyendo los efectos secundarios, así como

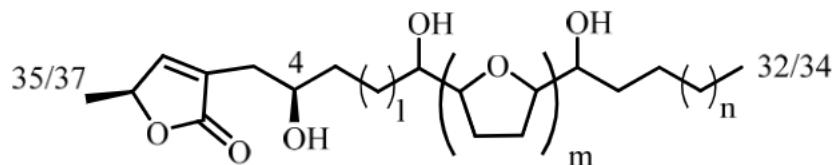
intentar bloquear los sistemas emergentes de evasión al proceso de apoptosis activado por las células tumorales. Una de estas alternativas es la utilización de fracciones complejas de fitoquímicos derivadas de plantas. Estas fracciones poseen una amplia diversidad de compuestos y se propone que el efecto benéfico que desencadenan en un organismo, es el resultado de la interacción entre distintos mecanismos inducidos por la activación simultánea de estas moléculas, modulando la respuesta celular, causando una ventaja en las capacidades para interferir en la progresión del cáncer y disminuyendo significativamente el daño generado a las células funcionales (Liu N y col., 2016). Dentro de los estudios más relevantes en los últimos años, sobre el papel de extractos naturales y su actividad terapéutica, son los hallazgos de Zuo y col. en 2022, en donde reporta la actividad antitumoral *in vitro* de extractos de la planta *Annona cherimola* en células de pulmón A-549, logrando eliminar el 40% de las células mediante la acción de las acetogeninas presentes en dicho extracto (Zuo C y col., 2022).

#### *I.4 Annona cherimola*

La *Annona cherimola* pertenece a la familia Annonaceae que es una de las familias más antiguas dentro del orden mongolias. Esta planta se encuentra distribuida en áreas tropicales en América, África y Australia. La *Annona cherimola* es comúnmente conocida como “chirimoya”, tiene hojas brillantes de color verde oscuro, con frutos comestibles y espinas suaves con curvas que cubren la piel del fruto, mismos que pueden contener entre 55 a 170 semillas en una pulpa. (Rady y col., 2018; Arroyo J y col., 2005).

Todas las partes de la planta son utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de distintas patologías, las raíces se usan por sus propiedades antiparasitarias y plaguicidas, el fruto se emplea en la prevención y tratamiento de infecciones respiratorias y diabetes, mientras que las hojas muestran propiedades antitumorales y citotóxicas. Su actividad terapéutica se atribuye a fitoquímicos como flavonoides, tocoferoles, taninos, saponinas, polifenoles y particularmente a las acetogeninas por su alta concentración y diversidad (Díaz de Cerio y col., 2018; Liu N y col., 2016).

Las acetogeninas (ACGs) son una familia de polisacáridos que se han aislado más comúnmente de las plantas de la familia *Annonaceae*. Estructuralmente, la mayoría de las acetogeninas poseen una cadena alifática de 35 o 37 átomos de carbono con uno, dos o tres anillos tetrahidrofuránicos adyacentes, así como sustituyentes oxigenados localizados a lo largo de ésta. En uno de sus extremos presentan un anillo lactónico metil sustituido, α, β saturado o insaturado como se muestra en la Figura 1 (Neske y col., 2020; Miyoshi y col., 1998).



Los procedimientos tradicionales para la extracción de los fitoquímicos de *Annona cherimola* son por maceración, percolación y extracción sólido-líquido. Los solventes más utilizados para estas extracciones son metanol y etanol (Aguilar Villalva y col.,2021). Sin embargo, estas técnicas utilizan grandes volúmenes de solventes y tiempos muy prolongados para la extracción, por lo que se han diseñado nuevos métodos de extracción para poder disminuir los solventes y a la vez mantener o mejorar la obtención de altas concentraciones de fitoquímicos, con el objetivo de mejorar la pureza e integridad de estos compuestos (Angionillo y col, 2015).

Un nuevo método, es la extracción asistida por ultrasonido, esta técnica ha demostrado tener una alta reproducibilidad, fácil extracción y reducción importante del costo y tiempo (Zhao y col.,2021). El funcionamiento de esta técnica es producir un fenómeno conocido como cavitación que son ondas de ultrasonido de alta y baja frecuencia logrando la ruptura de la pared celular e incrementando el área de contacto entre la fase sólida y el solvente, logrando una mejor extracción de los fitoquímicos (Zahari y col, 2020). Investigaciones efectuadas por Villalva y col. en 2021, realizaron la comparativa de extracción de los fitoquímicos de *Annona cherimola* con dos métodos tradicionales (Soxhlet y maceración) y la extracción asistida con ultrasonido, utilizando como solventes agua y etanol. Dicha experimentación concluyó que la utilización del ultrasonido daba mayores rendimientos de extracción que los métodos convencionales y disminuía de forma significativa la cantidad de solventes acarreados en la muestra (Aguilar Villalva y col.,2021).

Al tener un mayor rendimiento de extracción nos enfrentamos con la problemática de que la *Annona cherimola* en grandes concentraciones posee propiedades citotóxicas que puede causar un efecto negativo para los modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, tal es el caso reportado por Rawan y col en 2022 en el cual se utilizaron células de cáncer de mama (MCF-7) se comprobó que al tratar las células con 100 µg/ml de extractos de hojas liofilizadas mataba a más de la mitad de las células en el grupo control como en las células cancerígenas. Por lo que es indispensable realizar estudios para encontrar la susceptibilidad de distintos tipos celulares a través de la

determinación de la dosis letal media y así determinar la citotoxicidad. Para ello, las técnicas más utilizadas son la evaluación de la viabilidad celular (Rawan y col., 2022).

En la actualidad se han investigado alternativas para mantener la actividad biológica estable de las acetogeninas, mejorar su vía de administración y asegurar una mayor biodisponibilidad. Una posibilidad plausible es su combinación con la nanotecnología, ya que presenta una enorme versatilidad tanto en materiales como en estructuras, lo que podría aprovecharse para diseñar alternativas a través de las cuales se concentre y se protejan los compuestos fitoquímicos, manteniendo sus características intrínsecas y generando un vehículo que facilite su biodistribución. Además, la nanotecnología, permite modificar la carga, forma y tamaño de las nanopartículas durante la síntesis, aprovechando las características intrínsecas de los nanomateriales y la velocidad de la reacción, para diseñar nanopartículas que funcionen como vehículos de administración de fármacos, aumentando la afinidad a tipos celulares específicos y prolongar la biodisponibilidad de los principios activos (Grobmye S y col., 2010, Gómez A, 2017).

### I.5 Nanotecnología

La nanotecnología hace referencia a la manipulación, ingeniería, caracterización y aplicaciones de la materia a escala nanométrica de (1-100 nm). Esta herramienta ha impactado en el desarrollo de modalidades diagnósticas y terapéuticas más eficientes en distintas patologías por sus propiedades mecánicas, magnéticas, ópticas y catalíticas (Gómez, 2017).

Existe una considerable variedad de clasificaciones para las nanopartículas, de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas. Al referirnos a ellas por su naturaleza química se dividen en orgánicas e inorgánicas. Dentro de las orgánicas podemos encontrar a nanopartículas a base de carbono como grafeno, fullerenos o nanotubos de carbono, que particularmente se utilizan en la industria de materiales y recubrimientos ya que hacen más resistentes y ligeros los materiales con los que estas nanopartículas son recubiertas (Singh P y col.;2018). Por otro lado, tenemos a las que se basan en lípidos, como las micelas poliméricas, dendrímeros y liposomas.

Estas nanopartículas han tenido un impacto muy importante en la Biomedicina y Biotecnología al ser utilizado en técnicas de transferencia de moléculas como ADN, proteínas y nutrientes al interior de las células, resolviendo limitantes biológicas (Parveen S y col.;2022). El otro gran grupo es el de nanopartículas inorgánicas, algunas de ellas son coloides silíceos y puntos cuánticos que se utilizan como biosensores o vehículos estables para fármacos. Si bien estas nanoestructuras no son metabolizables, se han utilizado mucho en la industria farmacéutica como vehículos dispensadores de principios activos por su alta biocompatibilidad y factibilidad para adaptar moléculas que reaccionan o detectan compuestos en la célula o en fluidos biológicos y se proponen como prometedores biosensores, muy útiles en el diagnóstico (Alshameri A y col. ;2022). Otro importante grupo de nanopartículas utilizadas en el ámbito de la salud, son las nanopartículas de oro y plata por sus características ópticas y de carga. Al ser componentes metálicos tienen la propiedad de generar una resonancia plasmónica en su superficie, lo que facilita la funcionalización de ligandos como anticuerpos, polímeros o fármacos (Sudha P y col.;2018; Hammami ,2021). La estabilidad de la interacción entre la nanopartícula metálica de oro y los ligandos pueden modularse, esto controla la liberación del fármaco ante distintos microambientes con diferencias de pH o concentraciones de solutos, lo que las hacen una excelente opción en terapia (Wang S y col., 2022).

Utilizando las ventajas que presentan las nanopartículas de oro, se diseñó una síntesis de nanopartículas de oro utilizando como agente reductor los extractos de *Annona cherimola*, obtenidas mediante una modificación en el sistema de extracción. Dicha modificación se basó en la utilización de una sonopunta, incrementando el rendimiento en la extracción de acetogeninas. A continuación, el propio extracto se utilizó como catalizador de la reacción en la generación de las nanopartículas de oro denominadas de aquí en adelante como AuNps- Ch. Este diseño fue realizado por el grupo de investigación de la Dra. Estévez (Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada en la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla) y parece ser un sistema muy prometedor para mantener las características bioactivas del extracto y generar un vehículo eficiente para la administración de acetogeninas.

Se estableció un convenio de cooperación con nuestro laboratorio, en la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada de la Universidad Autónoma de Querétaro, para evaluar *in vitro* su capacidad citotóxica. Para tal objetivo, se usó el ensayo de viabilidad celular por azul de tripreno y se determinó que para células HepG2, la dosis letal media es 879.47 µg/mL. En este proyecto se pretende indagar en el proceso de muerte celular que están generando estas AuNps-Ch, por lo que analizaremos la actividad proapoptótica en la línea celular HepG2 (hepatoma celular humano).

## **II. HIPÓTESIS**

Las nanopartículas de oro se elaboraron por síntesis verde usando como agente reductor extractos de *Annona cherimola*, inducen un efecto proapoptótico en células de carcinoma hepatocelular HepG2.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1 General**

Evaluar la actividad proapoptótica del nanosistema AuNps-Ch en células HepG2.

#### **III.2 Específicos**

Sintetizar el nanosistema AuNps-Ch

Evaluar las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de AuNps-Ch.

Determinar la dosis letal media de AuNps-Chen células HepG2, por pruebas de viabilidad celular.

Analizar la inducción a muerte celular por la vía apoptótica en células HepG2.

## **IV METODOLOGÍA**

### **IV.1 Materiales.**

1. Placas de Cultivo celular en formato P6, P24 y P60
2. Puntas de micropipeta de 10, 200 y 1000  $\mu\text{L}$
3. Tubos tipo eppendorf de 1.5 mL y 2 mL
4. Micropipeta de 10, 200 y 1000  $\mu\text{L}$
5. Membrana de nitrocelulosa
6. Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

### **IV.2 Métodos**

#### **IV.2.1 Extractos enriquecidos en acetogeninas de *Annona cherimola*.**

La extracción se realizó en el laboratorio de Biomateriales Aplicados del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) en la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla. Las hojas de la planta *Annona cherimola* se identificaron de acuerdo a los lineamientos de investigación científica en el herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán. Posteriormente se recolectaron las hojas de la planta y se lavaron con agua del grifo para la eliminación de suciedad e impurezas, se secaron en una estufa a 40°C durante toda la noche y al día siguiente se molieron en seco con una licuadora personal Nutri Bullet pro. A continuación, se tamizó con un poro número 140 ASTM de 0.0040 in, se pesó 1 g del pulverizado tamizado y se mezcló con 15 mL de solución (70% agua y 30% etanol), se llevó a la sonopunta por 5 min con el 100% de energía del equipo. El producto homogeneizado se filtró con un papel filtro Whatman de 42  $\mu\text{M}$  para separar la fase líquida. Finalmente, el líquido obtenido fue almacenado en viales de vidrio ámbar sellados a 4° C hasta su uso.

#### **IV.2.2 Elaboración de AuNps-Ch.**

Se preparó una solución 5 mM de HAuCl<sub>4</sub> en agua y se mezcló con el extracto obtenido de *Annona cherimola* a una relación en volumen 2:1. Posteriormente la solución se puso en agitación constante por dos horas a temperatura ambiente, a continuación, se almacenó a 4°C por 24 hrs. Transcurrido el tiempo se realizaron dos

lavados con 1 mL de agua destilada mezclando con pipeteo y centrifugando a 8000 rpm durante 20 min, el sobrenadante se desechó y el precipitado fue dispersado en agua desionizada utilizando un baño ultrasónico por 20 min.

#### IV.2.3 Ensayos fisicoquímicos del extracto de *Annona cherimola* y de AuNps-Ch.

Al extracto de *Annona cherimola* que en lo subsecuente se le denominará (ExtCh), y de las nanopartículas de oro con *Annona cherimola* (AuNps-Ch), se les evaluaron las siguientes características físicas y químicas, como se describe en detalle a continuación.

##### IV.2.3.1 Determinación de fenoles totales.

Para determinar la concentración de fenoles totales, fue utilizado el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Para llevar a cabo esta técnica se preparó una solución 1 N del reactivo Folin-Ciocalteu y una solución al 20% de carbonato de sodio. Posteriormente, se realizó una curva de calibración usando el ácido gálico como estándar, para ello, se utilizaron diluciones seriadas de 2 a 1000 µg/mL. A partir de la curva de calibración se tomó 1 mL de cada dilución y se le adicionó 5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y 4 mL de la solución de carbonato de sodio, se dejó reposar durante 1 hrs y posteriormente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Uv-Vis.

Una vez obtenida la curva de calibración, se procedió a diluir las muestras de AuNps-Ch y ExtCh en una proporción 1:100 (muestra: agua). Luego, se añadieron 4 mL de carbonato de sodio y 5 mL el reactivo de Folin-Ciocalteu a las muestras diluidas, las cuales se dejaron reposar durante una hora antes de medir su absorbancia. A partir de la absorbancia obtenida, se interpoló el dato utilizando la curva previamente generada. Finalmente, se calculó la concentración con la fórmula de tendencia lineal obtenida de la curva de calibración.

##### IV.2.3.2 Obtención de potencial Z.

El potencial Zeta se obtuvo utilizando el analizador de tamaño de partícula Litesizer de la marca Anton Paar, se midió la dispersión de luz cmPALS. Se colocó una dilución 1:100 de las AuNps-Ch en agua en la celda del instrumento y posteriormente se

colocó en el accesorio Univette que nos permitió medir por triplicado de las lecturas del potencial Zeta.

#### IV.2.3.3 Análisis del tamaño de partícula.

El tamaño de las partículas se midió mediante la técnica de dispersión de luz dinámica utilizando el instrumento Litesizer 500 de la marca Anton Paar. Se preparó una dilución 1:100 de las AuNps en agua y se colocó en la celda del instrumento para realizar tres mediciones del tamaño.

#### IV.2.4 Cultivo celular.

Las células HepG2 (hepatoma humano, ref: ATCC HB-8065) e IMR-90 (fibroblastos de pulmón de origen no tumoral, ref.: ATCC CCL-186), se mantuvieron en medio DMEM alto en glucosa con glutamina, 10 % de suero fetal bovino y 1% antibiótico-antimicótico, como medio de cultivo. Al ser células adherentes, se crecieron en placas con formato P6 para su mantenimiento y P60 para su tratamiento. Se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 70% tanto para su mantenimiento como para su tratamiento. Para el mantenimiento de las células se les realizó un pase cada dos días, como se describe a continuación: se retiró el medio de cultivo en el que estaban creciendo las células, se lavaron dos veces con PBS 1X (1.05 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 155.1 mM NaCl, 2.9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O a pH 7.4 ), a continuación se les adicionó 200 µL de tripsina y se dejó incubar durante 5 min a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>, posteriormente se neutralizó la tripsina con 500 µL de medio de cultivo, se recogieron las células a través de múltiples pipeteos, arrastrándolas de la placa y se depositó el medio en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Se centrifugó por 5 min a 4500 rpm, a continuación, se eliminó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo fresco, para posteriormente subcultivar nuevamente a menor densidad celular.

#### IV.2.5 Ensayos de viabilidad.

Se determinó el número de células requerido para que en un pase a 24 horas obtengamos una densidad celular del 70% en una placa celular de formato P24, para ambas líneas celulares, con el objetivo que estén en su estado metabólico óptimo.

Una vez establecido el número de células requerido para cada tipo celular, esté se sembró y se mantuvo en cultivo por 24 horas. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS 1X para proceder a realizar los tratamientos; control positivo, DMEM adicionado con 10% SFB y antibiótico/antimicótico, control negativo, tritón al 0.0005% y una curva de dosis a 200, 400, 600, 800 y 1000 µL/mL de AuNps-Ch. Todos los tratamientos se adicionaron al medio de cultivo. Las células se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y posteriormente se procedió a hacer un lavado con PBS 1X, a continuación, se levantaron las células usando tripsina como se describe en el apartado VI.2.4, la pastilla de células se resuspendió en medio a través de múltiples pipeteos y se tomaron 10 µL de suspensión celular, posteriormente se le adicionaron 10 µL del reactivo azul de tripano y se realizó un conteo celular utilizando una cámara de Neubauer. Finalmente se determinó la viabilidad celular con la siguiente fórmula para conocer la concentración letal media.

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{número de células vivas}}{\text{número de células totales}} \times 100$$

#### IV.2.6 Tratamientos experimentales.

Una vez determinada la concentración letal media de nuestro tratamiento, se sembró la línea celular HepG2, manteniéndolas en cultivo por 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS 1X para proceder a administrar los tratamientos como se describen en el Cuadro 2. Las células tratadas se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Cuadro 2. Tratamientos experimentales.

Línea celular HepG2	
Control negativo: Medio de cultivo sin suero fetal bovino (DMEM S/SF)	DMEM S/SF adicionado con Ext-CH disuelto en agua
Control positivo: DMEM S/SF con tritón al 0.0005%	DMEM S/SF con NPAu-ExCH

#### IV.2.7 Extracción de proteínas

Se realizó la extracción de proteínas de las células HepG2 tratadas de acuerdo a lo descrito en el Cuadro 2. Se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS1X. Posteriormente se adicionaron 800 µL de solución de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl a pH 8.0, 150 mM de NaCl, 0.5 de desoxicolato de sodio, 1% SDS e inhibidor de proteasas). A continuación, se utilizó un raspador de plástico y se propició la lisis celular realizando múltiples pasos por la placa. El producto de lisis fue recuperado por pipeteo en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL, manteniendo a 4°C durante media hora y se agitó en vortex 30 seg. cada 10 min. Por último, el producto de lisis se centrifugó a 16,000 rpm durante 20 min a 4°C y el sobrenadante se coloca en un tubo limpio dividiéndolo en 5 alícuotas de 150 µL, almacenándolas a -80°C hasta su uso.

##### IV.2.7.1 Cuantificación de muestra proteica.

En una placa de 96 pocillos fondo plano, se realizó una curva de calibración con diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (BSA) a las siguientes concentraciones: 1.4, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25 y 0 µg/mL por triplicado, completando con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 5 µL para generar la curva de calibración. En el caso de las muestras problemas se añadió 5 µL del extracto proteico en RIPA, por triplicado. Y en todos los casos, se añadió a los pocillos 250 µL del reactivo de Bradford, posteriormente la placa se mantuvo por 6 min en agitación protegidos de la luz en un agitador orbital a 4°C a 240 rpm, a continuación, se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de placas. Finalmente, se realizaron los cálculos de concentración proteica utilizando el modelo matemático de regresión lineal, obteniendo la ecuación de la recta para la curva estándar e interpolando los valores de absorbancia de las muestras problema.

##### IV.2.7.2 Preparación de muestras con extractos proteicos

Se mezclaron 30 µg de extracto proteico y se le adicionó buffer de carga de proteína hasta 1 X (0.4% SDS, 0.5 mM de Tris-HCl a pH 6.8, 10% glicerol, 0.002% de azul de bromofenol y 5% de β- mercaptoetanol) y se llevó a un volumen final de 30 µL con agua bidestilada. Se almacenó a - 80°C hasta su uso.

#### IV.2.8 Electroforesis de gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

Se lavaron y ensamblaron los cristales para formar la cámara del gel, se preparó un gel separador a un porcentaje de poliacrilamida del 15% (H<sub>2</sub>O, 30% de la solución de poliacrilamida mix, 1.0 M de Tris a pH 6.8, 10% SDS, 10% persulfato amonio, TEMED), se vertió entre los geles y se completó con agua destilada hasta llegar al ras del cristal. Una vez polimerizado el gel, se eliminó el exceso de agua con un papel filtro. A continuación, se preparó el gel compactador con un porcentaje de poliacrilamida del 5 % (H<sub>2</sub>O, 30% de la solución poliacrilamida mix, 1.5 M de Tris a pH 8.8, 10% SDS, 10% persulfato amonio, TEMED), se adicionó a la cámara de cristal con el gel separador previamente polimerizado y rápidamente se colocó el peine y se dejó polimerizar.

Las muestras preparadas con el extracto proteico, se incubaron a 96°C por 5 min y se realizó un choque térmico en hielo por 1 min, posteriormente se centrifugó. Por otro lado, se colocaron los cristales con el gel en la cámara de electroforesis, se añadió buffer de corrida a la cámara de electroforesis hasta cubrir los geles (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.1% SDS a pH 8.3). En los geles de poliacrilamida, se cargó en un pocillo 4 µL del marcador de peso molecular y los 30 µL de la muestra de extracto proteico descrito previamente. A continuación, la cámara de electroforesis se conectó a una fuente de poder para llevar a cabo la electroforesis a 100 V durante 150 min.

#### IV.2.9 Transferencia húmeda.

Una vez terminada la electroforesis del gel, se desmontó de los cristales y se ensambló un casete para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de la siguiente manera: sobre el casete se coloca esponja, dos papeles filtro, el gel de proteínas tras la electroforesis, membrana de nitrocelulosa, dos papeles filtro y esponja. El casete se cierra y se ensambla en el contenedor de la cámara de transferencia. Se cubrió en buffer transferencia (25 mM Tris, 190 mM de glicina y 20 % de metanol a pH 8.3) evitando formar burbujas, se insertó el hielo en la cámara de transferencia. Se cierra la cámara de transferencia y se conectó a una fuente de poder por 60 min a 100 V. Una vez terminada la transferencia, la membrana de

nitrocelulosa sobre la que se transfirieron las proteínas se lavó con TBS 1% (20 mM Tris a pH 7.5, 150 Mm NaCl), se agregó el reactivo de Ponceau (0.2% de Ponceau S y 5% de ácido acético glacial) para teñir las proteínas y se confirmó su transferencia a la membrana de nitrocelulosa, posteriormente se destiñó con lavados de TBS-T (20 mM Tris a pH 7.5, 150 Mm NaCl y 0.15 Tween 20).

IV.2.10      Evaluación de marcadores apoptóticos por inmunodetección de fase sólida.

Una vez desteñida por completo, la membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas, se incubó en solución de bloqueo (5% de leche con TBS) por 2 hrs. en agitación constante a temperatura ambiente. A continuación, la membrana se incubó con la dilución de anticuerpos primarios correspondiente a cada anticuerpo en 2% de leche en TBS (caspasa 9 de la casa comercial Cell Signaling, ref. #9505, 1:500; tubulina de la casa comercial Santa Cruz, ref: sc-5286, 1:1000) en agitación constante por 16 hrs a 4°C. Al día siguiente se realizó un lavado rápido con TBS y dos lavados de 20 min con 2% leche-TBS en agitación a temperatura ambiente, a continuación, se incubó con el anticuerpo secundario anti ratón, Jackson Inmunoreserch (ref: 115-035-003) para tubulina y anti conejo marca Jackson Inmunoreserch (ref: 111-035-144) para caspasa 9 a una dilución de 1:7000 en leche al 2% con TBS por dos horas a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo, se realizaron 2 lavados de 20 min 2% de leche-TBS, un lavado de 20 min de leche 2%-TBST y dos lavados de 5 min con TBST. Finalmente, se reveló las membranas por quimioluminiscencia con el kit comercial Amersham ECL Prime y se capturó la información en el ChemieDoc.

IV.2.11      Bioseguridad y aspectos bioéticos.

Todo el manejo de cultivos celulares se realizó en una cabina de bioseguridad tipo II con filtros HEPA, tomando en cuenta el manual de bioseguridad de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2022).

El material utilizado que tuvo contacto con las líneas celulares se inactivó con una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 30 min., se enjuagó con agua corriente y se desechó a la basura.

Los desechos de las nanopartículas se almacenaron en un contenedor exclusivo marcado como desechos tóxicos y peligrosos para su recolección y desecho por el servicio externo con la empresa TRIRSA S.A de C.V.

#### IV.2.12 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó usando el programa GraphPad Prism 8.0. En las comparaciones se usó una prueba ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de comparación múltiple Dunnet. Las diferencias significativas se consideraron con un nivel de significancia estadística de  $p < 0.05$ , y los datos se presentan como media  $\pm$  SEM.

#### IV.3 Diseño experimental.

##### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROAPOPTÓTICA DE NANOPARTICULAS DE ORO CON EXTRACTOS DE *Annona cherimola* EN CÉLULAS HEPG2

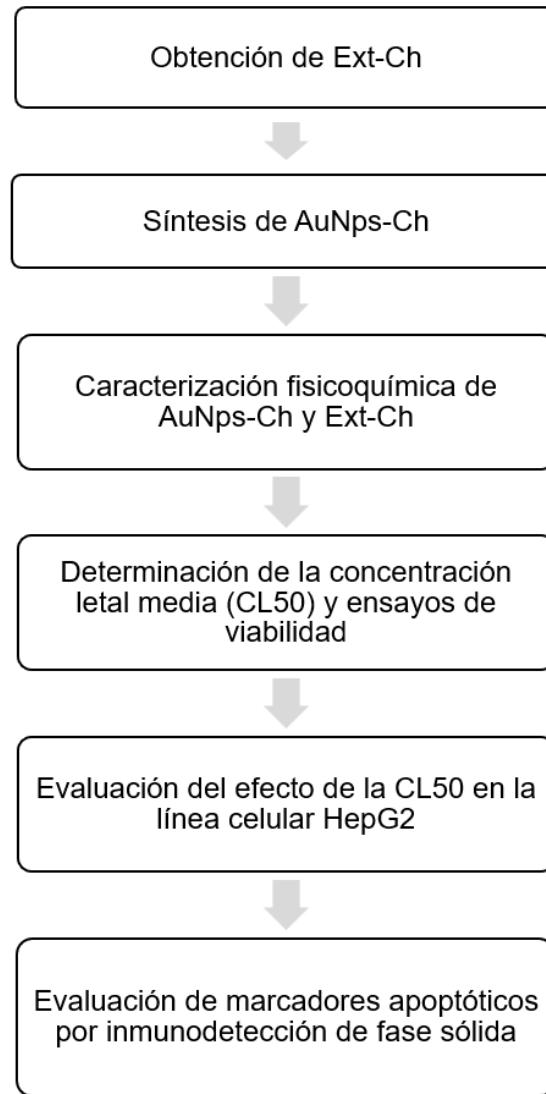


Figura 2. Diagrama de diseño experimental.

## V. RESULTADOS

### V.1 Extracción de acetogeninas.

Los extractos enriquecidos con acetogeninas fueron obtenidos utilizando la técnica de extracción asistida por ultrasonido, después del realizado proceso descrito en materiales y métodos en la sección IV.2.1, el extracto obtenido de la hoja fue concentrado mediante rotovaporación, obteniendo un volumen final de 150 mL. El extracto resultante presentó características organolépticas de color verde oscuro fuerte y un ligero olor ácido, que concuerdan con las características reportadas en la literatura.

### V.2 Elaboración de AuNps-Ch.

Con el objetivo de reducir el uso de solventes tóxicos requeridos en la síntesis de nanopartículas, se implementó una síntesis verde utilizando extractos enriquecidos con acetogeninas como agente reductor del precursor de oro ( $\text{HAuCl}_4$ ). Esta síntesis se llevó a cabo en menos de 20 minutos, y se pudo observar un cambio de color en la solución, pasando de verde a morado debido a la combinación del color verde del Ext-Ch con el característico color rojo de las nanopartículas de oro

### V.3 Ensayos fisicoquímicos de las AuNps-Ch y Ext-Ch

Se realizaron ensayos fisicoquímicos de las AuNps-Ch y Ext-Ch con el propósito de determinar sus características, las cuales serán relevantes para comprender su estabilidad, tamaño, carga superficial y la forma de interacción con las células

#### V.3.1 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Con el fin de conocer la cantidad de compuestos antioxidantes que se encuentran en el Ext-Ch y AuNps-Ch, se realizó la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, ya que este ensayo nos permite cuantificar los compuestos antioxidantes presentes en el extracto. Para ello se elaboró una curva de calibración usando el ácido gálico como estándar. Las muestras de AuNps-Ch y Ext-Ch se diluyeron 1:100 lo que permite interpolar los resultados en la curva estándar y de esta forma, determinar su concentración. En la tabla de la Figura 3 se presenta los valores de concentración utilizados en la curva estándar, así como los respectivos valores de

absorbancias obtenidos a 725 nm de longitud de onda. En la gráfica de la Figura 3 se muestra la correlación entre concentración y absorbancia, en donde, en el eje X se representan las concentraciones de las distintas diluciones del estándar y en el eje Y las absorbancias obtenidas en cada caso. Se realiza la regresión lineal y se calcula la ecuación de la recta  $y=0.0101+0.0106x$ , con una correlación cuadra de 0.999.

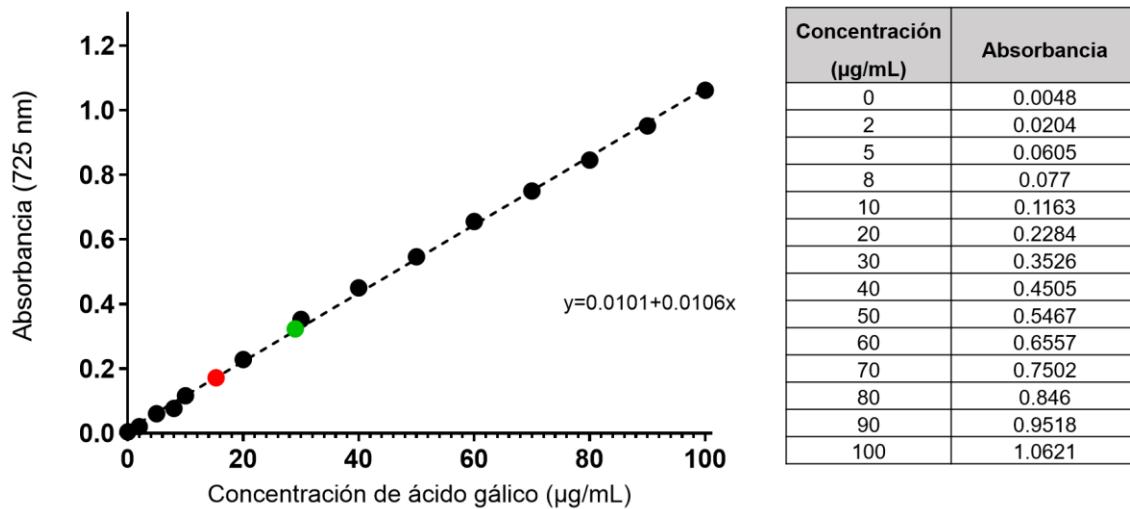


Figura 3. Curva de calibración de fenoles totales. En la tabla presenta la absorbancia obtenida a 725nm, con cada concentración del estándar. Estos datos, se grafican para obtener la curva de calibración que se representa con puntos negros en el gráfico. En la gráfica, se interpoló la absorbancia obtenida de las muestras de AuNps-Ch y Ext-Ch, que se representan con punto rojo y verde respectivamente.

Una vez obtenida la curva de calibración, se procedió a medir las absorbancias de las muestras problema. Estos resultados fueron interpolados como se muestra en la gráfica de la Figura 3. La absorbancia que corresponde al Ext-Ch (punto verde) fue de 0.3232 y de 0.17212 para AuNps-Ch (punto rojo). A continuación, se tomó en cuenta el factor de dilución (1:100) y se realizó el cálculo matemático mediante la sustitución en la ecuación de la recta, para determinar la concentración de cada muestra, como se puede observar en el Cuadro 3.

Cuadro 3.Determinación de la concentración del ExtCh y AuNps-Ch.

Muestra	Absorbancia (735 nm)	Concentración= $\frac{\text{abs}-0.0101}{0.106}$
ExtCh	0.3232	29 mg/mL
AuNps-Ch	0.1721	15.2936 mg/mL

### V.3.2 Cuantificación de AuNps-Ch

Para determinar la concentración de oro presente en las AuNps-Ch, se utilizó un analizador termogravimétrico (TGA) que permite conocer el peso de una muestra en función de su temperatura, mientras se somete a un calentamiento controlado, registrando en simultáneo y de manera constante su masa mediante un sensor de carga, lo que permite visualizar los cambios en las AuNps-Ch a medida que se elimina la materia y solventes orgánicos. La temperatura máxima aplicada fue de 500°C para asegurarse de evaporar los compuestos volátiles y se calcina la materia orgánica, sin afectar el oro, que tiene un punto de fusión de 1064°C.

Los resultados obtenidos de este análisis, se muestran en la gráfica de la Figura 4, en esta gráfica se muestra en el eje X la temperatura y en el eje Y la masa de la muestra. observamos una pérdida de masa a los 100°C, que corresponde a la evaporación de los solventes orgánicos de la muestra. Al llegar a los 500°C, se obtuvo un peso final de 0.736 mg. Tomando en cuenta el peso final y el volumen inicial de la muestra (40 µL), y realizando los cálculos usando la siguiente ecuación (Concentración de AuNps-Ch=  $\frac{(1 \text{ mL}) (0.736 \text{ mg})}{40 \mu\text{L}}$ ), se obtuvo una concentración de Au en las AuNps-Ch de 18.4 mg/mL.

### TGA de AuNPs-Ch

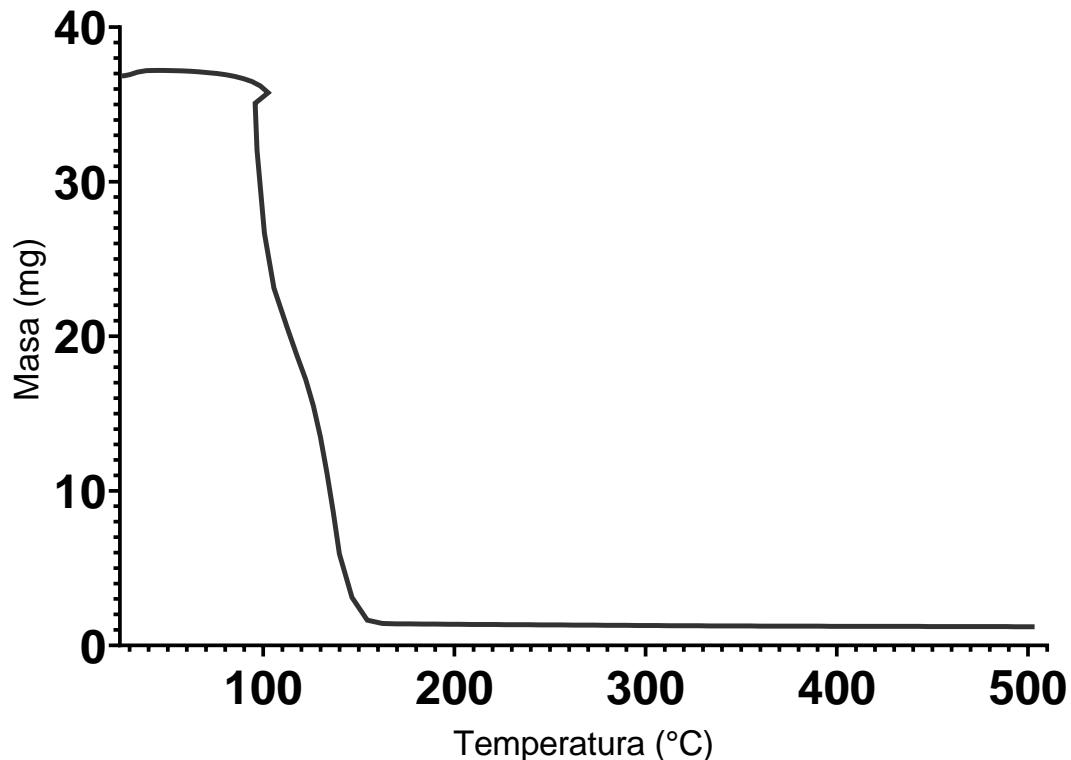


Figura 4. Gráfica del análisis termogravimétrico de AuNps-Ch. En el eje de las X se representa la temperatura, mientras que, en el eje de las Y se grafica la masa de la muestra en mg, observamos una caída abrupta de la masa entre los 100 y 160°C en el eje de las Y.

#### V.3.3 Caracterización mediante Uv-Vis de AuNps-Ch

Se llevó a cabo una caracterización mediante espectroscopia de absorción Uv-Vis, con el objetivo de identificar el oro presente en la muestra. En la Figura 5 se describe la transición vibracional y electrónica de la muestra a distintas longitudes de onda. En el eje de las X se observa las longitudes de onda de la luz en el espectro ultravioleta visible y en el eje Y las diferentes absorbancias. Al graficar estos datos, observamos que en el rango de 200 a 300 nm hay una abrupta caída de la absorbancia, lo cual indica la interacción de los grupos funcionales orgánicos presentes en el extracto en las AuNps-Ch. Además, se observa un pico de absorción

en 552 nm, que es característico de la resonancia plasmónica de las nanopartículas de oro.

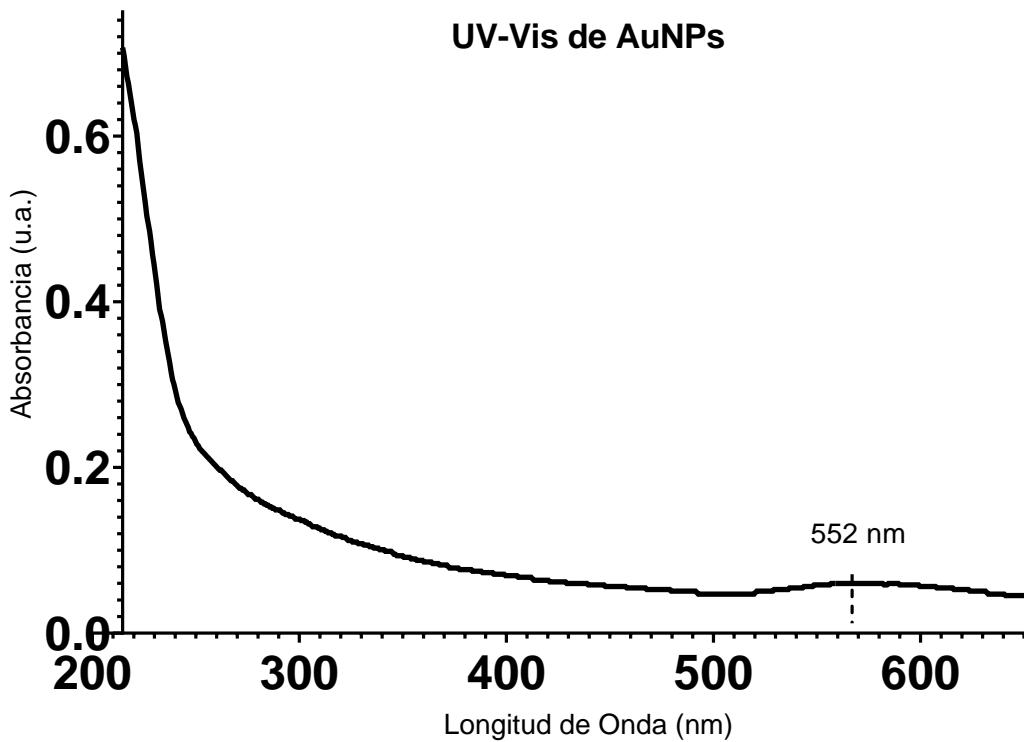


Figura 5. Espectro Uv-Vis de las AuNps-Ch. Se observa una curva en el rango de 200 a 300 nm, lo que indica la interacción entre los compuestos orgánicos presentes en las AuNps-Ch y la luz incidente. Además, se puede apreciar una banda de absorción característica en 552 nm, la cual corresponde al plasmón de resonancia de las nanopartículas de oro.

#### V.3.4 Tamaño de nanopartícula y potencial Zeta

El tamaño de las nanopartículas es un factor crítico que influye en sus características, físicas, químicas, en su capacidad para aglomerarse y de internalizar en las células. Es por ello que resulta necesario conocer el tamaño promedio de las partículas a escala nanométrica. Además, el potencial de carga superficial, también conocido como potencial Zeta, es otro factor importante a considerar, ya que proporciona

información sobre la estabilidad y la capacidad de dispersión de las nanopartículas en un medio acuoso.

Con el fin de determinar estas características, se llevó a cabo un análisis del tamaño de las nanopartículas y del potencial de carga superficial utilizando el instrumento Litesizer 500 de la marca Anton Paar. El equipo determina los valores con base a el análisis de dispersión de luz dinámica.

Se realizó un análisis de las AuNps-Ch, utilizando como medio acuoso agua destilada para conocer el tamaño del nanomaterial en condiciones hidrodinámicas dando un promedio de 99.08 nm, con una dispersión del 26.7%. Esta dispersión nos indica las dimensiones de la nanopartícula, así como los agregados que se presentan en estas condiciones.

Posteriormente se midió la carga superficial que nos da información sobre su estabilidad y capacidad de aglomeración, dando un valor de -34.96 que se determina mediante la movilidad electroforética de las partículas en un campo eléctrico aplicado a la muestra y se mide la velocidad de migración de las partículas hacia el electrodo con carga opuesta. En la Figura 6 se observa un histograma representando en el eje X el tamaño de nanopartículas y en el eje Y la frecuencia del evento, en donde se grafican los datos, mostrando la distribución de tamaños en la muestra. Estos promedios son el resultado del análisis por triplicado realizado por el instrumento.

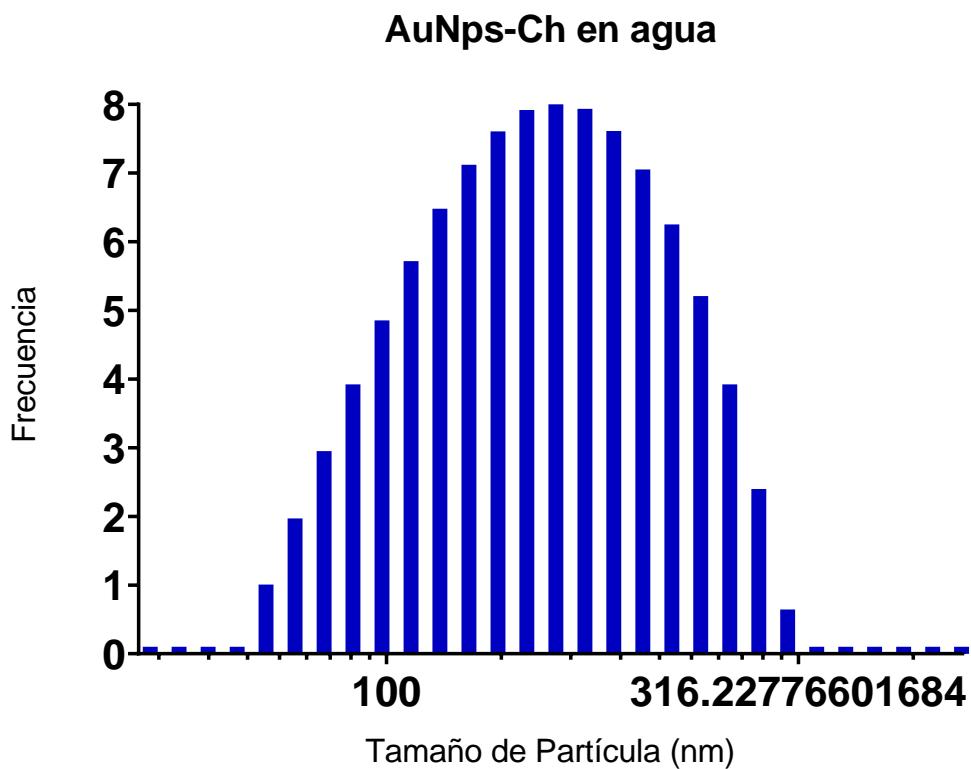


Figura 6. Histograma de tamaño de nanopartícula en agua. Este análisis se llevó a cabo en agua destilada con un pH de 7.0. En el eje las X se grafica el tamaño de partícula en nm, el eje de las Y se grafica la frecuencia del evento, se obtuvo un promedio de tamaño de 99.08 nm con una dispersión de 26.7%.

El tamaño y carga de las AuNps-Ch, pueden variar en distintos solventes y pH en que se dispersen los nanomateriales, debido a que estas nanopartículas se probaron en medio de cultivo DMEM, se realizó un segundo análisis analizando el comportamiento de las nanopartículas en este medio. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7, obteniendo un promedio de tamaño de partícula de 144.23 nm con una dispersión de 26.1% y una carga superficial de – 10.6. Con esta evaluación, se muestra la influencia del medio de cultivo sobre las características físicas en las nanopartículas.

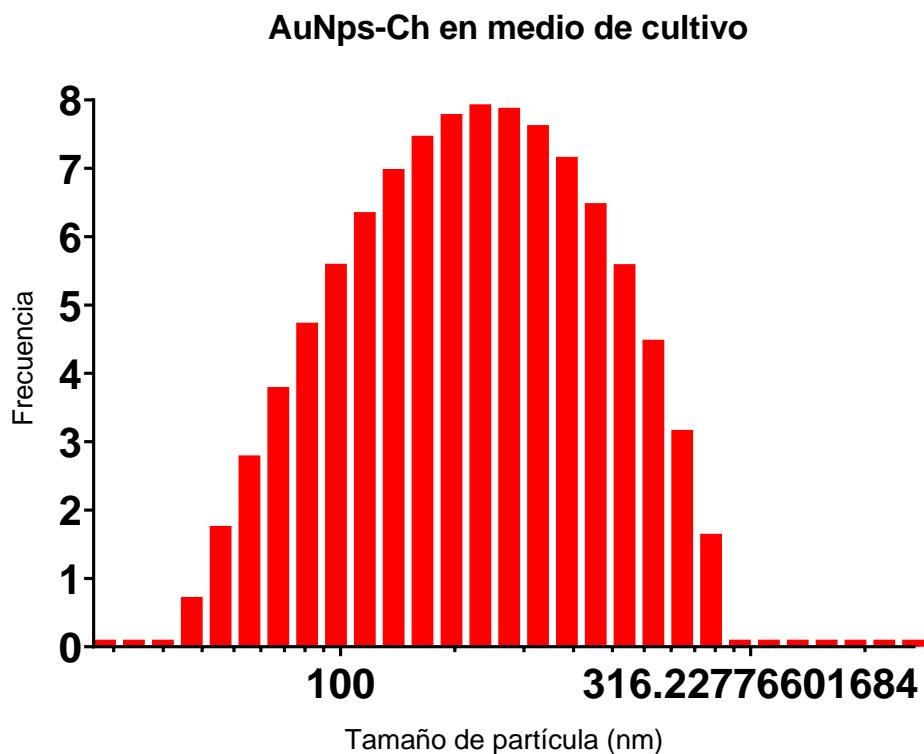


Figura 7. Histograma del análisis de tamaño de partícula en medio de cultivo. En el eje las X se grafica el tamaño de partícula en nm y en el eje de las Y se grafica la frecuencia del evento, se obtuvo un promedio de tamaño de partícula de 144.23 nm con una dispersión de 26.1%.

#### V.4 Ensayos de viabilidad celular mediante azul de tripano.

Para evaluar el efecto de AuNps-Ch a diferentes concentraciones, sobre la viabilidad celular, se realizó un ensayo que evalúa la integridad de membrana celular, utilizando el azul de tripano como indicador. Este colorante se internaliza en las membranas comprometidas y no en las sanas lo que al momento de realizar el conteo celular las células vivas y muertas son diferenciadas por estar teñidas de color azul.

Se llevó en paralelo, un control negativo, que son células en medio de cultivo sin ningún tratamiento. Además, se contó con una referencia del efecto citotóxico al que denominaremos control positivo, ya que se añade a nuestras células Tritón x100, que es surfactante no iónico y, por lo tanto, inductor de muerte celular al desestabilizar las membranas. Para las condiciones problema, se utilizaron las concentraciones de

200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL. Este ensayo se realizó por triplicado, en las líneas celulares HepG2 e IMR-90. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 8, en donde se graficó el porcentaje de la viabilidad celular en el eje de las X y el tratamiento en el eje de las Y, en ambas líneas celulares. Se observa una disminución en el porcentaje de viabilidad celular a medida que se incrementa la concentración de AuNps-Ch. La línea celular HepG2 (barras azules) mostró una mayor sensibilidad a las AuNps-Ch en comparación con la línea celular IMR-90 (barras rojas). Esto indica que las células HepG2 son más susceptibles a los efectos citotóxicos de las nanopartículas.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba *post hoc* utilizando el método Dunnett. En esta prueba, se compararon todas las concentraciones utilizadas respecto al control (DMEM) para cada línea celular. Los resultados de la prueba *post hoc* se representaron mediante asteriscos, donde \* indica un valor de  $p<0.33$ , \*\* indica un valor de  $p<0.002$  y \*\*\* indica un valor de  $p<0.001$ . Estos análisis nos permitieron determinar las diferencias significativas entre los grupos y evaluar la eficacia del tratamiento con las nanopartículas de oro en las células.

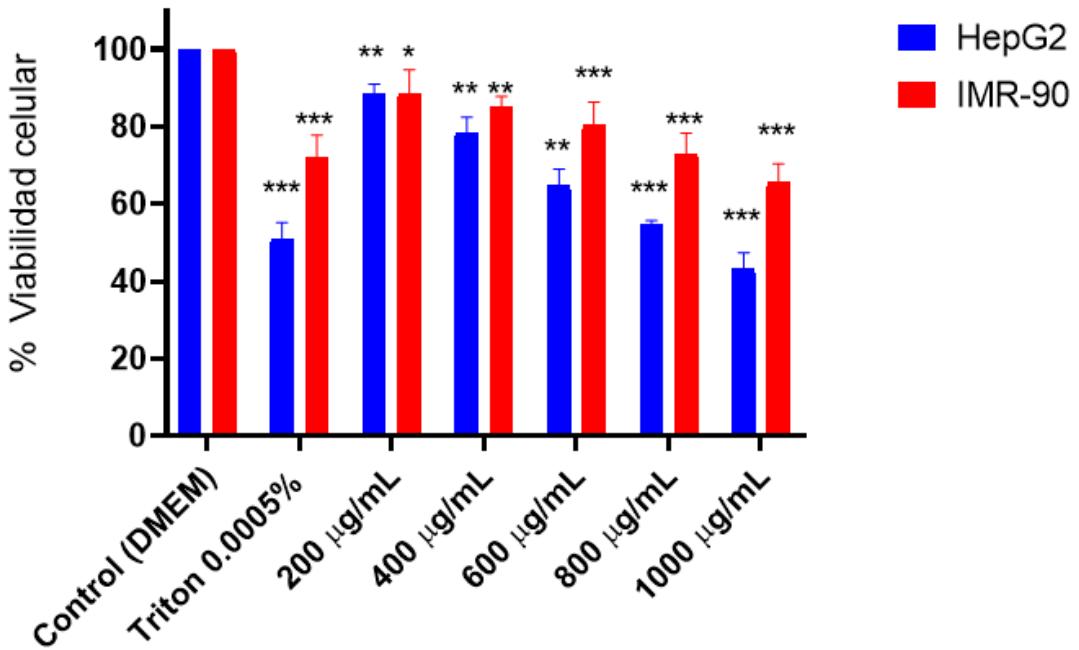
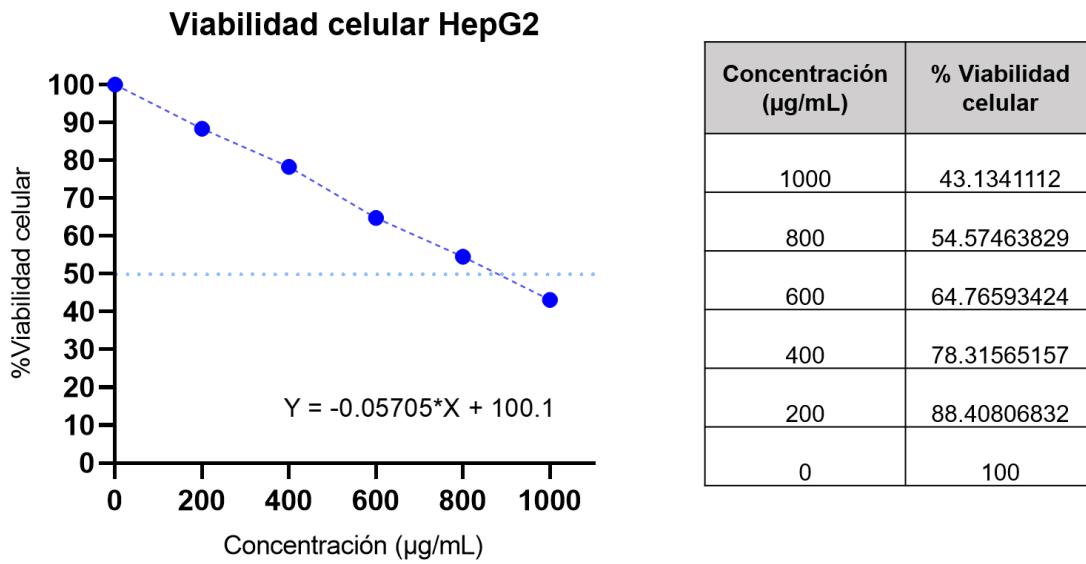


Figura 8. Ensayo de viabilidad celular. La grafica muestra el resultado del promedio de tres experimentos independientes con triplicados por experimento. Los ensayos se realizaron en las líneas celulares HepG2 (barras azules) e IMR-90 (barras rojas). En el eje de las X se muestran las concentraciones administradas de AuNps-Ch y en el eje de las Y el porcentaje de viabilidad celular. El análisis estadístico se realizó mediante una ANOVA de una vía con un *post hoc* a través del método Dunnett; \*  $p<0.33$ ; \*\*  $p< 0.002$ ; \*\*\* $p<0.001$ . Para cada una de las líneas celulares con su respectivo control.

Se calculó la concentración letal media (CL50) a partir de los ensayos de viabilidad de la línea celular del carcinoma hepatocelular (HepG2), con el fin de determinar la concentración óptima. En la tabla de la Figura 9. se muestra el porcentaje de viabilidad celular obtenido a las diferentes concentraciones del tratamiento, representando una gráfica de dosis-respuesta. Debido a que los resultados muestran una respuesta lineal y una alta correlación cuadrada cercana a 1.0, se obtuvo la ecuación de la recta  $y=-0.05705x+100.1$ . Con esta ecuación, se despejó el valor de

X para encontrar la concentración que produce un 50% de viabilidad celular ( $\frac{(50\%-100.1)}{-0.5705}$ ), y así determinar la CL50, la cual fue de 879.47 µg/mL

Figura 9.Determinación de la concentración letal media de AuNps-Ch en HepG2. Se grafican los resultados del ensayo de viabilidad celular en la línea celular HepG2. En el eje de las X se muestran las diferentes concentraciones aplicadas y en el eje de las Y el porcentaje de viabilidad, generando así una gráfica de dosis- respuesta. Al obtener una tendencia lineal se determinó la ecuación de la recta  $y = -0.05705x + 100.1$ , con un coeficiente de correlación fue de 0.9990. La gráfica resultante nos permite determinar mediante el despeje del v



valor de X de la ecuación de la recta la concentración letal media (CL50) del tratamiento, la cual fue de 879.47 µg/mL.

#### V.5 Evaluación de marcadores apoptóticos.

Se llevó a cabo una inmunodetección en fase sólida utilizando los extractos proteicos obtenidos de las células HepG2 tratadas con una concentración de 879.47 µg/mL de AuNps-Ch. Asimismo, se incluyeron controles con el fin de realizar una comparación de los posibles efectos de las AuNps-Ch sobre las células HepG2. Los controles

utilizados fueron: control negativo, células en medio de cultivo, sin ningún tratamiento. Control positivo, células tratadas con un 0.0005% de tritón X100. Control del efecto y una concentración de 16667.66 µg/mL del Ext-Ch, esta concentración fue calculada tomando en cuenta la concentración de fenoles totales de las AuNps-Ch, Ext-Ch y la CL50 en la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Ext-Ch} = \frac{(\text{CL50})(\text{Con. Fenólica Ext-Ch})}{\text{Con. Fenólica de AuNps-Ch}} = \frac{(879.47)(2900)}{15293.6}$$

Posteriormente, se estandarizaron las concentraciones de los anticuerpos a utilizar. Se evaluó la caspasa 9 como proteína inductora de apoptosis, utilizando el anticuerpo primario de caspasa 9 de la casa comercial Cell Signaling (ref. #9505) a una dilución de 1:500 y el anticuerpo secundario fue un anti conejo de la casa comercial Jackson Inmunoreserch (ref: 111-035-144) a una dilución 1:7000. En paralelo se analizó la expresión de la tubulina que es el gen endógeno de expresión constante, analizada en los mismos extractos. La determinación de tubulina, se utilizó como control de carga en la inmunodetección de fase sólida. Para ello, se utilizó como anticuerpo primario, tubulina de la casa comercial Santa Cruz (ref: sc-5286) a una dilución de 1:1000 y anticuerpo secundario anti ratón a una dilución 1:7000, de la casa comercial Jackson Inmunoreserch (ref: 115-035-003).

En la Figura 10 inciso a, se observa una banda de 35 KDa, correspondiente la caspasa 9 activa, ya que el anticuerpo solo reconoce el epítope de 35 KDa de la caspasa proteolisada. En la misma Figura 10, inciso a, observamos en el panel de abajo, una banda de 55 KDa, correspondiente al gen endógeno de expresión constante, tubulina. Con la intención de realizar un análisis semicuantitativo, se evaluó mediante densitometría, la intensidad de todas las bandas de ambas proteínas detectadas y se normalizaron los valores de caspasa 9/ tubulina entre cada condición. En la Figura 10 inciso b, se representa en un gráfico, el análisis densitométrico de las bandas obtenidas por quimioluminiscencia.

Los resultados de la evaluación semicuantitativa, revelaron que las células tratadas con un 0.0005% de tritón X100 mostraron una activación de la caspasa 9, muy similar en comparación con las células tratadas con AuNps-Ch. Sin embargo, se observó

una mayor producción de caspasa 9 en las células tratadas con AuNps-Ch en comparación con las tratadas con Ext-Ch, lo cual indica una mayor inducción a la apoptosis en el caso de las AuNps-Ch.

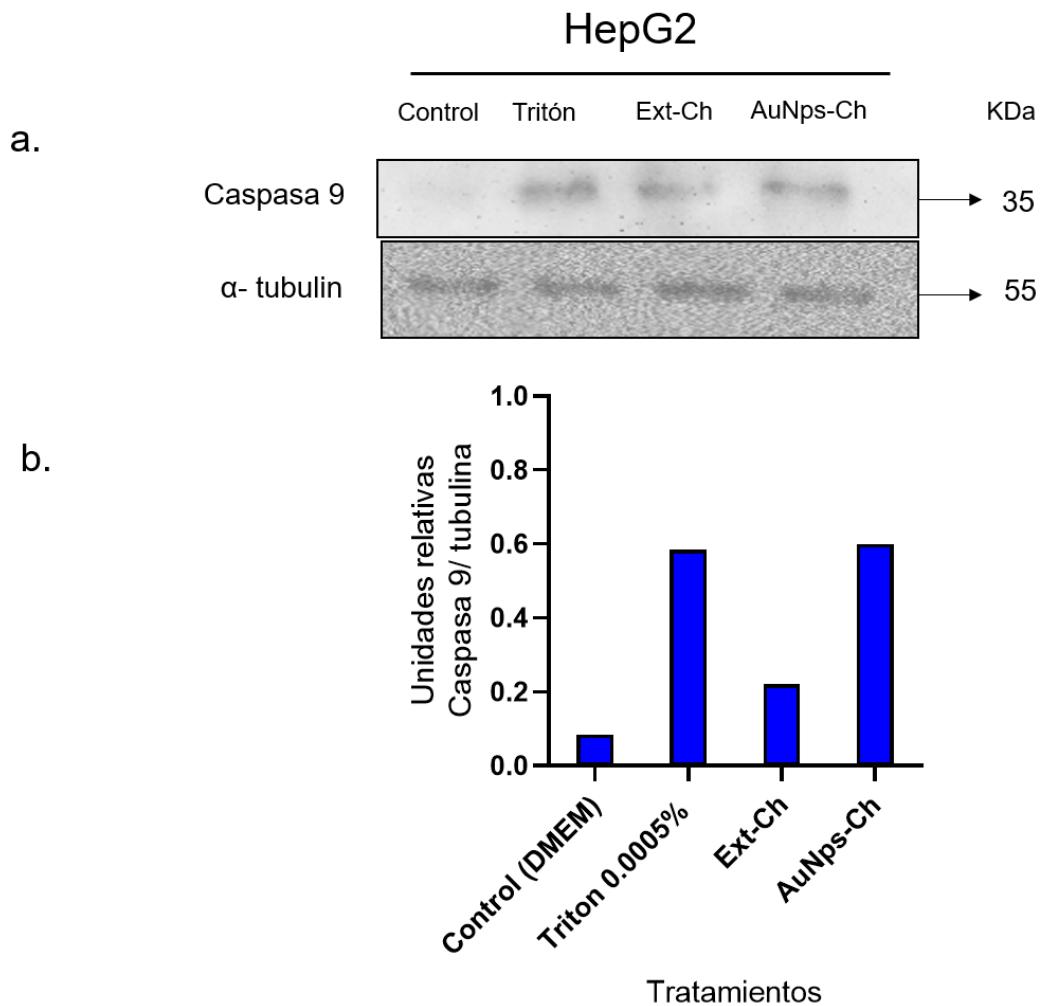


Figura 10. Análisis de la activación de caspasa 9 en células HepG2 tratadas con AuNps-Ch. Se realizó una inmunodetección en fase sólida, en el inciso a), se muestra las bandas de la caspasa 9 en 35 KDa y en el panel superior, y una banda de correspondiente a la proteína constitutiva, tubulina en 55 KDa en el panel inferior. En el inciso b). Se representa una gráfica con el análisis densimétrico de la intensidad de banda, normalizando el valor de caspasa9/ tubulina.

## **VI. DISCUSIÓN**

La incidencia creciente del cáncer de hígado, ha generado la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos que reduzcan la alta tasa de mortalidad. Es por ello, que se ha recurrido a la nanotecnología como una opción para transportar moléculas con capacidad terapéutica y mejorar la efectividad respecto a las opciones existentes. Las nanopartículas de oro tienen la capacidad de unir moléculas como lo son las acetogeninas, las cuales han demostrado tener una alta capacidad antitumoral. En este proyecto se diseñó y evaluó a nanopartículas de oro, en el que se usó como agente reductor, extracto de *Annona cherimola*.

En las hojas de *Annona cherimola*, se ha reportado una gran variedad y cantidad de acetogeninas. Para aumentar la capacidad de extracción de estos compuestos, utilizamos de la técnica de extracción asistida por ultrasonido. De acuerdo con los reportes de Aguilar Villalva R., en 2021, esta técnica tiene mayor rendimiento en comparación con extracción por Soxhlet o maceración. La técnica se basa en la utilización de ondas sonoras de alta frecuencia para generar ondas de choque que generan cavitación en el líquido que rodea las células vegetales de la planta, esta cavitación provoca la ruptura de las paredes celulares y permite la liberación de los compuestos bioactivos (Aguilar Villalva R y col, 2021, Wang Y y col, 2013). Al estandarizar este proceso en nuestras condiciones, obtuvimos un extracto con una gran cantidad de compuestos bioactivos, disminuyendo significativamente tiempo requerido para la extracción, lo cual reduce la posibilidad de que los fitoquímicos obtenidos, se comiencen a degradar al estar expuestos al medio ambiente menor tiempo o alterarse por el aumento de la temperatura de extracción. Además, la técnica por ultrasonido tiene la ventaja de no requerir la utilización de solventes, compuestos que requieren de un proceso posterior para su eliminación.

El uso de extractos naturales en la nanotecnología es una práctica muy extendida, ya que presenta diversas ventajas, entre ellas, su capacidad para actuar como precursor sintético, un claro ejemplo de esto fue reportado por Klekotko M y col, en 2019, sintetizando nanopartículas de oro a través del extracto de *Mentha piperita* para la reducción del ácido cloroáurico (Ali, M y col, 2021). En este proyecto,

realizamos la síntesis de nanopartículas de oro utilizando Ext-Ch, lo que la convierte en una síntesis verde, al utilizar extractos de origen natural, renovable y sin el uso solventes tóxicos. Los compuestos presentes en el extracto, tales como polifenoles, flavonoides y acetogeninas, contienen grupos hidroxilos, carboxilos y cetonas, los cuales actúan como donadores de electrones y reducen los iones de oro (Au 3+) a partir del cloruro de oro (HAuCl<sub>4</sub>). Además, el Ext-Ch sirve como estabilizador de las nanopartículas de oro, ya que tienen la capacidad de adsorberse en la superficie y prevenir su aglomeración y la oxidación (Hakke V y col, 2021; Vijayan R y col 2021)

Una vez sintetizadas las AuNps-Ch, se realizaron pruebas fisicoquímicas para conocer sus características y determinar si de acuerdo a su carga y tamaño son aptas para poder posteriormente realizar las pruebas *in vitro*, ya que, estas condiciones son determinantes para la interacción entre las nanopartículas y las células. Se determinó la concentración de fenoles totales en las AuNps-Ch y Ext-Ch con el fin de conocer su poder oxidativo e igualar su concentración experimental respecto a esta característica sobre las células, ya que esto determina la cantidad de compuestos orgánicos bioactivos. Utilizamos el método de Folin-Ciocalteu, la cual se basa en la oxidación de los fenoles en presencia de ácido fosfomolíbdico y reactivo de Folin-Ciocalteu. La solución del reactivo es una solución alcalina de sulfato de sodio y tungsteno, se agrega fosfomolibdato de sodio, que se reduce en presencia de fenoles para dar lugar a un complejo azul intenso. La cantidad de fenoles totales en la muestra se determina a partir de una curva de calibración previamente hecha utilizando el ácido gálico como estandar (Slinkard K y col, 1997; Ainsworth EA y col, 2007).

Aunque los compuestos mayoritarios presentes en el extracto Ext-Ch son las acetogeninas, se ha utilizado el método de Folin-Ciocalteu para cuantificar fenoles totales y también puede emplearse para cuantificar acetogeninas debido a que comparten grupos funcionales fenólicos que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu de manera similar a otros fenoles (Ainsworth EA y col, 2007). No obstante, es importante destacar que, si bien existen otras formas de cuantificar el poder oxidativo del Ext-Ch, como el método de DPPH, (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), el uso de

este reactivo puede interferir en la cuantificación del poder oxidativo de nuestras AuNps-Ch, ya que la longitud de onda a la que emite el reactivo DPPH es de 517 nm, es muy cercana a la longitud de onda de las AuNps-Ch que ronda entre los 500-580 nm (Razamura- Carmona F y col, 2021).

Es importante conocer la concentración de las nanopartículas de oro que se encuentra en las AuNps-Ch, ya que es la manera de determinar la concentración de AuNps-Ch a utilizar en los ensayos de viabilidad con azul de tripano y de esta manera determinar la CL50. Una vez obtenida la CL50 podremos equiparar la concentración de fenoles totales entre las AuNps-Ch y Ext-Ch. Además, conocer la cantidad de nanopartículas de oro es esencial ya que, si bien se han usado como dispensador de fármacos por su biocompatibilidad, es importante tener en cuenta los posibles efectos a concentraciones elevadas, debido a que el oro puede liberar iones oro, que podrían inducir necrosis celular. Este tipo de muerte celular puede desencadenar una respuesta inflamatoria y causar daño adicional a células cercanas (Abdelhalim M y col; 2018; Hossen S y col, 2019).

Adicionalmente, se realizó una caracterización de las AuNps-Ch utilizando espectroscopía de absorción Uv-Vis, que es una técnica que se basa en la interacción de las nanopartículas de oro con la luz, dependiendo el tamaño, forma y entorno (Murphy C y col, 2008). Estas interacciones están asociadas a la resonancia plasmónica de superficie, fenómeno óptico que ocurre en las nanopartículas debido a la interacción de la luz con los electrones libres en la superficie de la partícula. Esta se produce cuando la frecuencia de la luz coincide con la frecuencia de la resonancia de los plasmones y ahí se produce una fuerte interacción entre la luz y los plasmones, lo que resulta una absorción selectiva de luz. Las nanopartículas de oro tienen una longitud de onda característica que oscila entre los 500 y los 10000 nm, variando según su morfología. Por ejemplo, las nanopartículas de oro esféricas presentan una absorción máxima en el rango de 520 a 580 nm, mientras que las nanocajas de oro entre 600 y 800 nm, y los nanocables de oro tienen su absorción máxima entre 800 y 1000 nm (Mizutani T y col, 2015; Murphy C y col, 2008). En nuestros resultados,

observamos una absorción máxima de 552 nm, lo que indica que se sintetizaron nanopartículas de oro con morfología esférica.

Una vez se obtuvo la concentración y caracterización de las nanopartículas, se procedió a realizar análisis físicos que son relevantes para comprender su interacción con las células. Estos análisis se centraron en determinar el tamaño de las nanopartículas y su potencial de carga superficial.

La medición del tamaño de las nanopartículas se realizó mediante dispersión de luz dinámica. Esta técnica se basa en la interacción de las partículas en solución con un haz de luz láser. Cuando el haz de luz atraviesa la solución de las nanopartículas, estas dispersan la luz en diferentes direcciones debido a su movimiento browniano. La dispersión de luz cambia con el tiempo debido a los cambios de posición de las partículas, lo cual permite determinar su tamaño (Alami, A. et al., 2020; Wyatt, P., 2021). La importancia del tamaño de nanopartícula influye en el mecanismo de internalización a la célula, ya que dependiendo su tamaño puede ingresar a través de distintos procesos de endocitosis. En nuestro caso, se propone que la endocitosis se lleva a cabo a través de vesículas de clatrina, de acuerdo a las limitantes de tamaño en este sistema, que van entre 35 a 200 nm (Li Y y col, 2019). La endocitosis mediada por clatrina es un proceso en el cual los extractos de las nanopartículas se unen a diferentes receptores dependiendo el tipo de células, en el caso de los hepatocitos se ha demostrado que están involucrados los receptores, de asialoglicoproteínas (ASGPR), transferina (TfR), acido fólico (FR), entre otros (Yan L, 2020). Una vez que las nanopartículas se unen al receptor, esto deforma la membrana generando una invaginación que da origen a vesículas. En este proceso de formación vesicular se anclan adaptadores que finalmente ensamblarán a las clatinas con el fin de recubrir por completo la vesícula y ser un marcapasos para su tráfico intracelular. Ya dentro de la célula, las vesículas se fusionan con organelos como endosomas tempranos, en donde las nanopartículas pueden ser liberadas en las endosomas y luego dirigirse a diferentes compartimentos intracelulares, como los endosomas tardíos o los lisosomas (De Almeida S y col, 2021; Li Y y col, 2019).

La interacción de las nanopartículas entre sí y con otras moléculas, es dependiente de una característica física, denominada potencial Zeta. Este potencial es una medida de la carga eléctrica en la superficie de las partículas en suspensión determinante para predecir su capacidad de agregación. Un valor de potencial zeta negativo más alejado a cero, significa que las nanopartículas se repelen entre sí, lo que evita su agregación y sedimentación. Por lo tanto, esta característica define la interacción de las nanopartículas con las membranas celulares, induciendo su internalización. Las AuNps-Ch registraron un potencial Zeta de -10.6, lo que le permite interaccionar con los grupos polares de los lípidos de la membrana celular, pueden aumentar su afinidad y facilitar la endocitosis. De igual manera el potencial Zeta en las nanopartículas puede mejorar su estabilidad y biodisponibilidad, lo que facilita su transporte a través de las membranas celulares (Mahmoudi M y col, 2010). Es importante tener en cuenta que estas mediciones se realizan en suspensión acuosa, por lo tanto, el medio de crecimiento de las células de cultivo influye en las propiedades de las nanopartículas. En nuestro caso, el DMEM contiene una variedad de componentes como aminoácidos, vitaminas, sales y glucosa (Sabuncu A y col, 2012). En la sección V.2.4 de nuestros resultados, se comparan el comportamiento de las nanopartículas en agua y DMEM, al analizar los datos se observa que el líquido en el que se encuentre las nanopartículas tiene un impacto significativo en el potencial Zeta y en el tamaño de las nanopartículas. Estudios previos realizados por Saw y col. en 2018, han demostrado que los componentes iónicos del medio, influyen en la estabilidad coloidal de las nanopartículas y en la repulsión electrostática entre ellas (Sabuncu A y col, 2012; Saw W y col, 2018).

Una vez conocida las características fisicoquímicas de las nanopartículas, se procedió a realizar los ensayos de viabilidad celular, estos resultados revelaron que a medida que aumentaba la concentración de las AuNps-Ch, se observaba un incremento en la muerte celular en ambas líneas celulares, con una mayor sensibilidad en la línea HepG2. Existen varios factores que contribuyen a que las células cancerosas sean más sensibles en comparación con la línea IMR-90. Estudios realizados por Yan y col en 2020, han demostrado que las células

cancerosas pueden sobreexpresar receptores que están involucrados en la internalización de nanopartículas y otras moléculas, lo que resulta en una mayor internalización de las nanopartículas en las células cancerígenas (Yan L y col; 2020). Además, según la investigación de Priyadarsini en 2014, las células cancerosas enfrentan un estrés constante debido a su rápido crecimiento y demandas metabólicas, como un mayor consumo de nutrientes y una preferencia por la glicólisis aeróbico, así como una mayor demanda de glutamina. Como respuesta a este estrés, las células cancerosas pueden adaptarse y desarrollar mecanismos para captar en mayor cantidad los componentes de los extractos. Esta adaptación metabólica en las células cancerosas puede ser aprovechada en los nuevos tratamientos contra el cáncer, al utilizar extractos que contengan fitoquímicos que puedan ser utilizados como nutrientes y además que posean poder antiproliferativo. Esta modificación metabólica conlleva un aumento del potencial de internalización de las nanopartículas en las células cancerosas, aumentando por lo tanto su sensibilidad y toxicidad hacia estas células malignas. Lo que explicaría porqué las células de origen no tumoral, como las IMR-90, pueden ser menos susceptibles debido a un metabolismo más estable y regulado (Oberlies N, 1997; Priyadarsin K, 2014). Estos resultados muestran que las AuNps-Ch pueden ser un prometedor tratamiento contra el cáncer de hígado, al aumentar su susceptibilidad las células cancerosas.

Los datos obtenidos hasta el momento, nos indicaban que las nanopartículas están disminuyendo la viabilidad con mayor eficacia en las células tumorales. Sin embargo, desconocíamos el proceso celular a través del cual se realizaba esta muerte. Indagamos si nuestro tratamiento está induciendo apoptosis. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de inmunodetección de fase sólida. Este ensayo es una técnica que permite detectar la presencia de proteínas específicas en las células. Los tratamientos utilizados fueron control negativo, control positivo y una concentración equiparada a los fenoles totales entre el Ext-Ch y AuNps-Ch para observar y comparar la diferencia entre la inducción de la muerte celular entre el nanosistema y el extracto solo.

Se observa una mayor expresión de caspasa 9 en las células tratadas con AuNps-Ch en comparación con el Ext-Ch, este mismo efecto se ha visto con estudios realizados con Meenakshisundaram y col. en 2019, que reportan una mayor inducción en muerte celular en células de cáncer de pulmón utilizando nanopartículas de plata con extractos de *Annona muricata*. Este comportamiento se le atribuye a las acetogeninas en la nanopartícula, efecto que se ve potenciado al aumentar la estabilidad y protección en la nanopartícula a las acetogeninas. Sin olvidar el efecto sinérgico de los compuestos activos naturales de los extractos, que mejoran comparativamente su efecto respecto a un producto purificado (Meenakshisundaram y col, 2019; Lazzarini, R y col, 2016)

## **VII. CONCLUSIONES**

Se sintetizaron y caracterizaron AuNps-Ch empleando un método verde basado en extractos enriquecidos de acetogeninas de las hojas de *Annona cherimola* como precursor.

Las células HepG2 en comparación con las células IMR-90, presentan una mayor sensibilidad al ser tratadas con AuNps-Ch.

Las AuNps-Ch inducen apoptosis en las células HepG2 por la vía intrínseca.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

**Abdelhalim MAK et al. (2018).** Evaluation of gold nanoparticles toxicity on rat liver and kidney: Biochemical, histological, and molecular assessments. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(11), e22202.

**Adeoye, A. O., Quadri, R. O., & Lawal, O. S. (2023).** Wet synthesis, characterization of goethite nanoparticles and its application in catalytic pyrolysis of palm kernel shell in TGA. *Results in Surfaces and Interfaces*, 11, 100118. <https://doi.org/10.1016/j.rsurfi.2023.100118>

**Aguilar-Villalva, R., Molina, G., España-Sánchez, B., Díaz-Peña, L., Elizalde-Mata, A., & Valerio, E. et al. (2021).** Antioxidant capacity and antibacterial activity from *Annona cherimola* phytochemicals by ultrasound-assisted extraction and its comparison to conventional methods. *Arabian Journal Of Chemistry*, 14(7), 103239. doi: 10.1016/j.arabjc.2021.103239

**Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007).** Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature protocols*, 2(4), 875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>

**Alami, A., Lagarde, F., Huo, Q., Zheng, T., Baitoul, M., & Daniel, P. (2020).** Acetylcholine and acetylcholinesterase inhibitors detection using gold nanoparticles coupled with dynamic light scattering. *Sensors International*, 1, 100007. doi: 10.1016/j.sintl.2020.100007

**Ali, S., Iqbal, M., Naseer, A., Yaseen, M., Bibi, I., & Nazir, A. et al. (2021).** State of the art of gold (Au) nanoparticles synthesis via green routes and applications: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 16, 100511. doi: 10.1016/j.enmm.2021.100511

**Alshameri, A., & Owais, M. (2022).** Antibacterial and cytotoxic potency of the plant-mediated synthesis of metallic nanoparticles Ag NPs and ZnO NPs: A review. *Opennano*, 8, 100077. doi: 10.1016/j.onano.2022.100077

**American Joint Committee on Cancer.** (2017). ¿Qué es el cáncer de hígado?, recuperado el 22 de Febrero de 2022, en <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-higado/acerca/que-es-cancer-de-higado.html>

**Arroyo A**, J., Prashad G, M., Vásquez B, Y., Li P, E., & Tomás C, G. (2005). Actividad citotóxica in Vitro de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Publica, 22(4), 247-253. Retrieved from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342005000400002](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000400002)

**Bhagya**, N., & Chandrashekhar, K. R. (2022). Autophagy and cancer: Can tetrandrine be a potent anticancer drug in the near future? Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 148, 112727. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112727>

**Carranza-Aguilar**, C. J, S. L., González-Espinosa, C., Ruiz-Quiñonez, A. K., & Cruz-Martín-del-Campo (2020). Tipos de muerte celular y sus implicaciones Clínicas. El Residente, 15(3), 97–112. <https://doi.org/10.35366/95960>

Caspase-9 antibody. Cell Signaling Technology. (n.d.). <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/caspase-9-c9-antibody/9502>

**Chan**, F. K., Moriwaki, K., & De Rosa, M. J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 979, 65–70. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7)

**Cisneros Garza**, L. E., & Aiza Haddad, I. (2022). Hepatocellular carcinoma in Mexico. Clinical Liver Disease, 19(2), 73–77. <https://doi.org/10.1002/cld.1196>

**De Almeida**, M., Susnik, E., Drasler, B., Taladriz-Blanco, P., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2021). Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine. Chemical Society Reviews, 50(9), 5397–5434. doi:10.1039/d0cs01127d

**Díaz-de-Cerio**, E., Aguilera-Saez, L. M., Gómez-Caravaca, A. M., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez, A., Fernández, I., & Arráez-Román, D. (2018). Characterization of bioactive compounds of *Annona cherimola* L. leaves using a combined approach based on HPLC-ESI-TOF-MS and NMR. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410(15), 3607–3619. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1051-5>

**Durán**, A. G., Gutiérrez, M. T., Mejías, F. J. R., Molinillo, J. M. G., & Macías, F. A. (2021). An Overview of the Chemical Characteristics, Bioactivity and Achievements Regarding the Therapeutic Usage of Acetogenins from *Annona cherimola* Mill. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(10), 2926. <https://doi.org/10.3390/molecules26102926>

**Feng M**, Pan Y, Kong R, Shu S. Therapy of Primary Liver Cancer. *Innovation* (2020). 2020 Aug 28;1(2):100032. doi: 10.1016/j.xinn.2020.100032. Epub 2020 Aug 10. PMID: 32914142; PMCID: PMC7416132.

**Ferreiro J.**, Barceló R, García J. Inmunoterapia y sus Efectos Secundarios: Una Revisión General (2020). Fast Facts: Manejo De Eventos Adversos Relacionados Con El Sistema Inmunitario En Oncología, 2020: 10.1159

**Gómez López**, A. (2017). Nanomedicina y su impacto en la práctica médica. *Repertorio De Medicina Y Cirugía*, 26(3), 129-130. doi: 10.1016/j.reper.2017.06.003

**González Vega**, M. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y subtropical de valores promisorios. *Cultivos Tropicales*, 34(3), 52-63. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0258-59362013000300008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-59362013000300008)

**Grobmyer**, S. R., Ghali, L., Roitt, I., Munoz, L. P., & Bayford, R. (2021). Exploiting the efficacy of Tyro3 and folate receptors to enhance the delivery of gold nanoparticles into colorectal cancer cells *in vitro*. *Nanoscale advances*, 3(18), 5373–5386. <https://doi.org/10.1039/d1na00318f>

**Hakke**, V., Sonawane, S., Anandan, S., Sonawane, S., & Ashokkumar, M. (2021). Process Intensification Approach Using Microreactors for Synthesizing

Nanomaterials—A Critical Review. *Nanomaterials*, 11(1), 98. doi: 10.3390/nano11010098

**Hammami, I., Alabdallah, N., jomaa, A., & kamoun, M. (2021).** Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. *Journal Of King Saud University - Science*, 33(7), 101560. doi: 10.1016/j.jksus.2021.101560

**Hong, Z., Lu, Y., Ran, C., Tang, P., Huang, J., Yang, Y., Duan, X., & Wu, H. (2021).** The bioactive ingredients in *Actinidia chinensis* Planch. Inhibit liver cancer by inducing apoptosis. *Journal of ethnopharmacology*, 281, 114553. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114553>

**Hossein, S. (2019).** Nanoparticle-mediated combination therapy: Two-in-one approach for cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 9697-9713.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51254-1.00012-9>

**Ketelut-Carneiro, N., & Fitzgerald, K. A. (2022).** Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis-Oh My! The Many Ways a Cell Can Die. *Journal of molecular biology*, 434(4), 167378. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167378>

**Latournerie, M., Guillygomarc'h, A., Bardou-Jacquet, E., Brissot, P., & Raoul, J. (2012).** Metástasis hepáticas. *EMC - Tratado De Medicina*, 16(2), 1-8. doi: 10.1016/s1636-5410(12)61921-7

**Lazzarini, R., Alcántar-Ramírez, O., Jaime-Cruz, R., García-Monterrubio, E., Gutiérrez-Ruiz, M., & Gómez-Quiroz, L. (2016).** Las nanopartículas de oro de 20 nm inhiben la proliferación e invasión de células de carcinoma mamario humano MCF7, in vivo. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias Y Nanotecnología*, 8(15), 96-107. doi: 10.22201/ceiich.24485691e.2015.15.53886

**Lee, P. D., Sladek, R., Greenwood, C. M., & Hudson, T. J. (2002).** Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome research*, 12(2), 292-297.

**Li**, Y., Zhang, X., Lin, J., Li, R., & Yue, T. (2019). Extracting lipid vesicles from plasma membranes via self-assembly of clathrin-inspired scaffolding nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 239–248. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.01.00

**Li**, Y., Zhang, X., Polakiewicz, R. D., Yao, T. P., & Comb, M. J. (2008). HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced β-catenin nuclear localization. *Journal of Biological Chemistry*, 283(18), 12686-12690. DOI: 10.1074/jbc.C800042200

**Liu**, N., Yang, H. L., Wang, P., Lu, Y. C., Yang, Y. J., Wang, L., & Lee, S. C. (2016). Functional proteomic analysis revels that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. *Journal of ethnopharmacology*, 189, 210–217.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.045>

**Mahmoudi**, M., & Lynch, I. (2010). The importance of nanoparticle shape in determining cellular uptake. *Chemical Science*, 1(4), 358-367. DOI: 10.1039/c0sc00170a.

**Meenakshisundaram**, S., Krishnamoorthy, V., Jagadeesan, Y., Vilwanathan, R., & Balaiah, A. (2020). *Annona muricata* assisted biogenic synthesis of silver nanoparticles regulates cell cycle arrest in NSCLC cell lines. *Bioorganic Chemistry*, 95, 103451. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.103451

**Miyoshi**, H., Ohshima, M., Shimada, H., Akagi, T., Iwamura, H., & McLaughlin, J. L. (1998). Essential structural factors of Annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Biochimica et biophysica acta*, 1365(3), 443–452.  
[https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(98\)00097-8](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00097-8)

**Mizutani**, T., Ogawa, S., Murai, T., Nameki, H., Yoshida, T., & Yagi, S. (2015). In situ UV-vis investigation of growth of gold nanoparticles prepared by solution plasma sputtering in NaCl solution. *Applied Surface Science*, 354, 397–400. doi: 10.1016/j.apsusc.2015.04.139

**Montes**, S. A., Rodríguez, S. A., & Borunda, A. J. (2018). Biología molecular: Fundamentos Y Aplicaciones en las ciencias de la salud. McGraw Hill Education.

**Motola-Kuba**, D., Zamora-Valdés, D., Uribe, M., & Méndez-Sánchez, N. (2006). Hepatocellular carcinoma. an overview. Annals of Hepatology, 5(1), 16–24. [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)32034-4](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)32034-4)

**Murphy**, C. J., Gole, A. M., Stone, J. W., Sisco, P. N., Alkilany, A. M., Goldsmith, E. C., & Baxter, S. C. (2008). Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. Accounts of Chemical Research, 41(12), 1721–1730. doi:10.1021/ar800035u

**Neske**, A., Ruiz Hidalgo, J., Cabedo, N., & Cortes, D. (2020). Acetogenins from Annonaceae family. Their potential biological applications. Phytochemistry, 174, 112332. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112332>

**NIH**. Nanotechnology Cancer Therapy and Treatment. [monografía en internet] [Consultado el 22 de Febrero 2022]. Disponible en :<https://www.cancer.gov/nano/cancer-nanotechnology/treatment#:~:text=Nanotechnology%20offers%20the%20means%20to,ands%20other%20current%20treatment%20modalities.>

**Oberlies**, N. H., Chang, C. J., & McLaughlin, J. L. (1997). Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. Journal of medicinal chemistry, 40(13), 2102–2106. <https://doi.org/10.1021/jm9700169>

**OMS,Cáncer**. (2022). Retrieved 4 August 2023, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

**Parveen**, A., Malashetty, V., Shetty, P., Patil, V., & Deshpande, R. (2022). Rapid and easy identification of genes associated with nanoparticles from plant protein structure database. Opennano, 8, 100071. doi: 10.1016/j.onano.2022.100071

**Pazo Cid**, R. A., Álvarez, A., & Caballero de Miguel, A. (2012). Apoptosis, cáncer & Co. Revista Internacional de Grupos de Investigación En Oncología.

**Priyadarsini, K. I. (2014).** Chemical and structural features influencing the biological activity of curcumin. In Studies in Natural Products Chemistry (Vol. 42, pp. 331-358). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-444-63269-3.00011-9

**Rady, I., Bloch, M. B., Chamcheu, R. N., Banang Mbeumi, S., Anwar, M. R., Mohamed, H., Babatunde, A. S., Kuiate, J. R., Noubissi, F. K., El Sayed, K. A., Whitfield, G. K., & Chamcheu, J. C. (2018).** Anticancer Properties of Graviola (*Annona muricata*): A Comprehensive Mechanistic Review. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 1826170. <https://doi.org/10.1155/2018/1826170>

**Rami, J., Patel, C., Patel, C., & Patel, M. (2021).** Thermogravimetric analysis (TGA) of some synthesized metal oxide nanoparticles. *Materials Today: Proceedings*, 43, 655-659. doi: 10.1016/j.matpr.2020.12.554

**Reig, M., Forner, A., Ávila, M., Ayuso, C., Mínguez, B., & Varela, M. et al. (2021).** Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Actualización del documento de consenso de la AEEH, AEC, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH. *Medicina Clínica*, 156(9), 463.e1-463.e30. doi: 10.1016/j.medcli.2020.09.022

**Runel, G., Lopez-Ramirez, N., Chlasta, J., & Masse, I. (2021).** Biomechanical Properties of Cancer Cells. *Cells*, 10(4), 887. <https://doi.org/10.3390/cells10040887>

**Sabuncu, A., Grubbs, J., Qian, S., Abdel-Fattah, T., Stacey, M., & Beskok, A. (2012).** Probing nanoparticle interactions in cell culture media. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 96-102. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.02.022

**Sala, M., Varela, M., Forner, A., & Bruix, J. (2005).** Diagnóstico temprano del cáncer de hígado. *Gastroenterología Y Hepatología*, 28(5), 292-297. doi: 10.1157/13074066

**Salimi-Jeda, A., Ghabeshi, S., Gol Mohammad Pour, Z., Jazaeri, E. O., Araiinejad, M., Sheikholeslami, F., Abdoli, M., Edalat, M., & Abdoli, A. (2022).** Autophagy Modulation and Cancer Combination Therapy: A Smart Approach in Cancer Therapy. *Cancer treatment and research communications*, 30, 100512. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2022.100512>

**Saw**, W., Ujihara, M., Chong, W., Voon, S., Imae, T., & Kiew, L. et al. (2018). Size-dependent effect of cystine/citric acid-capped confeito-like gold nanoparticles on cellular uptake and photothermal cancer therapy. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 365-374. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.10.064

**Schirrmacher** V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International journal of oncology*, 54(2), 407–419. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>

**Silverthorn**, D. U., & Johnson, B. R. (2019). *Fisiología Humana: Un Enfoque integrado*. Editorial Médica Panamericana.

**Singh**, P., Pandit, S., Mokkapati, V. R. S. S., Garg, A., Ravikumar, V., & Mijakovic, I. (2018). Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1979. <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>

**Singh**, P., Pandit, S., Mokkapati, V. R. S. S., Garg, A., Ravikumar, V., & Mijakovic, I. (2018). Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1979. <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>

**Slinkard**, K., & Singleton, V. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal Of Enology And Viticulture*, 28(1), 49-55. doi: 10.5344/ajev.1977.28.1.49

**Sudha**, P.N., Sangeetha, K., Vijayalakshmi, K. and Barhoum, A. (2018) Nanomaterials History, Classification, Unique Properties, Production and Market. In: Makhlouf, A.S.H. and Barhoum, A., Eds., *Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures*, Elsevier, Cambridge, 341-384.

**Tacherfiout**, M., Petrov, P. D., Mattonai, M., Ribechini, E., Ribot, J., Bonet, M. L., & Khettal, B. (2018). Antihyperlipidemic effect of a *Rhamnus alaternus* leaf extract in Triton-induced hyperlipidemic rats and human HepG2 cells. *Biomedicine &*

pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 101, 501–509.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.106>

**Vijayan, R., & Joseph, S. (2021).** Plant compounds for the synthesis of gold nanoparticles and their applications. *Journal of Cluster Science*, 32(4), 723-737. doi: 10.1007/s10876-021-02029-w

**Villanueva, A. (2019).** Hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 380(15), 1450-1462. doi: 10.1056/NEJMra1713263

**Wang, C., Zhao, M., Liu, Y. R., Luan, X., Guan, Y. Y., Lu, Q., Yu, D. H., Bai, F., Chen, H. Z., & Fang, C. (2014).** Suppression of colorectal cancer subcutaneous xenograft and experimental lung metastasis using nanoparticle-mediated drug delivery to tumor neovasculature. *Biomaterials*, 35(4), 1215–1226.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.091>

**Wang, S Giri., P., Banerjee, A., & Layek, B. (2022).** A Recent Review on Cancer Nanomedicine. *Cancers*, 15(8), 2256. doi: 10.3390/cancers15082256

**Wang, Y., Xiong, X., & Huang, G. (2023).** Ultrasound-assisted extraction and analysis of maidenhairtree polysaccharides. *Ultrasonics Sonochemistry*, 95, 106395. doi: 10.1016/j.ultsonch.2023.106395

**Wyatt, P. (2021).** Differential light scattering and the measurement of molecules and nanoparticles: A review. *Analytica Chimica Acta*: X, 7-8, 100070. doi: 10.1016/j.acax.2021.100070

**Yan L. (2020).** "Clathrin-Mediated Endocytosis of Gold Nanoparticles in Cancer Cells." *Bioconjugate Chemistry*. 31(2): 303-309. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00877.

**Yan, L., Shen, J., Wang, J., Yang, X., Dong, S., & Lu, S. (2020).** Nanoparticle-Based Drug Delivery System: A Patient-Friendly Chemotherapy for Oncology. *Dose-Response*, 18(3), 155932582093616. doi: 10.1177/1559325820936161

**Zahari**, N., Chong, G., Abdullah, L., & Chua, B. (2020). Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) Process on Thymol Concentration from Plectranthus Amboinicus Leaves: Kinetic Modeling and Optimization. *Processes*, 8(3), 322. doi: 10.3390/pr8030322

**Zhao**, Y., Wen, C., Feng, Y., Zhang, J., He, Y., & Duan, Y. et al. (2021). Effects of ultrasound-assisted extraction on the structural, functional and antioxidant properties of Dolichos lablab L. Protein. *Process Biochemistry*, 101, 274-284. doi: 10.1016/j.procbio.2020.11.027

**Zuo**, C., Zou, Y., Gao, G., Sun, L., Yu, B., Guo, Y., Wang, X., & Han, M. (2022). Photothermal combined with intratumoral injection of annonaceous acetogenin nanoparticles for breast cancer therapy. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 213, 112426. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112426>