

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
Ciencias de la Vida
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Análisis farmacocinético de nanopartículas luminiscentes con
quitosano y ácido fólico para uso en detección de cáncer de
mama**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Eduardo Lucero Meza

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Eduardo Lucero Meza
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Patricia Juárez Camacho
Codirectora de tesis

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores
Codirector de tesis

Miembros del comité

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier

Dra. Karina Garay Palmett

Dr. David Cervantes Vásquez



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Eduardo Lucero Meza © 2022

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Eduardo Lucero Meza** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Análisis farmacocinético de nanopartículas luminiscentes con quitosano y ácido fólico para uso en detección de cáncer de mama

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho

Codirectora de tesis

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores

Codirector de tesis

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracteriza por el crecimiento desregulado de células, donde su diagnóstico y resección pueden ser complicados debido a la alta tasa de falsos negativos o positivos derivados de fallas técnicas y humanas, por lo que actualmente se emplean agentes de contraste que hacen más fácil de identificar el tejido tumoral. No obstante, estos tienden a acumularse en ciertos tejidos, por lo que es necesario explorar alternativas que complementen los métodos de detección de cáncer actuales. Por lo anterior, nuestro grupo de laboratorio se ha enfocado en la investigación de nanopartículas luminiscentes sintetizadas a partir de elementos de terras raras, como son las nanopartículas YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺, las cuales, son capaces de emitir luz al ser excitadas con longitudes de ondas pertenecientes al espectro visible y ultravioleta respectivamente. Estas nanopartículas pueden ser funcionalizadas con polímeros naturales y ligandos específicos para receptores expresados en células de cáncer, con lo que se lograría mejorar su biocompatibilidad y especificidad para detectar a las células cancerosas. Partiendo de esos principios, en este trabajo se sintetizaron y se caracterizaron nanopartículas YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺, las cuales fueron funcionalizadas con quitosano y ácido fólico. Posteriormente se compararon sus características fisicoquímicas y se comprobó *in vitro*, que, ambas nanopartículas no son citotóxicas para células normales, y que a altas concentraciones, las nanopartículas YAG:Ce³⁺, disminuyen la proliferación de células cancerígenas. Posteriormente, se determinaron los efectos que las nanopartículas podrían causar *in vivo* en un modelo murino por medio de análisis farmacocinético, biodistribución y cuantificación de células del sistema inmune. Los resultados de estos análisis demostraron que las nanopartículas YAG:Ce³⁺, funcionalizadas con quitosano y ácido fólico, podrían ser seguras para su utilización en organismos vivos, ya que no se observó acumulación en la mayoría de los tejidos explorados ni decremento significativo en las poblaciones de células inmunes analizadas. No obstante, aún se requieren de estudios futuros en el área de nanopartículas luminiscentes para determinar las mejores condiciones fisicoquímicas y luminiscentes para su aplicación *in vivo*.

Palabras clave: nanopartículas luminiscentes, quitosano, ácido fólico, farmacocinética, biomarcadores, biocompatibilidad.

Abstract of the thesis presented by **Eduardo Lucero Meza** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

Pharmacokinetics analysis of luminescent nanoparticles with chitosan and folic acid to use in breast cancer detection.

Abstract approved by:

Dra. Patricia Juárez Camacho

Codirectora de tesis

Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores

Codirector de tesis

Cancer is a group of diseases characterized by unregulated cell growth, in which diagnosis and resection can be hard to perform due to the high rate of false negatives or positives derived from technical issues and human error, therefore, contrast agents are currently used to facilitate tumor tissue detection. However, current contrast agents tend to accumulate in certain tissue, so it's necessary to explore new alternatives to complement and enhance current cancer detection methods. Because of this, our research group has focused on investigating luminescent nanoparticles synthesized from rare earth elements, such as YAG:Ce³⁺ and Gd₂O₃:Eu³⁺, which are capable of emitting light when they're stimulated by wavelengths within the visible and ultraviolet spectrum respectively. These nanoparticles can be functionalized with natural polymers and specific ligands for certain receptors expressed on cancer cells, thus enhancing their biocompatibility and specificity to detect these cells. From these principles, in this work, YAG:Ce³⁺ and Gd₂O₃:Eu³⁺ nanoparticles were synthesized and functionalized with chitosan and folic acid. Then, their physicochemical characteristics were compared and it was found *in vitro*, that both nanoparticles are not cytotoxic to normal cells, and that at high concentrations, YAG:Ce³⁺ nanoparticles decrease cancer cell proliferation. Then, the effects these nanoparticles could have *in vivo* in a murine model were determined via pharmacokinetic analysis, bioaccumulation, and immune cell quantification. The results of these analyses show that YAG:Ce³⁺ nanoparticles, when functionalized with chitosan and folic acid, could be safe for their use on living organisms, as there was no visible accumulation in most of the explored tissue nor a significant decrease of the immune cells that were analyzed. Regardless of this, future studies are still necessary to determine the best physicochemical and luminescent conditions for these nanoparticles to be used *in vivo*.

Keywords: luminescent nanoparticles, chitosan, folic acid, pharmacokinetics, biomarkers, biocompatibility.

Dedicatoria

A mis padres, Ma Elizabeth Meza Higuera y Francisco Javier Lucero León, quienes me inculcaron los valores que ahora me hacen un hombre de bien. Agradeceré eternamente sus enseñanzas, pues me han hecho una persona responsable, consciente y sobretodo resiliente. Mi madre que siempre me crió con amor y me llevó por el camino de la rectitud, y mi padre que siempre me inculcó el valor de la responsabilidad a partir del ejemplo. Ambos me enseñaron que debo tomar acción y no esperar a que la vida suceda por sí sola. Ambos mi mayor motivación y ejemplo para aprender de mis errores y así crecer y alcanzar siempre una mejor versión de mi.

En memoria de mi padre, el señor Francisco Javier Lucero León, un valiente y alegre maquinista de barco, quien surcaba los mares para proveer siempre salud y bienestar a su familia. Un valiente guerrero que aún durante su batalla contra el cáncer, mostró siempre la sonrisa más contagiosa entre los presentes. Mi educación, valores y la cualidad de sonreírle a la adversidad han sido la mejor herencia que me dejó.

*“El tiempo pasa, la gente sigue adelante.
Como el flujo de un río, nunca termina.
Una mentalidad infantil se transforma en una noble ambición.
Un amor joven se volverá un profundo afecto.
La superficie del agua clara refleja crecimiento.
Ahora escucha la serenata del agua y reflexiona sobre ti mismo.”*

- **Sheik**, La Leyenda de Zelda: Ocarina del Tiempo.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por permitirme llevar acabo mis estudios y experimentos en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca que me fue otorgada para poder concluir mis estudios de maestría.

A mis directores de tesis, la Dra. Patricia Juárez Camacho y al Dr. Gustavo Alonso Hirata Flores, por la confianza depositada en mi al aceptarme como su alumno. Por su guía y motivación para llevar a cabo cada experimento, apoyándome y respondiendo a cada una de mis dudas con toda paciencia.

A los miembros que conforman mi comité de tesis, el Dr. David Cervantes Vásquez, la Dra. Karina Garay Palmett y al Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier, por sus valiosas aportaciones a este proyecto que dieron durante cada presentación de avance de tesis. Especial agradecimiento al Dr. Pierrick Fournier, por tomarse el tiempo de instruirme y apoyarme durante mis experimentos *in vivo*.

Al Dr. Prakhar Sengar, por compartir parte de sus conocimientos en nanomateriales y biotecnología conmigo, respondiendo siempre con detalle y detenimiento a mis dudas.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a mis compañeros PnP: Oscar Colunga, Paloma Almeida, Tonatzin Zertuche, Paloma Acosta, Brenda Iduarte, Claudia Alcira, mis "senseis", que siempre me apoyaron cuando lo necesité en el laboratio, aparte de que hicieron del ambiente en el lugar más ameno.

Al grupo de bellos amigos que hice al iniciar este posgrado, con quienes pasé varios de los mejores momentos durante estos dos años de maestría: Gustavo Velázquez, Cristina Nafarrate, Francisca Zayas, Manuel Matus, Antonio Gorriño, Edna Arvizu y Vianey Cabello.

A Chiquis, mi noble y fiel compañera de desvelos, que me ha visto crecer (y desvelarme) desde primaria.

A mis amigos de toda la vida y de la licenciatura, que de alguna manera, siguen presentes en mi vida.

Tabla de contenido

| | Página |
|---|--------|
| Resumen en español..... | ii |
| Resumen en inglés..... | iii |
| Dedicatorias..... | iv |
| Agradecimientos..... | v |
| Lista de figuras..... | viii |
| | |
| Capítulo 1. Introducción | |
| 1.1 El cáncer de mama, diagnóstico y resección..... | 1 |
| 1.2 Nanopartículas luminiscentes y su funcionalización..... | 3 |
| 1.3 Antecedentes | 5 |
| 1.3.1 Funcionalización de nanopartículas YAG:Ce ³⁺ y Gd ₂ O ₃ :Eu ³⁺ | 5 |
| 1.3.2 Farmacocinética de nanopartículas funcionalizadas..... | 8 |
| 1.3.3 Respuesta inmune innata y adaptativa nanopartículas..... | 10 |
| 1.3 Justificación..... | 12 |
| 1.4 Hipótesis..... | 12 |
| 1.5 Objetivo..... | 12 |
| 1.5.1 Objetivo general..... | 12 |
| 1.5.2 Objetivos específicos..... | 12 |
| | |
| Capítulo 2. Metodología | |
| 2.1 Síntesis de nanopartículas..... | 14 |
| 2.1.1 Síntesis de nanopartículas YAG:Ce ³⁺ por método Sol-Gel..... | 14 |
| 2.1.2 Síntesis de nanopartículas Gd ₂ O ₃ :Eu ³⁺ por combustión asistida por sacarosa..... | 14 |
| 2.2 Ultrasonificación de nanopartículas..... | 15 |
| 2.3 Funcionalización con quitosano..... | 15 |
| 2.3.1 Preparación de solución de quitosano..... | 15 |
| 2.3.2 Funcionalización con quitosano por nanoprecipitación..... | 16 |
| 2.4 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas..... | 16 |
| 2.4.1 Ensayo de fotoluminiscencia..... | 16 |
| 2.4.2 Difracción de rayos X..... | 16 |
| 2.4.3 Potencial Zeta..... | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.4 Espectrofotometría UV-Visible..... | 17 |
| 2.4.5 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)..... | 18 |
| 2.5 Evaluación biológica..... | 18 |
| 2.5.1 Cultivos celulares..... | 18 |
| 2.5.2 Ensayo de viabilidad celular (MTT) | 19 |
| 2.5.3 Administración de nanopartículas en ratones para análisis de farmacocinética y biodistribución..... | 19 |
| 2.5.4 Análisis de farmacocinética..... | 19 |
| 2.5.5 Análisis de bioacumulación en tejidos por espectrofluorometría..... | 20 |
| 2.5.6 Microscopía confocal para análisis de tejidos..... | 20 |
| 2.5.7 Análisis de actividad inmunológica por citometría de flujo..... | 21 |
| | |
| Capítulo 3. Resultados | |
| 3.1 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas YAG:Ce ³⁺ y Gd ₂ O ₃ :Eu ³⁺ | 23 |
| 3.1.1 Caracterización de fotoluminiscencia de nanopartículas YAG:Ce ³⁺ y Gd ₂ O ₃ :Eu ³⁺ | 23 |
| 3.1.2 Determinación de estructura cristalina por difracción de Rayos X | 24 |
| 3.1.3 Potencial Zeta..... | 25 |
| 3.1.4 Análisis de grupos funcionales por espectrometría UV-Visible | 26 |
| 3.1.5 Análisis de tamaño y morfología por microscopía electrónica de transmisión..... | 28 |
| 3.2 Evaluación biológica <i>in vitro</i> | 29 |
| 3.2.1 Ensayo de viabilidad celular..... | 29 |
| 3.3 Evaluación biológica <i>in vivo</i> | 32 |
| 3.3.1 Análisis de farmacocinética en sangre..... | 32 |
| 3.3.2 Análisis de bioacumulación en tejidos..... | 33 |
| 3.3.3 Análisis de tejidos por microscopía confocal..... | 35 |
| 3.3.4 Análisis de actividad inmunológica..... | 36 |
| | |
| Capítulo 4. Discusión..... | 40 |
| | |
| Capítulo 5. Conclusiones..... | 43 |
| | |
| Literatura citada..... | 44 |

Lista de figuras

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Diferencias entre emisión por conversión descendente y conversión ascendente..... | 4 |
| 2 | Estructura cristalina y coordinación de una unidad de óxido de aluminio e itrio tipo granate dopado con iones de cerio..... | 6 |
| 3 | Estructura cristalina y coordinación de una unidad de óxido de gadolinio dopado con iones europio..... | 7 |
| 4 | Principales factores que influyen en la farmacocinética de distintos nanomateriales..... | 9 |
| 5 | Nanopartículas obtenidas..... | 23 |
| 6 | Espectros de excitación y emisión de luz de las nanopartículas desnudas, tratadas con quitosano y tratadas con quitosano y ácido fólico..... | 24 |
| 7 | Patrón de difracción de rayos X obtenido para las nanopartículas..... | 25 |
| 8 | Potencial zeta de las nanopartículas YAG:Ce ³⁺ y Gd ₂ O ₃ :Eu ³⁺ desnudas, tratadas con quitosano y tratadas con quitosano y ácido fólico..... | 26 |
| 9 | Espectros de absorción en el espectro visible de las nanopartículas..... | 27 |
| 10 | Micrografías de TEM de nanopartículas YAG:Ce ³⁺ a diferentes magnificaciones..... | 28 |
| 11 | Micrografías TEM de nanopartículas YAG:Ce ³⁺ funcionalizadas..... | 29 |
| 12 | Influencia en la viabilidad celular al tratar A) células 293T y B) Células MDA-MB-231 con diferentes concentraciones de nanopartículas YAG:Ce ³⁺ , YAG:Ce ³⁺ /Ch y YAG:Ce ³⁺ /Ch-FA..... | 30 |
| 13 | Influencia en la viabilidad celular al tratar A) células 293T y B) Células MDA-MB-231 con diferentes concentraciones de nanopartículas Gd ₂ O ₃ :Eu ³⁺ , Gd ₂ O ₃ :Eu ³⁺ /Ch y Gd ₂ O ₃ :Eu ³⁺ /Ch-FA..... | 31 |
| 14 | Espectros de emisión de sangre lisada..... | 32 |
| 15 | Espectros de emisión de tejidos..... | 33 |
| 16 | Picos máximos de emisión estandarizados a 520 nm..... | 34 |
| 17 | Micrografías confocales de riñón..... | 35 |

| | | |
|----|--|----|
| 18 | Micrografías confocales de hígado..... | 36 |
| 19 | Porcentaje de población de células de linaje mieloide..... | 37 |
| 20 | Porcentaje de población de células de linaje linfoide..... | 38 |

Capítulo 1. Introducción

1.1 El cáncer de mama, diagnóstico y resección

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracteriza por la división descontrolada de células que poseen inmortalidad replicativa y que pueden evadir la muerte celular programada (apoptosis), llegando a formar tumores que interfieren con el funcionamiento del organismo (Pérez-Herrero *et. al.*, 2015). Cuando estas células logran migrar del órgano inicial a otro en un proceso que se conoce como metástasis, la calidad de vida del paciente se ve aún más comprometida (American Cancer Society, 2015).

El cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia en el sexo femenino y a pesar de los avances en nuevos métodos de diagnóstico, la aparición de nuevos casos de este padecimiento sigue incrementando cada año (Wang *et al.*, 2019; Sung *et. al.*, 2020). Según el Observatorio Global del Cáncer (GCO por sus siglas en inglés), en el año 2020 se estimaron 2,261,419 nuevos casos de cáncer de mama en el mundo y 684,996 muertes a causa del mismo padecimiento (Sung *et. al.*, 2020), mientras que en México, donde el cáncer de mama es también el más prevalente en el sexo femenino, se registraron 29,929 nuevos casos y se le atribuyeron 7,931 muertes en ese mismo año (Sung *et. al.*, 2020).

La mamografía es el método de detección de cáncer de mama por excelencia (Hassan *et al.*, 2011), no obstante, el sobre diagnóstico y falsos positivos son un serio problema que aún necesita ser remediado (Houssami, 2017). Aunado a su imprecisión, la exposición prolongada a los rayos X que estos equipos emiten puede resultar contraproducente, pudiendo incrementar la probabilidad de desarrollar la enfermedad (de González *et. al.*, 2004).

Otros dispositivos que existen para el diagnóstico de cáncer de mama son los que emplean la emisión de microondas y ultrasonido, pero el diagnóstico debe ser complementado con mamografía al igual que las imágenes obtenidas por resonancia magnética (MRI). Los dispositivos de MRI permiten generar imágenes multi-direccionales sin exponer al paciente a radiación ionizante, pero su uso está condicionado a pacientes de alto riesgo (i. e. con alta densidad mamográfica). El principio funcional de los equipos de MRI es a partir de la interacción entre un fuerte campo electromagnético con los protones en el tejido del paciente. Uno de los parámetros que determinan la calidad de la imagen, es la densidad de protones de agua que se encuentran en los tejidos, la cual suele ser muy baja, por lo que se utilizan agentes de contraste (Veiga *et. al.*, 2020). Los líquidos de contraste son utilizados para obtener mejores imágenes y detalles que

diferencian a un tejido de otro, por lo tanto incrementando las densidades entre tejidos tumorales malignos y benignos así como entre tejido sano y tumoral (Feng-Zhi *et. al.*, 2020). Los líquidos de contraste que se encuentran con mayor frecuencia en el mercado y en la práctica clínica, son los agentes de contraste yodados, entre los cuales se encuentran el iodixanol, utilizado en imagenología arterial y coronaria; el iohexol y la iopromida, utilizados para imagenología de tejido cerebral; y el iodixanol, cuyo uso es más general y utilizado para escaneo de cuerpo completo (Aslan *et. al.*, 2020). Estos y otros agentes de contraste a base de yodo presentan varias desventajas, pues pueden provocar náusea, fiebre, vómito, y reacciones alérgicas, además de una rápida eliminación del sistema circulatorio, pero con tendencia a acumularse en tejido nervioso, riñones e hígado (Aslan *et. al.*, 2020; Feng-Zhi *et. al.*, 2020). Los agentes de contraste son clave en los estudios por CT y MRI, pues con ellos se resalta y delimita el área lesionada con respecto al tejido normal, haciendo posible evaluar el tamaño, morfología y patrón de desarrollo de la malignidad (Feng-Zhi *et. al.*, 2020).

La interpretación de resultados en imagenología está propensa al error humano, pues estos son analizados a comprensión y vista del personal médico, complicando el diagnóstico debido a la complejidad y diferencias morfológicas que existe entre el tejido neoplásico entre diferentes pacientes (Feng *et. al.*, 2020). También se tiene una variabilidad significativa en la capacidad de diagnóstico entre diferentes modelos de equipos de MRI (Kuroki-Suzuki *et. al.*, 2010). La tomografía computarizada, por otro lado, presenta menor discrepancia entre diferentes equipos, sin embargo, esta técnica por sí sola (sin agente de contraste), no es efectiva para detectar cáncer en etapas tempranas debido a su menor sensibilidad y limitada resolución espacial (Rahmim *et. al.*, 2008).

Otro problema ligado a la detección de células cancerosas, es la dificultad de diferenciar el tejido neoplásico del tejido sano durante cirugía, donde la completa extracción de células tumorales es fundamental para evitar recaídas de la enfermedad. La mayoría de los cirujanos aún utilizan su propia vista y tacto para palpar e identificar el tejido maligno durante una cirugía de resección de tumor, dejando posibles residuos tumorales que pueden culminar en una recurrencia y por consiguiente, en más procedimientos quirúrgicos a futuro (Song *et. al.*, 2019). Varias alternativas se han propuesto para contrarrestar esta problemática, una muy prometedora es el diagnóstico intraoperatorio empleando agentes fluorescentes. En el trabajo de Song *et. al.* (2019), por ejemplo, utilizaron nanoplateformas cargadas con un agente fluorescente estimulable a 780 nm (IR-780) para extraer tumores de cáncer de mama en un modelo murino. Otro método utilizado para la resección de un tumor, es el de Low *et. al.* (2020), donde realizaron una cirugía para extraer un tumor cerebral pediátrico con el apoyo de una

técnica de MRI intraoperatoria, aunque en este caso, el equipo es bastante costoso y no muy práctico durante la cirugía.

Una alternativa a los agentes yodados, son los agentes de contraste a base de gadolinio (GBCA), un elemento lantánido o tierra rara pesada. Estos agentes de de contraste han tenido una extensiva utilización en imagenología por CT-Scan y MRI desde la aprobación del primer agente de contraste de este tipo en 1988 (Fu *et. al.*, 2020). No obstante, se ha observado que los GBCA en pacientes con enfermedad crónica de riñones, promueven el desarrollo de fibrosis nefrogénica sistémica y tienden también a acumularse en tejido nervioso por largos periodos de tiempo incluso en pacientes sin disfunciones renales, aunque no se han identificado efectos adversos derivados de esta acumulación (Perazella, 2009; Kanda *et. al.*, 2015; Fu *et. al.*, 2020). Con esto en mente, se han buscado alternativas que empleen otros elementos, y gracias a los recientes avances en nanotecnología, se ha logrado el desarrollo de nuevos agentes de contraste a escalas nanométricas y con características que permiten un diagnóstico preciso (Fu *et. al.*, 2020).

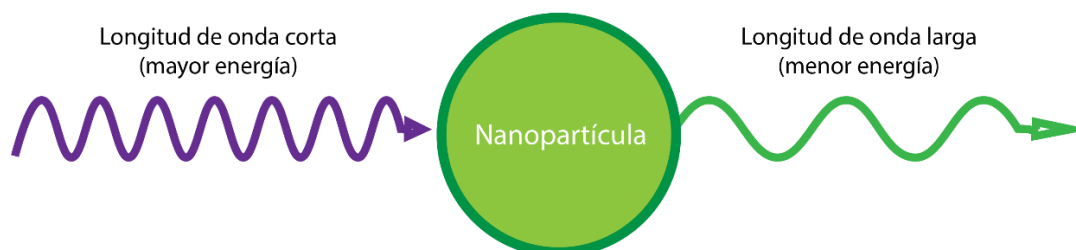
1.2 Nanopartículas luminiscentes y su funcionalización

Actualmente se busca mejorar los métodos de imagenología ya existentes a partir de nanopartículas estimulables con diferentes tipos de radiación electromagnética, a este tipo de nanopartículas, se les conoce como nanopartículas fotoluminiscentes, pues son capaces de emitir luminiscencia al ser estimuladas por la absorción de fotones provenientes de otra fuente de luz de determinada longitud de onda. Este fenómeno ocurre gracias a que los electrones excitados por estimulación óptica vuelven a su estado basal, lo que es acompañado por la emisión de fotones (Wang *et.al.*, 2019). La emisión de fotones en estos sistemas puede darse por conversión ascendente o conversión descendente. En las nanopartículas de conversión ascendente (Figura 1), los electrones son excitados por fotones de longitud de onda larga (baja energía) para emitir un fotón a una longitud de onda corta (alta energía) (Figura 1). Por otro lado, la conversión descendente consiste en excitar a los electrones con la incidencia de fotones a una longitud de onda corta (alta energía) para emitir un fotón a una longitud de onda más larga, es decir, de menor energía (Loo *et al.*, 2019).

Las nanopartículas son materiales que poseen por lo menos una dimensión igual o menor a 100 nm, y es por su tamaño, estabilidad de carga, hidrofiliidad y la posibilidad de ser funcionalizadas, que tienen gran

potencial para utilizarse en aplicaciones biomédicas como el diagnóstico de varios tipos de cáncer (Perfézou *et. al.*, 2012). Existe una vasta variedad de nanopartículas con diferentes características que se atribuyen al método de síntesis y a los elementos que las componen. Algunos materiales empleados son las tierras raras, que por sus características intrínsecas, han adquirido especial atención en el área de bioimagenología como bioetiquetadores y agentes de contraste (Osorio, 2018; Araichimani *et. al.*, 2020). Al incluir tierras raras en una nanoestructura adecuada se obtienen materiales capaces de emitir energía luminiscente, con gran estabilidad química (Boukerika *et. al.*, 2014).

Emisión por conversión descendente



Emisión por conversión ascendente

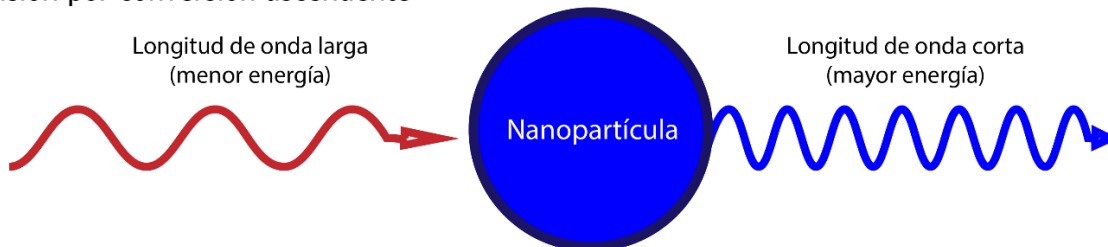


Figura 1. Diferencia entre emisión por conversión descendente y conversión ascendente. En la conversión descendente se inciden fotones de una longitud corta (alta energía) para emitir una longitud de onda más larga (menor energía). Caso contrario con la emisión ascendente, donde la longitud de onda incidente es de menor energía a la emitida.

A pesar de tener gran potencial para usos en biotecnología, la toxicidad de las nanopartículas luminiscentes de tierras raras es muy poco conocida, especialmente en las que podrían utilizarse en imagenología, pero se sabe que la toxicidad de estos materiales puede deberse a la concentración, vía de suministro y carga superficial (Dong *et. al.*, 2012). Para mitigar efectos citotóxicos de nanopartículas metálicas se emplean cubiertas poliméricas como polietilenglicol (PEG), quitosano y alcohol polivinílico para lograr mayor biocompatibilidad y tiempos de vida media aprovechables en circulación (Dong *et. al.*, 2012; Marcato, 2014; Pem *et. al.*, 2018).

Los iones de lantánidos o de tierras raras por sí solos y sin un material huésped, pueden generar problemas de citotoxicidad e inestabilidad química al ser suministrados en organismos vivos, observando daños en el DNA y organelos celulares. Por esto, se opta por dopar materiales biocompatibles con iones de tierras raras, lo que resuelve el problema de la inestabilidad química y la citotoxicidad, además de aprovechar las propiedades ópticas de estos iones (Mondal *et. al.*, 2020). En el trabajo de Mondal *et. al.* (2020), se utilizó hidroxiapatita como material hospedero para iones de Eu^{3+} y Gd^{3+} , donde observaron que esta combinación es adecuada para utilizarse en métodos de imagenología *in vivo* no invasiva, pues no reportan una citotoxicidad significativa del material mientras se observan sus propiedades fotoluminiscentes a través de la piel del modelo utilizado. No obstante, el trabajo carece de estudios farmacocinéticos, ya que sólo reportan que el material ya no es observable en el área suministrada después de 24 h, más no se reporta la búsqueda de acumulación del material en algún otro tejido.

Un compuesto muy utilizado como mejorador de biocompatibilidad, es el quitosano, un polisacárido que resulta de la desacetilación de la quitina, componente principal del exoesqueleto de crustáceos (Nikapitiya *et. al.*, 2018). Este material posee propiedades que dependerán de su grado de desacetilación (número de grupos -NH) y peso molecular. Entre sus atributos, destaca su excelente biocompatibilidad, que no es antigénico, es hidrofílico y puede interactuar con distintos componentes celulares de manera beneficiosa (Zhong *et. al.*, 2020). El quitosano es capaz de interrumpir de manera transitoria uniones adherentes en tejidos, lo que le agrega un componente de permeabilidad, un motivo más por el que puede ser utilizado como un transportador de fármacos a sitios específicos como tumores, pues podría penetrar hasta el microambiente tumoral, sumado a que ya actúa como un mejorador de biocompatibilidad de una extensa variedad de nanopartículas metálicas (Croisier *et. al.*, 2013; Alavi *et. al.*, 2019). Por las características mencionadas, el quitosano es un material con gran potencial y extensivo uso en áreas como la medicina, biotecnología, alimentos, agricultura y la industria en general (Nikapitiya *et. al.*, 2018).

1.3 Antecedentes

1.3.1 Funcionalización de nanopartículas $\text{YAG}:\text{Ce}^{3+}$ y $\text{GdO}:\text{Eu}^{3+}$

Uno de los elementos de tierras raras que llama la atención, es el ion cerio (Ce^{3+}), pues al dopar con este ion una matriz de granate de óxido de aluminio e itrio (YAG) (Figura 2), se obtiene un material con excelente estabilidad química y propiedades ópticas favorables, como la posibilidad de ser excitadas luz

visible y una emisión muy característica (Boukerika *et. al.*, 2014). En la matriz YAG, los iones Ce^{3+} son estimulables con luz del espectro visible en el intervalo de 400 a 520 nm, con lo que emiten luz a una longitud de onda de entre 480 a 700 nm (Osorio, 2018). En otras palabras, las nanopartículas de $\text{YAG}:\text{Ce}^{3+}$ son capaces de emitir una luz en color amarillo verdoso al ser estimuladas con luz azul no ionizante (Dong *et. al.*, 2012 ; Osorio, 2018).

Se ha comprobado que el $\text{YAG}:\text{Ce}^{3+}$, en forma de nanovarillas y nanopartículas sin modificaciones superficiales, son citocompatibles con células troncales de médula ósea (Guo *et. al.*, 2016) y en células de cáncer de hígado (HepG2) (Dong *et. al.*, 2012) Esto es por la presencia de grupos hidroxilo (OH-) y carboxilo (COO-) presentes en la superficie de la matriz YAG, lo que le da una inherente hidrofiliidad, contribuyendo a su biocompatibilidad. En el trabajo de Osorio (2018) se comprobó que las nanopartículas de $\text{YAG}:\text{Ce}^{3+}$ no son citotóxicas en dos líneas celulares de cáncer de mama (MB-MDA-231 y T47-D), en este caso sin recubrimiento y con recubrimiento de quitosano.

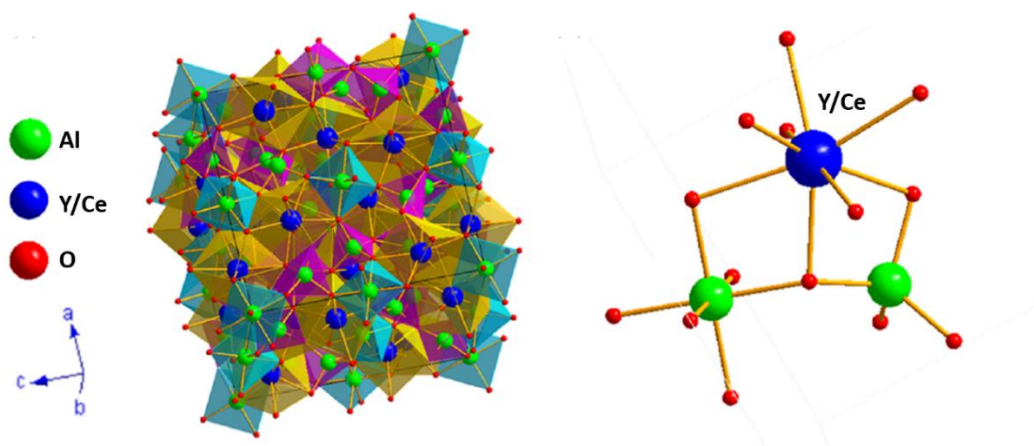


Figura 2. Estructura cristalina y coordinación de una unidad de óxido de aluminio e itrio tipo granate dopado con iones de cerio. El cerio reemplaza al itrio de manera sustitutiva en la estructura. Figura adaptada, obtenida de: Wang *et al.*, (2015).

Otro tipo de nanopartículas a base de tierras raras y con propiedades prometedoras para su aplicación en imagenología *in vivo*, son las de óxido de gadolinio dopadas con el ion europio ($\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$). El Gd_2O_3 presenta una estructura cristalina (Figura 3) que por su estabilidad química y térmica, resulta ser un buen hospedero para el ion Eu^{3+} (Jain *et. al.*, 2016). Las nanopartículas de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ muestran una emisión en los ~ 612 nm al ser excitadas con luz a ~ 254 nm. Debido a que los compuestos a base de gadolinio son ampliamente utilizados como agentes de contraste en la resonancia magnética, estos son muy estudiados

en ensayos toxicológicos, donde se ha determinado baja toxicidad. Debido a esto, las nanopartículas $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ podrían ser aptas para aplicaciones biológicas como inmunoensayos y bioimagenología *in vivo* (Jain *et. al.*, 2016).

La fotoluminiscencia de estos materiales, tanto $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ y $\text{YAG}:\text{Ce}^{3+}$, está estrechamente relacionado con el tamaño del cristal, morfología y tamaño de la partícula, parámetros que dependen del método de síntesis y el tratamiento térmico que se le da al material (Jain *et. al.*, 2016; Osorio, 2018).

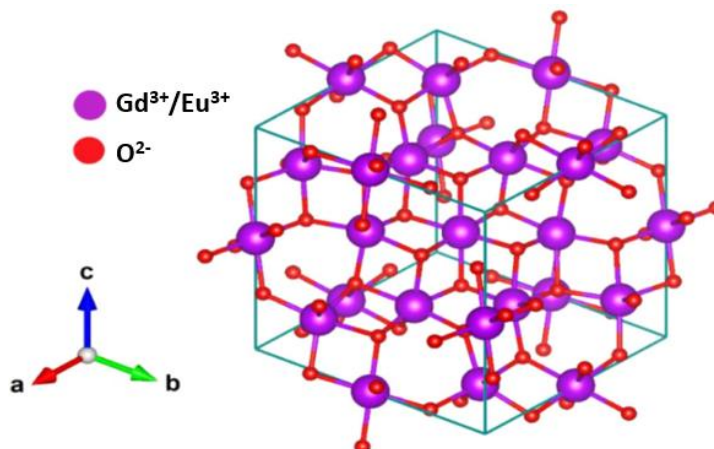


Figura 3. Estructura cristalina y coordinación de una unidad de óxido de gadolinio dopado con iones europio. En esta estructura el europio se coloca de manera sustitutiva en los espacios del gadolinio en una proporción menor a éste. Figura adaptada, obtenida de: *Abdelrehman et al.*, (2020).

Debido a que el quitosano es insoluble en soluciones neutras, su tiempo de vida en circulación es el suficiente para soportar la pronta degradación en el torrente sanguíneo (Zhao *et. al.*, 2018). Se ha reportado que el quitosano tampoco desencadena respuestas inmunes, propiedad que lo hace muy deseable como un medio de transporte para fármacos y nanopartículas para fines de tratamiento (Zhao *et. al.*, 2018). Se puede obtener mayor especificidad con la adición de ligandos en la superficie del quitosano, por sus grupos amino, es con otros grupos funcionales y ligandos específicos hacia receptores de interés presentes en tejidos determinados. Un ejemplo de estos ligandos, es el ácido fólico, una molécula utilizada primordialmente durante el desarrollo embrionario, se obtiene de la dieta o como suplemento alimenticio, y se involucra en procesos metabólicos como la obtención de energía y síntesis de ácidos nucleicos, siendo una vitamina esencial para el crecimiento y mantenimiento celular (De Giori *et. al.*, 2018).

La mayoría de las células de mamífero consiguen sus requerimientos de folato a través de transportadores, siendo una minoría las células que expresan los receptores de folato (FRs) en cantidades considerablemente altas. Ejemplos de esto son los macrófagos activados y sus precursores, ya que estos se acumulan y consumen ácido fólico en sitios de inflamación; células de riñón en la superficie apical del tubo proximal, donde los FRs captan el FA de la orina para transportarlo a través del epitelio y regresarlo al torrente sanguíneo; y células de cáncer, que por sus altos requerimientos de FA para síntesis de nucleótidos, expresan altas concentraciones de FRs, lo que explicaría la gran necesidad de estas células por el limitado nutriente (Xia *et al.*, 2010). Las células toman al ácido fólico a través de la endocitosis mediada por receptores de folato. Estos receptores han sido encontrados en gran concentración en diferentes tipos de cáncer, entre ellos, el cáncer de pulmón y de mama (Jain *et al.*, 2018). En el trabajo de Osorio (2018) se observó mayor internalización de las nanopartículas tratadas con quitosano, pero el efecto fue aún mayor cuando se funcionalizaron con ácido fólico, por lo que adicionando receptores de folato a nanopartículas cubiertas con quitosano, sería posible detectar y/o tratar tejido tumoral de cáncer de mama que exhiba alta expresión de receptores de folato..

1.3.2 Farmacocinética de nanopartículas funcionalizadas

La farmacocinética estudia los tiempos de absorción, biodistribución, metabolismo y excreción de un fármaco suministrado a un individuo para describir y estimar la concentración del fármaco en fluidos corporales y tejidos (Marcato, 2014). También es posible determinar dosificación del material, efectos secundarios provocados por su acumulación en ciertos tejidos, determinar los sitios de distribución y biotransformación, vías de excreción y la frecuencia con la que puede ser suministrado el material (Marcato, 2014).

Se ha observado un mejoramiento de las características farmacocinéticas cuando un fármaco es encapsulado en un sistema nanoscópico, ya que incrementan su biodisponibilidad, su concentración en el sitio de acción y su internalización en las células objetivo (Marcato, 2014). Esto podría aplicar para nanopartículas con superficies modificadas con quitosano, debido a que dependiendo de su densidad polimérica, se puede regular su degradación y la liberación de su contenido. No obstante, son varios los factores que afectan a la farmacocinética de las nanopartículas en general, como el tamaño, carga superficial y modificación de su superficie. La química de superficie de las nanopartículas determina el tipo de proteínas que serán adsorbidas sobre el material, y esto es importante por la inmediata opsonización

que sufre el material al ser suministrado por vía intravenosa, especialmente en nanopartículas con carga superficial positiva (Huang *et. al.*, 2011; Albanese *et. al.*, 2012). En el trabajo de Huang *et. al.* (2011) lograron generar nanopartículas de óxido de hierro funcionalizadas con poli (glicil metacrilato) y ácido fólico, con lo que minimizaron la internalización de las nanopartículas por parte de macrófagos (no activados) y células normales para llegar a células cancerosas, mostrando un mayor tiempo en circulación y respaldando la necesidad por mejorar las superficies de las nanopartículas con materiales poliméricos y ligandos específicos.

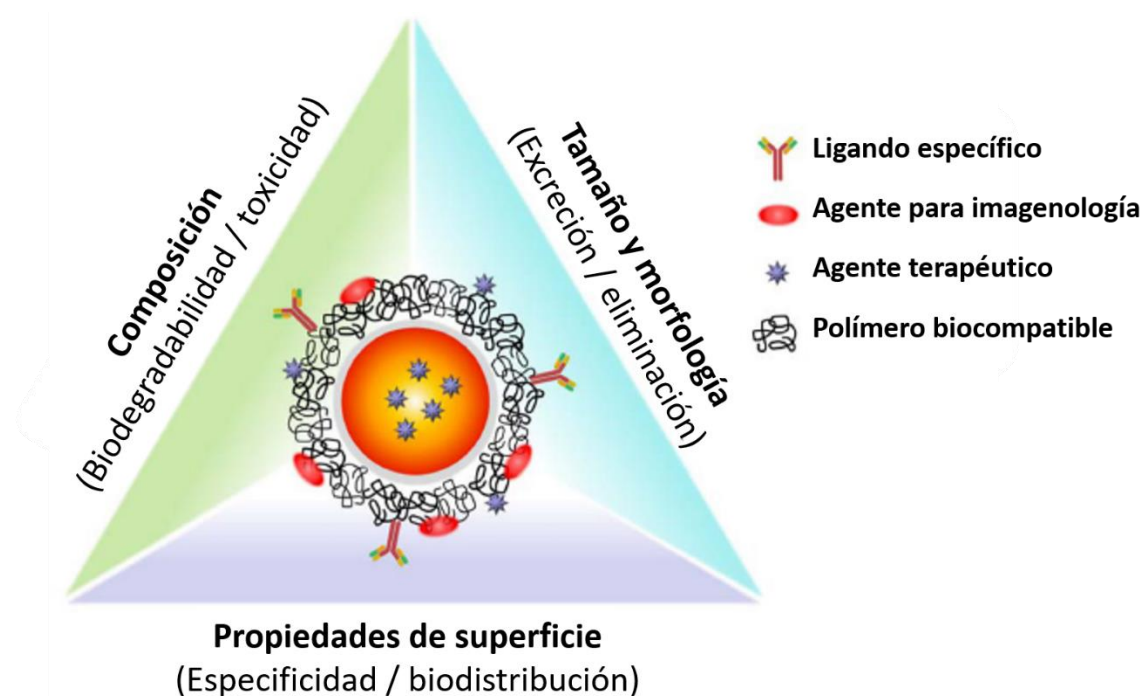


Figura 4. Principales factores que influyen en la farmacocinética de distintos nanomateriales. Imagen adaptada, obtenida de Kang *et. al.*, 2015. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicology of theranostic nanoparticles. *Nanoscale*, 7(45), 18848-18862.

A pesar de que la biodisponibilidad del material es considerada como del 100% cuando se suministra por vía intravenosa, su vida media en circulación es afectada por la opsonización, lo que lleva a la rápida remoción del material por medio del sistema fagocítico mononuclear (MPS) en el bazo e hígado, aunque puede mejorarse el tiempo de circulación agregando PEG al material (Albanese *et. al.*, 2012; Marcato, 2014). A pesar de esto, el tamaño y geometría de las nanopartículas también determina la distribución del material en el cuerpo y su excreción. En general, nanopartículas con un tamaño menor a 6 nm, serán eliminadas rápidamente por los riñones, mientras que nanopartículas con diámetros mayores a 200 nm

tenderán a acumularse en el bazo e hígado, donde son procesadas por células del MPS (Litzinger *et al.*, 1994; Albanese *et. al.*, 2012; Marcato, 2014). En el caso de nanopartículas en el intervalo de 90 y 150 nm, su tiempo en circulación es de alrededor de 4 y 24 h respectivamente (Brinkhuis *et al.*, 2012; Marcato, 2014).

Es importante considerar cómo una nanopartícula va a interactuar con una célula, comenzando con la interacción con receptores superficiales y ligandos presentes en la célula y la nanopartícula respectivamente. Posteriormente, el método de internalización, el cual es determinado no sólo por la composición del material, sino también dependerá en gran medida del tamaño promedio de las nanopartículas. Se ha demostrado que las nanopartículas de un diámetro promedio de 50 nm se internalizan con mayor eficiencia en comparación con otros tamaños, especialmente mejor que tamaños mayores (Rovais *et. al.*, 2018). La mayoría de los mecanismos de endocitosis transportan relativamente pocas cantidades de moléculas, por lo que un sistema de entrega mediado por ligandos específicos debe ser efectivo a bajas concentraciones. Un mecanismo de internalización muy importante, es la endocitosis mediada por receptores, que se lleva a cabo a partir de la interacción de ligandos expuestos en la superficie de las nanopartículas con receptores en la superficie celular. Posteriormente, la membrana envuelve a las nanopartículas y se desprende hacia el interior celular formando una vesícula o endosoma (Kumari *et. al.*, 2011).

1.3.3 Respuesta inmune innata y adaptativa a nanopartículas metálicas

El sistema inmune es el encargado de defender a un organismo frente a amenazas externas, considerando como antígeno a todo agente que genere una respuesta inmune. Este sistema puede dividirse en dos tipos: innato y adaptativo. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa en el cuerpo, y depende del reconocimiento de receptores y patrones moleculares asociados a patógenos que son muy conservados (Mogensen, 2009), es decir, que han sido adquiridos a lo largo de la evolución de la especie. Por otro lado, el sistema inmune adaptativo interactúa específicamente con antígenos que ya fueron procesados por células tanto del sistema inmune innato como el adaptativo para activar células que se encargarán de responder ante una subsecuente aparición del antígeno en cuestión.

Dependiendo de las características de la nanopartícula, como el tamaño, carga, hidrofiliidad e hidrofobicidad, será el efecto que se desencadenará por parte de sistema inmune (Moyano *et al.*, 2012).

La mayoría de las nanopartículas son reconocidas como agentes externos al organismo y son desechadas por el sistema inmune. Sin embargo, si el sistema inmune no considera a la nanopartícula como una amenaza, el material sólo es ignorado o tolerado por el organismo (Luo *et. al.*, 2015). No obstante, en caso contrario, la respuesta inmune puede generar consecuencias indeseables, por lo que es de suma importancia considerar las características fisicoquímicas de nanomateriales cuya intención sea utilizar *in vivo*. También es importante considerar el efecto que se desea lograr al introducir el nanomaterial en un organismo vivo, pues en algunos casos, como lo es en la entrega dirigida de fármacos, es preferible evitar una respuesta inmune. Por otro lado, también es posible utilizar nanopartículas como método de inmunización, pues por modificaciones de superficie, se puede presentar antígenos específicos al sistema inmune adaptativo, haciendo imprescindible que exista interacción con el sistema inmune.

Al administrar nanopartículas *in vivo*, en caso de haber una respuesta inmune, los primeros en actuar son las células del sistema inmune innato (neutrófilos, mastocitos, células dendríticas, macrófagos, etc). Esta interacción desencadena la expresión de citocinas proinflamatorias, secreción de histaminas, en algunos casos muerte celular y el inicio del proceso de presentación de antígeno (fragmentos de la nanopartícula) al sistema inmune adaptativo (Boraschi *et al.*, 2017). Posteriormente, se tendría la activación de linfocitos T y linfocitos B, pudiendo haber un incremento en la población de este tipo de células. Se tiene poca información específica respecto a los efectos de nanopartículas metálicas en linfocitos T, pero ha reportado que algunas nanopartículas como las de TiO_2 , generan un incremento en la activación y proliferación de linfocitos T ingenuos, aparte de provocar un incremento en la maduración de células dendríticas (Schanen *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se determinó si existe algún cambio poblaciones celulares sistema inmune innato y adaptativo de un modelo *in vivo* al ser inoculado con las nanopartículas de YAG:Ce^{3+} y $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, desnudas y funcionalizadas con quitosano y con ácido fólico. También se investigó la farmacocinética de estas nanopartículas, ya que es necesario identificar los efectos que este material causará a nivel sistémico para determinar las condiciones adecuadas en las que este material puede utilizarse, así como su distribución e internalización celular.

1.6 Justificación

Las nanopartículas de YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺ funcionalizadas con quitosano y ácido fólico tienen gran potencial para aplicaciones en imagenología, por eso se plantea el objetivo de evaluar la farmacocinética del material para conocer en qué tejidos se distribuye y su tiempo en circulación. Con esto se busca determinar si las nanopartículas de YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺ son seguras para aplicaciones biomédicas y estimar cantidades de dosificación para su uso en imagenología orientada al diagnóstico de cáncer de mama.

1.7 Hipótesis

Las nanopartículas luminiscentes YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺ funcionalizadas con quitosano y ácido fólico se distribuyen en diferentes tejidos de un modelo murino y son desechadas de su sistema sin provocar efectos adversos.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

Sintetizar, caracterizar y evaluar la farmacocinética y biodistribución de nanopartículas luminiscentes YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺ funcionalizadas con quitosano y ácido fólico en tejidos y tumores *in vivo*.

1.8.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar nanopartículas luminiscentes YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺ desnudas, recubiertas con quitosano y funcionalizadas con ácido fólico y quitosano.

2. Determinar características fisicoquímicas y morfológicas de las seis variedades de nanopartículas sintetizadas.
3. Evaluar citotoxicidad e internalización de las nanopartículas en dos líneas celulares de cáncer de mama y en células normales.
4. Analizar la distribución y acumulación de las nanopartículas en fluidos corporales y tejidos de un modelo *in vivo*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntesis de nanopartículas

2.1.1 Síntesis de nanopartículas YAG:Ce³⁺ por método de Sol – Gel

La síntesis de las nanopartículas YAG:Ce³⁺ se realizó según el protocolo explicado en el trabajo de Osorio (2018), empleando el método de Sol – Gel, ya que este método permite la obtención de un material uniforme en cuanto a morfología y distribución de tamaño. La concentración de iones de Ce³⁺ que se utilizó para dopar la matriz YAG fue del 2%, ya que fue la concentración que mostró mayor emisión en los ensayos de luminiscencia realizados por Osorio (2018). Para esto, se realizaron los cálculos necesarios para sintetizar 1 g de nanopartículas YAG:Ce³⁺ con ese porcentaje de dopado, luego se pesaron los precursores metálicos: nitrato de itrio hexahidratado (Y(NO₃)₃ • 6H₂O), nitrato de aluminio hexahidratado (Al(NO₃)₃ • 6H₂O), nitrato de cerio hexahidratado (Ce(NO₃)₃ • 6H₂O), ácido tartárico (C₄H₆O₆). Después se disolvieron los reactivos en agua desionizada y se mantuvieron en agitación rigurosa durante 24 h. Posteriormente se incrementó la temperatura de la solución a 80° C manteniendo la agitación, donde se comenzó a observar una consistencia gelatinosa, donde poco a poco se incrementó la temperatura hasta los 120° C, punto en el que se fue perdiendo la consistencia gelatinosa hasta observar la formación de un polvo esponjoso y quebradizo, donde se incrementó aún más la temperatura para secar totalmente el material y observar un cambio en la coloración a un tono marrón rojizo. Se procedió a moler en un mortero de ágata hasta obtener un polvo muy fino del mismo tono para después llevarlo al tratamiento térmico en un horno a 1200° C durante 3 h.

2.1.2 Síntesis de nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺ por combustión asistida por sacarosa

Las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺ fueron sintetizadas por el método de combustión asistida por sacarosa, descrita en los trabajos de Jain *et al.* (2016, 2018). En esos trabajos, se determinó que la mayor intensidad de emisión se da con una proporción estequiométrica del 5% del ion Eu³⁺, además de que este método de síntesis resultó en nanopartículas con un tamaño y morfología uniformes (Jain *et al.*, 2016). Con esto en mente, se realizaron los cálculos para sintetizar 1 g de nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺ (Eu=0.05) y se pesaron los precursores metálicos: nitrato de gadolinio (Gd(NO₃)₃) y nitrato de europio (Eu(NO₃)₃). Para la sacarosa,

basándose en el trabajo de Jain *et. al.* (2016, 2018), se calculó una relación de metales y combustible (sacarosa) de 1:2. Se mezclaron los tres reactivos en agua Milli Q durante 25 minutos para luego pasarlo a un horno precalentado a 380° C. Una vez que el horno alcanzó los 380°C de nuevo, se dejó que la combustión ocurriera durante 25 minutos para después sacarlo y dejarlo enfriar a temperatura ambiente. Se pulverizó el material en un mortero de ágata y se le dio un tratamiento térmico durante 3 h a 1000° C. Finalmente, se almacenó para subsecuente análisis y tratamiento con quitosano y ácido fólico.

2.2 Ultrasonicación de nanopartículas

Para evitar agregados en la suspensión del material, se ultrasonicaron las nanopartículas en agua Milli Q en un baño de hielo durante 15 minutos con pulsos de 3s de duración y una amplitud del 75%. Los parámetros fueron ajustados en el equipo Sonics VibraCell VCX750.

La sonicación es necesaria antes del recubrimiento con quitosano y funcionalización con ácido fólico para evitar aglomeraciones en la mayor medida posible. En el caso de las nanopartículas recubiertas con quitosano, se sonicaron en baño de agua durante 5 minutos y suspendidas en 1 ml de agua Milli Q dentro de un tubo Eppendorf.

2.3 Funcionalización con quitosano

2.3.1 Preparación de solución de quitosano

Se preparó una solución de quitosano al 30%: se disolvieron 0.30 g de quitosano en 98 ml de agua desionizada y se agregaron 2 ml de ácido acético glacial (proporción del 2%). Fue necesario agregar hidróxido de sodio (NaOH) 1 M para lograr mantener el pH entre 5 – 6. Una vez estabilizado el pH, se dejó en agitación constante durante 24 horas y pasado el tiempo, una bomba de vacío y un filtro de poliéter sulfona marca Corning con poros de 0.22 µm. Finalmente, se preparó una solución en proporción 1:1 de quitosano en agua desionizada.

2.3.2 Funcionalización con quitosano por nanoprecipitación

Por el método de goteo, se recubrieron con quitosano las nanopartículas YAG:Ce³⁺ o Gd₂O₃:Eu³⁺ previamente obtenidas. Una vez sonicadas las nanopartículas (1 mg/ml), se colocaron en agitación magnética y en un lapso de una hora se adicionaron 2 ml de quitosano con una pipeta Pasteur. Después se realizaron cinco lavados al material por medio de centrifugación a 3100 rpm durante 20 min a 4° C, y finalmente se dejó secar el material en un horno a 60° C durante 24 h.

2.4 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

2.4.1 Ensayo de fotoluminiscencia

Las mediciones se realizaron en un espectrofluorómetro Hitachi F-7000, diluyendo la muestra en agua Milli Q a una concentración de 10 mg/ml. Posteriormente, se colocó un mililitro de la suspensión en una celda de cuarzo para luego realizar un barrido de 200 a 700 nm para determinar los intervalos de excitación del material analizado, mientras que para determinar el espectro de emisión, se dejó fija una longitud de onda de excitación para captar la emisión en un intervalo de 300 a 800 nm.

2.4.2 Difracción de rayos-X

Se analizaron dos muestras de nanopartículas, las de YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺ desnudas. El análisis se realizó en el equipo D2 PHASER de la marca Bruker, donde se empleó una radiación de $\lambda=0.154$ nm y se escaneó en un rango de 2θ de 20° a 80°. El tamaño del cristalito se estimó a través de la ecuación de Scherrer:

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad (1)$$

Donde D es el tamaño del cristalito o grano, 0.9 es una constante correspondiendo a la forma de un cristal, λ es la longitud de onda XRD (0.154 nm), β es la mitad del ancho del punto más alto del pico (Full Width Half Maxima o FWHM) en un ángulo de difracción específico θ .

2.4.3 Potencial Zeta

El potencial zeta es la diferencia de carga entre la capa de fluido absorbida por la superficie de la nanopartícula y el resto del mismo fluido en el que se encuentra el material. Este tipo de análisis provee información acerca del comportamiento de las nanopartículas en un medio con características determinadas. Con esto se logra determinar si las nanopartículas son estables en su medio y si tienden a aglomerarse (Banerjee *et al.*, 2017).

En el equipo Malvern Zetasizer SZ fue posible determinar la carga neta de las nanopartículas y sus variantes. Esta información indica si el material tiende a segregarse en este caso, en medios acuosos, además de que con esto se puede intuir qué interacciones podrían tener las nanopartículas con el medio biológico.

En el mismo equipo también fue posible estimar el tamaño de las nanopartículas y sus variantes, sin embargo, es una medición basada en difracción de luz y sus resultados no son tan certeros como el TEM, especialmente por las propiedades fluorescentes de ambos materiales.

Para realizar los análisis, se diluyó 1 mg de nanopartículas en 1 ml de agua Milli Q, para después realizar una dilución x100 de cada muestra. Se introdujo el material en el equipo con ayuda de una celda y se establecieron los parámetros basándose en las propiedades del diluyente, en este caso, el agua.

2.4.4 Espectrofotometría UV-Visible

Para determinar si la funcionalización fue exitosa, se realizó un análisis por espectrofotometría UV-Visible, para a través de la absorbancia del ácido fólico y el quitosano, observar las curvas características de ambos, y por ende, su presencia en las nanopartículas supuestamente funcionalizadas.

Se suspendieron en agua Milli Q las nanopartículas a una concentración de 1 mg/ml y se hicieron diluciones 1:10 de cada suspensión, teniendo una concentración final de 0.1 mg/ml. Posteriormente se sonicaron en baño de agua antes de introducirse al espectrofotómetro. Se hizo un barrido de 200 a 800 nm a cada una de las muestras. Finalmente se analizaron las curvas obtenidas para identificar la presencia del ácido fólico y el quitosano en las nanopartículas.

2.3.5 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Se determinó la morfología y tamaño promedio de las nanopartículas YAG:Ce³⁺, YAG:Ce³⁺/Ch y YAG:Ce³⁺/Ch/FA a través de Microscopía Electrónica de Barrido (TEM). Las muestras fueron suspendidas en etanol al 70% para después ser colocadas en una rejilla de cobre y ser analizadas en el equipo Hitachi H7500, con un voltaje de 80 KeV. Posteriormente, se analizaron las micrografías por medio del software ImageJ, donde se tomaron en cuenta 1040 nanopartículas para determinar su tamaño promedio

2.5 Evaluación biológica

2.5.1 Cultivos celulares

Se cultivó una línea celular de riñón de embrión humano (293T, ATCC) y una línea de cáncer de mama (MDA-MB-231, ATCC), ambos se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino y con un antimicótico y antibiótico al 1%. Los cultivos se incubaron a 37° C con 5% de CO₂.

2.5.2 Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Para determinar el efecto de las nanopartículas YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺ en la viabilidad celular, se realizó un ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol), en el que el reactivo MTT es reducido por la actividad metabólica de las células a formazán, un compuesto insoluble que forma cristales. Posteriormente se agrega una solución de lisis liberando una coloración azul en el medio. La cantidad de células vivas, se determina midiendo la intensidad de la coloración azul medida en unidades arbitrarias por espectrofotometría en el medio, lo cual es proporcional a la cantidad de formazán producida.

En placas de 96 pozos, se sembraron 5,000 células/100µl/pozo por cuadruplicado durante 24 h, después se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco conteniendo diferentes concentraciones de nanopartículas: 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 µg/ml. Se dejó incubar por 24 h para después agregar 20

μl de MTT y dejar incubar durante 4 h más para después detener la reducción del MTT a formazán agregando 100 μl de una solución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% con HCl al 0.01 M. Finalmente se dejó incubar durante 18 a 24 h para después medir la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Epoch.

2.5.3 Administración de nanopartículas en ratones para análisis de farmacocinética y

Para determinar el tiempo en circulación y la distribución *in vivo* de las nanopartículas, se utilizaron ratones Balb/C y se establecieron tres grupos de $n=3$ cada uno. Se preparó una suspensión de nanopartículas YAG:Ce³⁺/Ch-FA (funcionalizadas con quitosano y ácido fólico) en PBS 1X, a partir de la cuál se administró una dosis de 200 mg/kg en cada animal. Después de transcurrido un periodo de tiempo determinado para cada ratón (0, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 480 y 960 minutos) se aplicó anestesia (pentobarbital) y se extrajo la sangre a través de punción cardiaca y se almacenó a -80° C para posterior análisis. Acto seguido, se provocó una dislocación cervical como segundo método de eutanasia para proceder a coleccionar riñones, bazo, hígado, corazón y pulmones.

El riñón, pulmón e hígado fueron fijados con formalina durante 24 h a 4° C y procesados posteriormente con etanol y xileno para deshidratarlos y con parafina para conservarlos. Esto se realizó en un procesador de tejidos automático STP 120 de Thermo Fisher Scientific. Luego se hicieron bloques de parafina, se dejaron enfriar a 4° C y se realizaron cortes de 6 a 8 μm de grosor en un microtomo de la marca Thermo Fisher Scientific modelo HM 355S. Otra parte de los tejidos, incluyendo el corazón y el bazo, se conservaron a -80° C para analizarlos posteriormente por microscopía confocal

2.5.4 Análisis de farmacocinética

Se descongeló en hielo la sangre extraída y se empleó una solución de lisis de eritrocitos 1X para aclarar las muestras y poder detectar la emisión de las nanopartículas YAG:Ce³⁺. Una vez lisados los eritrocitos, se resuspendió la muestra en PBS 1X y se realizó una curva estándar para estimar una concentración de nanopartículas a diferentes puntos de tiempo post-inoculación. Para esto se agregó a una muestra control una cantidad de nanopartículas aproximada a la administrada a los ratones y se realizaron diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64. Una vez finalizadas las mediciones para la curva de calibración, se procedió a

medir la fluorescencia de las muestras. Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-7000, captando la emisión entre los 480 a 680 nm con una longitud de onda de excitación de 450 nm, donde se buscaba el pico característico de emisión del ión cerio alrededor de los 530 nm. No fue posible aplicar la curva estándar debido a que no fue posible diferenciar la señal generada por las nanopartículas de la señal producida por otros componentes de la sangre.

2.5.5 Análisis de bioacumulación en tejidos por espectrofluorimetría

Para determinar si las nanopartículas tienden a acumularse específicamente en órganos se colectaron hígado, riñones, pulmones, corazón y bazo de cada individuo, se pesaron y se le agregaron perlas de zircón para después homogenizar los tejidos en PBS con ayuda de un FastPrep – 24 5G, utilizando 5 ciclos de 30 s a una velocidad de 6 m/s. Luego se realizaron diluciones de cada uno de los tejidos a un factor de 1:6, donde a partir de los controles de cada tejido, se determinó que dicho factor de dilución da como resultado una solución lo suficientemente clara para observar la fluorescencia. Luego se procedió a medir la fluorescencia asociada a las nanopartículas dentro de cada tejido en el espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-7000, empleando un haz de excitación de 450 nm para observar la emisión característica del ion cerio alrededor de los 520 - 530 nm. Una vez analizada cada muestra, los datos fueron estandarizados en función del peso de cada tejido y se establecieron gráficas donde se muestra el pico máximo de emisión de cada muestra a los 520 nm.

2.5.6 Microscopía confocal para análisis de tejidos

Con el fin de reforzar los resultados obtenidos en el análisis de bioacumulación en tejidos por espectrofluorimetría, se buscó la presencia de las nanopartículas por microscopía confocal. Por este método es posible visualizar los tejidos y parte de sus estructuras, así como las células que lo componen. Este método emplea láseres capaces de excitar estructuras biológicas teñidas, además de detectar emisión a distintas longitudes de onda en diferentes planos de cortes histológicos.

En este caso, los cortes de hígado, riñón y pulmón que se encontraban cubiertos de parafina en portaobjetos, fueron rehidratados mediante inmersión en etanol al 100%, etanol al 95%, etanol al 80%,

agua desionizada, y finalmente en PBS 1X. Después se realizó una contratinción con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), que consiste en teñir los núcleos para lograr ubicar las células dentro de los tejidos, ya que se esperaba que las nanopartículas fueran internalizadas por estas. se realizaron dos lavados con PBS 1X y se agregó medio de montaje sobre el portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos.

Los portaobjetos con tejidos teñidos fueron llevados a analizar en un microscopio confocal Olympus FV1000. De acuerdo a los datos obtenidos en los ensayos de fluorescencia de las nanopartículas YAG:Ce³⁺, se empleó un láser de excitación a una longitud de onda de 488 nm para provocar la excitación de las nanopartículas que pudiese haber en las muestras y se utilizó un filtro para captar la emisión a 519 nm. Posteriormente, las imágenes fueron visualizadasl software FIJI y Olympus Fluoview versión 2.2b.

2.5.7 Cuantificación de células inmunes por citometría de flujo

Se estableció una n de 18 ratones Balb/C y se dividieron en tres grupos de 6 animales para ser tratados con las tres variantes de nanopartículas: YAG:Ce³⁺, YAG:Ce³⁺/Ch, YAG:Ce³⁺/Ch-FA. El objetivo del experimento, fue determinar si existía algún incremento o decremento en las células del sistema inmune innato (linaje mieloides) y del sistema inmune adaptativo (linaje linfático, linfocitos T), comparando los valores con los de un estado basal. Para esto, sin haber administrado algún tratamiento a los ratones, se extrajo sangre a través del seno retro-orbital, se lisaron los eritrocitos con solución de lisis 1X y se realizó una tinción con anticuerpos con fluoróforos afines a los linajes celulares de interés Para células linfoides se utilizaron anticuerpos anti-CD3 FITC, anti-CD4 PE-Cy5.5, anti-CD8 APC y anti-CD90.2 PE-Cy7. En el caso de las células mieloides, se utilizaron anticuerpos anti-CD11b PE, anti-Ly-6C PerCP-Cy5.5, anti-F4/80 PE-Cy7 y anti-Ly6G APC-Cy7. Después de la tinción, se cuantificó el porcentaje de células mieloides (macrófagos, monocitos y neutrófilos) y linfáticas (linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺) en un citómetro de flujo de la modelo Attune.

La citometría de flujo es una técnica que permite cuantificar y analizar células de acuerdo a sus características y tamaño. Las células reciben la luz de uno o más láseres de longitud de onda específica mientras pasan por un capilar. Mientras esto ocurre, las células dispersan la luz que les es incidida, lo que en el equipo es detectado como un evento que de acuerdo a la intensidad y dirección de la dispersión, clasificará en un plano bidimensional (Pérez-Lara *et al.*, 2019). La dispersión frontal (FSC, por sus siglas en

inglés) indica relativamente el tamaño de la célula, mientras que la dispersión lateral (SSC, por sus siglas en inglés) indica su complejidad o granularidad (McKinnon, 2018).

Una vez establecido el estado basal (*baseline*), al siguiente día, se trató a cada grupo con una dosis de 200 mg/kg de cada una de las variantes de las nanopartículas YAG:^{Ce3+}e nanopartículas vía intravenosa. Al segundo día después del tratamiento, se volvió a extraer sangre, se realizó una tinción con anticuerpos para células mieloides y se cuantificaron por citometría de flujo. Pasados seis días de haber administrado las nanopartículas, se extrajo sangre y se cuantificó la población de células linfoides y de nuevo el linaje mieloide.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺

3.1.1 Caracterización de fotoluminiscencia de nanopartículas YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺

Se sintetizaron nanopartículas YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺ por método de Sol-Gel y combustión asistida por sacarosa respectivamente. Ambas nanopartículas emitieron luz visible al ser expuestas a radiación UV. En el caso de las nanopartículas YAG:Ce³⁺ sin funcionalizar, se observó cualitativamente una emisión amarillo verdosa intensa a los 365 nm, mientras que las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺ emitieron luz roja al ser excitadas con una longitud de onda de 254 nm (Figura 5). Con esto, ya fue posible inferir que en ambos casos, se logró obtener las fases cristalinas que permiten la emisión luminosa característica de los iones Ce³⁺ y Eu³⁺. Sin embargo, fue necesario realizar análisis por difracción de rayos X para confirmar la formación de estas fases cristalinas.

Al recubrir ambas nanopartículas con quitosano y ácido fólico, la intensidad lumínica bajo la lámpara UV, disminuyó en el caso de las nanopartículas YAG:Ce³⁺, mientras que, en las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺ la intensidad luminosa se mantuvo casi como si estuviesen desnudas.

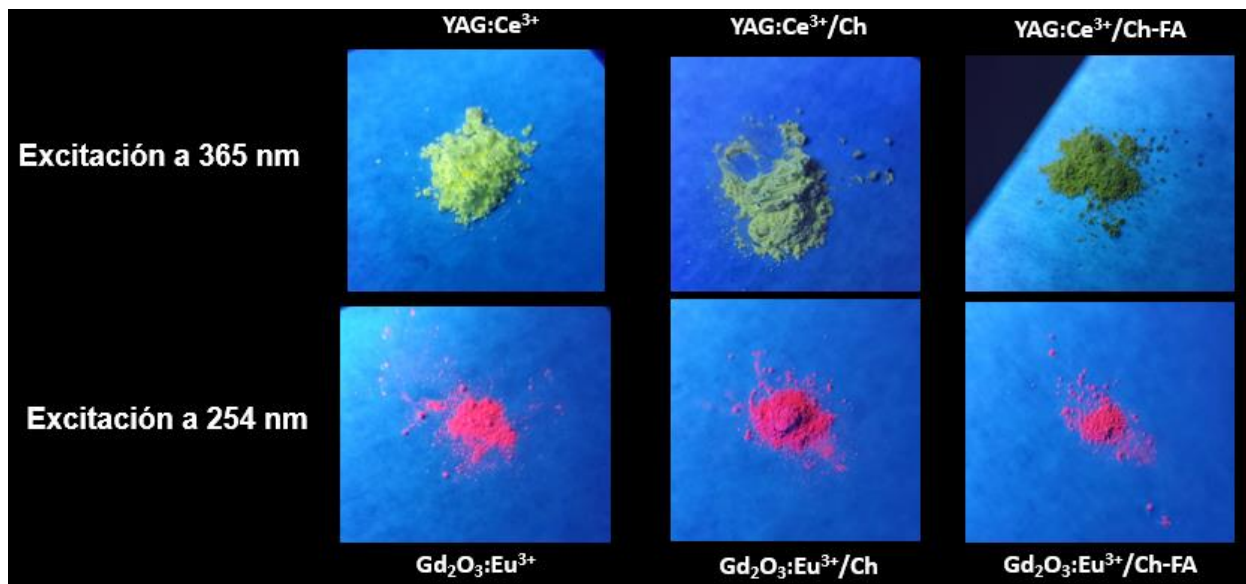


Figura 5. Nanopartículas obtenidas. Nanopartículas YAG:Ce³⁺ siendo excitadas con luz UV a 365 nm, lo que las lleva a emitir en su característico color amarillo/verdoso. En la parte inferior se observan las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺ siendo excitadas con luz UV a 254 nm, haciendo posible su característica emisión en color rojo.

Para complementar, se determinó puntualmente a qué longitudes de onda eran excitables ambos tipos de nanopartículas y a qué longitudes de onda emiten al ser estimuladas dentro de su intervalo de excitación por medio espectrofluorimetría. Con esta técnica, se observó que las nanopartículas YAG:Ce³⁺ presentan una máxima excitación a los 450 nm, lo que correspondiente al color azul en el espectro visible (Figura 7a). También se observó que la emisión máxima al excitar el material con esa misma longitud de onda, se dio a alrededor de los 530 a 550 nm, correspondiente a colores amarillos y verdes (Figura 7a).

Se determinó que las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺ eran excitables a 254 nm, resultando en una emisión muy pronunciada en el espectro visible correspondiente al color rojo (613 nm) (Figura 7b). Al agregar el recubrimiento de quitosano y posteriormente el ácido fólico, la intensidad luminosa fue disminuyendo, probablemente por la barrera física que el quitosano genera alrededor del material. al comparar las intensidades lumínicas de las nanopartículas YAG:Ce³⁺ con las Gd₂O₃:Eu³⁺, se observa que en las últimas, la luminiscencia se ve mínimamente afectada por la funcionalización con quitosano y ácido fólico. Esto sugiere que la intensidad luminosa emitida es aún mayor en las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺ que en las YAG:Ce³⁺, lo suficiente, para atravesar la capa de quitosano y ácido fólico con menor problema.

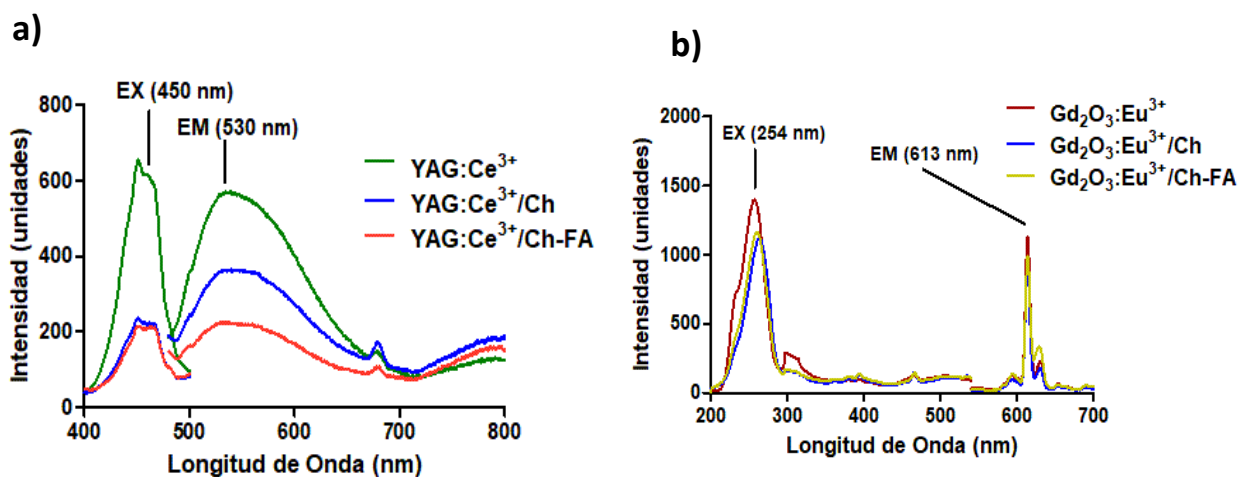


Figura 6. Espectros de excitación y emisión de luz de las nanopartículas desnudas, tratadas con quitosano y tratadas con quitosano y ácido fólico. En ambas figuras se observan las longitudes de onda de excitación y emisión lumínica característicos de los iones a) cerio (450 nm de excitación y 530 nm de emisión) b) europio (254 nm de excitación y 613 de emisión).

3.1.2 Determinación de estructura cristalina por difracción de Rayos X

Para confirmar que se obtuvieron las fases cristalinas YAG y Gd₂O₃ durante la síntesis de las nanopartículas, se sometieron a análisis por difracción de rayos X. Para las nanopartículas YAG:Ce³⁺ se logró identificar los

picos característicos de la fase YAG ($Y_3Al_5O_{12}$) pura, mostrando también el pico principal de la estructura cúbica a $2\theta=33.3^\circ$ (Figura 6a). Con estos datos y utilizando la ecuación de Scherrer, se determinó que el tamaño promedio de cristalito de las nanopartículas YAG:Ce³⁺ es de 16.73 nm. En el caso de las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺, se realizó el mismo análisis con los mismos parámetros, donde fue posible ubicar también los picos característicos de la fase cristalina Gd₂O₃, mostrando un pico principal alrededor de $2\theta=30^\circ$ (Figura 6b). El tamaño promedio de cristalito para las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺, según lo obtenido mediante la ecuación de Scherrer, fue de 35.33 nm.

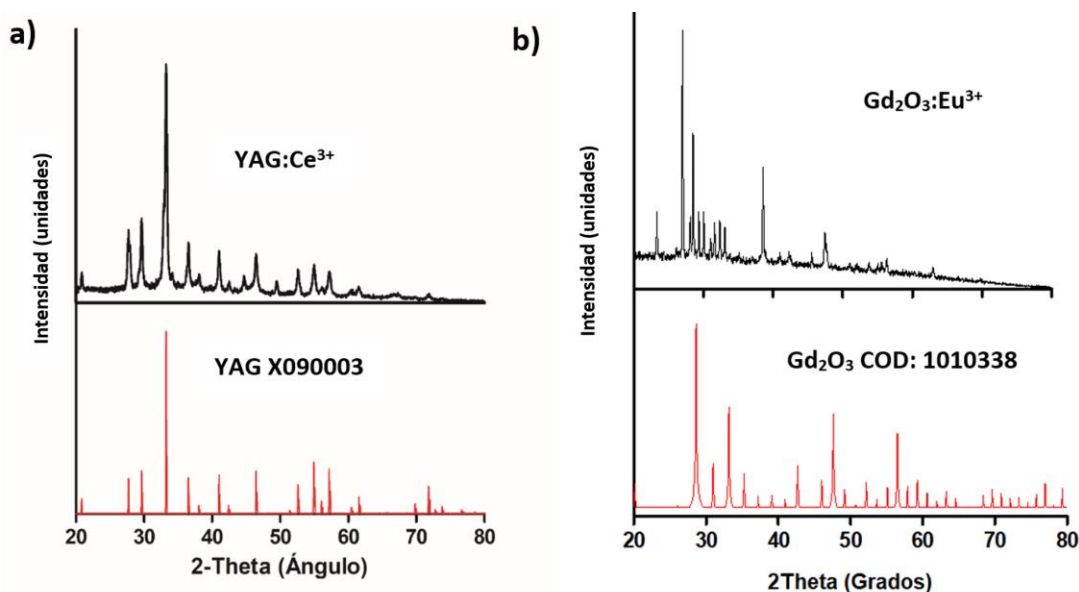


Figura 7. Patrón de difracción de rayos X obtenido para las nanopartículas a) YAG:Ce³⁺ sintetizadas por sol-gel comparado con la fase pura YAG (X090003) y b) Gd₂O₃:Eu³⁺ sintetizadas mediante combustión asistida por sacarosa, con la fase cristalina pura del Gd₂O₃ de acuerdo al archivo de la base de datos cristalográfica 1010338.

3.1.3 Potencial Zeta

Mediante este análisis, se buscó determinar la carga que existía en el espacio en el que la superficie de las nanopartículas y su medio de suspensión interactúa, ya que la carga es un factor determinante con respecto a las interacciones que las nanopartículas tendrían con el medio biológico y sus componentes. Un potencial zeta más alejado de cero sugiere una mejor distribución en su medio, es decir, menos aglomeración entre nanopartículas.

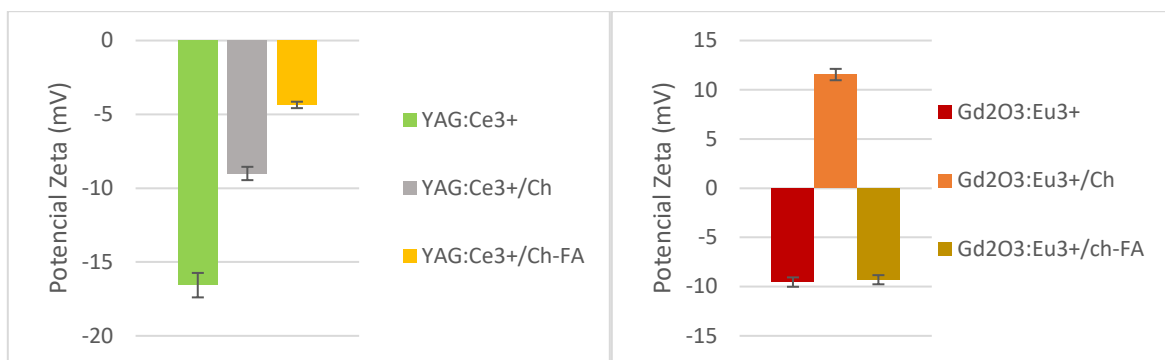


Figura 8. Potencial zeta de las nanopartículas YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺ desnudas, tratadas con quitosano y tratadas con quitosano y ácido fólico. Se observó un potencial zeta negativo en todas las variantes de YAG:Ce³⁺. En el caso de las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺, el potencial zeta pasó de ser negativo a positivo al funcionalizarse con quitosano. Esto sugiere que las nanopartículas YAG:Ce³⁺ tienden a aglomerarse al estar en pH neutros, mientras que las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺ tienden menos a ese comportamiento en las mismas condiciones.

Para el caso de las nanopartículas YAG:Ce³⁺, el potencial zeta fue cada vez menos negativo conforme se fue funcionalizando (Figura 8), acercándose cada vez más al cero. Por otro lado, las nanopartículas de Gd₂O₃:Eu³⁺ pasaron a ser positivas al funcionalizar con quitosano, pero los valores volvieron a ser negativos al agregar el ácido fólico. Con esto se puede concluir que el recubrimiento de las nanopartículas no se disocian fácilmente en medio acuoso, pero tenderán a aglomerarse entre ellas, especialmente las nanopartículas YAG:Ce³⁺.

3.1.4 Análisis de grupos funcionales por espectrometría UV-Visible

A partir de espectrometría UV-Vis se buscó la presencia del quitosano y el ácido fólico mediante sus espectros de absorción. Las nanopartículas desnudas, tanto YAG:Ce³⁺ como Gd₂O₃:Eu³⁺, no presentan picos de absorción muy definidos, lo cual puede deberse a una dispersión relativa de luz debido al tamaño y morfología de las nanopartículas, y a que los grupos funcionales presentes en sus superficies no presentan transiciones electrónicas en los 200 a 800 nm (Osorio, 2018). El quitosano por sí sólo no exhibe una absorbancia muy definida en el intervalo en el que se realizó el barrido, sin embargo, fue posible detectar una absorbancia en el rango de los 320 y 340 nm en las muestras de quitosano y de nanopartículas YAG:Ce³⁺/Ch.

En el caso del ácido fólico se observaron picos alrededor de los 280 nm y una curva característica alrededor de los 365 nm, los cuáles también fueron detectados en la muestra de YAG:Ce³⁺/Ch-FA (funcionalizada con quitosano y ácido fólico) (Figura 9a), comprobando la presencia del ácido fólico en el material y por lo tanto, que fue funcionalizado. Para las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺/Ch (Figura 9b), detectar el quitosano fue más complicado, sin embargo, para la muestra con Gd₂O₃:Eu³⁺/Ch-FA, se identificó el pico característico del ácido fólico a 283 nm y su curva alrededor de los 365 nm, concluyendo que el material también fue funcionalizado, no obstante, aún sería necesario confirmar por medio de espectrometría infrarroja (FTIR).

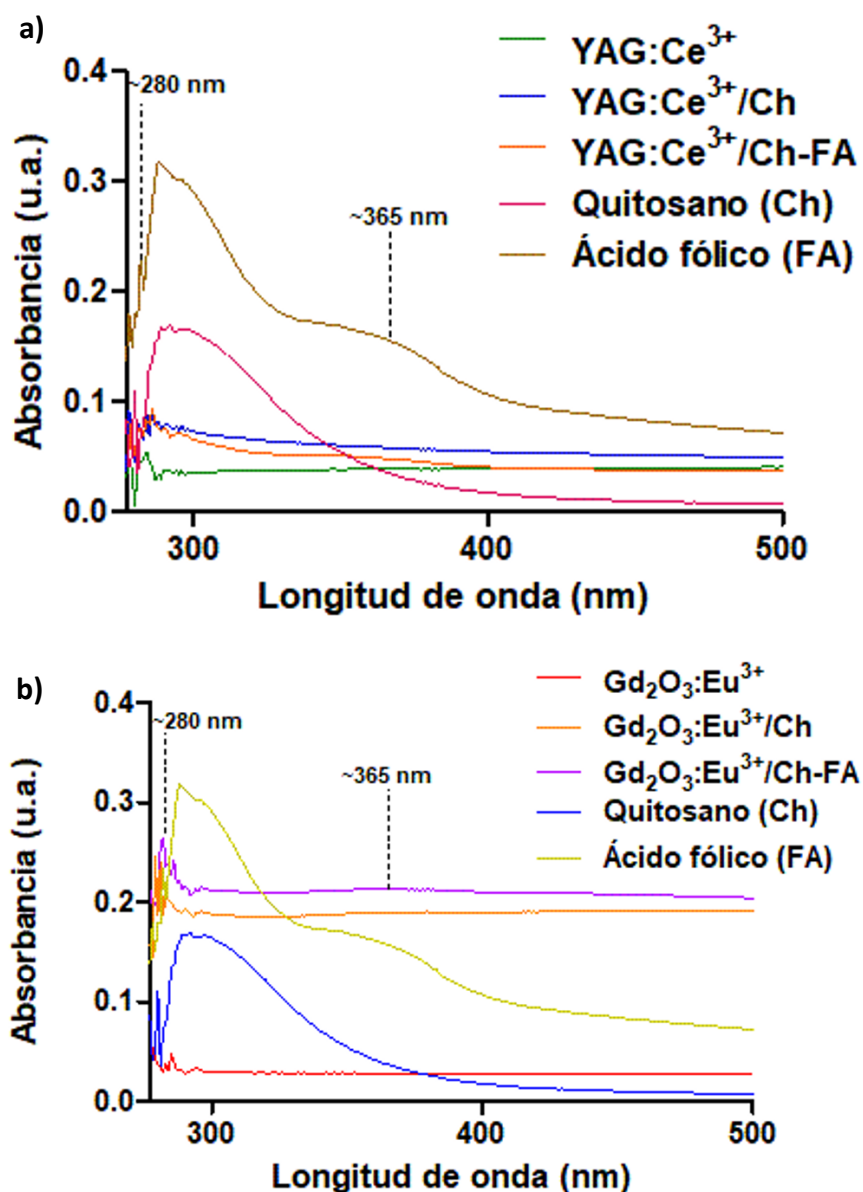


Figura 9. Espectros de absorción en el espectro visible de las nanopartículas. Se incluyeron los espectros de absorción del quitosano y del ácido fólico para corroborar la funcionalización de las nanopartículas a) YAG:Ce³⁺ y b) Gd₂O₃:Eu³⁺.

3.3.5 Análisis de tamaño y morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las muestras de YAG:Ce³⁺, YAG:Ce³⁺/Ch, YAG:Ce³⁺/Ch-FA fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido, de donde se obtuvieron micrografías (Figura 10a) que fueron analizadas mediante el software ImageJ. Las nanopartículas exhibieron una morfología y tamaño uniforme, tendiendo a ser esféricas en su mayoría y con un tamaño promedio de 16.1 nm (Figura 10b).

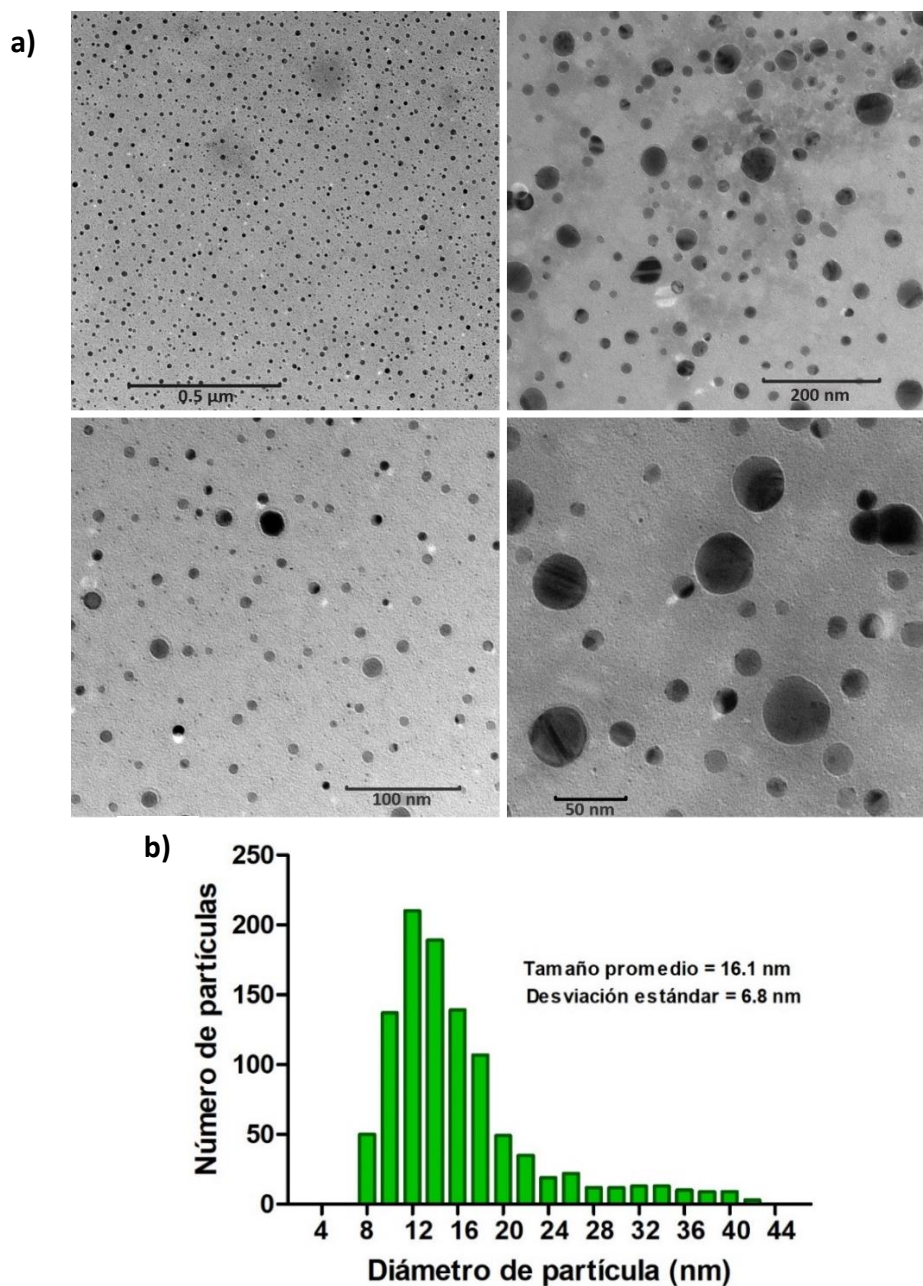


Figura 10. Micrografías de TEM de las nanopartículas YAG:Ce³⁺ a diferentes magnificaciones, donde a) se observa una distribución de tamaño uniforme y una morfología con tendencia esférica. b) Distribución de tamaños de nanopartículas YAG:Ce³⁺ mediante análisis por ImageJ, donde se observa un tamaño promedio de 16.1 nm de diámetro entre las nanopartículas.

También se analizaron muestras de nanopartículas YAG:Ce³⁺/Ch y YAG:Ce³⁺/Ch-FA (Figura 11), donde se observó una distribución más limitada de nanopartículas, ya que se encontraron aglomeraciones densas de lo que podría ser quitosano, donde es posible notar figuras esféricas que sugieren ser nanopartículas embebidas en el biopolímero, exhibiendo una morfología y el rango de tamaño (12 – 20 nm) observado en las nanopartículas desnudas.

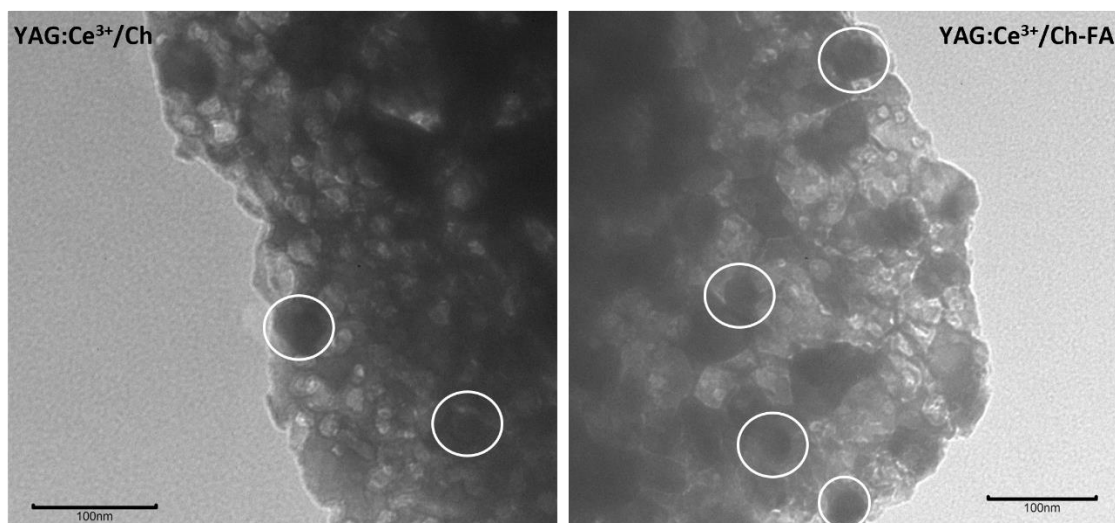


Figura 11. Micrografías TEM de nanopartículas YAG:Ce³⁺ funcionalizadas. En ambos casos se observan aglomeraciones que pudiesen ser de quitosano con nanopartículas embebidas (algunas rodeadas en blanco).

3.2 Evaluación biológica *in vitro*

3.2.1 Ensayo de viabilidad celular

Se realizaron ensayos de viabilidad celular para determinar el efecto que podrían tener diferentes concentraciones y las funcionalizaciones de las nanopartículas luminiscentes en la proliferación celular de dos líneas diferentes. En el caso de las nanopartículas YAG:Ce³⁺ y YAG:Ce³⁺/Ch (Figura 12) no se observó una disminución significativa en la proliferación celular con respecto al control negativo, manteniéndose siempre por encima del 90% de viabilidad. Sin embargo, al incrementar la concentración de nanopartículas, se distingue una ligera disminución del 5% en la viabilidad en el caso de las nanopartículas YAG:Ce³⁺/Ch a partir de una concentración 12.5 µg/ml. Para las nanopartículas YAG:Ce³⁺/Ch-FA, el porcentaje de viabilidad se vio más afectado desde la dosis más baja (1.5 µg/ml), pero el decremento fue

mayor a partir de los 25 $\mu\text{g/ml}$. Este comportamiento puede deberse a un mayor grado de internalización de las nanopartículas hacia el interior de las células.

A pesar del visible decremento al exponer las células a las nanopartículas de $\text{YAG:Ce}^{3+}/\text{Ch-FA}$, estas no comprometieron la viabilidad celular en más de un 23%, lo que indica que esta variante de nanopartículas siguen siendo un potencial candidato para utilizarse como bioetiquetadores para detección de células cancerosas que expresen receptores de folato.

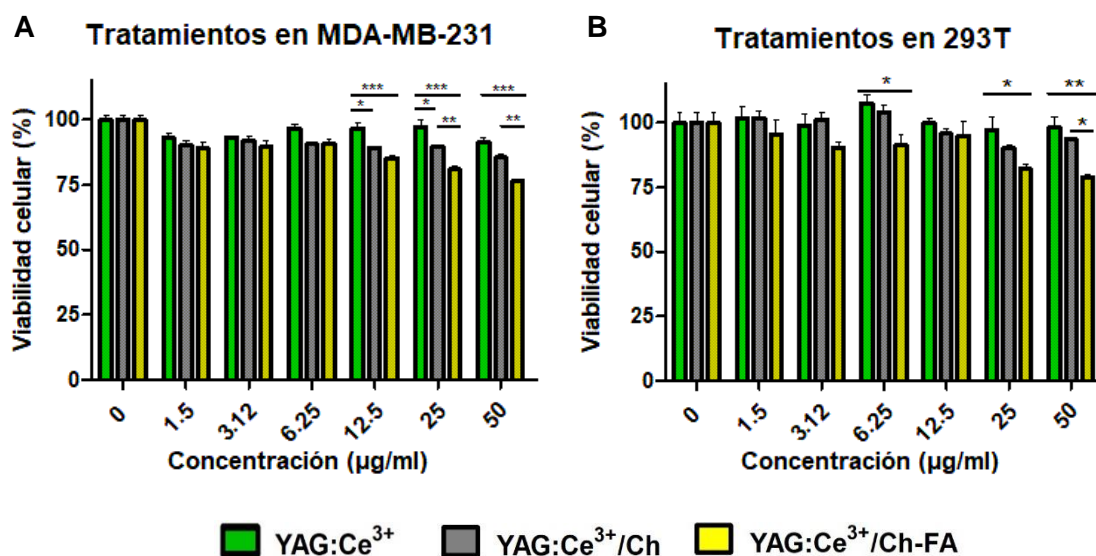


Figura 12. Influencia en la viabilidad celular al tratar A) células 293T y B) Células MDA-MB-231 con diferentes concentraciones de nanopartículas YAG:Ce^{3+} , $\text{YAG:Ce}^{3+}/\text{Ch}$ y $\text{YAG:Ce}^{3+}/\text{Ch-FA}$. En ambas líneas celulares, la disminución en la viabilidad celular comienza a ser más evidente a partir de una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, este decremento es poco significativo. Los resultados están expresados como el promedio \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, obtenido por análisis ANOVA de dos vías con prueba Bonferroni post-análisis.

El comportamiento de las nanopartículas de $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}/\text{Ch}$ y $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}/\text{Ch-FA}$ (Figura 13) presentaron un comportamiento contrastante, pues en general disminuyeron la viabilidad celular de manera más marcada a partir de la menor concentración (1.5 $\mu\text{g/ml}$) utilizada. Sin embargo, como en el caso del $\text{YAG:Ce}^{3+}/\text{Ch}$, también hubo un ligero decremento en sobrevivencia de las células al ser tratadas con $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}/\text{Ch}$. No obstante, se observó que la viabilidad se mantuvo al tratarlas con $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}/\text{Ch-FA}$, posiblemente debido a las diferencias morfológicas y de superficie que estas podrían presentar, ya que su potencial zeta resultó más negativo, lo que podría afectar a la adsorción en la membrana celular, cuya carga superficial es también negativa.

En general, las nanopartículas $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}/\text{Ch}$ y $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}/\text{Ch-FA}$ también comenzaron a ser citotóxicas a partir de los 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A pesar de esto, no limitaron en gran porcentaje la viabilidad celular en ambos tipos de células, por lo que también se sugiere continuar con pruebas para su utilización como bioetiquetadores en la detección de células de cáncer.

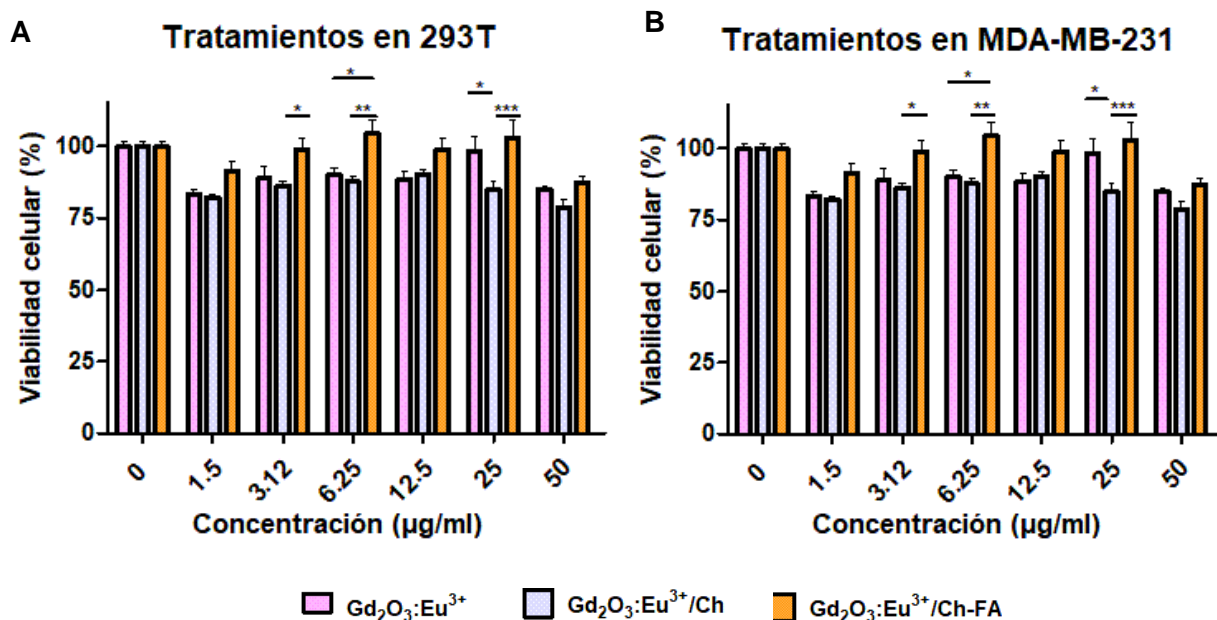


Figura 13. Influencia en la viabilidad celular al tratar A) células 293T y B) Células MDA-MB-231 con diferentes concentraciones de nanopartículas $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$, $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}/\text{Ch}$ y $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}/\text{Ch-FA}$. Las nanopartículas, al ser funcionalizadas también con ácido fólico, contribuyeron a mantener la viabilidad hasta una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, observando un evidente pero poco significativo decremento a los 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los resultados están expresados como el promedio \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, obtenido por análisis ANOVA de dos vías con prueba Bonferroni post-análisis.

Estos resultados permiten concluir que ambas nanopartículas son seguras al menos para las líneas celulares en las que fueron probadas. No obstante, se decidió continuar con experimentos *in vivo* solamente con las nanopartículas $\text{YAG}:\text{Ce}^{3+}$ y sus funcionalizaciones por el impacto menor que su forma funcionalizada generó en ambas líneas celulares.

3.3 Evaluación biológica *in vivo*

3.3.1 Análisis de farmacocinética en sangre

Cada una de las muestras de sangre extraídas de los ratones a los que se les suministró una variante de nanopartículas YAG:Ce³⁺, fueron sometidas a una lisis para obtener una solución más clara y poder realizar lecturas de espectrofluorometría.

En la figura 14 se observan los espectros de luminiscencia de cada muestra, pero es difícil diferenciar entre la fluorescencia de las nanopartículas y la autofluorescencia de la hemoglobina, pues esta, tiene un espectro de emisión que también ronda la misma longitud de onda que las nanopartículas YAG:Ce³⁺. No obstante, se observa que el control (amarillo) expresa una luminiscencia que está por encima de las muestras que sí fueron expuestas a las nanopartículas. Es por esto, que se puede concluir que no hay presencia de nanopartículas en sangre durante estos intervalos de tiempo y que probablemente estas se encuentren en algún otro tejido, ya que se está observando sólo la autofluorescencia de la sangre.

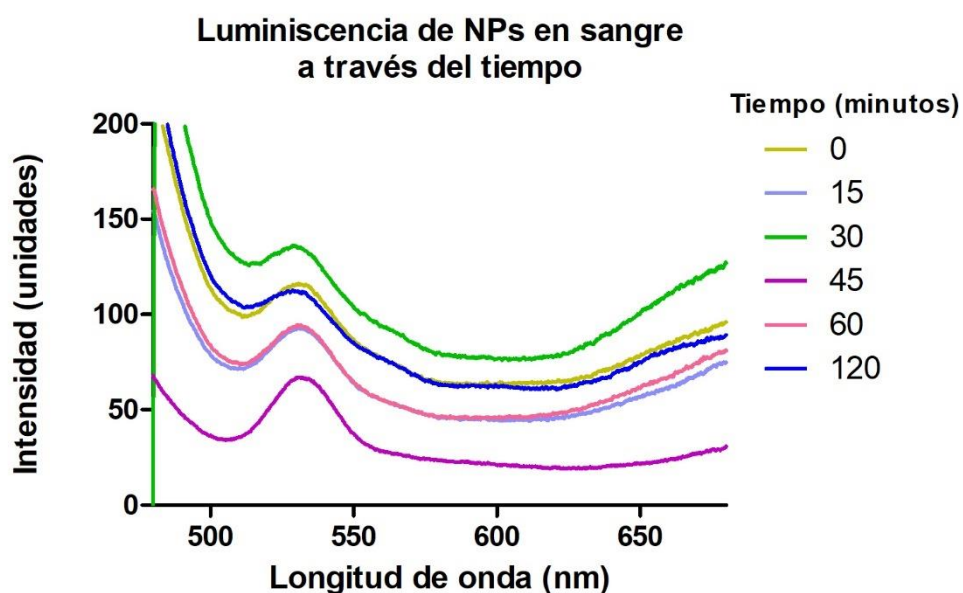


Figura 14. Espectros de emisión de sangre lisada. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 450 nm para buscar la luminiscencia a 530 nm característica de las nanopartículas YAG:Ce³⁺. No se puede aseverar la presencia de nanopartículas luminiscentes en alguna de las muestras, ya que el control exhibió el mismo comportamiento que el resto de las muestras, concluyendo que sólo se está observando la autofluorescencia de la sangre.

3.3.2 Análisis de bioacumulación en tejidos

Los espectros de emisión de las nanopartículas (Figura 6) y de los tejidos (Figura 15) fueron muy similares, haciendo más complicado el análisis. Esto es debido a la autofluorescencia de los tejidos, ya que existen componentes celulares y extracelulares que exhiben espectros de emisión muy cercanos al espectro de emisión y excitación de las nanopartículas YAG:Ce³⁺.

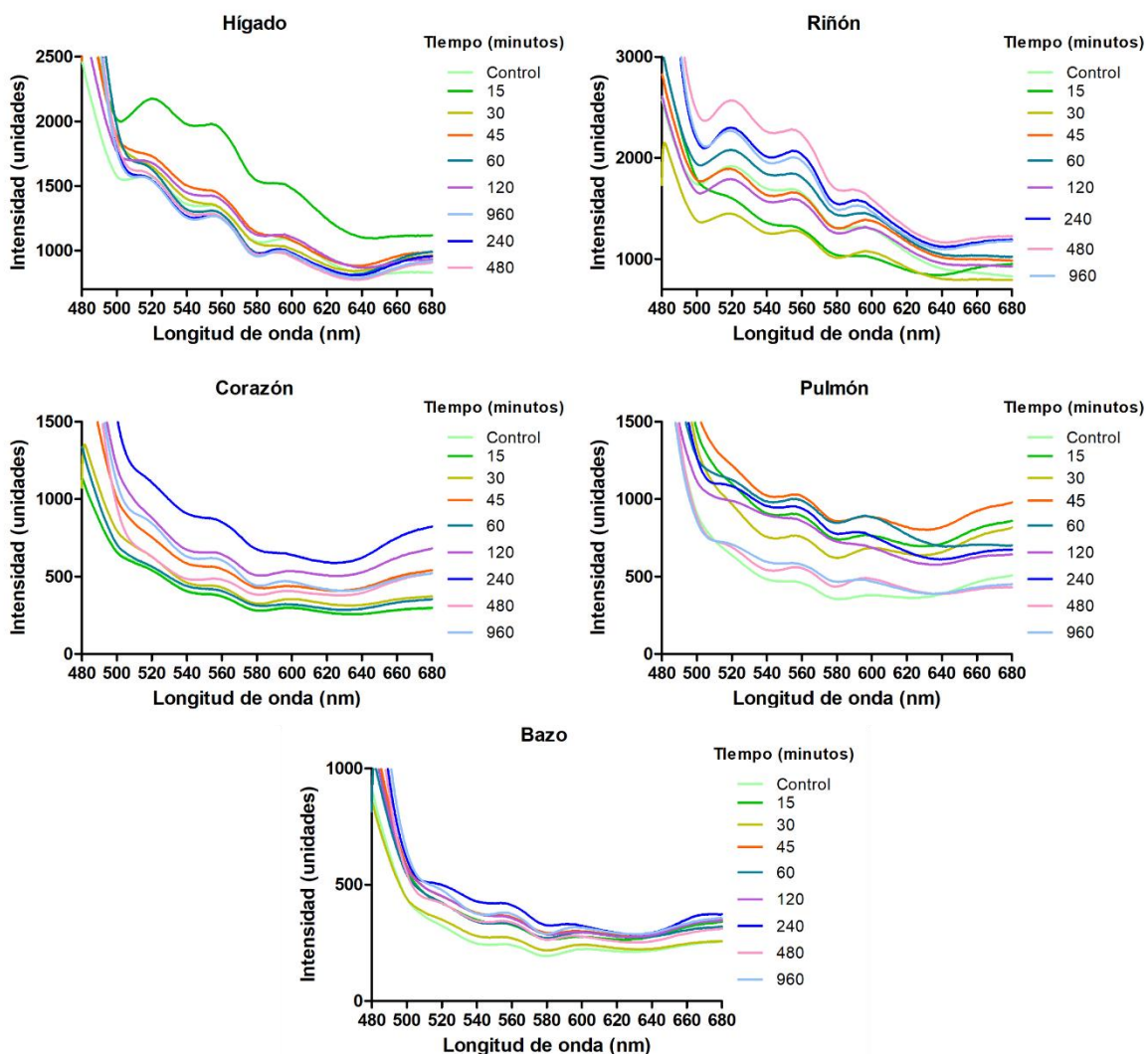


Figura 15. Espectros de emisión de nanopartículas YAG:Ce³⁺ en tejidos. Se utilizó una fuente de excitación de 450 nm para excitar a las nanopartículas que estuviesen presentes en las muestras de tejido. Los espectros de emisión reflejan lo persistente que es la autofluorescencia de cada tejido, no obstante, es importante puntualizar que en la mayoría de los casos, el control presenta una intensidad de emisión menor, lo que lleva a considerar la posibilidad de que existan nanopartículas en algunos de los tejidos.

Los resultados de este análisis son poco concluyentes, con excepción de lo observado en hígado, donde se percibe un comportamiento menos aleatorio. En tal caso, se aprecia mayor luminiscencia de nanopartículas a los 15 minutos después de la inoculación, mientras que para el resto de los puntos en el tiempo se aprecia un decremento muy evidente (Figura 16). También se puede concluir que a las 2 horas post-inoculación las nanopartículas no son detectables por espectrofluorometría en el hígado.

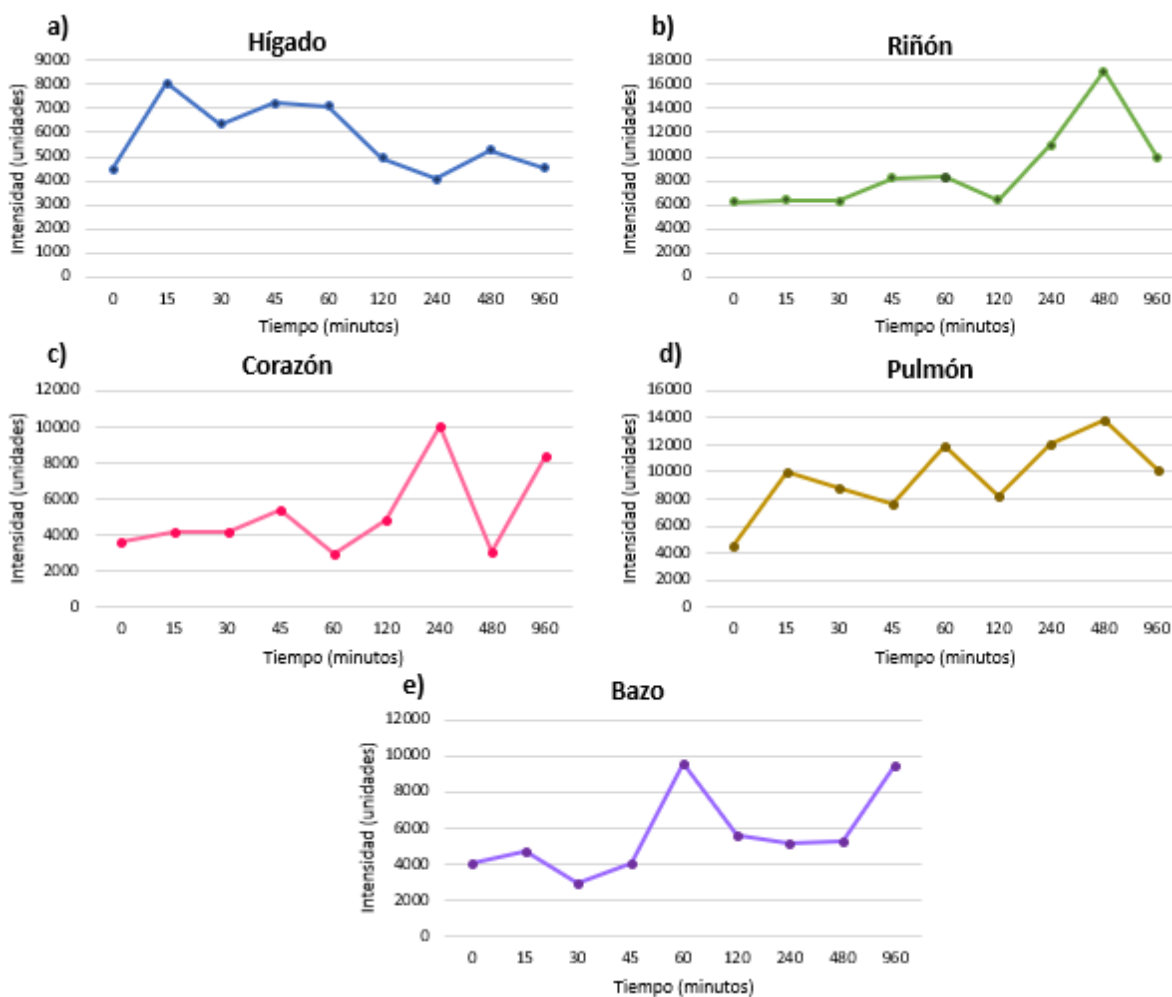


Figura 16. Picos máximos de emisión estandarizados a 520 nm. Se buscó el espectro de emisión de las nanopartículas, sin embargo, la autofluorescencia de los tejidos es muy persistente. No se encontró evidencia certera de que hubiese nanopartículas en los tejidos analizados. Sin embargo, en hígado se observa una tendencia descendente en la luminiscencia con el paso del tiempo.

Es difícil determinar la presencia de nanopartículas YAG:Ce³⁺ por medio de espectrofluorometría. Esto se observa en riñón, corazón, pulmón y bazo, donde los valores de intensidad lumínica varían en los diferentes puntos de tiempo de manera que podría parecer aleatoria. No obstante, en el caso del corazón

y del pulmón, se observa que de manera general y con pocas excepciones, la luminiscencia es mayor en muestras que fueron expuestas a las nanopartículas que el control, sugiriendo que también pudo haber una tendencia a que las nanopartículas se acumularan en esos tejidos. Aún así, los resultados no son concluyentes por falta de coherencia entre algunos puntos donde la luminiscencia es demasiado alta en comparación con el resto de las muestras a diferentes tiempos de exposición.

3.3.3 Análisis de tejidos por microscopía confocal

A través de microscopía confocal, fue posible observar los núcleos celulares teñidos con DAPI, brillando en su característico color azul (Figura 17). En campo verde fue posible observar el tejido gracias a su autofluorescencia, tanto de riñón como de hígado.

En los cortes de riñón no fue posible encontrar una señal que indicara la presencia de nanopartículas. En las micrografías (Figura 13), al observar el campo verde, se aprecian áreas cuya fluorescencia es mayor que en el resto del tejido, pero es poco probable que se trate de nanopartículas, ya que estas áreas son apreciables tanto en el control como en la muestra que fue inoculada con las nanopartículas.

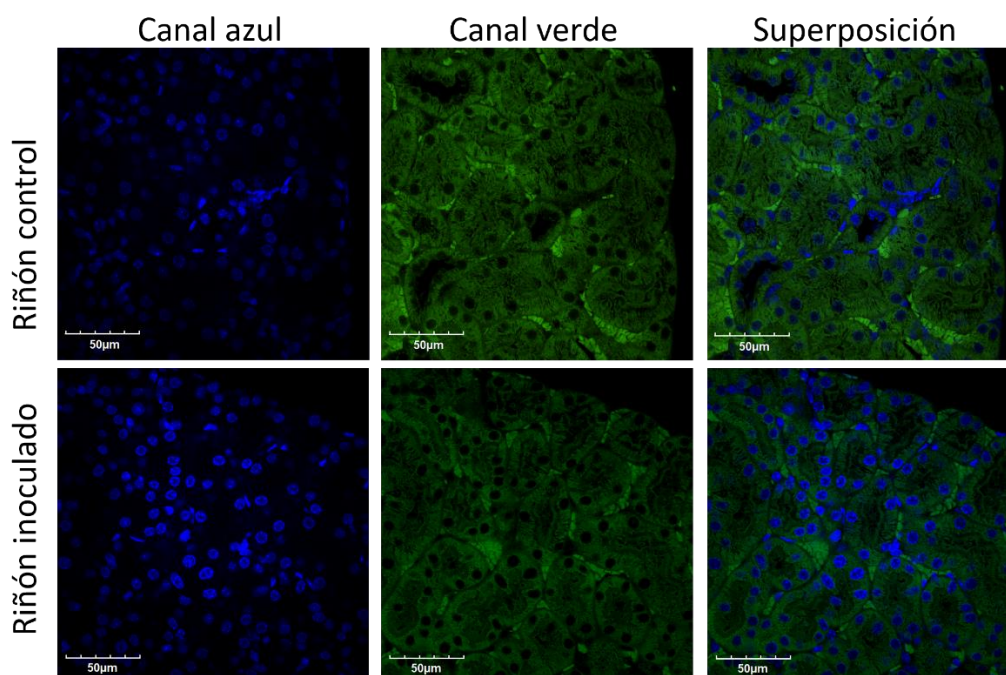


Figura 17. Micrografías confocales de riñón. Cortes de riñón visualizados por microscopía confocal en canales azul, verde y superpuestos, donde se observan los núcleos celulares teñidos en azul y la autofluorescencia del tejido. Se notan estructuras extracelulares con mayor brillo con respecto al resto de la imagen, pero es muy poco probable que se trate de las nanopartículas.

En el caso de los cortes de hígado (Figura 18), fue posible notar puntos y cúmulos (circulados en blanco en la Figura 18) cuya intensidad en el espectro amarillo/verde era mucho más alta que la del resto del tejido. Esos puntos y cúmulos se encontraban muy cerca de los núcleos celulares, sin embargo, debido a la autofluorescencia que producen algunos otros componentes del medio extracelular (y celular), es muy complicado discernir entre estructuras biológicas y las nanopartículas, ya que también fue posible encontrar esos puntos y cúmulos brillantes en los tejidos control. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que exista nanopartículas por lo menos en hígado.

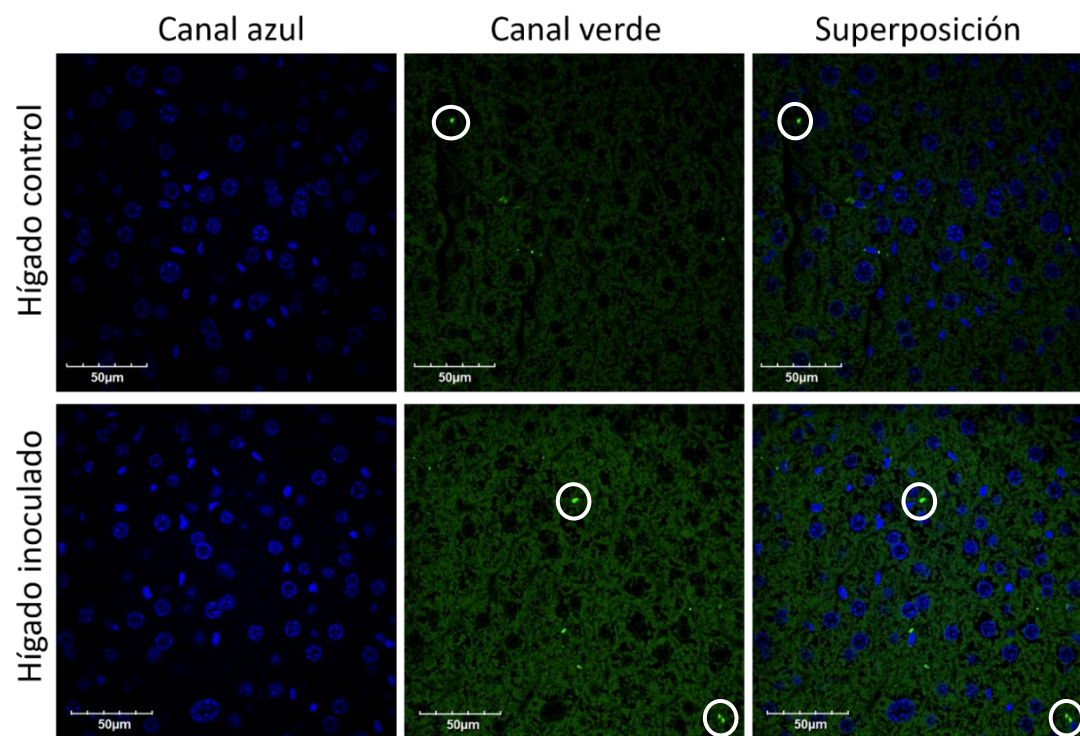


Figura 18. Micrografías confocales de hígado. Cortes de hígado vistos por microscopía confocal en canales azul, verde y superpuestos. Se aprecian puntos de alta intensidad lumínica asociados a núcleos (azul) que podrían ser nanopartículas, sin embargo, estos puntos intensos también se observan en el control, lo que pone en duda la presencia de nanopartículas en el tejido.

3.3.4 Análisis de actividad inmunológica

Se planteó evaluar si existía algún tipo de respuesta hacia las variantes de nanopartículas por parte del sistema inmune innato y adaptativo. Para esto, se planteó cuantificar algunas células del sistema inmune innato y adaptativo de ratones antes y después de haber sido inoculados con nanopartículas YAG:Ce³⁺ funcionalizadas con quitosano y ácido fólico.

Debido a que el sistema inmune innato es la primera línea de defensa del organismo, se esperaría que haya un incremento en la actividad y población de células pertenecientes a dicho sistema, por lo que se determinó la presencia de células de linaje mielóide (neutrófilos y monocitos), al segundo día de haber inoculado a los ratones con las nanopartículas YAG:Ce³⁺ desnudas o funcionalizadas. También se realizó un segundo análisis a los seis días post-inoculación para observar si existía algún cambio significativo a lo largo del tiempo.

Células de linaje mielóide (sistema inmune innato)

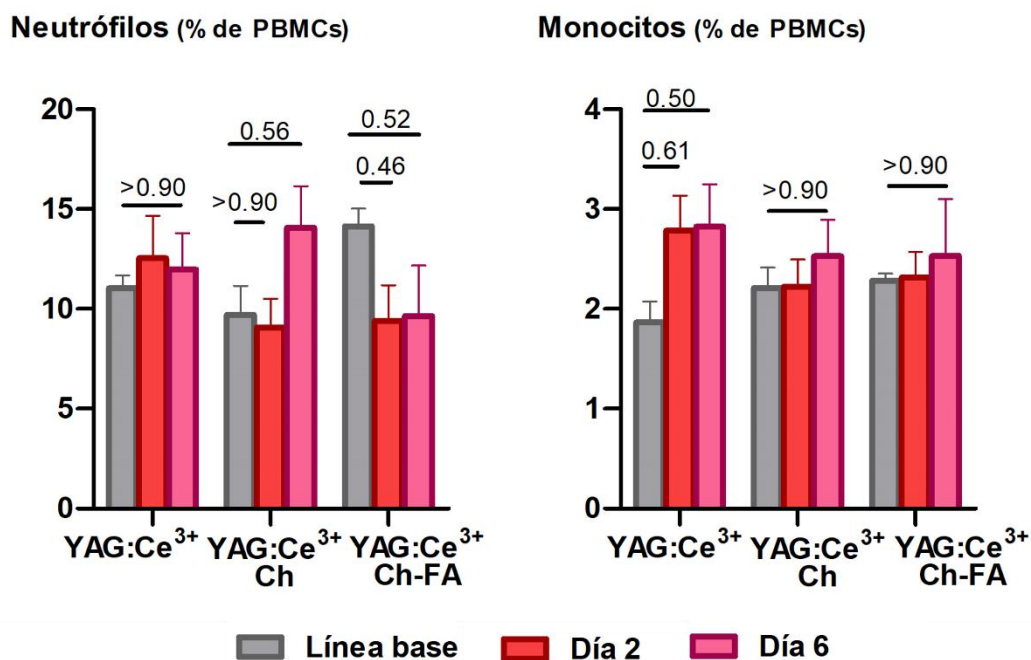


Figura 19. Porcentaje de población de células de linaje mielóide. Análisis fue realizado por citometría de flujo. Los datos se presentan como los porcentajes de neutrófilos y monocitos dentro de una población de células mononucleares de la sangre periférica. Se muestra la línea base (ratones sin inocular), datos a los dos días y seis días post-inoculación con nanopartículas YAG:Ce³⁺, YAG:Ce³⁺/Ch o YAG:Ce³⁺/Ch-FA. Se observan decrementos en las poblaciones de neutrófilos y monocitos, sin embargo, son poco significativos. Los resultados están expresados como el promedio \pm SEM, obtenido por análisis ANOVA de una vía con prueba Tukey post-análisis.

En general, las nanopartículas no generaron cambios significativos en las poblaciones de células del sistema inmune innato (Figura 19). Aunque es importante notar que los datos varían un poco al sexto día, donde se observa que hubo un incremento en la población de neutrófilos al inocular con nanopartículas funcionalizadas sólo con quitosano (YAG:Ce³⁺/Ch), aunque no es significativo. También se observa un decremento de alrededor del 35% en la población de neutrófilos al segundo y sexto día, esto sólo en el

grupo inoculado con nanopartículas funcionalizadas con quitosano y ácido fólico (YAG:Ce³⁺/Ch-FA), sin embargo, este cambio tampoco es estadísticamente significativo. En el caso de la población de monocitos, el cambio fue todavía menos significativo que lo observado con los neutrófilos, no obstante, en el caso de las nanopartículas desnudas, se observó un incremento de alrededor del 35% en la población de monocitos.

Para el caso del sistema inmune adaptativo (Figura 20), se tomó en cuenta que se requiere de un periodo de tiempo mayor para observar algún tipo de actividad por parte de los linfocitos, ya que primero tuvieron que haber pasado por presentación de antígenos, maduración y activación. Por esto, se determinó el porcentaje de células de linaje linfoide (linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺) hasta el día seis post-inoculación de nanopartículas. En la Figura 20, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ están considerados dentro de la población de linfocitos T CD3⁺.

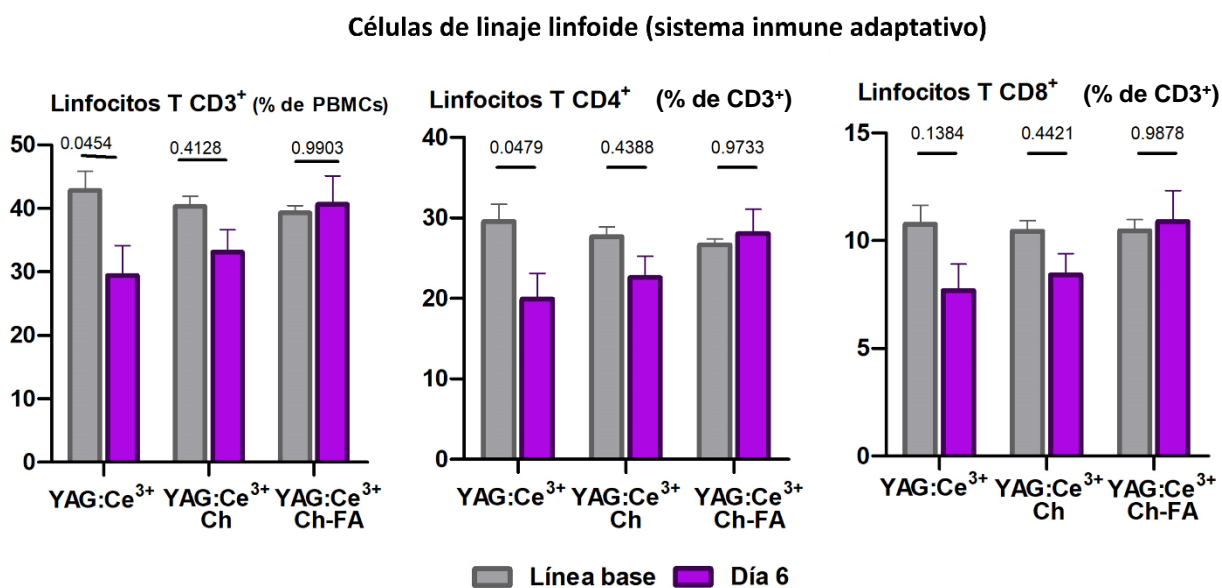


Figura 20. Porcentaje de población de células de linaje linfoide. Análisis fue realizado por citometría de flujo. Los datos se presentan como los porcentajes de neutrófilos y monocitos dentro de una población de células mononucleares de la sangre periférica. Se muestra la línea base (ratones sin inocular), datos a los dos días y seis días post-inoculación con nanopartículas YAG:Ce³⁺, YAG:Ce³⁺/Ch o YAG:Ce³⁺/Ch-FA. Es evidente que la funcionalización del material causa menos decremento en la población de linfocitos. Los resultados son expresados como el promedio \pm SEM, obtenido por análisis ANOVA de una vía con prueba de Sidak post-análisis.

Las nanopartículas desnudas provocaron un decremento estadísticamente significativo del 31.27% en la población de linfocitos T. Dentro de esa misma población y grupo inoculado con nanopartículas desnudas, el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ tuvo un decremento significativo del 32.62%. En el caso de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺, y en los grupos que fueron inoculados con nanopartículas funcionalizadas con quitosano y con quitosano y ácido fólico, no se observaron cambios significativos.

De este análisis, se puede concluir que de manera general, las nanopartículas no exhiben un comportamiento que sugieran decrementos e incrementos considerables de las poblaciones de células inmunes, y que su funcionalización con quitosano y ácido fólico, podría hacerlas más seguras.

Capítulo 4. Discusión

Durante el desarrollo de este trabajo, se sintetizaron nanopartículas fotoluminiscentes a partir de elementos de tierras raras como núcleo para después funcionalizarlas con quitosano y con quitosano y ácido fólico, con la finalidad de mejorar la biocompatibilidad y especificidad de las nanopartículas respectivamente. Se ha reportado que la naturaleza conservada del quitosano como polisacárido, le permite casi pasar desapercibido por el sistema inmune hasta su degradación por amilasas, y gracias a sus grupos amino, es posible conjugarlo con moléculas como el ácido fólico. Por tal motivo, y porque algunos tipos de cáncer sobreexpresan receptores de folato, se decidió conjugar el quitosano presente en la superficie de las nanopartículas al haber sido funcionalizadas, con el ácido fólico para lograr que la nanopartícula tuviese mayor afinidad por células tumorales y penetrar en su medio. Con esto en mente, sería posible utilizar a estas nanopartículas como una nueva opción de medio de contraste y para mejorar la sensibilidad y resolución de métodos como el CT-Scan y la mamografía.

De acuerdo a la caracterización fisicoquímica, los resultados obtenidos nos permitieron determinar que se lograron sintetizar nanopartículas YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺. Se buscó confirmar la funcionalización tanto con quitosano, como con quitosano y ácido fólico por espectrofotometría UV-Visible, donde fue posible identificar los grupos funcionales de estos dos componentes orgánicos. No obstante, aún es necesario realizar análisis por Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) para tener mayor certeza de que los grupos amino y carboxilo del quitosano y el ácido fólico respectivamente, fueron conjugados exitosamente.

Otro punto importante a considerar, es el potencial Zeta, donde se observó una variación considerable e incluso cambios de negativo a positivo y viceversa. A pesar de estas variaciones, las nanopartículas funcionalizadas con quitosano y ácido fólico mantuvieron un potencial zeta ligeramente por debajo de cero, lo que sugiere una ligera tendencia a aglomerarse, pero también sugiere que son estables en medios acuosos. No obstante, es muy importante considerar más estudios que analicen los medios en los que estas nanopartículas se comporten de una manera menos coloidal y con menor tendencia a aglomerarse. También se sugiere investigar más sobre su comportamiento en medio biológico y sangre. El potencial zeta de una nanopartícula se ve influenciado por las impurezas en su estructura, tamaño, el medio en el que están suspendidas las nanopartículas y su pH. Por esto, es importante considerar cómo se administrarán las nanopartículas y cómo podrían interactuar con el medio biológico.

En la parte biológica, se observó que *in vitro* el tratamiento de dos líneas celulares, una normal y otra cancerosa, con las nanopartículas sintetizadas, no afecta significativamente el porcentaje de viabilidad celular. Se determinó que al funcionalizar las nanopartículas YAG:Ce³⁺ con quitosano y con ácido fólico, la viabilidad celular tuvo un ligero decremento, probablemente debido a que hubo mayor internalización de las nanopartículas. Esto no sucedió con las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺, pues se observó que la viabilidad celular se mantuvo mejor al agregar el quitosano y el ácido fólico en la superficie de las nanopartículas. Esta diferencia pudo deberse primordialmente a las diferencias fisicoquímicas de las nanopartículas, como el tamaño y morfología. En el trabajo de Jain (2018), se observó por TEM, que las nanopartículas Gd₂O₃:Eu³⁺ también sintetizadas por combustión asistida por sacarosa, exhibían una morfología mayormente esférica con tendencias poliédricas, además de un tamaño cercano a los 20 nm. Por otro lado, las nanopartículas YAG:Ce³⁺, a través de los análisis por TEM, tendieron a una morfología esférica y a un tamaño de alrededor de 16 nm, no obstante, al ser funcionalizadas con quitosano, se observaron aglomeraciones posiblemente del polímero con nanopartículas embebidas. Esto sugiere y refuerza la necesidad de estudiar diferentes medios de suspensión y administración para las nanopartículas que promuevan una mejor dispersión. También se sugiere investigar más métodos de embebido con el mismo polímero.

Los resultados *in vitro* alentaron a que se probaran las nanopartículas en un modelo *in vivo*. En este caso, por limitaciones de tiempo, se realizaron análisis *in vivo* con las nanopartículas YAG:Ce³⁺ y sus variantes para determinar su farmacocinética, bioacumulación y respuesta por parte del sistema inmune. Del lado de la farmacocinética, se inocularon las nanopartículas YAG: Ce³⁺/Ch-FA, y al analizar la sangre por medio de espectrofluorimetría, no se logró identificar claramente la emisión característica de las nanopartículas. Esto sucedió a pesar de lisar los eritrocitos para disminuir la autofluorescencia generada por componentes biológicos que pueden estar presentes en sangre y que podrían actuar como “fluoróforos endógenos”, entre ellos las flavinas, algunos lipo-pigmentos y porfirinas (Monici, 2005), cuyo intervalo de emisión ronda los 500 a 700 nm, intervalo en el que las nanopartículas YAG:Ce³⁺ emiten su luminiscencia. Al analizar los tejidos, también ocurrió el problema de autofluorescencia utilizando la misma técnica de espectrofluorimetría, con excepción del hígado, donde a pesar de que los espectros de emisión eran muy similares entre muestras, era posible correlacionar el tiempo con una disminución en la concentración de nanopartículas, siendo este el comportamiento esperado.

Debido a los problemas con la técnica de espectrofluorimetría, se optó por visualizar cortes de hígado y riñón por microscopía confocal para observar directamente cúmulos de nanopartículas empleando filtros afines a su emisión característica. Pese a ello, el resultado fue casi el mismo, pues debido a la misma autofluorescencia, no fue posible distinguir a las nanopartículas del resto del tejido en caso de haberlas.

Estos problemas de autofluorescencia se deben a las ventanas biológicas para imagenología, es decir, los intervalos dentro del espectro electromagnético en los que la luz atraviesa sangre y tejidos de manera eficiente en lugar de ser absorbida. Un ejemplo de esto, es entre los 650 – 950 nm, en otras palabras, en el infrarrojo cercano (Smith *et. al.*, 2009). La sangre y los tejidos absorben muy poca radiación del espectro infrarrojo cercano, pero sucede lo contrario con la luz en el espectro visible, por lo que la longitud de onda de emisión ideal de un agente fluorescente para imagenología *in vivo* debe estar en la región de los 700 – 1100 nm aproximadamente (Wang *et al.*, 2015). A pesar de que las nanopartículas YAG:Ce³⁺ tienen su pico emisión en el espectro visible, cerca de los 530 nm, no se debe descartar la posibilidad de utilizarlas para imagenología, pues en el estudio de Wang *et. al.* (2015), se utilizó el mismo núcleo de tierras raras, con la diferencia de que la estructura YAG estaba co-dopada con neodimio (Nd). Esta simple modificación generó que la nanopartícula emitiera luz en el infrarrojo cercano con un haz de excitación a 470 nm. Es importante considerar que si se sintetizara esta variante YAG:Ce³⁺/Nd³⁺ para dar seguimiento a este estudio, no debería de esperarse cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas en comparación con las nanopartículas sintetizadas en este trabajo, pues la estructura cristalina tipo granate se mantendría primordialmente porque los iones cerio se encuentran posicionados de manera sustitutiva en los espacios pertenecientes al itrio (Y) en un porcentaje pequeño dentro de la estructura, por lo que se esperaría lo mismo del neodimio.

Para completar los análisis *in vivo*, se determinó la presencia de células del sistema inmune innato y adaptativo antes y después de un tiempo de inoculación de las nanopartículas en ratones. Los resultados de este análisis, en general, sugieren que las nanopartículas YAG:Ce³⁺ no generan decrementos significativos en las poblaciones de células del sistema inmune que se analizaron, y esto se minimiza aún más al funcionalizar con quitosano o con quitosano y ácido fólico. A pesar de esto, es recomendable realizar más estudios al respecto, pues aún se desconoce mucho sobre cómo ocurriría una presentación de antígeno con este tipo de materiales y qué otro tipo de interacciones podrían desencadenarse a mayor periodo de tiempo. En adición, es de importancia considerar que para poder pasar de una fase pre-clínica a fase clínica, es necesario proveer información detallada con respecto a las dosis a suministrar y sus niveles de toxicidad (FDA, 2018).

Capítulo 5. Conclusiones

En el presente trabajo, se realizó un estudio de nanopartículas fotoluminiscentes YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺ y su posible uso como auxiliares en el diagnóstico de cáncer de mama al ser excitadas con luz en el espectro visible. También se evaluó la influencia del quitosano y el ácido fólico como recubierta para mejorar la biocompatibilidad y como ligando para lograr mayor afinidad hacia el tejido canceroso respectivamente. Los resultados *in vitro* mostraron que las nanopartículas eran adecuadas para continuar con los análisis *in vivo*, donde se evaluó la seguridad de las nanopartículas YAG:Ce³⁺, YAG:Ce³⁺/Ch y YAG:Ce³⁺/Ch-FA en un modelo murino, y por análisis de farmacocinética, bioacumulación y actividad inmunológica, se puede concluir que las tres variables podrían ser seguras para el modelo en el que se realizaron los análisis. Además, la funcionalización con quitosano y con ácido fólico, parece mejorar la biocompatibilidad de las nanopartículas. No obstante, aún es necesario realizar más pruebas, pues aún se desconocen los efectos a largo plazo y su mecanismo de eliminación. También se sugiere realizar pruebas con tejido tumoral en el modelo de estudio, empleando técnicas diferentes a la espectrofluorimetría para determinar la especificidad de las nanopartículas funcionalizadas. Mientras tanto, se presentan algunos de los puntos más importantes de este trabajo.

- Se sintetizaron nanopartículas YAG:Ce³⁺ y Gd₂O₃:Eu³⁺, las cuales fueron funcionalizadas con quitosano y ácido fólico.
- Se determinó que ambas nanopartículas con sus respectivas funcionalizaciones son seguras en dos líneas celulares, una de riñón y otra de cáncer de mama.
- No se logró distinguir la presencia de nanopartículas YAG:Ce³⁺ y sus variantes en sangre ni tejidos al cabo de 15 minutos de su inoculación. Esto, probablemente por limitaciones técnicas.
- Se determinó que la autofluorescencia es un problema si se considera utilizar nanopartículas YAG:Ce³⁺ porque los tejidos también absorben y emiten en el espectro visible.
- Se comprobó que *in vivo*, mediante la cuantificación de células de linaje mieloide y linfoide, las nanopartículas YAG:Ce³⁺ y sus funcionalizaciones no generan decrementos significativos en células del sistema inmune innato y adaptativo.
- También se concluye que la funcionalización con quitosano y con ácido fólico, debe analizarse más a fondo.

Literatura citada

- Alavi, M., Rai, M. 2019. Recent progress in nanoformulations of silver nanoparticles with cellulose, chitosan, and alginic acid biopolymers for antibacterial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 103 (21-22), 8669-8676.
- Albanese, A., Tang, P. S., y Chan, W. C. 2012. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*, 14, 1-16.
- American Cancer Society, 2015. What is cancer?. Consultado el 19 de mayo, 2020 de: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>
- Araichimani, P., Prabu, K. M., Kumar, G. S., Karunakaran, G., Van Minh, N., Karthi, S. y Kolesnikov, E. 2020. Rare-earth ions integrated silica nanoparticles derived from rice husk via microwave-assisted combustion method for bioimaging applications. *Ceramics International*, 46(11), 18366-18372.
- Aslan, N., Ceylan, B., Koç, M. M., y Findik, F., 2020. Metallic nanoparticles as X-Ray computed tomography (CT) contrast agents: A review. *Journal of Molecular Structure*, 1219, 128599.
- Banerjee, D. 2017. Nanofluids and applications to energy systems. *Encyclopedia of Sustainable Technologies*, 2017. 29-439 pp.
- Boraschi, D., Italiani, P., Palomba, R., Decuzzi, P., Duschl, A., Fadeel, B., y Moghimi, S. M. 2017. Nanoparticles and innate immunity: new perspectives on host defense. In *Seminars in Immunology* (Vol. 34, pp. 33-51). Academic Press.
- Boukerika, A., Guerbous, L., Brihi, N. 2014. Ce-doped YAG phosphors prepared via sol-gel method: Effect of some modular parameters. *Journal of alloys and compounds*, 614, 383-388.
- Croisier, F., Jérôme, C. 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.
- Moyano, D. F., Goldsmith, M., Solfiell, D. J., Landesman-Milo, D., Miranda, O. R., Peer, D., y Rotello, V. M. 2012. Nanoparticle hydrophobicity dictates immune response. *Journal of the American Chemical Society*, 134(9), 3965-3967.
- De Giori, G. S., y LeBlanc, J. G. 2018. Folate production by lactic acid bacteria. In *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease* (pp. 15-29). Academic Press.
- de Gonzalez, A. B. y Darby, S. 2004. Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries. *The Lancet*, 363(9406), 345-351.
- DeMartini, W., Lehman, C., Partridge, S. 2008. Breast MRI for Cancer Detection and Characterization. *Academic Radiology*, 15(4), 408-416. doi:10.1016/j.acra.2007.11.006.

- Dong, B., Wang, J., Sun, J., Xu, S., Bai, X., Jiang, Z. y Song, H. 2012. Non-photobleaching YAG: Ce nanoparticles for optical imaging with blue excitation. *RSC advances*, 2(9), 3897-3905.
- Ebnesajjad, S. 2014. Surface and Material Characterization Techniques. *Surface Treatment of Materials for Adhesive Bonding*, 39–75. doi:10.1016/b978-0-323-26435-8.00004-6.
- Food And Drug Administration [Administración de Medicamentos y Alimentos] 2018. The Drug Development Process, Step 2: Preclinical Research. [fda.gov/patients/drug-development-process/step-2-preclinical-research](https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-2-preclinical-research)
- Feng, H., Cao, J., Wang, H., Xie, Y., Yang, D., Feng, J., y Chen, B. 2020. A knowledge-driven feature learning and integration method for breast cancer diagnosis on multi-sequence MRI. *Magnetic Resonance Imaging*.
- Feng-Zhi, C. U. I., Jian-Hua, L. I. U., Yang, L. I. U., Bi-Ying, Y. U. A. N., Xue, G. O. N. G., Qing-Hai, Y. U. A. N., y Lei, W. A. N. G. 2020. Synthesis of PEGylated BaGdF5 Nanoparticles as Efficient CT/MRI Dual-modal Contrast Agents for Gastrointestinal Tract Imaging. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 48(8), 1004-1011.
- Fu, C., Yu, Y., Xu, X., Wang, Q., Chang, Y., Zhang, C., y Whittaker, A. K. 2020. Functional Polymers as Metal-free Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Progress in Polymer Science*, 101286.
- Guo, D., Ma, B., Zhao, L., Qiu, J., Liu, W., Sang, Y. y Liu, H. 2016. Bright YAG: Ce nanorod phosphors prepared via a partial wet chemical route and bio labeling applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(19), 11990-11997.
- Hassan, A. M., El-Shenawee, M. 2011. Review of Electromagnetic Techniques for Breast Cancer Detection. *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, 4, 103–118. doi:10.1109/rbme.2011.2169780.
- Houssami, N. 2017. Overdiagnosis of breast cancer in population screening: does it make breast screening worthless? *Cancer biology and medicine*, 14(1), 1.
- Huang, C., Neoh, K. G., Kang, E.-T., y Shuter, B. 2011. Surface modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for high-efficiency folate-receptor targeting with low uptake by macrophages. *Journal of Materials Chemistry*, 21(40), 16094. doi:10.1039/c1jm11270h.
- Huynh P., Jarolimek A., and Daye S., "The false-negative mammogram," *RadioGraphics*, vol. 18, pp. 1137–1154, 1998.
- International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN. 2020. Global Cancer Observatory. Consultado el 15 de junio de 2020. Recuperado de: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map>
- Jain, A., Fournier, P. G., Mendoza-Lavaniegos, V., Sengar, P., Guerra-Olvera, F. M., Iñiguez, E., y Juárez, P. 2018. Functionalized rare-earth-doped nanoparticles for breast cancer nanodiagnostic using fluorescence and CT imaging. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1), 26.

- Kanda, T., Fukusato, T., Matsuda, M., Toyoda, K., Oba, H., Kotoku, J. I., y Furui, S. 2015. Gadolinium-based contrast agent accumulates in the brain even in subjects without severe renal dysfunction: evaluation of autopsy brain specimens with inductively coupled plasma mass spectroscopy. *Radiology*, 276(1), 228-232.
- Kang, H., Mintri, S., Menon, A. V., Lee, H. Y., Choi, H. S., y Kim, J. 2015. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicology of theranostic nanoparticles. *Nanoscale*, 7(45), 18848-18862.
- Kumari, A., y Yadav, S. K. 2011. Cellular interactions of therapeutically delivered nanoparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(2), 141–151. doi:10.1517/17425247.2011.547934.
- Kuroki-Suzuki, S., Kuroki, Y., Ishikawa, T., Takeo, H., y Moriyama, N. 2010. Diagnosis of breast cancer with multidetector computed tomography: analysis of optimal delay time after contrast media injection. *Clinical Imaging*, 34(1), 14–19. doi:10.1016/j.clinimag.2009.03.004.
- Litzinger, D. C., Buiting, A. M. J., van Rooijen, N., y Huang, L. 1994. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1190(1), 99–107. doi:10.1016/0005-2736(94)90038-8.
- Loo, Jacky Fong-Chuen, et al. Upconversion and downconversion nanoparticles for biophotonics and nanomedicine. *Coordination Chemistry Reviews*, 2019, vol. 400, p. 213042.
- Lorenzo-Lamosa, M., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J., y Alonso, M. 1998. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 52(1-2), 109–118. doi:10.1016/s0168-3659(97)00203-4.
- Low, S. Y., Lim, E. H., Loh, L. E., Mok, Y. H., Siow, Y. N., Ng, L. P., Low, D. C. 2020. Use of an Offsite Intraoperative MRI Operating Theater for Pediatric Brain Tumor Surgery: Experience from a Singapore Children's Hospital. *World Neurosurgery*, 135, e28-e35.
- Luo, Y. H., Chang, L. W., y Lin, P. 2015. Metal-based nanoparticles and the immune system: activation, inflammation, and potential applications. *BioMed research international*, 2015.
- Marcato, P. D. 2014. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nanomaterials. En *Nanotoxicology* (pp. 97-110). Springer, Nueva York, NY.
- Marques, A. C., Costa, P. J., Velho, S., y Amaral, M. H. 2020. Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies. *Journal of Controlled Release*, 320, 180-200.
- McKinnon, K. M. 2018. Flow cytometry: an overview. *Current protocols in immunology*, 120(1), 5-1.
- Mogensen, T. H. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, 22(2), 240-273.

- Mondal, S., Park, S., Choi, J., Vo, T. M. T., Shin, J. H., Kang, Y. H., y Oh, J. 2020. Rare-earth element doped hydroxyapatite luminescent bioceramics contrast agent for enhanced biomedical imaging and therapeutic applications. *Ceramics International* (artículo por publicar).
- Monici, M. 2005. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology annual review*, 11, 227-256.
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, M. S., Atarod, M., Sajjadi, M., y Isaabadi, Z. 2019. *An Introduction to Green Nanotechnology*. Academic Press.
- Nikapitiya, C., Dananjaya, S. H. S., De Silva, B. C. J., Heo, G. J., Oh, C., De Zoysa, M., y Lee, J. 2018. Chitosan nanoparticles: a positive immune response modulator as display in zebrafish larvae against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish and shellfish immunology*, 76, 240-246.
- Osorio, R. 2018. Síntesis y caracterización de nanopartículas luminiscentes funcionalizadas como bioetiquetadores de células cancerosas (Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada).
- Pan, H., Marsh, J. N., Christenson, E. T., Soman, N. R., Ivashyna, O., Lanza, G. M., Wickline, S. A. 2012. Postformulation Peptide Drug Loading of Nanostructures. *Nanomedicine - Cancer, Diabetes, and Cardiovascular, Central Nervous System, Pulmonary and Inflammatory Diseases*, 17–39. doi:10.1016/b978-0-12-391860-4.00002-1.
- Pem, B., González-Mancebo, D., Moros, M., Ocana, M., Becerro, A. I., Pavičić, I., Vinkovic Vrcek, I. 2018. Biocompatibility assessment of up- and down-converting nanoparticles: implications of interferences with *in vitro* assays. *Methods and Applications in Fluorescence*. doi:10.1088/2050-6120/aae9c8.
- Perazella, M. A. 2009. Current status of gadolinium toxicity in patients with kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4(2), 461-469.
- Pérez-Herrero, E., y Fernández-Medarde, A. 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 52–79. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
- Pérez-Lara, J. C., Santiago-Cruz, W., Romero-Ramírez, H., y Rodríguez-Alba, J. C. 2019. Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 18(2), 41-52.
- Perfézou, M., Turner, A., y Merkoçi, A. 2012. Cancer detection using nanoparticle-based sensors. *Chem. Soc. Rev.*, 41(7), 2606–2622. doi:10.1039/c1cs15134g.
- Rahmim, A., y Zaidi, H. 2008. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. *Nuclear medicine communications*, 29(3), 193-207.

- Rovais, M. R. A., Alirezapour, B., Moassesi, M. E., Amiri, M., Novin, F. B., y Maadi, E. 2018. Internalization capabilities of gold-198 nanoparticles: Comparative evaluation of effects of chitosan agent on cellular uptake into MCF-7. *Applied Radiation and Isotopes*. doi:10.1016/j.apradiso.2018.09.027.
- Schanen, B. C., Karakoti, A. S., Seal, S., Drake III, D. R., Warren, W. L., y Self, W. T. 2009. Exposure to titanium dioxide nanomaterials provokes inflammation of an *in vitro* human immune construct. *ACS Nano*, 3(9), 2523-2532.
- Sharifi, M., Hasan, A., Attar, F., Taghizadeh, A., Falahati, M. 2020. Development of point-of-care nanobiosensors for breast cancers diagnosis. *Talanta*, 121091.
- Smith, A. M., Mancini, M. C., y Nie, S. 2009. Second window for *in vivo* imaging. *Nature nanotechnology*, 4(11), 710-711.
- Smith, J., Wood, E., y Dornish, M. 2004. Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. *Pharmaceutical Research*, 21(1), 43-49. doi:10.1023/b:pham.0000012150.60180.e3.
- Song, J., Zhang, L., Yi, H., Huang, J., Zhang, N., Zhong, Y., Yang, Z. 2019. NIR-responsive nanoplatfor for pre/intraoperative image-guided carcinoma surgery and photothermal ablation of residual tumor tissue. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 20, 102020.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 Feb 4. doi: 10.3322/caac.21660.
- VandeVord, P. J., Matthew, H. W. T., DeSilva, S. P., Mayton, L., Wu, B., y Wooley, P. H. 2001. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59(3), 585-590. doi:10.1002/jbm.1270.
- Vårum, K. M., Myhr, M. M., Hjerde, R. J. N., Smidsrød, O. 1997. *In vitro* degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydrate Research*, 299(1-2), 99-101. doi:10.1016/s0008-6215(96)00332-1.
- Veiga, M., Mattiazzi, P., Gois, J. S., Nascimento, P. C., Borges, D. L., y Bohrer, D. 2020. Presence of other rare earth metals in gadolinium-based contrast agents. *Talanta*, 120940.
- Wang, F., Liu, X. K., y Gao, F. 2019. Fundamentals of solar cells and light-emitting diodes. In *Advanced Nanomaterials for Solar Cells and Light Emitting Diodes* (pp. 1-35). Elsevier.
- Wang, P., Du, Y., Wang, J. 2019. Identification of breast cancer subtypes sensitive to HCQ-induced autophagy inhibition. *Pathology-Research and Practice*, 215(10), 152609.
- Wang, Q., Qiu, J. B., Song, Z. G., Yang, Z. W., Yin, Z. Y., y Zhou, D. C. 2015. Optical properties of Ce³⁺-Nd³⁺ co-doped YAG nanoparticles for visual and near-infrared biological imaging. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149, 898-903.

- Xia, W., y Low, P. S. 2010. Folate-targeted therapies for cancer. *Journal of medicinal chemistry*, 53(19), 6811-6824.
- Yang, J., Tian, F., Wang, Z., Wang, Q., Zeng, Y.-J., Chen, S.-Q. 2007. Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 84B(1), 131–137. doi:10.1002/jbm.b.30853.
- Zhao, J., Li, J., Jiang, Z., Tong, R., Duan, X., Bai, L., y Shi, J. Y. 2020. Chitosan, N, N, N-trimethyl chitosan (TMC), and 2-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan (HTCC): The potential immune adjuvants and nanocarriers. *International Journal of Biological Macromolecules*.