

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2022. Todos los derechos reservados

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



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Síntesis de nanopartículas de oro con morfología de cubos
cóncavos y su influencia *in vitro* en la viabilidad y
morfología de osteoblastos**

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

Presenta:

Williams de Jesús Jiménez Martínez

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Williams de Jesús Jiménez Martínez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Codirectora de tesis

Dr. José Manuel Romo Herrera
Codirector de tesis

Dra. Katrin Quester

Dra. Ernestina Castro Longoria



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Williams de Jesús Jiménez Martínez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Síntesis de nanopartículas de oro con morfología de cubos cóncavos y su influencia *in vitro* en la viabilidad y morfología de osteoblastos

Resumen aprobado por:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Codirectora de tesis

Dr. José Manuel Romo Herrera
Codirector de tesis

El estudio de los nanomateriales (NMs), es de gran interés debido a sus propiedades como tamaño, naturaleza química y forma. Las nanopartículas de oro (AuNPs), en formas como esferas, rodillos, estrellas son utilizadas en diagnóstico y terapias tumorales, mientras que los cubos cóncavos, son prometedores en el diagnóstico y marcaje molecular, debido a su efecto de resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR); sin embargo, no existen estudios toxicológicos *in vitro* que permitan asegurar su biocompatibilidad. Es por ello, que se realizó la síntesis de nanocubos cóncavos de oro (AuNCCs) y la evaluación de su efecto citotóxico en osteoblastos murinos MC3T3-E1, ya que pertenecen al sistema óseo y son células que permiten la regeneración y maduración de los huesos. En este trabajo se logró sintetizar de forma sistemática 3 tamaños de nanocubos etiquetados como: Pequeños (22 ± 4 nm), Medianos (35 ± 4 nm) y Grandes (40 ± 3 nm); en 3 diferentes concentraciones de AuNCCs: 0.45 mM, 2.25mM y 4.5 mM de Au⁰, para cada tamaño. Se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y se monitoreó su estabilidad coloidal, mediante espectroscopía UV-Visible, microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión de luz dinámica (DLS) con mediciones de diámetro hidrodinámico y potencial zeta. Además de evaluar su toxicidad y los cambios morfológicos en osteoblastos inducidos por exposición de 48 horas a los AuNCCs, mediante ensayos como reducción de MTT, generación de ROS, hemocompatibilidad, tipo de muerte celular e internalización por citometría de flujo. Los resultados de este proyecto indican que un menor tamaño y mayor concentración de AuNCCs, inducen una mayor toxicidad al aumentar la generación de ROS y también produciendo cambios en la morfología celular. Se obtuvo la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de estos cubos y la cantidad adecuada en la cual estos AuNCCs no causan toxicidad en los osteoblastos ni en pruebas de hemocompatibilidad. Se encontró también que los AuNCCs producen en mayor porcentaje muerte por apoptosis temprana y estos también se internalizan en las células, siendo esto más visible en concentraciones de 2.25 mM de Au⁰ para los AuNCCs de todos los tamaños.

Palabras clave: nanopartículas de oro, osteoblastos, nanocubos cóncavos de oro, nanotoxicología

Abstract of the thesis presented by **Williams de Jesús Jiménez Martínez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience

Synthesis of gold nanoparticles with morphology of concave cubes and their effects on the viability and morphological changes of osteoblasts

Abstract approved by:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Thesis Co-director

Dr. José Manuel Romo Herrera
Thesis Co-director

The study of nanomaterials (NMs) is of great interest due to their size, chemical nature, and shape properties. Gold nanoparticles (AuNPs), in shapes such as spheres, rods, and stars, are used in tumor diagnosis and therapy, while concave cubes are promising in molecular diagnosis and labeling due to their localized surface plasmon resonance effect (LSPR). However, to the best of our knowledge, there are no in vitro toxicological studies to confirm their biocompatibility. Therefore, in this work, the synthesis of concave gold nanocubes (AuNCCs) and the evaluation of their cytotoxicity on MC3T3-E1 murine osteoblasts were carried out. Herein, the systematic synthesis of 3 sizes of AuNCCs: Small (22 ± 4 nm), Medium (35 ± 4 nm), and Large (40 ± 3 nm), with 3 different concentrations of AuNCCs at 0.45 mM, 2.25 mM, and 4.5 mM, for each of them is presented. Physicochemical characterization was carried out to monitor the stability through UV-Visible spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS), with measurements of hydrodynamic diameter and z potential. The morphological changes of osteoblast after 48 hours of exposition to AuNCCs indicate that cells undergo cell death. In addition, cytotoxicity, type of cell death, ROS generation, hemocompatibility, and internalization of AuNCCs were assessed. The results indicate that the smaller size of AuNCCs and higher AuNCCs concentration induce more significant toxicity by increasing ROS generation, cell death by early apoptosis, and producing changes in cell morphology. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of AuNCCs was obtained, as also the concentrations in which AuNCCs are biocompatible and hemocompatible. It was found that AuNCCs internalized to osteoblast at concentrations of 2.25 mM Au⁰ in AuNCCs.

Keywords: gold nanoparticles, osteoblasts, gold concaves nanocubes, nanotoxicology

Dedicatoria

A mi madre María Elena, por siempre acompañarme y apoyarme en todas las etapas de mi vida.

A mi familia: Papá, Hermanos y Sobrinos por motivarme siempre en mis logros y objetivos.

A la señora Fabiola López[†], sin su ayuda no habría podido salir adelante, muchas gracias.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM (CNyN-UNAM) por aceptarme en la formación académica de maestría y permitirme el uso de sus instalaciones y recursos para la elaboración de este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría otorgada, la cual constó de número de becario 1030512.

Al Departamento de Bionanotecnología y al laboratorio de Síntesis de micro y nanoestructuras del CNyN, por permitirme usar su equipo e infraestructura para la elaboración del proyecto.

A la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno por aceptarme como su alumno, confiar en mis habilidades y capacidades en todo momento, por su constante tutoría y tiempo que me dedicaba. Aprendí mucho, la recordaré y llevaré siempre conmigo en todo momento. Estaré eternamente agradecido.

Al Dr. José Manuel Romo Herrera, ya que siempre estuvo atento a mis necesidades y abierto para mis dudas. Gracias a usted adquirí nuevo conocimiento, que jamás creí obtener. Siempre estará presente durante mi formación académica.

A mi comité de tesis, la Dra. Ernestina Castro Longoria y la Dra. Katrin Quester, por las observaciones, sugerencias y tiempo dedicado en cada avance de tesis y la revisión de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio de Nanotox Lab por su amistad, apoyo y atenciones dentro y fuera de los deberes académicos, gracias, Daniela Molina, Salma López, Elizabeth Mavil, Melissa Gutiérrez y Jorge Ontiveros.

A los compañeros del laboratorio de síntesis: Christian Palacios, Luis Miranda, Ysidro Jauregui, Belman, Erick Toledo, Deiby Espinoza, Montserrat Gallegos, José Ruíz y Germán Morales, por sus consejos, ayuda y pláticas dentro y fuera del laboratorio. No olvidaré las pláticas lupulosas.

A mi familia, que siempre estuvo atenta en mi bienestar, apoyo y cuidado durante mi estancia en Ensenada, preguntando siempre por mi salud física y emocional.

A la familia Sánchez López por brindarme el apoyo que necesitaba en un mal momento. Gracias Luis Enrique, Fabis, Eduardo Sánchez y Fabiola López; señora, donde quiera que se encuentre, usted siempre será mi segunda madre.

A los nuevos amigos que encontré en Ensenada y se quedarán para siempre, Maribel Gálvez, Iskra Galarza, Ernesto Ayala y por último y en especial Óscar Albino, la mejor persona con la que pude convivir. Gracias por esos días de relajación, pláticas filosóficas y por ayudarme durante mi nueva vida como foráneo.

Por último, a la persona que llegó para quedarse, María José, la cual siempre confío en mí y me dio ánimos para seguir adelante. Tus atenciones, cuidados y cariño son y serán las cosas que siempre voy a apreciar. A seguir creciendo y mejorando día con día. Nunca olvides lo mucho que te aprecio.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Clasificación de los nanomateriales	2
1.1.2 Nanopartículas metálicas.....	3
1.1.2.1 Nanopartículas de oro (AuNPs)	4
1.1.2.2 Resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR)	4
1.1.2.3 Nanocubos de oro cóncavos (AuNCCs)	4
1.1.3 Síntesis de AuNPs mediadas por semillas	5
1.1.4 Nanotoxicología: generalidades e importancia	5
1.1.4.1 Mecanismos de internalización de los nanomateriales en la célula	6
1.1.5 Mecanismos de toxicidad celular inducidos por los NMs	6
1.1.5.1 Citotoxicidad.....	6
1.1.5.2 Estrés oxidante	7
1.1.5.3 Genotoxicidad	7
1.1.5.4 Inflamación	7
1.1.6 Toxicidad de las nanopartículas de Au en Osteoblastos.....	8
1.1.6.1 Osteoblastos como modelo celular para estudios <i>in vitro</i>	8
1.1.6.2 Toxicidad de las AuNPs en osteoblastos	9
1.2 Hipótesis.....	10
1.3 Objetivos	10
1.3.1 Objetivo general.....	10

1.3.2	Objetivos específicos.....	10
Capítulo 2. Metodología.....		11
2.1	Síntesis de tres diferentes tamaños de AuNCCs	11
2.2	Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los AuNCCs sintetizados	14
2.3	Cultivo celular.....	15
2.4	Ensayos de Biocompatibilidad.....	18
2.4.1	Ensayo de viabilidad celular por reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)	19
2.4.2	Ensayo fluorimétrico de la producción de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) mediante la reducción del reactivo diacetato de 2',7'-diclorohidrofluoresceína (H ₂ DCFDA)	20
2.4.3	Ensayo de hemocompatibilidad de los distintos tamaños y concentraciones de los AuNCCs .	22
2.4.4	Ensayo de tipo de muerte celular por citometría de flujo	23
2.4.5	Internalización de los AuNCCs en osteoblastos por citometría de flujo.....	26
Capítulo 3. Resultados		27
3.1	Caracterización fisicoquímica de los AuNCCs.....	27
3.1.1	Tamaño de partícula mediante TEM.....	27
3.1.2	LSPR de los AuNCCs monitoreado mediante UV-Vis.....	28
3.1.3	Medición del Potencial Zeta mediante DLS	30
3.1.4	Medición del Diámetro Hidrodinámico mediante DLS	32
3.2	Resultados de los ensayos de biocompatibilidad.....	33
3.2.1	Viabilidad celular de los osteoblastos murinos MC3T3-E1 expuestos a diferentes cantidades y tamaños de los AuNCCs, mediante la reducción de MTT	36
3.2.2	Cambios morfológicos de los osteoblastos murinos MC3T3-E1 expuestos a diferentes concentraciones y tamaños de los AuNCCs	43
3.2.3	Ensayo fluorimétrico para la medición de la producción de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) mediante la reducción del reactivo diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H ₂ DCFDA)	45
3.2.4	Ensayo de hemocompatibilidad de los AuNCCs en sus distintos tamaños y concentraciones.	47
3.2.5	Evaluación del tipo de muerte celular en osteoblastos expuestos a los AuNCCs.....	49
3.2.6	Evaluación de la Internalización de los AuNCCs en osteoblastos	54

Capítulo 4. Discusión.....	57
4.1 Caracterización fisicoquímica de los AuNCCs.....	57
4.1.1 Tamaño de Partícula mediante TEM.....	57
4.1.2 Intensidad del Plasmón de Superficie localizado	57
4.1.3 Medición del Potencial Zeta mediante DLS	58
4.1.4 Medición del Diámetro Hidrodinámico mediante DLS	59
4.2 Ensayos de Biocompatibilidad.....	60
4.2.1 Viabilidad celular de los osteoblastos murinos MC3T3-E1 expuestos a diferentes concentraciones y tamaños de AuNCCs, mediante la reducción de MTT.....	60
4.2.2 Cambios morfológicos de los osteoblastos murinos MC3T3-E1 expuestos a diferentes concentraciones y tamaños de AuNCCs.....	62
4.2.3 Ensayo fluorimétrico de la producción de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) mediante la reducción del reactivo diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H ₂ DCFDA)	64
4.2.4 Ensayo de hemocompatibilidad de los AuNCCs en sus distintos tamaños y concentraciones.	65
4.2.5 Evaluación del tipo de muerte celular en osteoblastos expuestos a los AuNCCs.....	66
4.2.6 Evaluación de la internalización de AuNCCs en osteoblastos.....	67
Capítulo 5. Conclusiones	69
Literatura citada	70
Anexo.....	75

Lista de figuras

Figura	Página
1. Cuadrantes de la cámara de Neubauer.....	17
2. Ejemplos de cuadrantes para la identificación del tipo de muerte	24
3. Micrografías TEM y sus correspondientes histogramas de incidencias de los AuNCCs y su comparación de tamaños.....	27
4. Comparación del LSPR de los AuNCCs sintetizados de diferentes tamaños.....	28
5. Estabilidad de los AuNCCs mediante su LSPR (0.45 mM de Au ⁰ y 100 mM de CTAC). Mediciones cada 15 días por un lapso de 45 días.....	29
6. Monitoreo de la estabilidad de los AuNCCs mediante su LSPR	29
7. Monitoreo de la estabilidad mediante el LSPR de los AuNCCs al aumentar la concentración de AuNCCs	30
8. Comparación de la toxicidad de los AuNCCs medianos con 0.45 mM de Au ⁰ mediante los métodos Alternativo y Tradicional	37
9. Comparación de la toxicidad de los AuNCCs pequeños con diferentes concentraciones de AuNCCs y 0.1 mM de CTAC, mediante el método Alternativo	38
10. Comparación de la toxicidad de los AuNCCs medianos con diferentes concentraciones de AuNCCs y 0.1 mM de CTAC, mediante el método Alternativo	39
11. Comparación de la toxicidad de los AuNCCs grandes con diferentes concentraciones de AuNCCs y 0.1 mM de CTAC, mediante el método Alternativo	40
12. Comparación de la toxicidad de los coloides de los diferentes tamaños de AuNCCs con concentración de Au ⁰ 0.45 mM, mediante el método alternativo	40
13. Comparación de la toxicidad de los coloides de los diferentes tamaños de AuNCCs con concentración de Au ⁰ 2.25 mM, mediante el método alternativo	41
14. Comparación de la toxicidad de los coloides de los diferentes tamaños de AuNCCs con concentración de Au ⁰ 4.5 mM, mediante el método alternativo	42
15. Cambios morfológicos de los osteoblastos por exposición a los AuNCCs pequeños por un lapso de 48 horas y la comparación con las células control sin ningún tratamiento	43
16. Cambios morfológicos de los osteoblastos por exposición a los AuNCCs medianos por un lapso de 48 horas y la comparación con las células control sin ningún tratamiento	44

17.	Cambios morfológicos de los osteoblastos por exposición a los AuNCCs grandes por un lapso de 48 horas y la comparación con las células control sin ningún tratamiento	44
18.	A la izquierda porcentaje de ROS y a la derecha producción de ROS relativa, por la exposición a los AuNCCs pequeños con diferentes concentraciones de Au ⁰ y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo	45
19.	A la izquierda porcentaje de ROS y a la derecha producción de ROS relativa, por la exposición a los AuNCCs medianos con diferentes concentraciones de Au ⁰ y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo	46
20.	A la izquierda porcentaje de ROS y a la derecha producción de ROS relativa, por la exposición de los AuNCCs grandes con diferentes concentraciones de Au ⁰ y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo	46
21.	Porcentaje de hemólisis producida por la exposición a los AuNCCs pequeños con diferentes concentraciones de Au ⁰ y 0.1 mM de CTAC	48
22.	Porcentaje de hemólisis producida por la exposición a los AuNCCs medianos con diferentes concentraciones de Au ⁰ y 0.1 mM de CTAC	48
23.	Porcentaje de hemólisis producida por la exposición a los AuNCCs grandes con diferentes concentraciones de Au ⁰ y 0.1 mM de CTAC	49
24.	Porcentaje de células con los tipos de muerte celular de osteoblastos expuestos a AuNCCs pequeños en concentraciones 0.45, 2.25 y 4.5 mM de Au ⁰ y 0.1 mM de CTAC por 48 horas	50
25.	Porcentaje de células con los tipos de muerte celular de osteoblastos expuestos a AuNCCs medianos en concentraciones 0.45, 2.25 y 4.5 mM de Au ⁰ y 0.1 mM de CTAC por 48 horas	51
26.	Porcentaje de células con los tipos de muerte celular de osteoblastos expuestos a AuNCCs grandes en concentraciones 0.45, 2.25 y 4.5 mM de Au ⁰ y 0.1 mM de CTAC por 48 horas	52
27.	Porcentaje de apoptosis temprana obtenida con la exposición a los AuNCCs de distintos tamaños y diferentes concentraciones	54
28.	Porcentaje de cambios de complejidad celular producida por la exposición a los AuNCCs de distintos tamaños y concentraciones relativa al control	55
29.	Toxicidad de los AuNCCs medianos con 0.45 mM de Au ⁰ y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo en macrófagos murinos RAW 264.7	75
30.	Comparación de la toxicidad de los AuNCCs medianos con 0.45 mM de Au ⁰ y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo en macrófagos murinos RAW 264.7 y osteoblastos murinos MC3T3-E1	76
31.	Comparación de la toxicidad de diferentes surfactantes con concentración 0.1 mM en macrófagos murinos RAW 264.7	77

Lista de tablas

Figura	Página
1. Volúmenes y su equivalencia en número de AuNCCs pequeños usados para el ensayo de tipo de muerte celular	24
2. Volúmenes y su equivalencia en número de AuNCCs medianos usados para el ensayo de tipo de muerte celular	25
3. Volúmenes y su equivalencia en número de AuNCCs grandes usados para el ensayo de tipo de muerte celular	25
4. Valores del Potencial Zeta en mV para las dispersiones de los distintos tamaños de AuNCCs (0.45 mM de Au ⁰ y 100 mM de CTAC)	30
5. Medición del Potencial Zeta en mV para las dispersiones coloidales con los distintos tamaños de AuNCCs durante 45 días (0.45 mM de Au ⁰ y 100 mM de CTAC)	31
6. Medición del Potencial Zeta en mV para la estabilidad de las dispersiones coloidales con los distintos tamaños de AuNCCs (0.45 mM de Au ⁰)	31
7. Medición del Potencial Zeta en mV para las dispersiones coloidales con los distintos tamaños de AuNCCs (0.1 mM de CTAC) con distintas concentraciones de AuNCCs	31
8. Medición del Diámetro Hidrodinámico en d.nm para las dispersiones coloidales con los distintos tamaños de AuNCCs (0.45 mM de Au ⁰ y 100 mM de CTAC)	32
9. Medición del Diámetro Hidrodinámico en d.nm para monitorear la estabilidad (formación de agregados) durante 45 días de las distintas dispersiones coloidales (0.45 mM de Au ⁰ y 100 mM de CTAC)	32
10. Medición del Diámetro Hidrodinámico en d.nm para las dispersiones coloidales al disminuir la concentración de CTAC de 100 mM a 0.1 mM.....	33
11. Medición del Diámetro Hidrodinámico en d.nm para monitorear la estabilidad (formación de agregados) en los distintos coloides (0.1 mM de CTAC) al aumentar la concentración de AuNCCs	33
12. Estimación de cantidad de partículas en cada volumen empleado (μL) de dispersión coloidal de AuNCCs pequeños	35
13. Estimación de cantidad de partículas en cada volumen empleado (μL) de dispersión coloidal de AuNCCs medianos	35

14.	Estimación de cantidad de partículas en cada volumen empleado (μL) de dispersión coloidal de AuNCCs grandes	35
15.	Porcentaje de tipo de muerte celular obtenidos debido a la exposición de osteoblastos a los AuNCCs pequeños y sus diferentes concentraciones	51
16.	Porcentaje de tipo de muerte celular obtenidos debido a la exposición de osteoblastos a los AuNCCs medianos y sus diferentes concentraciones.....	52
17.	Porcentaje de tipo de muerte celular obtenidos debido a la exposición de osteoblastos a los AuNCCs grandes y sus diferentes concentraciones	53
18.	Porcentajes de cambio de complejidad celular obtenidos por la exposición de osteoblastos a los AuNCCs de diferentes tamaños y concentraciones por citometría de flujo	56

Capítulo 1. Introducción

El estudio de los nanomateriales (NMs), su síntesis y aplicaciones, son de gran interés debido a sus diversas propiedades fisicoquímicas como su tamaño pequeño, elevada área superficial, carga superficial, química superficial y naturaleza química (Gumiel, 2020). Esto ha permitido su uso en diversas áreas con aplicaciones tecnológicas en electrónica, dispositivos de energía alternativa y en el área biológica. Para aprovechar al máximo estas características, se requiere de una vasta identificación y análisis de su toxicidad mediante modelos *in vitro* e *in vivo* para brindar resultados que puedan garantizar la seguridad de su uso como biomateriales. Con estos estudios se asegura que los potenciales riesgos derivados de las exposiciones a lo largo de su síntesis, uso, comercialización y posterior desecho queden completamente identificados y documentados para su correspondiente aplicación (Mohammadpour, 2020). Los NMs pueden tener distinta naturaleza química. Como ejemplo se encuentran los NMs desarrollados a base de polímeros, cerámicos, derivados del carbono como el grafeno y los nanotubos de carbono, quantum dots (QD), óxidos-metálicos y metales. Estos últimos son los que han tenido buenos resultados en el área biológica, por ello se sigue buscando mejorar las propiedades de las nanopartículas metálicas. Las nanopartículas (NPs) metálicas, en especial las que se basan en oro (AuNPs), están entre las más usadas en diversos procesos, y en el área médica para el marcaje, diagnóstico y terapia de tumores malignos (Fan y Zhang, 2020).

Estos estudios se han realizado con distintas variaciones de AuNPs, por ejemplo, diferentes tamaños y formas como nanoesferas, nanorodillos o nanoestrellas. El estudio de estas AuNPs ha aumentado en los últimos años, provocando que diversos grupos de investigación se interesen en la síntesis de nuevas formas de este tipo de NPs como, por ejemplo, en la obtención de nanocubos cóncavos de oro, que tienen grandes y benéficas propiedades en el desarrollo de herramientas para aplicaciones como la detección molecular, el diagnóstico y caracterización de biomoléculas que pueden ser adsorbidas en la superficie de las NPs (Salata, 2004). Los nanocubos cóncavos de oro son de gran interés para el campo de materiales en el estudio por espectroscopía de dispersión Raman amplificada en la superficie (SERS) (Romo-Herrera, 2016).

Sin embargo, en comparación con las tradicionales formas de AuNPs: esferas, rodillos y estrellas. Los nanocubos de oro no tienen estudios de evaluaciones toxicológicas que permitan usarlas como un potencial biomaterial novedoso.

1.1 Antecedentes

A lo largo de los años, se han desarrollado nuevos métodos de síntesis de las AuNPs para mejorar sus propiedades fisicoquímicas y obtener morfologías variadas. Esto ha arrojado diversos resultados generando interés en este tipo de NPs para sus posibles aplicaciones en el campo biológico. Las AuNPs tienen una amplia gama de aplicaciones en diversas áreas como la medicina, biología, óptica, catálisis y materiales, las cuales siguen aumentando y desarrollándose debido a las nuevas técnicas de síntesis y caracterización de este tipo de NPs. Actualmente, estos materiales han sido utilizados en el área biológica, en la industria bioquímica, en el diseño de nuevos fármacos inteligentes, marcadores moleculares, antitumorales, entre otros. Por tal motivo, es de suma importancia el conocer tanto sus características fisicoquímicas como su toxicidad, para su correcto manejo y exposición por parte del usuario de este tipo de aplicaciones (Salata, 2014).

Durante los últimos años, la nanotoxicología se ha enfocado en estudiar las interacciones entre las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas y sus efectos tóxicos en los diferentes sistemas biológicos, evaluando parámetros como la modificación de la morfología, función, y viabilidad celular entre otros.

1.1.1 Clasificación de los nanomateriales

a) Clasificación por su dimensionalidad

Existe una clasificación de los nanomateriales basada en el aspecto del material y cuántas de sus dimensiones se encuentran dentro de la escala nanométrica (Buzea, *et al.*, 2007). De tal forma que se clasifican de la siguiente manera:

- Cero dimensiones (0 D): Es aquel nanomaterial en el que todas sus dimensiones se encuentran en el rango de 1-100 nanómetros (nm).
- Unidimensional (1 D): Es aquel nanomaterial en el que una de sus tres dimensiones se encuentra fuera del rango de 1-100 nm.

- Bidimensional (2 D): Es aquel nanomaterial en el que dos de sus dimensiones se encuentran fuera del rango de 1-100 nm.
- Tridimensionales (3D): Son aquellos materiales cuyas tres dimensiones se encuentran fuera del rango de 1-100 nm.

b) Clasificación por su morfología

En los nanomateriales, otra característica muy importante para ser clasificados es su morfología. En ese sentido, pueden mencionarse: esferas, cubos, prismas, rodillos, tubos, estrellas, entre otros (Buzea, et al., 2007).

c) Clasificación por la composición química

Los nanomateriales pueden clasificarse de acuerdo con su naturaleza química: se encuentran los metales, óxidos metálicos, polímeros, cerámicos y derivados del carbono como los fullerenos, grafeno y nanotubos de carbono, cada uno con sus propiedades y características distintivas. Algunos ejemplos de nanopartículas metálicas que existen son de oro, plata, cobre, platino, entre otros metales.

1.1.2 Nanopartículas metálicas

Como su nombre lo indica son nanopartículas que tienen como base a un metal. Una característica común de este tipo de NPs corresponde a sus propiedades electrónicas relacionadas con la ausencia de una brecha prohibida, separando la banda de conducción de la banda de valencia.

Cuando se compara una nanopartícula metálica con su contraparte de bulto, se pueden observar diferencias significativas en su reactividad química, estabilidad cinética y termodinámica, interacción con el medio en el que se encuentren, entre otros, todo esto influenciado por la elevada relación superficie-volumen que poseen (Zhang-Wang, 2017).

1.1.2.1 Nanopartículas de oro (AuNPs)

Las nanopartículas metálicas se han explotado ampliamente para aplicaciones biomédicas siendo las nanopartículas de oro (AuNPs) unas de las más destacables

Sus características electrónicas, fisicoquímicas y en particular ópticas, con su resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR), pueden ser modificadas al alterar la forma y tamaño de las NPs. La facilidad de sus síntesis y funcionalización han promovido sus diversas aplicaciones en el campo biomédico (Elahi, *et al.*, 2018).

1.1.2.2 Resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR)

Una de las propiedades más importantes de las nanopartículas metálicas de oro está ampliamente relacionada con la resonancia del plasmón de superficie localizado, por sus siglas en inglés LSPR “Localized Surface Plasmon Resonance”.

El LSPR, es el movimiento oscilatorio coherente y colectivo de los electrones libres de la nanopartícula, en respuesta al campo eléctrico de una radiación electromagnética incidente. Para el caso del oro, este efecto es dado con la radiación electromagnética de la longitud de onda en el espectro visible o infrarrojo cercano, dependiendo fuertemente del tamaño y forma de la AuNPs (Liz-Marzán, 2004). Entre las principales aplicaciones de este tipo de propiedades se encuentra la Espectroscopia por Dispersión Raman incrementada en la Superficie (SERS, por sus siglas del inglés *surface-enhanced Raman spectroscopy*), (Chang, *et al.*, 2016).

1.1.2.3 Nanocubos de oro cóncavos (AuNCCs)

Entre las distintas morfologías que pueden adquirir las AuNPs, destacan las formas con puntas agudas ya que estas zonas pueden concentrar grandes campos eléctricos al ser excitado su LSPR, de gran interés para aplicaciones de detección mediante espectroscopía SERS (Romo-Herrera, *et al.*, 2016).

Una de las formas de AuNPs desarrolladas a partir del interés por su actividad plasmónica, son los nanocubos cóncavos de oro (AuNCCs), debido a los altos campos eléctricos que logran concentrarse de

forma similar cerca en cada una de sus ocho esquinas. Esto ocasiona que los AuNCCS presenten un incremento en la señal SERS, técnica con la cual es posible la identificación de moléculas con señales débiles debido a su baja concentración.

1.1.3 Síntesis de AuNPs mediadas por semillas

Existen diversos métodos de síntesis de nanopartículas metálicas y en específico para obtener diversas morfologías de AuNPs (Scarabelli, *et al.*, 2015).

El método de síntesis mediado por semillas es uno de los que mejores resultados ha arrojado. Este tipo de técnica fue reportado por primera vez para la preparación de nanocubos cóncavos, por el grupo de investigación de Zhang y colaboradores (Zhang, *et al.*, 2010). Consiste en la preparación de semillas de oro mediante una reducción de la sal del ácido cloroaúrico HAuCl_4 , por la presencia de una solución en frío y recién preparada de borohidruro de sodio NaBH_4 , en presencia de un agente surfactante derivado de una sal cuaternaria de amonio como el cetiltrimetil amonio (CTAC) o el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). Estas semillas son caracterizadas y purificadas para posteriormente ser agregadas a una solución de crecimiento que es preparada mediante la adición de HAuCl_4 como precursor, junto con la adición de nitrato de plata (AgNO_3), ácido clorhídrico (HCl) y ácido L-ascórbico, en presencia de un agente surfactante como CTAC.

1.1.4 Nanotoxicología: generalidades e importancia

Derivado del aumento en la síntesis de los nanomateriales y la exposición de los seres vivos a éstos, surgió una rama de las nanociencias que estudia y evalúa los efectos tóxicos en los diferentes seres vivos y el ambiente debido a las exposiciones a los nanomateriales. Además, se encarga de estudiar los mecanismos de las respuestas celulares, la forma de controlarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar la interacción biológica con los nanomateriales y su impacto en las posibles respuestas tóxicas (Eaton-Gilbert, 2008). Otro de los objetivos finales de la nanotoxicología es el de garantizar la bioseguridad de los nanomateriales para sus futuras aplicaciones en la industria y en productos comerciales y de consumo diario. Algunos nanomateriales, en su mayoría de naturaleza metálica, han sido utilizados en el ámbito biológico, electrónico, textil, alimenticio, entre otros, por lo que es indispensable determinar su biocompatibilidad en sistemas *in vitro* e *in vivo*.

Diversos análisis han determinado que la biocompatibilidad de las nanopartículas metálicas está asociada a su tamaño, forma, distribución y aglomeración, llegando a reaccionar con los componentes biológicos y afectando las funciones celulares y por consiguiente a todo el organismo (Cheng Y-S, *et al.*, 2009).

1.1.4.1 Mecanismos de internalización de los nanomateriales en la célula

Los NMs pueden entrar al sistema biológico por medio de múltiples vías como la inhalación, vía oral o incluso la dérmica. Una vez dentro, los NMs interactúan con distintas células en el cuerpo por medio de la membrana celular. Existen distintas vías de internalización o endocitosis de los NMs, por ejemplo, las dependientes de clatrina, dependientes de caveolas, la endocitosis independiente de receptores, fagocitosis y pinocitosis, siendo esta última la vía más común para la internalización de NMs de forma inespecífica. En todos estos mecanismos, los nanomateriales son encapsulados en vesículas membranales selectivas, a las que se conocen como endosomas.

Las propiedades fisicoquímicas de los NMs, también pueden influenciar cuál de las vías de internalización será utilizada por la célula para llevarlo hacia el citoplasma o los organelos celulares. Shang y colaboradores reportaron que estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, por el contrario, un mismo NM puede utilizar distintas vías de internalización al mismo tiempo (Shang, 2014). A su vez, las vías de internalización varían de un tipo de célula a otra dependiendo de su actividad biológica.

Entre las células que tienen una función fagocítica, se encuentran los monocitos/macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, entre otras.

1.1.4 Mecanismos de toxicidad celular inducidos por los NMs

1.1.5.1 Citotoxicidad

Según lo descrito por Lewinski y colaboradores, uno de los principales efectos derivados de la exposición celular a los NMs, es la citotoxicidad, que puede comprometer la estructura de la membrana celular, provocando daños en ésta, cambios en la morfología celular, desestabilización de su correcta función y

alterando su actividad en el intercambio de sustancias entre el interior y el exterior celular, influyendo directamente en su viabilidad (Lewinski, *et al.*, 2008).

1.1.5.2 Estrés oxidante

Alkilany y colaboradores, en 2010, reportaron que el blanco inicial para desencadenar un efecto citotóxico por un NM, especialmente las nanopartículas metálicas, son las membranas celulares. Esto se debe a que la forma iónica del metal, que puede ser segregado por las nanopartículas metálicas, causa el daño celular más severo, pues presentan una mayor difusión, disponibilidad y distribución al interactuar con algunas proteínas como las metalotioninas encargadas del transporte de los metales y sus respectivos iones hacia el interior de la célula (Alkilany, *et al.*, 2010).

Uno de estos daños está relacionado con la disrupción de la cadena respiratoria mitocondrial, al aumentar la producción de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) creando un desequilibrio por el aumento de radicales libres y la disminución del sistema antioxidante celular, además de la interrupción de la síntesis de ATP, provocando daños en el interior de la célula (J.J-Li, *et al.*, 2010).

1.1.5.3 Genotoxicidad

Otro de los efectos de toxicidad desencadenados por los NMs es el daño al material genético, también conocido como genotoxicidad. Este es un mecanismo que puede provocar daños reversibles e irreversibles al ADN, ocasionando mutaciones, aberraciones cromosómicas y deleciones del material genético. Utilizando una técnica conocida como ensayo cometa, Paino y colaboradores reportaron que las AuNPs con un diámetro de 20 nm y concentraciones mayores a 50 μM , por un tiempo de exposición de 24 horas, pueden causar genotoxicidad en células hepáticas (Paino, *et al.*, 2012).

1.1.5.4 Inflamación

Otro de los mecanismos de toxicidad que pueden inducir los NMs en las células, son los procesos de inflamación, una vez que la célula activa un mecanismo de respuesta inmunológica frente a la posible

toxicidad de estas partículas. Este mecanismo incluye la secreción de enzimas digestivas, citosinas, etc., que eliminan a la célula dañada, sin embargo, si no es posible deshacerse de los agentes que ocasionan el daño, la producción de estas sustancias aumenta, lo que puede comprometer la función del tejido, así como los lugares adyacentes a este (Gutiérrez-Araujo, *et al.*, 2021).

Sin embargo, estudios relacionados con respuestas inflamatorias, han demostrado que las AuNPs no tienen este tipo de respuesta, al contrario, pueden tener actividad antiinflamatoria (Sumbayev, *et al.*, 2012).

En este trabajo se busca evaluar el efecto de AuNPs con morfología de cubos cóncavos mediante diferentes ensayos toxicológicos usando como modelo celular *in vitro* a los cultivos celulares de osteoblastos.

Toxicidad de las nanopartículas de Au en Osteoblastos

1.1.6.1 Osteoblastos como modelo celular para estudios *in vitro*

Los osteoblastos son células del tejido óseo encargadas de la remodelación de este sistema, se encuentran a lo largo de todo el cuerpo en el sistema óseo, específicamente en la capa de los huesos llamada epiteloide de células cilíndricas, implicadas en condensar los componentes de la matriz ósea y junto con los osteoclastos logran la constante renovación de los huesos.

Los cultivos celulares de osteoblastos obtenidos mediante explantes óseos ya sea de humano o de ratón, son un buen modelo de estudio para la actividad celular osteoblástica *in vivo* y/o *in vitro* debido a los factores reguladores que estos pueden presentar con la exposición de algunos fármacos, y en este caso con nanomateriales.

La línea celular de osteoblastos MC3T3-E1 es usada en estudios de cultivo celular *in vitro*, se deriva de la primera línea celular de fibroblastos del grupo de investigación de Peck y colaboradores, en 1964, donde se estableció un modelo primario de cultivo de osteoblastos viables, sin embargo, no se eliminaron por completo células con características totales de fibroblastos (Peck, *et al.*, 1964). En recientes años y teniendo en cuenta los antecedentes mencionados Bakker y Klein-Nulend en el año 2012 lograron aislar

células preosteoblásticas, a las cuales se les indujo su maduración para obtener osteoblastos (Bakker y Klein-Nulend, 2012).

1.1.6.2 Toxicidad de las AuNPs en osteoblastos

Se ha reportado que la toxicidad de las AuNPs puede ser afectada por sus distintos tamaños y formas de las NPs, por su gran área de superficie en relación con su volumen, reactividad superficial y debido a los diferentes recubrimientos o funcionalizaciones químicas que contengan (Goodman, 2004). Las interacciones de las AuNPs con los sistemas biológicos se asocian con sus diferentes propiedades fisicoquímicas, una de ellas es su tamaño, que favorece su internalización en las células, asociando a que una AuNP más pequeña es más tóxica, por lo que se enfatiza la relevancia en estas características para evaluar sus posibles aplicaciones biológicas (Sani, 2021).

Por ejemplo, algunas de estas AuNPs causan distintos efectos tóxicos en osteoblastos, influyendo en su morfología y viabilidad. Estudios recientes reportados por el grupo de investigación de Shiao-Wen y colaboradores en el año 2013, mencionan que la morfología, tamaño y funcionalización de las AuNPs está relacionada con su toxicidad en las células de osteoblastos.

Se ha reportado que en la línea celular MG63 de osteoblastos, a partir de 20 horas de exposición, las AuNPs con formas esféricas de 10 nm a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, son más tóxicas que las nanoesferas con mismo tamaño a concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pues causan daño en la morfología celular (Shiao-Wen, *et al.*, 2013).

Por otro lado, Taylor y su grupo de investigación, compararon la toxicidad de nanoesferas y nanorodillos de Au de 10 nm, encontrando que a distintas concentraciones en los osteoblastos MG63, a una exposición por 24 horas y a partir de 9.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$, existe una inhibición en el crecimiento celular con ambas formas de las AuNPs, teniendo un mayor cambio con los nanorodillos (Tayler, *et al.*, 2010).

En el año 2013 Kwang Sik Suh y colaboradores, reportaron que nanoesferas de Au causan una mejora en la diferenciación celular y efectos protectores en la disfunción mitocondrial en células osteoblásticas MC3T3 en relación con el incremento del diámetro de la nanopartícula empleada, las evaluaciones fueron realizadas con tamaños de las AuNPs de 5, 10 y 20 nm en concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por un tiempo de exposición de 24 h (Kwang-Suh, *et al.*, 2013).

Sin embargo, otras NPs con morfologías como los AuNCCs, no cuentan con este tipo de estudios, por lo que, en este trabajo, se realizarán ensayos toxicológicos para determinar las posibles influencias de estas AuNPs.

1.2 Hipótesis

Los nanocubos cóncavos de oro (AuNCCs) con tamaños menores a 40 nm ocasionan alteraciones negativas en la viabilidad y morfología de osteoblastos murinos MC3T3-E1.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto toxicológico de la síntesis de diferentes tamaños de nanopartículas de oro con morfología de cubos cóncavos y su efecto en la viabilidad y morfología celular de osteoblastos murinos MC3T3-E1.

1.3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar la síntesis de tres diferentes tamaños de nanopartículas de oro (AuNCCs) con morfología de cubos cóncavos.
- b) Determinar la distribución de tamaños, potencial zeta y resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR) de los AuNCCs sintetizados.
- c) Determinar la citotoxicidad de diferentes concentraciones de los distintos AuNCCs en osteoblastos murinos MC3T3-E1.
- d) Comparar los cambios morfológicos celulares inducidos por la exposición de los osteoblastos a diferentes concentraciones de AuNCCs y determinar si los AuNCCs son internalizados por las células.
- e) Determinar el estrés oxidativo en osteoblastos murinos expuestos a diferentes concentraciones de los 3 tipos de AuNCCs.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntesis de tres diferentes tamaños de AuNCCs

La síntesis de AuNCCs se llevó a cabo por el método descrito por Romo-Herrera y colaboradores en 2016, con la modificación del uso de agua Milli Q durante toda la síntesis. Este método consta de cuatro pasos en la siguiente secuencia: 1) Síntesis de semillas, 2) dilución de semillas, 3) crecimiento de AuNCCs y 4) disminución de concentración del agente estabilizante usado durante la síntesis.

Reactivos: Cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC) (Sigma Aldrich 292737), Ácido tetracloroaúrico trihidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma Aldrich 520918), Borohidruro de sodio (NaBH_4) (Sigma Aldrich 71320), Nitrato de Plata (AgNO_3) (Sigma Aldrich 209139), Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (Sigma Aldrich A7506), Ácido clorhídrico (HCl) y Agua Milli Q.

Preparación de soluciones madre: Se prepararon las soluciones madre en agua a las siguientes molaridades para ser usadas en la síntesis de semillas de oro y cubos cóncavos. CTAC 100 mM, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, NaBH_4 40 mM, AgNO_3 10 mM, Ácido ascórbico 100 mM y HCl 1M.

Preparación de semillas de oro: Se añadieron abruptamente 150 μL de la solución madre de NaBH_4 , previamente enfriada a punto de congelación a la mezcla que contenía 10 mL de solución madre de CTAC y 250 μL de solución madre de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ bajo agitación vigorosa (aproximadamente 500 r.p.m.).

Se mantuvo esta velocidad de agitación durante 1 minuto, posterior a esto se redujo su velocidad a un nivel bajo y se dejó así durante 2 horas a temperatura ambiente. Con esto se obtuvieron AuNPs con morfología esférica de aproximadamente 2-3 nm tipo semillas.

Dilución de semilla de oro: Utilizando las semillas de oro previamente obtenidas, se realizaron 3 diluciones con solución madre de CTAC para ser utilizada para el crecimiento de los diferentes tamaños de AuNCCs. Estas diluciones fueron 1/10, 1/100 y 1/200 (v/v). Estas diluciones tienen esta relación debido a que entre mayor sea la dilución (menor cantidad de semillas), el tamaño de los AuNCCs en el crecimiento será mayor, buscándose obtener tres distintos tamaños a los que se etiquetaron como: pequeños, medianos y grandes respectivamente.

Crecimiento de AuNCCs: Para la obtención de los diferentes tamaños de los AuNCCs, se siguió una misma metodología con excepción de la adición de semillas utilizándose las distintas diluciones de semillas. (1/10 para tamaño pequeño, 1/100 para tamaño mediano y 1/200 para tamaño grande).

A 10 mL de solución madre de CTAC bajo agitación media (300 r.p.m.) se añadieron de forma secuencial 500 μ L de solución madre de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 100 μ L de solución madre de AgNO_3 , 200 μ L de solución madre de HCl, 100 μ L de solución madre de Ácido ascórbico y 100 μ L de dilución de semillas. Se dejó en agitación vigorosa (500 r.p.m.) durante 1 minuto y posteriormente se disminuyó a una velocidad moderada y se dejó en agitación por una hora a temperatura ambiente.

Terminado este tiempo se realizó el lavado de la dispersión de AuNCCs de la siguiente manera: Se centrifugaron a las siguientes revoluciones y tiempos dependiendo del tamaño de los AuNCCs: 2800 RCF por 15 minutos para los cubos medianos y grandes y 3500 RCF por 30 minutos para los cubos pequeños; dividiendo 10 mL de dispersión de AuNCCs en 5 tubos eppendorf con capacidad de 2 mL cada uno, posterior a ello se retiró el sobrenadante y se adicionó el mismo volumen de solución madre de CTAC para resuspender los AuNCCs (se realizaron 3 lavados iterativamente).

La concentración final de CTAC al terminar los lavados es de 100 mM. Para evitar tener en exceso la presencia de CTAC en las dispersiones de AuNCCs, debido a su toxicidad ante las células (Zhou, *et al.*, 2018), fue necesario bajar su concentración hasta un punto donde esta fuera suficientemente baja para minimizar el daño, sin llegar a comprometer la agregación de los AuNCCs. La concentración adecuada fue 0.1 mM de CTAC (la disminución en concentración de CTAC fue realizada con 24 horas de anticipación previa a los experimentos celulares).

Disminución de la concentración del surfactante: La concentración inicial de CTAC en la dispersión de AuNCCs es de 100 mM, por lo que se requirió realizar una primera disminución a 10 mM de CTAC. Para lo cual, colocaron 2 mL de dispersión de AuNCCs en 1 tubo eppendorf de 2 mL, se centrifugó según los tiempos y RCF mencionados anteriormente dependiendo del tamaño de los cubos, terminado este tiempo se extrajeron 1.8 mL de sobrenadante y se adicionó el mismo volumen de agua Milli Q, donde se resuspendieron. En un siguiente paso se disminuyó la concentración de CTAC a 1 mM. Se colocaron los 2 mL de AuNCCs (10 mM de CTAC) en 1 tubo eppendorf de 2 mL, se centrifugó según los tiempos y RCF mencionados anteriormente dependiendo del tamaño de los cubos, finalizado este tiempo se retiraron 1.8 mL de sobrenadante y se adicionó el mismo volumen de agua Milli Q, para resuspender nuevamente.

Para el tercer y último paso se disminuyó la concentración de CTAC a 0.1 mM. Se colocaron nuevamente los 2 mL de AuNCCs (1 mM de CTAC) en tubos eppendorf de 2 mL, se centrifugó según los tiempos y RCF mencionados anteriormente dependiendo del tamaño de los cubos, culminado este tiempo se retiraron 1.8 mL del sobrenadante y se adicionó el mismo volumen de agua Milli Q, concluyendo con su resuspensión. Estos AuNCCs terminaron con una concentración final de 0.1 mM de CTAC y 0.45 mM de Au⁰.

Además de evaluar el tamaño de los AuNCCs, es importante el estudio del efecto toxicológico de diferentes concentraciones de nanopartículas. Para ello, se prepararon dispersiones a mayor concentración de AuNCCs manteniéndose fija la concentración mínima (0.1 mM) de CTAC.

AuNCCs concentrados: Partiéndose de 20 mL de dispersión de AuNCCs 10 mM de CTAC, la dispersión fue transferida y dividida en 10 tubos eppendorf de 2 mL cada uno, se centrifugaron según los tiempos y RCF mencionados anteriormente dependiendo del tamaño de los cubos, terminado se extrajeron de cada tubo 1.8 mL de sobrenadante y se adicionó el mismo volumen de agua Milli Q para resuspenderlos, obteniéndose una dispersión 1 mM de CTAC. Esta nueva dispersión de AuNCCs fue transferida a 10 tubos eppendorf de 2 mL cada uno y centrifugados por 30 min a 4000 RCF, terminado este tiempo se extrajeron de cada tubo 1.8 mL de sobrenadante, resuspendiendo el pellet con el precipitado de volumen restante de 0.2 mL en cada tubo eppendorf.

En un tubo eppendorf de 2 mL se juntaron los 10 remanentes (0.2 mL en cada uno) concentrados anteriores, quedando con volumen y concentración final: 2 mL de AuNCCs (4.5 mM de Au⁰) y 1 mM de CTAC. Esta dispersión fue centrifugada nuevamente según los tiempos y RCF mencionados anteriormente dependiendo del tamaño de los cubos, terminado este tiempo se extrajeron 1.8 mL de sobrenadante y se adicionó el mismo volumen de agua Milli Q para resuspenderlos, obteniéndose así 2 mL de AuNCCs (4.5 mM de Au⁰) y 0.1 mM de CTAC.

De la dispersión anterior, se tomó 1 mL a la cual se adicionó 1 mL de solución de CTAC 0.1 mM. Obteniéndose así los siguientes volúmenes y concentraciones finales respectivamente: 1 mL de AuNCCs a 0.1 mM de CTAC y 4.5 mM de Au⁰ y 2 mL de AuNCCs a 0.1 mM de CTAC y 2.25 mM de Au⁰ (Para cada uno de los tamaños de cubos sintetizados).

2.2 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de los AuNCCs sintetizados

Caracterización y monitoreo de la resonancia del plasmón de superficie localizado: En una celda espectrofotométrica de cuarzo de 1 mm de paso óptico se colocaron 0.4 mL de cada una de las dispersiones a ser analizadas. Para las mediciones de las soluciones concentradas con 2.25 mM de Au⁰ y 4.5 mM de Au⁰ de todos los tamaños, se realizaron diluciones de estas en una proporción de 5 y 10 veces respectivamente de la siguiente manera: Para las dispersiones de AuNCCs con concentración de 2.25 mM de Au⁰ se tomaron 80 µL y se diluyeron con 320 µL de solución de CTAC 0.1 mM; para las dispersiones de AuNCCs con concentración de 4.5 mM de Au⁰ se tomaron 40 µL y se diluyeron con 360 µL de solución de CTAC 0.1 mM.

Se realizaron las mediciones del plasmón de superficie localizado en el espectrofotómetro de UV- visible (Cary 60 Agilent Technologies) en un rango de medición de 1000 a 200 nm. Para la corrección de línea base y blanco de reactivo, se utilizó agua Milli Q. Estas mediciones se realizaron con los AuNCCs recién sintetizados, después de los 3 lavados y en cada paso al ir bajando la concentración del surfactante, para corroborar que los AuNCCs se encontraran estables.

Medición del potencial zeta y diámetro hidrodinámico: A partir de cada dispersión con los distintos tamaños y concentraciones de AuNCCs (Mismas diluciones empleadas en la medición del plasmón de superficie localizado), se realizó una dilución tomando 100 µL de la muestra y 900 µL de solución de CTAC 0.1 mM, esto para evitar que la celda usada quedara manchada al finalizar las mediciones.

Para cada medición del potencial zeta, se tomó una celda con capilar plegado para medición de potencial zeta (Malvaren DTS1070), se adicionó la dilución correspondiente y se limpió con un paño suave, evitando el contacto con los electrodos. Se colocó en el detector del DLS (Zetasaizer Malvern Instruments Instruments Ltda) configurando las siguientes indicaciones: Medición de Potencial Zeta, Material AuNPs, Dispersante agua y el tipo de celda usado que fue una celda Mallware. Las Mediciones se realizaron por triplicado y se obtuvo un promedio de estas.

Para cada medición de diámetro hidrodinámico, la configuración indicada fue la siguiente: Medición del diámetro hidrodinámico, Material AuNPs, Dispersante agua y el tipo de celda usado que fue una celda Mallware. Las Mediciones de realizaron por triplicado y se obtuvo un promedio de estas.

Imágenes TEM: Las imágenes de micrografías TEM de los AuNCCs fueron realizadas con el uso de los equipos JEOL JEM-2010 y JEOL2100F (a 200 kV) de la UNaC (Unidad de Nanocaracterización) del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM. Se emplearon rejillas de cobre recubiertas de carbono *mesh* 200 para TEM. Para la preparación y montaje de las muestras, estas se llevaron a las concentraciones de 1 mM de CTAC (surfactante) y 1.8 mM de Au⁰. Fueron utilizados 10 µL de dispersión por cada rejilla y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas.

2.3 Cultivo celular

Reactivos para el medio de cultivo de células: MEM- α (Minimum Essential Medium Alpha Medium) (Sigma-Aldrich D5648), suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés Fetal Bovine Serum) (Biowest S1400), solución antibiótica/antimicótica, L-glutamina (Sigma-Aldrich G8540), bicarbonato de sodio (NaHCO₃) (Fermont 12902), Solución al 0.25 % de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich SLCF6554).

La línea celular de osteoblastos murinos MC3T3-E1 con morfología de fibroblastos (ATCC CRL-2593) fue cultivada en cajas Petri de 6 cm y utilizando medio de cultivo: MEM- α suplementado con 10% v/v de FBS, 1% v/v de solución antibiótico/antimicótico, 1% v/v de L-glutamina y 1.5 g/L de NaHCO₃, todo lo anterior aforado a 1 L de agua Milli Q previamente estéril y ajustada a un pH de 7.4. Esta solución fue esterilizada por filtración a través de un filtro con tamaño de porosidad de 0.22 µm.

Reactivos Solución Buffer de Fosfatos (PBS por sus siglas en inglés "Phosphate Buffered Saline"): Cloruro de Sodio (NaCl) (Fermont 24902), Cloruro de Potasio (KCl) (J.T. Baker 304001), Hidrógenofosfato disódico (Na₂HPO₄) (Merck 908359) e Hidrógenofosfato dipotásico (K₂HPO₄) (Fermont 35842).

El PBS usado durante el cultivo celular y en los diferentes ensayos celulares de biocompatibilidad fue preparado en un frasco estéril de 1 L, adicionando 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄ y 0.24 g de KH₂PO₄ y disolviéndolos en 1 L de agua Milli Q, para obtener concentraciones finales de 137 mM, 2.7 mM, 10 mM y 2 mM respectivamente. El pH de esta solución fue ajustado a 7.4 y posteriormente fue esterilizada en autoclave.

Subcultivo o Pase celular: La línea celular de osteoblastos MC3T3-E1 se mantuvo en crecimiento en cajas de Petri de 6 cm, una vez que las células adheridas cubrieron entre un 70-80% de la superficie de la caja, fue necesario cambiar las células a una nueva caja lo cual es conocido como subcultivo o pasaje celular.

Para ello, primero hay que despegar las células adheridas a la caja Petri con 1 mL de solución de tripsina/EDTA. Esto se realizó removiendo el medio de cultivo viejo de la caja de Petri y posteriormente se realizó un lavado con 2 mL de PBS, removiendo posteriormente este medio, al terminar se adicionó 1 mL de tripsina y se incubó por 5 minutos a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, al término de este tiempo, se realizaron movimientos unilaterales en la superficie de la caja para despegar las células, el sobrenadante que contenía las células despegadas fue colocado en un tubo eppendorf de 1.5 mL, que se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 5 minutos. Se desechó con sumo cuidado el sobrenadante y el pellet celular obtenido fue resuspendido en 1 mL de PBS para eliminar cualquier residuo de tripsina, este se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 5 minutos. Se desechó con cuidado el sobrenadante y el pellet celular obtenido fue resuspendido en 1 mL de medio MEM- α de cultivo suplementado con 10% SFB.

Las células viables contenidas en ese volumen fueron contadas mediante una tinción por exclusión con azul tripano con la ayuda de la cámara de Neubauer y por último se realizó el subcultivo o pase celular correspondiente, colocando en una nueva caja Petri de cultivo celular un número aproximado de 100,000 células MC3T3-E1 en una caja de 6 cm con 5 mL de medio de cultivo MEM- α suplementado con 10% SFB y con 5 μ L de antibiótico/antimicótico que se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Conteo de células viables por el método de exclusión por azul de tripano: Para los subcultivos o pases celulares realizados, así como la evaluación de ensayos de citotoxicidad por reducción de MTT, es necesario contar las células viables obtenidas durante su cultivo.

Para ello fue necesario el uso del Hemocitómetro o Cámara de Neubauer, la cual es una placa de vidrio esmerilado y grabado con dimensiones de 3x7 cm y 5 mm de grosor. El cuadrante de conteo mide 3x3 mm cuadrados, el cual se encuentra dividido a su vez, en 9 cuadros de 1 mm cuadrado cada uno. La cámara cuenta con un cuadro central destinado al conteo de glóbulos blancos y hematíes, dividido en 9 cuadrantes como se muestra en la **Figura 1**:

El cuadrante número 5 es usado en el conteo de hematíes también llamados glóbulos rojos, mientras que los cuadrantes 1 al 4 se utilizaron para el conteo celular en este trabajo. Para el conteo de células viables se usó azul de tripano, un colorante que permite identificar y diferenciar las células vivas de las células muertas, ya que la membrana celular no permite el paso del colorante mientras las células sean viables, caso contrario a las células muertas, las cuales son teñidas totalmente de color azul debido a que la membrana plasmática está dañada; de esta forma se lograron contar las células vivas las cuales tienen un aspecto translúcido.

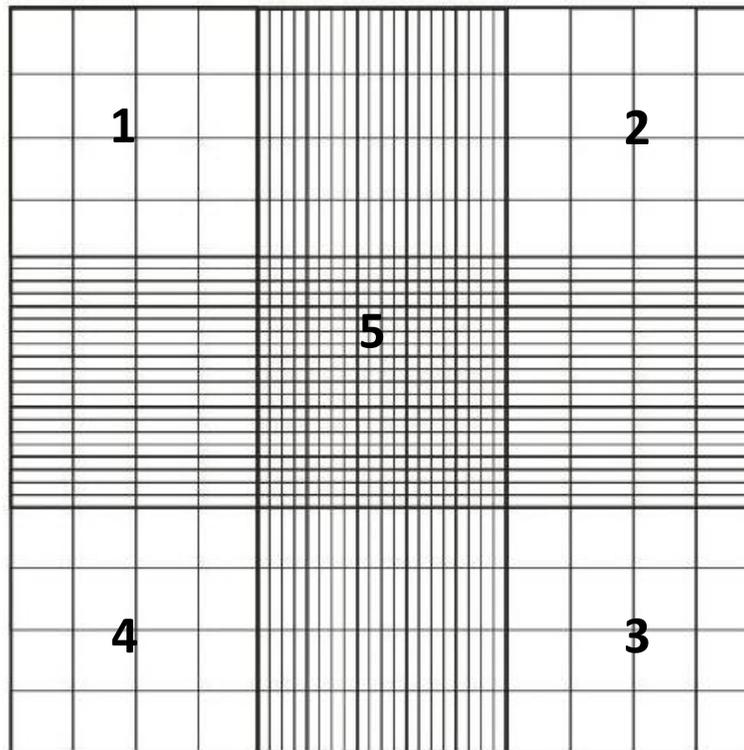


Figura 1. Cuadrantes de la cámara de Neubauer. Creada por el autor.

En un tubo eppendorf de 1.5 mL se agregaron 40 μL del colorante + 10 μL de la suspensión celular de células, se mezcló, y se tomaron 10 μL de la muestra para colocarse en la cámara de Neubauer y proceder al conteo celular. Para conocer la cantidad de células vivas por mL de medio, se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo:

$$\# \text{ Células por mL} = \left(\frac{\# \text{ Células contadas}}{4} \right) (\text{F. D}) \left(\frac{10,000}{\text{mL}} \right) \quad (1)$$

Donde:

Células contadas = El número de células viables en los cuatro cuadrantes de conteo

F.D = Factor de dilución usado, que en este caso fue de 5.

Reactivos para el Medio de Criopreservación: Medio Dubelcco's Modified Eagle's Media DMEM (Sigma-Aldrich D5648), FBS (Biowest S1400), dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich D8418).

Para la criopreservación de la línea celular, se preparó la solución de criopreservación usando del total a preparar 40% v/v de DMEM previamente suplementado con SFB y antibiótico/antimicótico, mezclado con

10% v/v de DMSO, y con 50% v/v de FBS. El total de la solución obtenida fue alicuotada en viales de criopreservación de 1 mL y almacenados hasta su uso a -20°C .

Método para criopreservación: Una vez que las células MC3T3-E1 llegan a cubrir entre el 70 al 80% del área de la caja Petri de cultivo celular, las células se tripsinizan y se recuperan en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 1500 r.p.m. durante 5 minutos, después se decantó el sobrenadante en un solo movimiento, cuidando que el pellet celular no sufriera pérdida o perturbación alguna. El pellet celular fue resuspendido en 1 mL de medio de criopreservación y posterior a ello fue mezclado con el total del medio a emplear, tomando en cuenta la siguiente proporción: cada 1,000,000 células contadas fueron resuspendidas en 1 mL de medio de criopreservación. En relación con lo anterior, el total fue alicuotado en viales de criopreservación de 1 mL y las células se criopreservaron a -80°C .

Descongelamiento celular: Para cultivar células previamente criopreservadas, se descongeló el vial que contenía las células de MC3T3-E1 criopreservadas y se trasvasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL, que fue centrifugado a 1500 r.p.m. durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de PBS el cual fue mezclado nuevamente con el pellet celular obtenido. Esta solución fue centrifugada a 1500 r.p.m. por 5 minutos y posteriormente se decantó el sobrenadante.

El pellet celular obtenido fue resuspendido en 1 mL de medio de cultivo y después fue adicionado a la caja Petri para su subcultivo correspondiente en incubación a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

2.4 Ensayos de Biocompatibilidad

Reactivos: PBS, medio de cultivo MEM- α suplementado, solución de MTT a una concentración de 3 mg/mL (Sigma-Aldrich M5G55), Isopropanol absoluto (Fermont H6092), Solución 150 mM de NaCl (Fermont 24902), Solución 2% y 20% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich MCFD00128254), solución H_2DCFDA 20 mM.

2.4.1 Ensayo de viabilidad celular por reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Para determinar la citotoxicidad de los diferentes tamaños y concentraciones de los AuNCCs en la línea celular de osteoblastos MC3T3-E1, se realizó un ensayo de citotoxicidad mediante el ensayo colorimétrico de la reducción del MTT.

Esta reducción es llevada a cabo por la actividad metabólica de la enzima succinato deshidrogenasa presente en células viables; la forma reducida del MTT es el compuesto llamado (*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano (Formazán), el cual se precipita formando cristales de color violeta que son insolubles en agua.

El ensayo fue realizado en una placa de 96 pozos, en donde se cultivaron 10,000 osteoblastos por pozo en un volumen final de 100 μ L de medio de cultivo MEM- α . Las células fueron incubadas por 48 h a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂ de acuerdo con los siguientes tratamientos:

- a) *Método tradicional*: Para corroborar la toxicidad de los AuNCCs medianos con 0.45 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC por el método tradicional, se colocaron 10,000 células de osteoblastos y 100 μ L de medio MEM- α en cada pozo de la placa de 96 pozos y por triplicado, se incubaron por 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Terminado este tiempo se retiró el medio de cada pozo y se colocaron en cada pozo de la caja por triplicado, los diferentes volúmenes de los AuNCCs medianos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 μ L, de los cuales la equivalencia en número de partículas de Au⁰ queda indicada en la **Tabla 10**) con 0.45 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC, todos en un volumen final de medio de cultivo MEM- α de 100 μ L, para incubarlas junto con los osteoblastos por 48 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.
- b) *Método alternativo*: Para corroborar la toxicidad de los AuNCCs de los diferentes tamaños (pequeños, medianos y grandes) y concentraciones de Au⁰ (0.45, 2.25 y 4.5 mM) y 0.1 mM de CTAC en un formato más parecido al que se usará en futuras aplicaciones biomédicas, por ejemplo, sobre un soporte de papel, se decidió evaluar la biocompatibilidad de los AuNCCs por el método alternativo. Para esta variación de los ensayos, previo a la incubación con células, primero cada uno de los pozos de la caja de 96 pozos fueron impregnados por triplicado con los volúmenes de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 μ L de los diferentes AuNCCs (La equivalencia del volumen en número de partículas de Au⁰ queda indicada en la **Tabla 9** para los cubos pequeños, la **Tabla 10** para los

medianos y la **Tabla 11** para los grandes). La impregnación se dejó en incubación por 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y posteriormente se colocaron 10,000 osteoblastos en un volumen final de 100 µL de medio de cultivo por cada pozo. Esta placa se dejó en incubación por 48 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Como control positivo para cada una de las pruebas realizadas, además de las 10,000 células incubadas por triplicado, sólo fue añadido 100 µL de medio de cultivo. Como control negativo y para inducir la muerte celular, las células fueron incubadas con 100 µL de Tritón X-100 al 2%. Al término de los tiempos de incubación mencionados anteriormente para cada prueba (48 h), se decantó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados a cada pozo con 200 µL de PBS. Concluido el último lavado, se adicionó a cada pozo 10 µL de reactivo MTT y 90 µL de medio de cultivo, incubando la placa por 4 horas a 37°C en oscuridad y con una atmósfera de 5% de CO₂. Terminado este lapso, se agregó a cada pozo 100 µL de isopropanol absoluto, para resuspender el volumen en cada pozo con ayuda de una micropipeta para disolver el precipitado derivado de cristales de formazán.

Esta placa fue envuelta en papel aluminio e incubada por 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la absorbancia del formazán en las longitudes de onda de 570 y 690 nm en el lector de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan Go).

Al tener la lectura de las absorbancias, se realizó el tratamiento matemático para obtener el porcentaje de viabilidad celular y con estos datos y utilizando el método Probit se realizó la estimación de la IC₅₀ para las células expuestas con cada tamaño y concentración de Au⁰ en los AuNCCs. La IC₅₀ obtenida fue en valor de volumen, por lo cual fue realizada su conversión a número de partículas de Au, de acuerdo con las Tablas antes mencionadas. (Estos datos de IC₅₀ fueron tomados en cuenta para el ensayo de tipo de muerte celular).

2.4.2 Ensayo fluorimétrico de la producción de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) mediante la reducción del reactivo diacetato de 2',7'-diclorohidrofluoresceína (H₂DCFDA)

Para determinar el estrés oxidativo celular, provocado por los diferentes tamaños y concentraciones de los AuNCCs en la línea celular de osteoblastos MC3T3-E1, se realizó un ensayo fluorimétrico para la detección del DCF.

Esta reducción es llevada a cabo por la generación de especies de oxígeno altamente reactivas derivadas del estrés celular; la forma reducida del H₂DCFDA es el compuesto llamado 2',7'-diclorofluorosceína (DCF), reactivo altamente fluorescente.

Para corroborar la toxicidad de los diferentes tamaños y concentraciones de Au⁰ de los AuNCCs por el método alternativo: Para los ensayos, previo a la incubación con células, primero cada uno de los pozos de la caja de 96 pozos fueron impregnados por triplicado con los volúmenes de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 µL (La equivalencia del volumen en número de partículas de Au queda indicada en la **Tabla 9** para los cubos pequeños, la **Tabla 10** para los medianos y la **Tabla 11** para los grandes) de los diferentes tamaños y concentraciones de los AuNCCs sintetizados (tamaños pequeños, medianos y grandes y concentraciones de 0.45 mM, 2.25 mM y 4.5 mM de Au⁰ en 0.1 mM de CTAC). La impregnación se dejó en incubación por 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, y posteriormente se colocaron 10,000 osteoblastos en un volumen final de 100 µL de medio de cultivo por cada pozo. Esta placa se dejó en incubación por 48 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Como control positivo para cada una de las pruebas realizadas, además de las 10,000 células incubadas por triplicado, sólo fue añadido 100 µL de medio de cultivo. Como control negativo y para inducir la muerte celular, las células fueron incubadas con 100 µL de Tritón X-100 al 2%. Al término de los tiempos de incubación mencionados anteriormente para cada prueba (48 h), se decantó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados a cada pozo con 200 µL de PBS.

Concluido el último lavado, se adicionó a cada pozo 100 µL de medio de cultivo MEM-α con reactivo H₂DCFDA con una concentración final de 25 µM derivada de la solución stock 20 mM, incubando la placa por 1 hora a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂, cuidando que esté en oscuridad.

Terminado este lapso, se removió el medio mediante pipeteo y se agregó a cada pozo 100 µL de medio MEM-α. La placa fue cubierta y protegida contra la luz, hasta su lectura con papel aluminio. Posteriormente se midió la fluorescencia de la placa en las longitudes de onda excitación/emisión de 485 y 530 nm en el espectrofluorómetro Cary Eclipse (Agilent).

2.4.3 Ensayo de hemocompatibilidad de los distintos tamaños y concentraciones de los AuNCCs

El evaluar la biocompatibilidad de nanomateriales, específicamente la hemocompatibilidad es de suma importancia, para asumir que la composición del material no causa una respuesta citotóxica a nivel sanguíneo, este ensayo se encuentra alojado en la norma ISO 10993-4:2017 “Requerimientos generales para evaluar las interacciones de aparatos/materiales médicos en la sangre”. La cual menciona que cualquier material/aparato médico es hemocompatible, cuando este no presente alguna reacción adversa como trombosis, hemólisis y/o activación de plaquetas, así como algún tipo de activación inmunitaria o del sistema del complemento. Para la evaluación de los AuNCCs y sus distintos tamaños y concentraciones, se realizó el siguiente protocolo:

Preparación de la muestra sanguínea (eritrocitos): Se extrajeron 5 mL de sangre humana, y se colocaron en un tupo con tapa verde (Heparina) de la marca “BD Vacutainer®”, para prevenir su coagulación mediante la inhibición del factor II de la cascada de coagulación, invirtiendo el tubo receptor de 5 veces con sumo cuidado, asegurando la homogeneización de la sangre con el anticoagulante. La muestra fue centrifugada por 5 minutos a 3000 r.p.m. Al término del tiempo, se desechó el sobrenadante (plasma) mediante pipeteo lento y cuidadoso, el pellet de eritrocitos fue resuspendido cuidadosamente, en 10 mL de NaCl (150 mM), la solución se centrifugó por 5 minutos a 3000 r.p.m. y se desechó el sobrenadante con cuidado. Los eritrocitos se resuspendieron en 10 mL de solución PBS y se centrifugaron nuevamente con los mismos parámetros anteriores.

Este último paso se repitió 8 veces, de modo que el sobrenadante después de centrifugar adquiriera una apariencia traslúcida. Los eritrocitos obtenidos del último lavado fueron diluidos y resuspendidos 1:50 con PBS (1 mL de eritrocitos con 49 mL de PBS).

Preparación de las muestras con AuNCCs: En tubos eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron los volúmenes de 1 a 10 μ L de las distintas concentraciones y tamaños de los AuNCCs, a cada uno se adicionó medio de cultivo MEM- α , de modo que en cada uno el volumen final fue de 30 μ L. A cada tubo se le agregó 270 μ L de la solución 1:50 de eritrocitos, para obtener un volumen total de 300 μ L. Para el control negativo de hemólisis se adicionaron 30 μ L de medio de cultivo MEM- α + 270 μ L de solución 1:50 de eritrocitos; para el control positivo de hemólisis, se adicionaron 30 μ L de Tritón X-100 al 20% + 270 μ L de solución 1:50 de eritrocitos.

Las muestras fueron leídas en la longitud de onda de 450 nm en el lector de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan Go), los resultados fueron normalizados, tomando en cuenta la hemólisis inducida por el control positivo como el 100% máximo.

2.4.4 Ensayo de tipo de muerte celular por citometría de flujo

El ensayo de tipo de muerte celular, nos indica el proceso que lleva a cabo la célula cuando ésta sufre algún daño en ella, y así conocer la vía de inducción de muerte. Para el ensayo, se toma en cuenta la membrana celular y los lípidos que esta tiene. Un lípido muy importante es la fosfatidilserina, la cual se encuentra en la parte citosólica de la membrana plasmática, sin embargo, cuando existe perturbación en ella, este lípido puede encontrarse externamente en la parte extracelular de la membrana plasmática, característica del tipo de muerte por apoptosis o muerte celular programada, esto último permite interactuar con distintos marcadores moleculares. El ensayo para determinar el tipo de muerte celular por apoptosis o necrosis está dado por la tinción conjunta de los marcadores Anexina V acoplada a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) y Yoduro de Propidio (PI). Cuando existe apoptosis temprana la fosfatidilserina se expone en el exterior de la membrana plasmática, lo cual permite la unión de esta con la Anexina V. Cuando hay células necróticas, la membrana celular es dañada, perdiendo su integridad, permitiendo la exposición de su ADN, el cual será intercalado por el PI indicando una muerte por necrosis. Por último, cuando hay exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática y daño parcial en la estructura de la misma, la tinción conjunta de Anexina V y PI, dará como señal la muerte por apoptosis tardía. El método hace uso de la citometría de flujo para diferenciar los tipos de muerte como apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis celular.

Los cuadrantes de detección de muerte celular por número de eventos encontrados, se dividen de la siguiente manera: Células Vivas (- , -), células en apoptosis temprana (+ , -), células en apoptosis tardía (+ , +), células en necrosis (- , +). De acuerdo con la siguiente **Figura 2**.

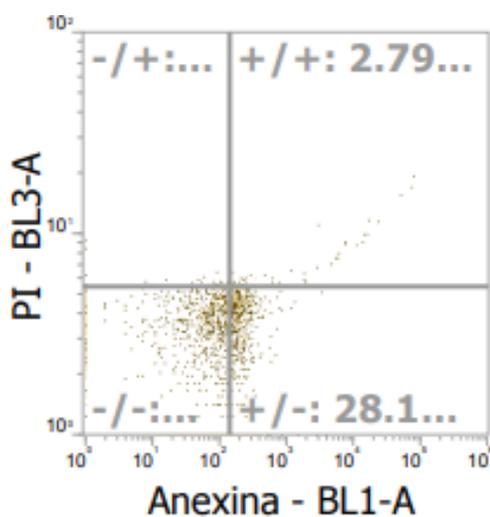


Figura 2. Ejemplo de cuadrantes para la identificación del tipo de muerte celular. Células vivas, cuadrante inferior izquierdo (- , -); Necrosis, cuadrante superior izquierdo (- , +); Apoptosis temprana, cuadrante inferior derecho (+ , -); Apoptosis tardía, cuadrante superior derecho (+ , +). Creada por el autor.

Se utilizó el Kit de Detección de muerte celular Annexin V-FITC Apoptosis (APOAF-20TST) de Sigma-Aldrich.

Preparación celular: El cultivo celular se realizó del mismo modo que en los ensayos de biocompatibilidad. Utilizando los resultados de la IC₅₀ obtenidos en los ensayos de reducción de MTT, como referencia en los volúmenes y su equivalencia en número de partículas de Au⁰, aproximados a utilizar en los diferentes tamaños y concentraciones. Como se indica a continuación:

Tabla 1. Volúmenes y su equivalencia en número de AuNCCs pequeños usados para el ensayo de tipo de muerte celular.

Concentración de Au ⁰ (mM)	Volumen de AuNCCs empleado (μL)	# AuNCCs equivalente
0.45 mM	4 μL	1.7 x 10 ¹⁵
2.25 mM	2 μL	4.3 x 10 ¹⁵
4.5 mM	1 μL	4.3 x 10 ¹⁵

Tabla 2. Volúmenes y su equivalencia en número de AuNCCs medianos usados para el ensayo de tipo de muerte celular.

Concentración de Au ⁰ (mM)	Volumen de AuNCCs empleado (μL)	# AuNCCs equivalente
0.45 mM	8 μL	8.6 x 10 ¹⁴
2.25 mM	4 μL	2.1 x 10 ¹⁵
4.5 mM	2 μL	2.1 x 10 ¹⁵

Tabla 3. Volúmenes y su equivalencia en número de AuNCCs grandes usados para el ensayo de tipo de muerte celular.

Concentración de Au ⁰ (mM)	Volumen de AuNCCs empleado (μL)	# AuNCCs equivalente
0.45 mM	9 μL	6.5 x 10 ¹⁴
2.25 mM	5 μL	1.8 x 10 ¹⁵
4.5 mM	4 μL	2.9 x 10 ¹⁵

Al término del período de incubación (48h), se obtuvo el sobrenadante de las células muertas con Tritón X-100 al 2%, para usarlo como control de muerte celular. Para los demás tratamientos, se realizaron dos lavados con 200 μL de PBS.

Se separaron las células con ayuda de tripsina, utilizando 100 μL por pozo e incubación por 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se trasvasaron a tubos de 1.5 mL, para ser centrifugados a 1500 r.p.m por 5

minutos, al terminar, se realizó un lavado con PBS, resuspendiendo el pellet celular, se centrifugó a 1500 r.p.m por 5 minutos y se decantó el sobrenadante.

Para cada reacción y repetición, se adicionaron a cada tubo 7 μ L de PI, 3 μ L de Anexina V y 490 μ L de Buffer de Unión, para obtener un volumen final de 500 μ L final. Por último, las células con el tratamiento anterior fueron incubadas por 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂, al término de este tiempo, se midió la fluorescencia y eventos de la unión de Anexina V y PI, usando láser azul a 488 nm en el citómetro de flujo Attune NxT, utilizando los canales BL1-para la detección de FITC y BL3-para detectar yoduro de propidio, PI.

2.4.5 Internalización de los AuNCCs en osteoblastos por citometría de flujo

Para corroborar si los AuNCCs de todos los tamaños y concentraciones se internalizaban en las células de osteoblastos, se hizo uso de la citometría de flujo, mediante los parámetros de complejidad celular SSC (Side Scatter por sus siglas en inglés). Este método de SSC, permite obtener la complejidad celular mediante cambios en su interior, por la incidencia del láser y su propagación en diferentes direcciones de la luz incidente, obteniendo así una información de complejidad celular interna, también conocida como granularidad.

Utilizando el mismo tratamiento del cultivo celular expuesto a los diferentes tamaños y concentraciones de AuNCCs, empleado para el ensayo de tipo de muerte celular, se realizó el parámetro de SSC en el citómetro de flujo, y así obtener su complejidad celular. Para su análisis, se seleccionaron las células vivas (Anexina V FITC – PI), para contrastar el cambio de complejidad celular en cada uno de los tamaños y concentraciones realizados.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización fisicoquímica de los AuNCCs

Se realizó la caracterización fisicoquímica de los AuNCCs por cuatro diferentes métodos: Espectroscopía Ultravioleta Visible (UV-Vis) para la medición de su LSPR, Potencial Zeta y Diámetro hidrodinámico mediante DLS (Dispersión de Luz Dinámica) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

3.1.1 Tamaño de partícula mediante TEM

Para obtener el tamaño promedio de las distintas muestras de los AuNCCs sintetizados, se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) con al menos 100 nanopartículas de AuNCCs por cada muestra, de las cuales se realizaron mediciones de sus aristas con ayuda del software ImageJ de licencia abierta. La figura 3 muestra micrografías representativas junto con su distribución de tamaños y su tamaño promedio a cada una de las tres muestras obtenidas. Obteniendo los resultados de AuNCCs pequeños con tamaño promedio de 22 nm con una D.E de ± 4 nm; AuNCCs medianos con un tamaño promedio de 35 nm con una D.E de ± 4 nm y AuNCCs grandes con un tamaño promedio de 40 nm con una D.E de ± 3 nm.

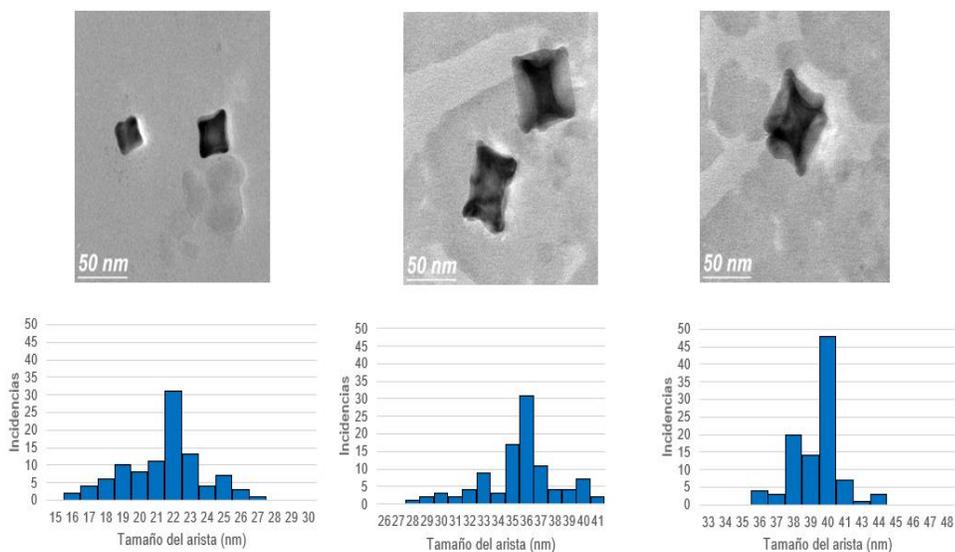


Figura 3. Micrografías TEM y sus correspondientes histogramas de incidencias de los AuNCCs y su comparación de tamaños. Con los siguientes tamaños promedio, de izquierda a derecha: Pequeños (22 ± 4 nm), Medianos (35 ± 4 nm) y Grandes (40 ± 3 nm).

3.1.2 LSPR de los AuNCCs monitoreado mediante UV-Vis

Se midió la resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR) de las tres muestras de AuNCCs después del proceso de tres lavados realizados para retirar cualquier remanente de los reactivos o subproductos formados (dispersiones a una concentración de 0.45 mM de Au⁰ y 100 mM de CTAC).

Se obtuvieron los picos correspondientes a los plasmones localizados en las siguientes longitudes de onda: pequeños (607 nm), medianos (660 nm) y grandes (705 nm) mostrados en la **Figura 4**. Se realizaron también mediciones cada 15 días durante 45 días después de su síntesis, para monitorear su estabilidad (**Figura 5**), obteniéndose los valores de 607 nm (15 días), 606 nm (30 días) y 605 nm (45 días) para los AuNCCs pequeños, para los AuNCCs medianos los valores obtenidos fueron de 657 nm (15 días), 654 nm (30 días) y 653 nm (45 días); para los AuNCCs grandes los valores obtenidos fueron de 700 nm (15 días), 699 nm (30 días) y 698 nm (45 días). Las condiciones de almacenado fueron: Temperatura ambiente y sin exposición directa a la luz.

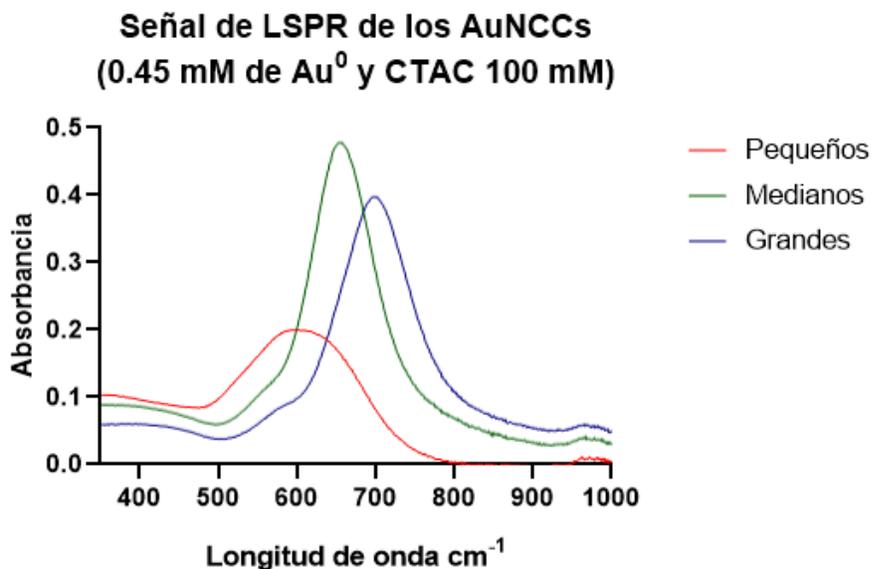


Figura 4. Comparación del LSPR de los AuNCCs sintetizados de diferentes tamaños. Rojo (Pequeños), Verde (Medianos) y Azul (Grandes).

Además, se midió su LSPR después de disminuir la concentración del surfactante CTAC a 0.1 mM (**Figura 6**) y al aumentar la concentración de AuNCCs (de 0.45 mM de Au⁰ a 2.25 mM o 4.5 mM de Au⁰) (**Figura 7**). Al disminuir la concentración de CTAC a 0.1 mM, se obtuvieron LSPRs en 608 nm para los AuNCCs

pequeños, para los AuNCCs medianos de 658 nm y 699 nm para los AuNCCs grandes. Al aumentar la concentración de AuNCCs con 0.1 mM de CTAC, se midieron LSPRs de los AuNCCs pequeños en 609 nm (2.25 mM de Au⁰) y en 608 nm (4.50 mM de Au⁰); para los AuNCCs medianos en 660 nm (2.25 mM de Au⁰) y en 650 nm (4.50 mM de Au⁰); para los AuNCCs grandes en 705 nm (2.25 mM de Au⁰) y en 703 nm (4.50 mM de Au⁰).

Monitoreo de la estabilidad de los AuNCCs cada 15 días por 45 días

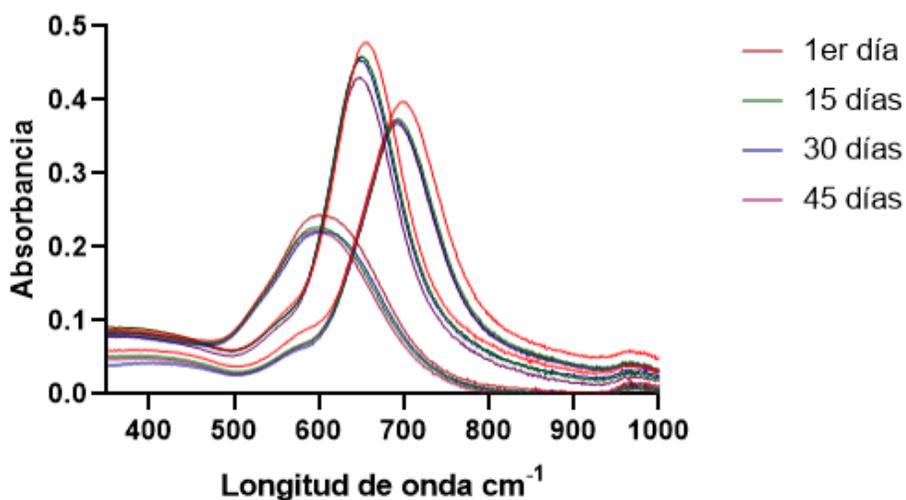


Figura 5. Estabilidad de los AuNCCs mediante su LSPR (0.45 mM de Au⁰ y 100 mM de CTAC). Mediciones cada 15 días por un lapso de 45 días. De izquierda a derecha: Pequeños, Medianos y Grandes. Rojo (1er día, recién sintetizadas), Verde (15 días), Azul (30 días) y Morado (45 días).

Comparación de la estabilidad de los AuNCCs al disminuir la concentración del surfactante de 100 mM a 0.1 mM

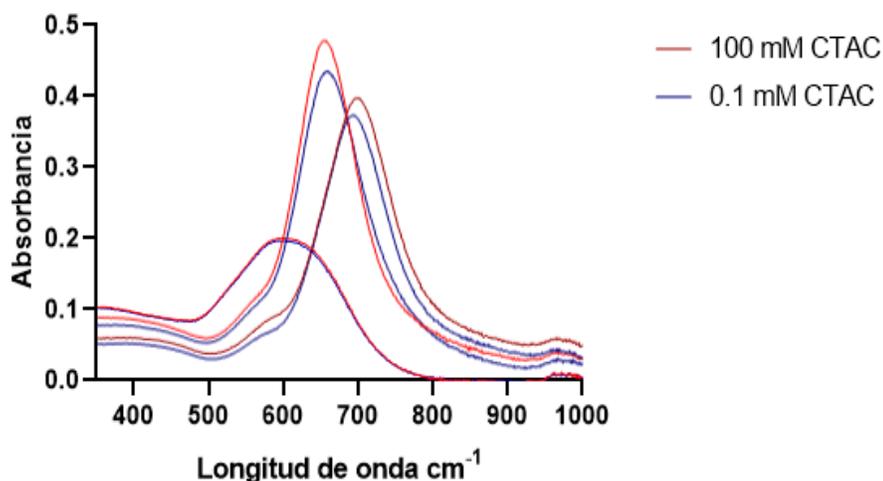


Figura 6. Monitoreo de la estabilidad de los AuNCCs mediante su LSPR. De izquierda a derecha: Pequeños, Medianos y Grandes. Rojo (100 mM CTAC) y Azul (0.1 mM CTAC).

Comparación de la estabilidad de los AuNCCs al aumentar la concentración de AuNCCs en 0.1 mM de CTAC

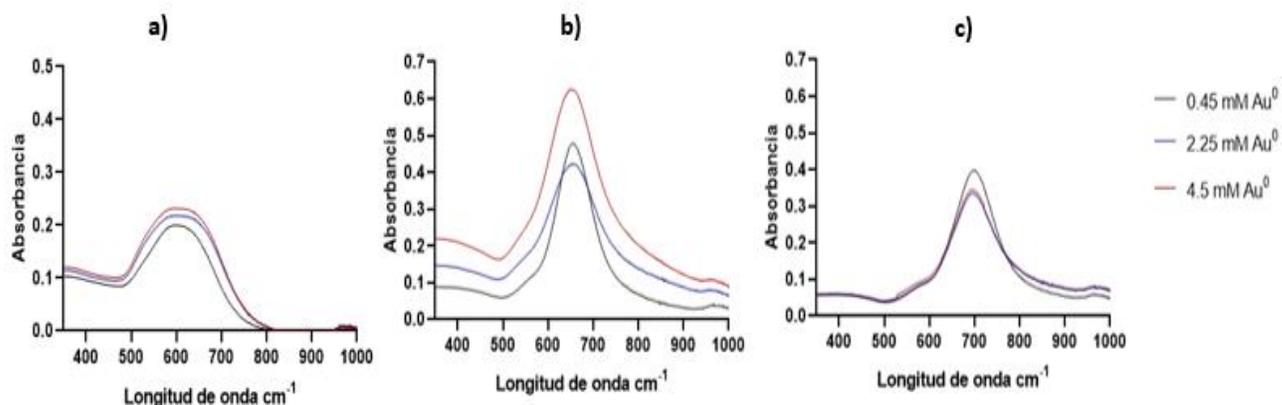


Figura 7. Monitoreo de la estabilidad mediante el LSPR de los AuNCCs al aumentar la concentración de AuNCCs. De izquierda a derecha: a) Pequeños, b) Medianos y c) Grandes.

3.1.3 Medición del Potencial Zeta mediante DLS

Se midió el potencial zeta de las dispersiones de AuNCCs de cada tamaño (0.45 mM de Au⁰ y 100 mM de CTAC) (**Tabla 4**), para conocer la carga superficial presente en los AuNCCs. Estas mediciones se realizaron para verificar la estabilidad coloidal de las muestras de diferentes tamaños de los AuNCCs cada 15 días durante 45 días (0.45 mM de Au⁰ y 100 mM de CTAC) (**Tabla 5**).

Tabla 4. Valores del Potencial Zeta en mV para las dispersiones de los distintos tamaños de AuNCCs (0.45 mM de Au⁰ y 100 mM de CTAC).

Tamaño	mV
Pequeños	+ 22.3±11.60
Medianos	+ 32.6±19.60
Grandes	+ 35.0±8.19

Tabla 5. Medición del Potencial Zeta en mV para las dispersiones coloidales con los distintos tamaños de AuNCCs durante 45 días (0.45 mM de Au⁰ y 100 mM de CTAC).

Tamaño	1er día (mV)	15 días (mV)	30 días (mV)	45 días (mV)
Pequeños	+ 22.3±11.60	+ 22.4±11.00	+ 22.2±10.50	+ 22.3±10.70
Medianos	+ 32.6±19.60	+ 30.7±15.40	+ 28.1±11.30	+28.3±13.40
Grandes	+ 35.0±8.19	+ 30. 5±9.53	+ 24.4±9.02	+25.1±9.36

Para verificar la estabilidad de las dispersiones coloidales con los diferentes tamaños de los AuNCCs al disminuir la concentración de CTAC de 100 mM a 0.1 mM (**Tabla 6**); y para verificar la estabilidad de los AuNCCs al aumentar su concentración de AuNCCs (**Tabla 7**).

Tabla 6. Medición del Potencial Zeta en mV para las dispersiones coloidales con los distintos tamaños de AuNCCs (0.45 mM de Au⁰).

Tamaño	100 mM CTAC (mV)	0.1 mM CTAC (mV)
Pequeños	+ 22.3±11.60	+ 20.1±13.10
Medianos	+ 32.6±19.60	+ 32.2±11.40
Grandes	+ 35.0±8.19	+ 26.4±8.73

Tabla 7. Medición del Potencial Zeta en mV para las dispersiones coloidales con los distintos tamaños de AuNCCs (0.1 mM de CTAC) con distintas concentraciones de AuNCCs.

Tamaño	0.45 mM Au ⁰ (mV)	2.25 mM Au ⁰ (mV)	4.5 mM Au ⁰ (mV)
Pequeños	+ 20.1±13.10	+ 44.8±16.00	+ 50.3±16.70
Medianos	+ 32.2±11.40	+ 17.9±7.00	+ 14.5±5.07
Grandes	+ 26.4±8.73	+ 24.3±9.82	+ 9.64±6.34

3.1.4 Medición del Diámetro Hidrodinámico mediante DLS

El diámetro hidrodinámico permite darnos una idea del tamaño promedio de las nanopartículas dispersas en los coloides, incluyendo la presencia de la micela de CTAC que rodea a estas. Vale la pena mencionar que los modelos utilizados por los equipos de dispersión de luz dinámica (DLS) asumen una morfología esférica de las partículas presentes en el coloide; debido a lo cual no se puede cuantificar con precisión el tamaño de las nanopartículas presentes en nuestras muestras mediante esta técnica. No obstante, esta técnica resulta de utilidad en el presente trabajo para monitorear cualitativamente la formación de agregados de nanopartículas en el coloide ante los distintos pasos de disminución de surfactante (CTAC) o aumento en la concentración de AuNCCs, lo cual se vería reflejado en aumentos del diámetro hidrodinámico del coloide. Se realizó el análisis del diámetro hidrodinámico de las dispersiones de AuNCCs originales (0.45 mM de Au⁰ y 100 mM de CTAC) como se muestran en la **Tabla 8**, esto para cada tamaño de AuNCCs sintetizados. Este parámetro es de utilidad para monitorear la estabilidad del coloide durante 45 días, como se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 8. Medición del Diámetro Hidrodinámico en d.nm para las dispersiones con los distintos tamaños de AuNCCs (0.45 mM de Au⁰ y 100 mM de CTAC).

Tamaño	Size (d.nm)
Pequeños	22.90±0.72
Medianos	66.16±13.91
Grandes	85.67±16.75

Tabla 9. Medición del Diámetro Hidrodinámico en d.nm para monitorear la estabilidad (formación de agregados) durante 45 días de las distintas dispersiones coloidales obtenidas (0.45 mM de Au⁰ y 100 mM de CTAC).

Tamaño	1er día (d.nm)	15 días (d.nm)	30 días (d.nm)	45 días (d.nm)
Pequeños	22.90±0.72	22.93±28.47	22.65±23.40	22.72±17.80
Medianos	66.16±13.91	66.29±36.60	66.42±32.80	66.38±39.40
Grandes	85.67±16.75	85.82±50.42	87.78±45.80	88.02±39.37

También se realizaron mediciones del diámetro hidrodinámico de los AuNCCs, al disminuir la concentración del surfactante (**Tabla 10**) y al aumentar la concentración de AuNCCs (**Tabla 11**). Estas mediciones fueron realizadas con las mismas muestras y diluciones empleadas para la medición del potencial Zeta.

Tabla 10. Medición del Diámetro Hidrodinámico en d.nm para monitorear la estabilidad (formación de agregados) de los distintos coloides al disminuir la concentración de CTAC de 100 mM a 0.1 mM.

Tamaño	100 mM CTAC - Size (d.nm)	0.1 mM CTAC - Size (d.nm)
Pequeños	22.90±0.72	23.31±0.26
Medianos	66.16±13.91	65.98±37.69
Grandes	85.67±16.75	85.41±35.37

Tabla 11. Medición del Diámetro Hidrodinámico en d.nm para monitorear la estabilidad (formación de agregados) en los distintos coloides (0.1 mM de CTAC) al aumentar la concentración de AuNCCs.

Tamaño	0.45 mM Au ⁰ – Size (d.nm)	2.25 mM Au ⁰ - Size (d.nm)	4.5 mM Au ⁰ – Size (d.nm)
Pequeños	23.31±0.26	14.60±0.29	12.52±0.31
Medianos	65.98±37.69	67.23±39.85	71.20±45.36
Grandes	85.41±35.37	94.66±48.00	99.89±47.41

3.2 Resultados de los ensayos de biocompatibilidad

Inicialmente fue necesario estimar la cantidad de nanopartículas (AuNCCs) presentes en las pruebas de biocompatibilidad. Los volúmenes de las dispersiones coloidales de AuNCCs utilizados fueron de 1-10 µL, con distintas concentraciones de AuNCCs (0.45, 2.25 y 4.5 mM de Au⁰).

Para ello fue usada la siguiente conversión:

Cantidad de nanopartículas (AuNCCs) =

$$\left[\left("X_1" \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) \left(\frac{1 \text{ L}}{10^6 \mu\text{L}} \right) \left("X_2" \mu\text{L} \right) \left(\frac{196.97 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \right) \left(\frac{1 \text{ cm}^3}{19.3 \text{ g}} \right) \right] / \left[\left("X_3" \text{ nm} \right)^3 \left(\frac{1 \text{ E}-21 \text{ cm}^3}{1 \text{ nm}^3} \right) \right] \quad (2)$$

Donde:

X_1 = Concentración de Au^0 (0.00045, 0.00225 o $0.0045 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$) presentes en los coloides con distinta concentración de AuNCCs

X_2 = Volumen usado de cada dispersión coloidal de AuNCCs (de 1 hasta 10 μL)

$196.97 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ es la masa molar del oro

$19.3 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ es la densidad del oro

X_3 = Arista promedio de los cubos (22, 35 y 40 nm) según su tamaño (pequeños, medianos o grandes)

Una vez realizadas las estimaciones, se obtuvo la siguiente tabla con la cantidad de AuNCCs presentes en cada volumen de muestra usada:

Tabla 12. Estimación de cantidad de partículas en cada volumen empleado (μL) de dispersión coloidal de AuNCCs pequeños.

Volumen empleado (μL)	# AuNCCs equivalente (coloide con 0.45 mM de Au^0)	# AuNCCs equivalente (coloide con 2.25 mM de Au^0)	# AuNCCs equivalente (coloide con 4.5 mM de Au^0)
1	4.3×10^{14}	2.2×10^{15}	4.3×10^{15}
2	8.6×10^{14}	4.3×10^{15}	8.6×10^{15}
3	1.3×10^{15}	6.5×10^{15}	1.3×10^{16}
4	1.7×10^{15}	8.6×10^{15}	1.7×10^{16}
5	2.2×10^{15}	1.1×10^{16}	2.2×10^{16}
6	2.6×10^{15}	1.3×10^{16}	2.6×10^{16}
7	3.0×10^{15}	1.5×10^{16}	3.1×10^{16}
8	3.5×10^{15}	1.7×10^{16}	3.5×10^{16}
9	3.8×10^{15}	1.9×10^{16}	3.9×10^{16}
10	4.3×10^{15}	2.2×10^{16}	4.3×10^{16}

Tabla 13. Estimación de cantidad de partículas en cada volumen empleado (μL) de dispersión coloidal de AuNCCs medianos.

Volumen empleado (μL)	# AuNCCs equivalente (coloide con 0.45 mM de Au^0)	# AuNCCs equivalente (coloide con 2.25 mM de Au^0)	# AuNCCs equivalente (coloide con 4.5 mM de Au^0)
1	1.1×10^{14}	5.4×10^{14}	1.1×10^{15}
2	2.1×10^{14}	1.0×10^{15}	2.1×10^{15}
3	3.2×10^{14}	1.6×10^{15}	3.2×10^{15}
4	4.3×10^{14}	2.1×10^{15}	4.3×10^{15}
5	5.3×10^{14}	2.7×10^{15}	5.4×10^{15}
6	6.4×10^{14}	3.2×10^{15}	6.4×10^{15}
7	7.5×10^{14}	3.7×10^{15}	7.5×10^{15}
8	8.6×10^{14}	4.3×10^{15}	8.6×10^{15}
9	9.7×10^{14}	4.8×10^{15}	9.6×10^{15}
10	1.1×10^{15}	5.4×10^{15}	1.1×10^{16}

Tabla 14. Estimación de cantidad de partículas en cada volumen empleado (μL) de dispersión coloidal de AuNCCs grandes.

Volumen empleado (μL)	# AuNCCs equivalente (coloide con 0.45 mM de Au^0)	# AuNCCs equivalente (coloide con 2.25 mM de Au^0)	# AuNCCs equivalente (coloide con 4.5 mM de Au^0)
1	7.2×10^{13}	3.4×10^{14}	7.2×10^{14}
2	1.4×10^{14}	7.2×10^{14}	1.4×10^{15}
3	2.2×10^{14}	1.1×10^{15}	2.2×10^{15}
4	2.9×10^{14}	1.4×10^{15}	2.9×10^{15}
5	3.6×10^{14}	1.8×10^{15}	3.6×10^{15}
6	4.3×10^{14}	2.2×10^{15}	4.3×10^{15}
7	5.0×10^{14}	2.5×10^{15}	5.0×10^{15}
8	5.7×10^{14}	2.9×10^{15}	5.7×10^{15}
9	6.5×10^{14}	3.2×10^{15}	6.5×10^{15}
10	7.2×10^{14}	3.6×10^{15}	7.2×10^{16}

Como se observa en las **Tablas 12, 13 y 14**, la cantidad de partículas por aumenta con relación al tamaño de los AuNCCs, al tener tamaños menores resulta necesaria una mayor cantidad de partículas para consumir una misma cantidad de oro presente.

Por conveniencia, en el eje "x" de las gráficas se manejará el volumen (μL) utilizado, aunque puede utilizarse la equivalencia adecuada consultándose las **Tablas 12, 13 y 14**.

3.2.1 Viabilidad celular de los osteoblastos murinos MC3T3-E1 expuestos a diferentes cantidades y tamaños de los AuNCCs, mediante la reducción de MTT

En la evaluación de la viabilidad celular por el método de reducción del reactivo MTT, se observó y cuantificó el porcentaje de la actividad metabólica de la enzima celular succinato deshidrogenasa mitocondrial (Tolosa, *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que una mayor reducción indica mayor actividad metabólica, por lo tanto, una mayor viabilidad.

El primer experimento de biocompatibilidad en la línea celular de osteoblastos murinos MC3T3-E1, fue la evaluación de la toxicidad de los AuNCCs medianos, para poder comparar el método tradicional y alternativo (ver sección 2.4.1) de exposición de los cubos a las células, y así tener un referente de si existe una diferencia para poder decidir el método a utilizar en los siguientes experimentos de viabilidad.

El análisis estadístico realizado fue análisis de varianza por un factor, teniendo en cuenta un alfa de 0.05, donde si $p > 0.05$ no hay diferencia significativa y sí $p < 0.05$ hay diferencia significativa.

En la **Figura 8**, al comparar la toxicidad de los AuNCCs medianos (0.45 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC), por el método alternativo contra el tradicional, se observa que los intervalos de IC₅₀ para cada método son muy similares, siendo de aproximadamente 8.6×10^{14} partículas de cubos medianos de oro para el método alternativo y 7.5×10^{14} partículas de oro de cubos medianos para el método tradicional, con análisis estadístico ajustado de 0.9728 y 0.9496 respectivamente, encontrando además que no hay diferencia significativa entre estos métodos ya que $p > 0.05$.

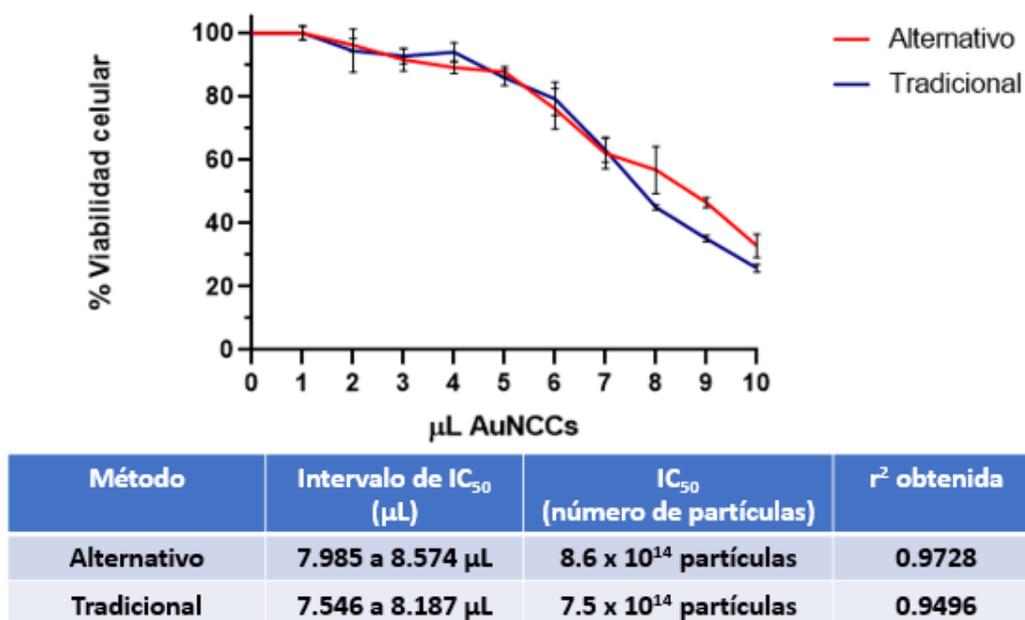
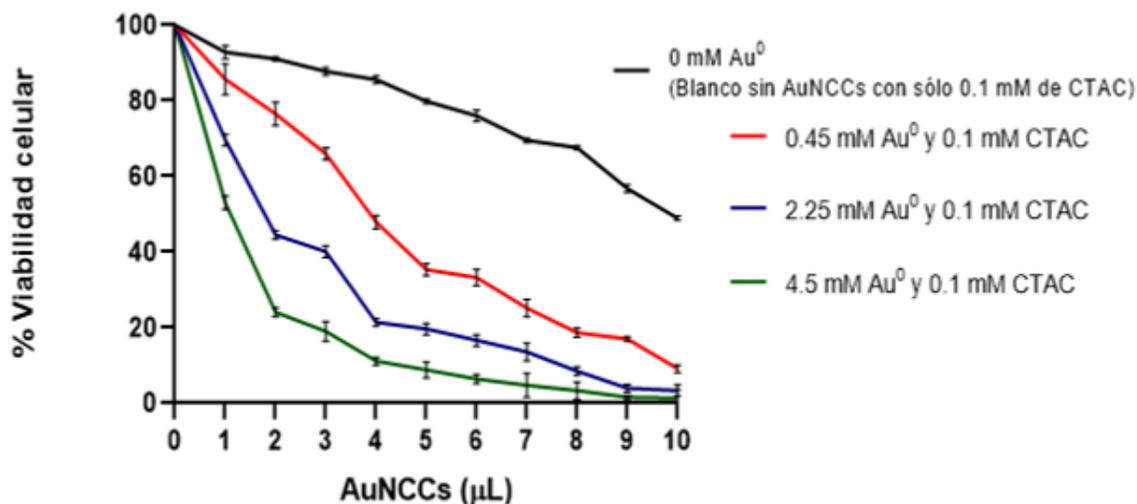


Figura 8. Comparación de la toxicidad de los AuNCCs medianos con 0.45 mM de Au⁰ mediante los métodos Alternativo y Tradicional. Alternativo (Rojo) y Tradicional (Negro). Cada punto indica el valor promedio \pm DE de un triplicado. ($p > 0.05$), indica que no hay diferencia significativa entre los distintos métodos.

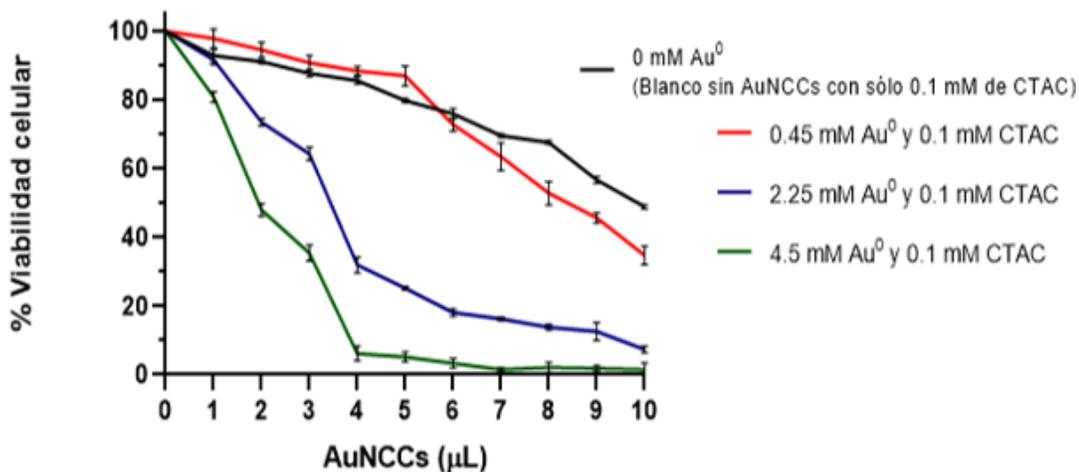


[mM] Au ⁰	Intervalo de IC ₅₀ (μL)	IC ₅₀ (número de partículas)	r ² obtenida
0 mM	10.22 a 11.77 μL	No aplica	0.9435
0.45 mM	3.663 a 4.010 μL	1.7 x 10 ¹⁵ partículas	0.9774
2.25 mM	1.718 a 1.986 μL	4.3 x 10 ¹⁵ partículas	0.9669
4.5 mM	1.004 a 1.130 μL	4.3 x 10 ¹⁵ partículas	0.9789

Figura 9. Comparación de la toxicidad de los AuNCCs pequeños con diferentes concentraciones de AuNCCs y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo. 0 mM Au⁰ (Negro), 0.45 mM Au⁰ (Rojo), 2.25 mM Au⁰ (Azul) y 4.5 mM Au⁰ (Verde). Cada punto indica el valor promedio ±DE de un triplicado. ($p < 0.05$), indica que hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones de AuNCCs.

Como se observa en la **Figura 9**, cuando se comparan las distintas concentraciones de AuNCCs pequeños, se encontró que, a mayor concentración de dispersión coloidal, existe mayor toxicidad, pues el porcentaje de viabilidad celular disminuye. Encontrando que la IC₅₀ correspondiente para cada caso en número de partículas fue de 1.7×10^{15} partículas para la concentración de 0.45 mM de Au⁰ y 4.3×10^{15} partículas para las concentraciones de 2.25 mM y 4.5 mM de Au⁰. En el último caso se toma en cuenta que la conversión volumen en μL a cantidad de partículas es diferente como puede ser consultada en la **Tabla 12**. Mencionando que existe diferencia significativa entre la IC₅₀ de las distintas muestras, pues se obtuvo un valor de $p < 0.05$.

Este experimento nos permite excluir el efecto por la presencia de CTAC, observándose la toxicidad debido a los AuNCCs.

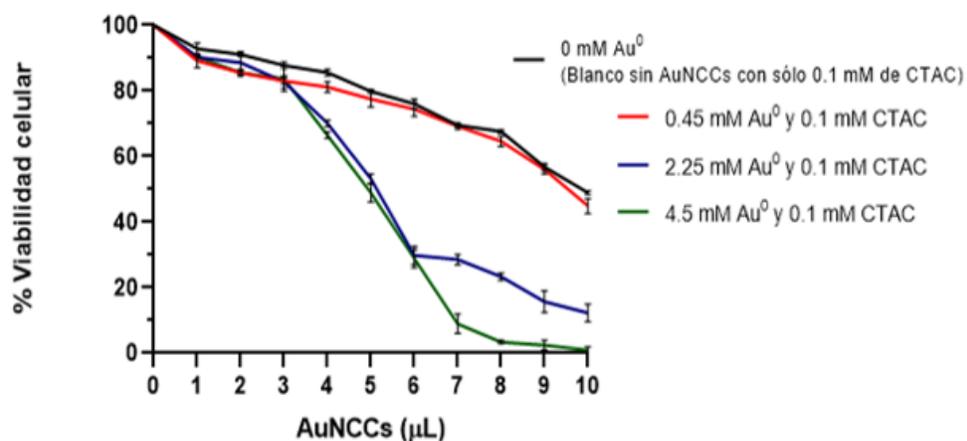


[mM] Au ⁰	Intervalo de IC ₅₀ (μL)	IC ₅₀ (número de partículas)	r ² obtenida
0 mM	10.22 a 11.77 μL	No aplica	0.9435
0.45 mM	8.130 a 8.657 μL	8.6 x 10 ¹⁴ partículas	0.9670
2.25 mM	3.123 a 3.448 μL	1.6 x 10 ¹⁵ partículas	0.9770
4.5 mM	1.827 a 2.081 μL	2.1 x 10 ¹⁵ partículas	0.9680

Figura 10. Comparación de la toxicidad de los AuNCCs medianos con diferentes concentraciones de AuNCCs y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo. 0 mM Au⁰ (Negro), 0.45 mM Au⁰ (Rojo), 2.25 mM Au⁰ (Azul) y 4.5 mM Au⁰ (Verde). Cada punto indica el valor promedio ±DE de un triplicado. ($p < 0.05$), indica que hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones de AuNCCs.

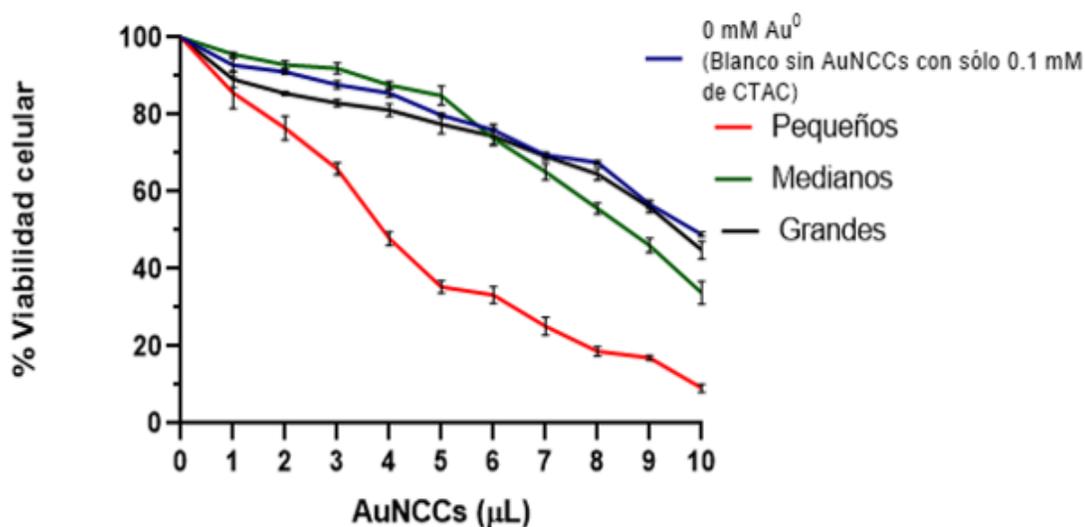
En la **Figura 10** se comparan las distintas cantidades de AuNCCs provenientes de coloides con distintas concentraciones de AuNCCs medianos. Se encuentra que a mayor concentración y volumen de dispersión coloidal de AuNCCs, existe una mayor toxicidad, los valores encontrados en número de partículas fueron de 8.6×10^{14} cubos para 0.45 mM de Au⁰, 1.6×10^{15} cubos para 2.25 mM de Au⁰ y 2.1×10^{15} cubos de oro para 4.5 mM de Au⁰. Entre las IC₅₀ encontradas, se obtuvo un valor de $p < 0.05$, indicando que existe diferencia significativa.

La **Figura 11** representa la viabilidad celular y su comportamiento con la exposición de los AuNCCs grandes, se observa que la muestra con concentración de 0.45 mM de Au⁰, tienen un comportamiento muy similar al blanco de CTAC 0.1 mM sin AuNCCs usado, teniendo una IC₅₀ de 7.2×10^{14} partículas, para el caso de la dispersión coloidal de AuNCCs con Au⁰ 2.25 mM se obtuvo el valor de IC₅₀ de 1.8×10^{15} partículas y para 4.5 mM de Au⁰ de 2.9×10^{15} partículas. Entre las tres concentraciones de Au⁰ existe diferencia significativa, con un valor obtenido de $p < 0.05$. Encontrando nuevamente que, a mayor volumen y concentración de dispersión coloidal de los AuNCCs, existe mayor toxicidad celular.



[mM] Au ⁰	Intervalo de IC ₅₀ (μL)	IC ₅₀ (número de partículas)	r ² obtenida
0 mM	10.22 a 11.77 μL	No aplica	0.9435
0.45 mM	9.936 a 12.840 μL	7.2 x 10 ¹⁴ partículas	0.9640
2.25 mM	4.851 a 5.243 μL	1.8 x 10 ¹⁵ partículas	0.9743
4.5 mM	4.485 a 4.890 μL	2.9 x 10 ¹⁵ partículas	0.9677

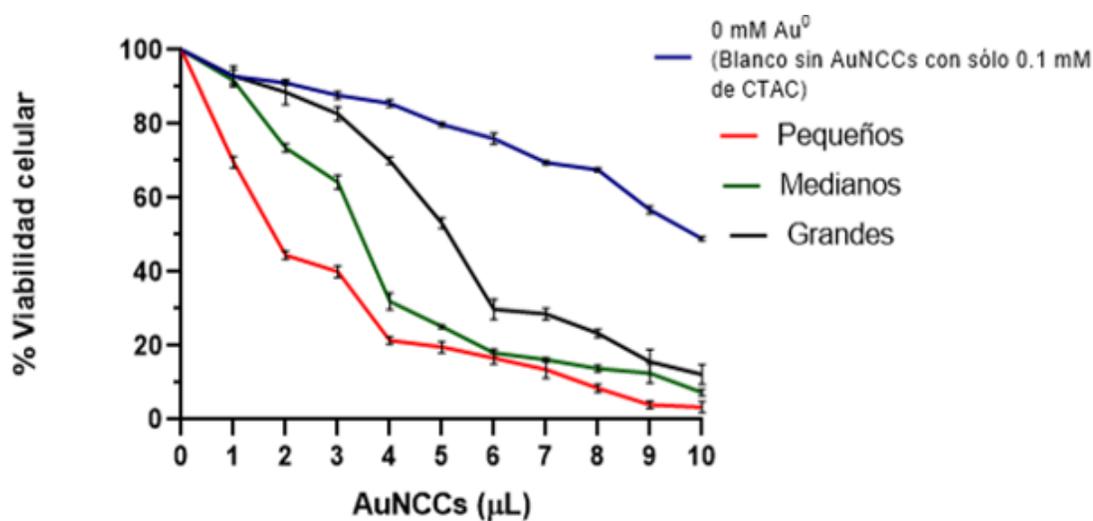
Figura 11. Comparación de la toxicidad de los AuNCCs grandes con diferentes concentraciones de AuNCCs y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo. 0 mM Au⁰ (Negro), 0.45 mM Au⁰ (Rojo), 2.25 mM Au⁰ (Azul) y 4.5 mM Au⁰ (Verde). Cada punto indica el valor promedio ±DE de un triplicado. (p<0.05), indica que hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones de AuNCCs.



Tamaño	Intervalo de IC ₅₀ (μL)	IC ₅₀ (número de partículas)	r ² obtenida
Pequeños	3.663 a 4.010 μL	1.7 x 10 ¹⁵ partículas	0.9774
Medianos	8.130 a 8.657 μL	8.6 x 10 ¹⁴ partículas	0.9670
Grandes	9.936 a 12.840 μL	7.2 x 10 ¹⁴ partículas	0.9696

Figura 12. Comparación de la toxicidad de los coloides de los diferentes tamaños de AuNCCs con concentración de Au⁰ 0.45 mM, mediante el método alternativo. Blanco (Azul), Pequeños (Rojo), Medianos (Verde) y Grandes (Negro). Cada punto indica el valor promedio ±DE de un triplicado. (p<0.05), indica que hay diferencia significativa entre los distintos tamaños de cubos.

La **Figura 12** representa la comparación de la IC_{50} obtenida de los diferentes tamaños de los AuNCCs a una concentración de Au^0 de 0.45 mM, observando los siguientes valores: para los cubos pequeños un número de partículas de 1.7×10^{15} partículas, para los medianos de 8.6×10^{14} partículas y en los grandes de 7.2×10^{14} partículas. Estos valores y su conversión a cantidad de volumen en μL de acuerdo con las **Tablas 12, 13 y 14**, muestran que para los AuNCCs pequeños, se necesita una menor cantidad de volumen del coloide de estos, en relación con los medianos y estos a su vez que los grandes. Esto nos indica que ante un mismo volumen (μL) de coloide de los cubos pequeños es más tóxico, seguido por el coloide de los medianos y por último el de los grandes. Observando que estos dos últimos, tienen una tendencia aproximadamente similar al blanco. Encontrando que existe diferencia significativa entre los tres tamaños, con un valor de $p < 0.05$.

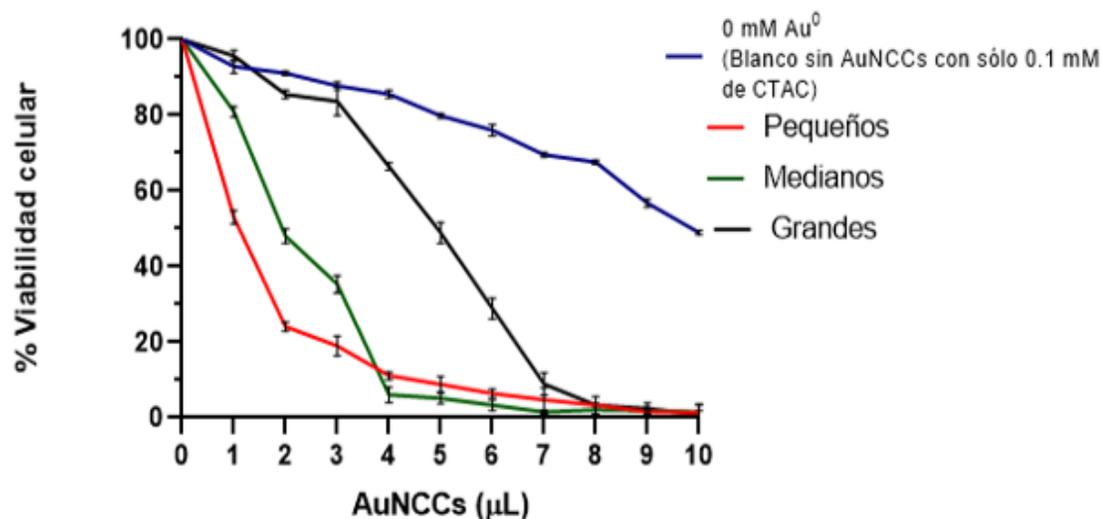


Tamaño	Intervalo de IC_{50} (μL)	IC_{50} (número de partículas)	r^2 obtenida
Pequeños	1.718 a 1.986 μL	4.3×10^{15} partículas	0.9669
Medianos	3.123 a 3.448 μL	2.1×10^{15} partículas	0.9770
Grandes	4.871 a 5.230 μL	2.9×10^{15} partículas	0.9788

Figura 13. Comparación de la toxicidad de los coloides de los diferentes tamaños de AuNCCs con concentración de Au^0 2.25 mM, mediante el método alternativo. Blanco (Azul), Pequeños (Rojo), Medianos (Verde) y Grandes (Negro). Cada punto indica el valor promedio \pm DE de un triplicado. ($p < 0.05$), indica que hay diferencia significativa entre los distintos tamaños de cubos.

En la **Figura 13** se compara la toxicidad de los coloides con AuNCCs de tamaños diferentes con concentración 2.25 mM de Au^0 y sus IC_{50} obtenida cuando los osteoblastos fueron expuestos a estos. También se menciona el número de partículas correspondientes a cada una. Comparando nuevamente que en una misma cantidad de volumen en μL de coloide a menor tamaño de AuNCCs hay mayor toxicidad.

Cabe recordar que el Au^0 también influye directamente en este efecto. Con un valor de $p < 0.05$, existe diferencia significativa entre los coloides con distintos tamaños de AuNCCs.



Tamaño	Intervalo de IC_{50} (μL)	IC_{50} (número de partículas)	r^2 obtenida
Pequeños	1.004 a 1.130 μL	4.3×10^{15} partículas	0.9669
Medianos	1.827 a 2.081 μL	1.6×10^{15} partículas	0.9770
Grandes	4.505 a 4.872 μL	1.8×10^{15} partículas	0.9788

Figura 14. Comparación de la toxicidad de los diferentes coloides con AuNCCs de distintos tamaños de AuNCCs con concentración de Au^0 4.5 mM, mediante el método alternativo. Blanco (Azul), Pequeños (Rojo), Medianos (Verde) y Grandes (Negro). Cada punto indica el valor promedio \pm DE de un triplicado. ($p < 0.05$), indica que hay diferencia significativa entre los distintos tamaños de cubos.

La última comparación de los coloides con AuNCCs de distintos tamaños fue con las IC_{50} obtenidas en la concentración 4.5 mM de Au^0 . En la **Figura 14** se puede observar la tendencia en la gráfica que con poco volumen en μL de coloide de esta concentración, disminuye más rápido la viabilidad celular. Para los tres casos sigue existiendo diferencia significativa con un valor de $p < 0.05$. Los resultados expresados en número de partículas por para las IC_{50} de los AuNCCs en coloides con concentración 4.5 mM fueron de 4.3×10^{15} partículas para cubos pequeños, 1.6×10^{15} partículas en cubos medianos y 1.8×10^{15} partículas en cubos grandes.

3.2.2 Cambios morfológicos de los osteoblastos murinos MC3T3-E1 expuestos a diferentes concentraciones y tamaños de los AuNCCs

La evaluación de los cambios morfológicos celulares causados por la exposición a los diferentes tamaños y concentraciones de los AuNCCs, se muestran en este apartado. Estas modificaciones fueron registradas a las 48 horas de exposición a los AuNCCs, donde las imágenes control son células de osteoblastos sin tratamiento con cubos. La **Figura 15** corresponde a las células expuestas con los nanocubos pequeños y sus diferentes concentraciones, la **Figura 16** a las células expuestas a los cubos medianos y sus diferentes concentraciones, y la **Figura 17** a los AuNCCs grandes con sus distintas concentraciones de Au⁰.

Los mayores cambios se dan ante la exposición a los cubos menores y a volúmenes de coloide pequeños, confirmando lo obtenido en relación con los tamaños y concentraciones en la viabilidad celular. Los cambios producidos en relación con las células control, es una disminución proporcional en su tamaño al ser expuestas a mayor cantidad de AuNCCs; su forma alargada cambia a una forma semi-circular, y cuando se presenta la IC₅₀ y posterior, comienzan a aparecer gránulos de color oscuro en ellas y su membrana comienza a presentar deformidades

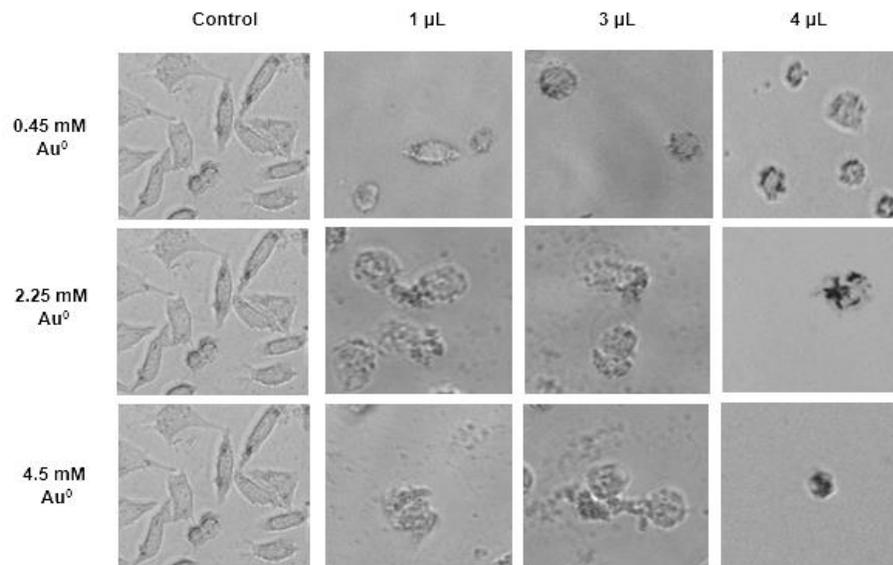


Figura 15. Cambios morfológicos de los osteoblastos por exposición a los AuNCCs pequeños por un lapso de 48 horas y su comparación contra las células control sin ningún tratamiento. Las células control fueron las mismas para los tres tratamientos.

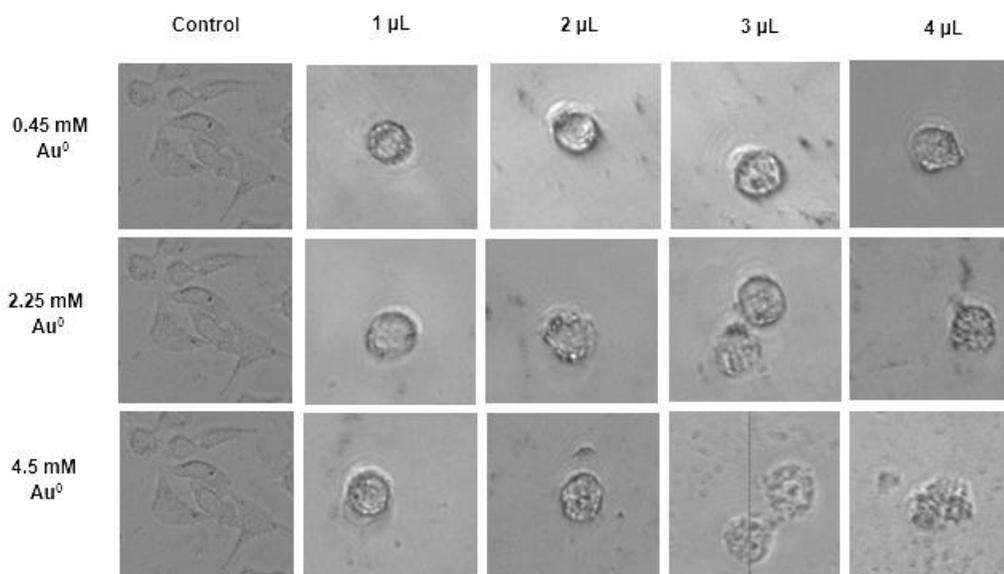


Figura 16. Cambios morfológicos de los osteoblastos por exposición a los AuNCCs medianos por un lapso de 48 horas y su comparación contra las células control sin ningún tratamiento. Las células control fueron las mismas para los tres tratamientos.

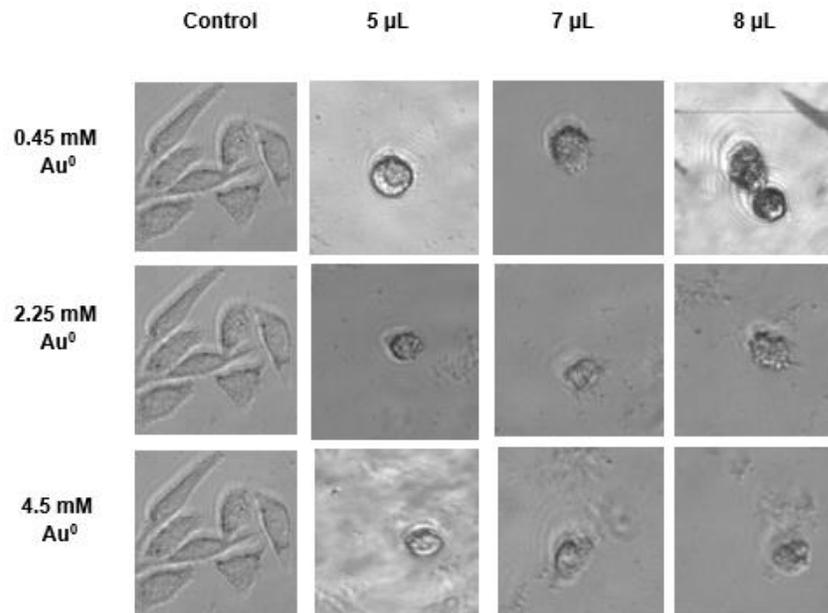


Figura 17. Cambios morfológicos de los osteoblastos por exposición a los AuNCCs grandes por un lapso de 48 horas y su comparación contra las células control sin ningún tratamiento. Las células control fueron las mismas para los tres tratamientos.

3.2.3 Ensayo fluorimétrico para la medición de la producción de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) mediante la reducción del reactivo diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA)

La producción de ROS producidas por los osteoblastos al estar en exposición por 48 horas con los distintos AuNCCs, fue analizado por la reducción del reactivo H₂DCFDA a DCF. Los resultados mostrados a continuación muestran la producción de radicales hidroxilos, peróxilos y sus derivados, debido a la gran actividad de las enzimas esterasas presentes del sistema antioxidante por el estrés oxidativo. Para los ensayos, se tomó el control negativo de células sin AuNCCs de cada muestra, como referencia para cálculos de fluorescencia. Los ensayos fueron realizados con los diferentes tamaños de AuNCCs y las respectivas concentraciones de AuNCCs (0.45, 2.25 y 4.5 mM de Au⁰). Obteniendo así dos tipos de gráficas, el porcentaje de ROS producido y el porcentaje de ROS producido relativo a la viabilidad celular (obtenido al dividir el porcentaje producido de ROS y el porcentaje de viabilidad obtenido por MTT). Se observa que a mayor concentración de Au⁰ y menor tamaño de nanocubos, la producción de ROS va incrementando. Una tendencia similar ocurre al aumentar el volumen utilizado de coloide con AuNCCs en la exposición celular. El análisis estadístico realizado fue análisis de varianza por un factor, teniendo en cuenta un alfa de 0.05, donde si $p > 0.05$ no hay diferencia significativa y sí $p < 0.05$ hay diferencia significativa.

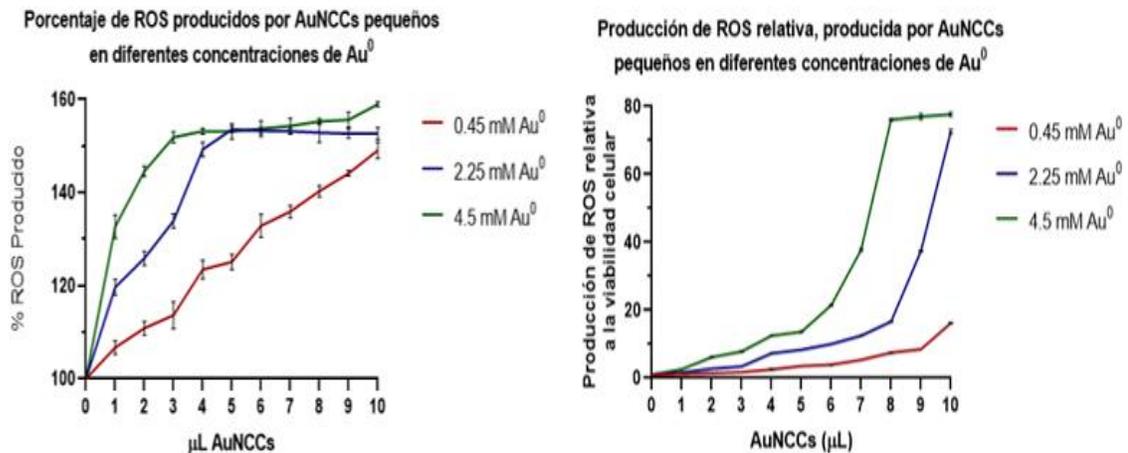


Figura 18. A la izquierda porcentaje de ROS y a la derecha producción de ROS relativa, por la exposición a los AuNCCs pequeños con diferentes concentraciones de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo. 0.45 mM Au⁰ (Rojo), 2.25 mM Au⁰ (Azul) y 4.5 mM Au⁰ (Verde). Cada punto indica el valor promedio \pm DE de un triplicado. ($p < 0.05$), indica que hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones de Au⁰.

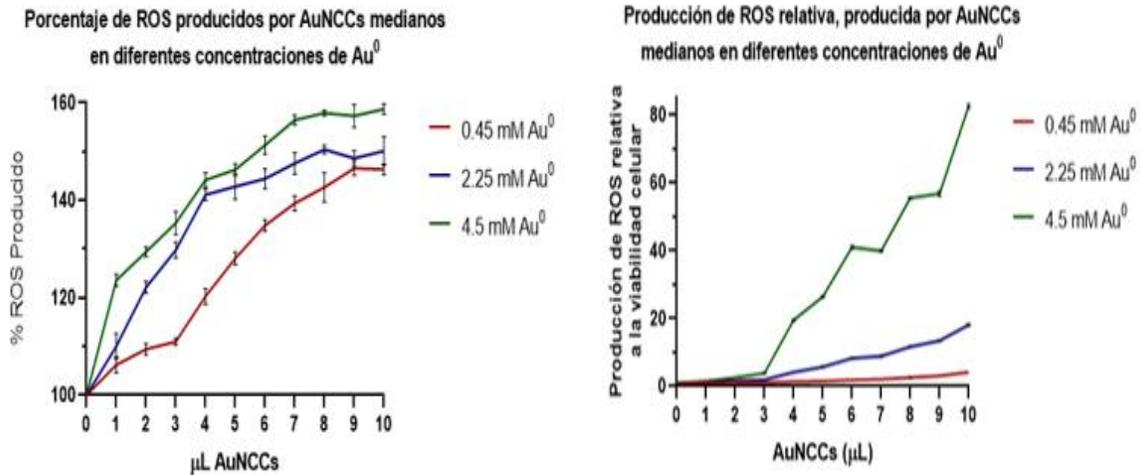


Figura 19. A la izquierda porcentaje de ROS y a la derecha producción de ROS relativa, por la exposición a los AuNCCs medianos con diferentes concentraciones de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo. 0.45 mM Au⁰ (Rojo), 2.25 mM Au⁰ (Azul) y 4.5 mM Au⁰ (Verde). Cada punto indica el valor promedio \pm DE de un triplicado. ($p < 0.05$), indica que hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones de Au⁰.

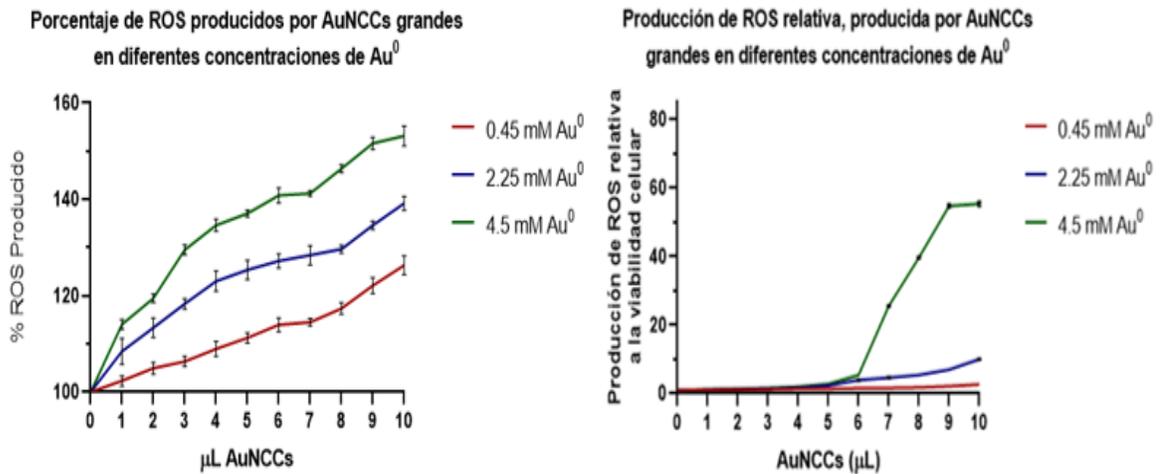


Figura 20. A la izquierda porcentaje de ROS y a la derecha producción de ROS relativa, por la exposición a los AuNCCs grandes con diferentes concentraciones de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo. 0.45 mM Au⁰ (Rojo), 2.25 mM Au⁰ (Azul) y 4.5 mM Au⁰ (Verde). Cada punto indica el valor promedio \pm DE de un triplicado. ($p < 0.05$), indica que hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones de Au⁰.

El incremento en la producción de ROS es evidente entre mayor concentración de AuNCCs sea empleada en la exposición a los osteoblastos, como queda plasmado en las **Figuras 18, 19 y 20**. Un mayor volumen

de coloide utilizado aumenta este incremento también. La tendencia de las gráficas sufre una pendiente más prolongada con los cubos pequeños (**Figura 18**), seguida de los medianos (**Figura 19**) y por último de los grandes (**Figura 20**). Resultando la toxicidad de la siguiente manera: Pequeños > Medianos > Grandes. Este comportamiento y su relación con la viabilidad celular se muestra en la parte de producción de ROS relativa a la viabilidad celular. Se obtuvo un valor de $p < 0.05$, indicando que hay diferencia significativa en las ROS producidas por el incremento de concentración de AuNCCs, así como en la comparación de los tamaños con una misma concentración de oro.

3.2.4 Ensayo de hemocompatibilidad de los AuNCCs en sus distintos tamaños y concentraciones

El ensayo de hemólisis mide la hemoglobina liberada en el medio debido a la lisis o ruptura de los eritrocitos, provocada por el daño a su membrana plasmática, debido al biomaterial con el que tuvo contacto, en este caso con los distintos AuNCCs. La cuantificación y normalización de la hemoglobina liberada, se realizó en relación con el control positivo de hemólisis con el Tritón x-100 al 20%.

La absorbancia máxima de la hemoglobina está dada en la longitud de onda de $\lambda = 541$ nm, sin embargo, a esta misma longitud de onda se encuentran señales de absorbancia de los AuNCCs; por lo tanto, la medición se realizó evitándose los picos correspondientes al LSPR de $\lambda = 450$ nm, ya que a esta longitud de onda se encuentran señales de hemoglobina libre, además de mínimos de los AuNCCs. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 21** (AuNCCs pequeños), **Figura 22** (AuNCCs medianos) y **Figura 23** (AuNCCs grandes), donde se observa que el porcentaje de hemólisis de la mayoría de los AuNCCs se encuentra por arriba del 5% máximo permitido por la ISO 10993-4:2017.

Las muestras hemocompatibles fueron los AuNCCs medianos con una concentración de 0.45 mM de Au⁰, 0.1 mM de CTAC y un volumen de 1 μ L; así como los AuNCCs grandes a 0.45 mM de Au⁰, 0.1 mM de CTAC y volúmenes de 1 y 2 μ L, como lo indica la línea punteada marcada con color rojo (5% de hemólisis).

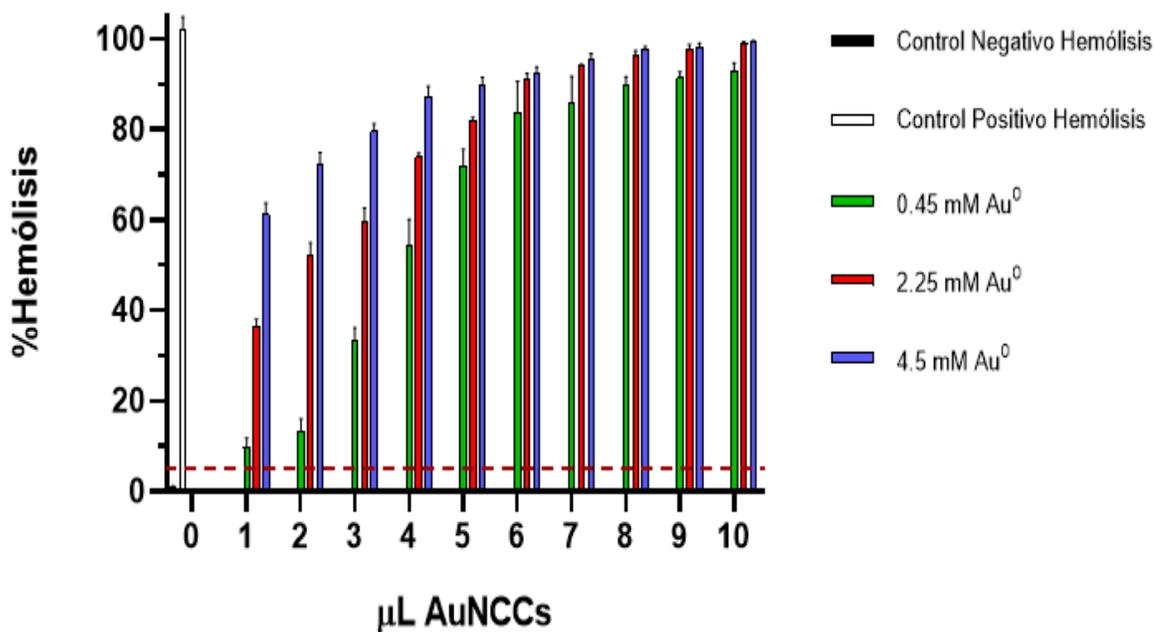


Figura 21. Porcentaje de hemólisis producida por la exposición a los AuNCCs pequeños con diferentes concentraciones de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC. Control Negativo (Rojo), Control Positivo Tritón X-100 20% (Azul), 0.45 mM Au⁰ (Verde), 2.25 mM Au⁰ (Gris) y 4.5 mM Au⁰ (Morado). Cada barra indica el valor promedio \pm DE de un triplicado.

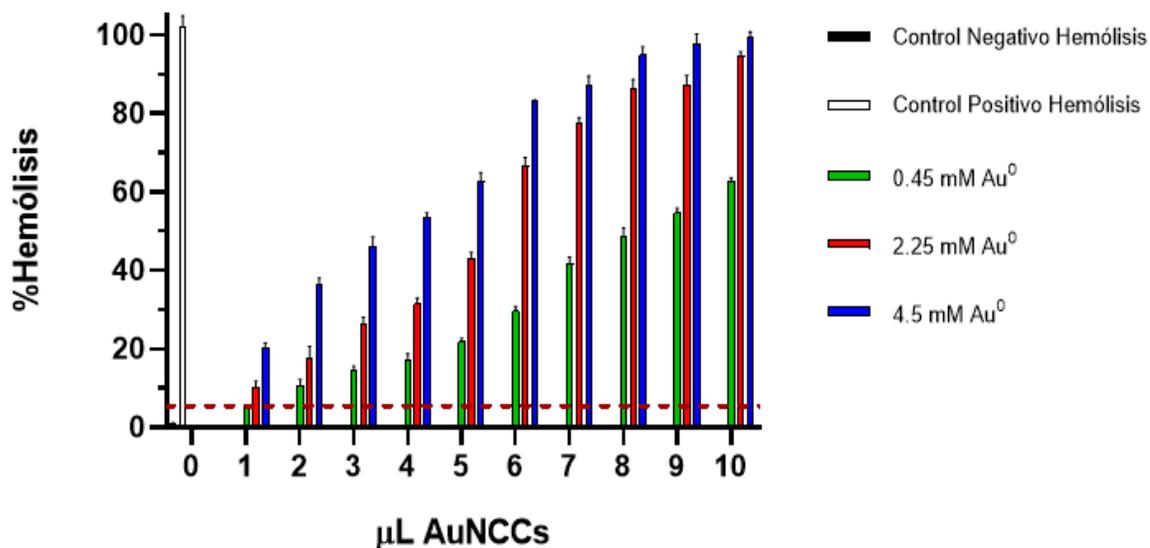


Figura 22. Porcentaje de hemólisis producida por la exposición a los AuNCCs medianos con diferentes concentraciones de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC. Control Negativo (Rojo), Control Positivo Tritón X-100 20% (Azul), 0.45 mM Au⁰ (Verde), 2.25 mM Au⁰ (Gris) y 4.5 mM Au⁰ (Morado). Cada barra indica el valor promedio \pm DE de un triplicado.

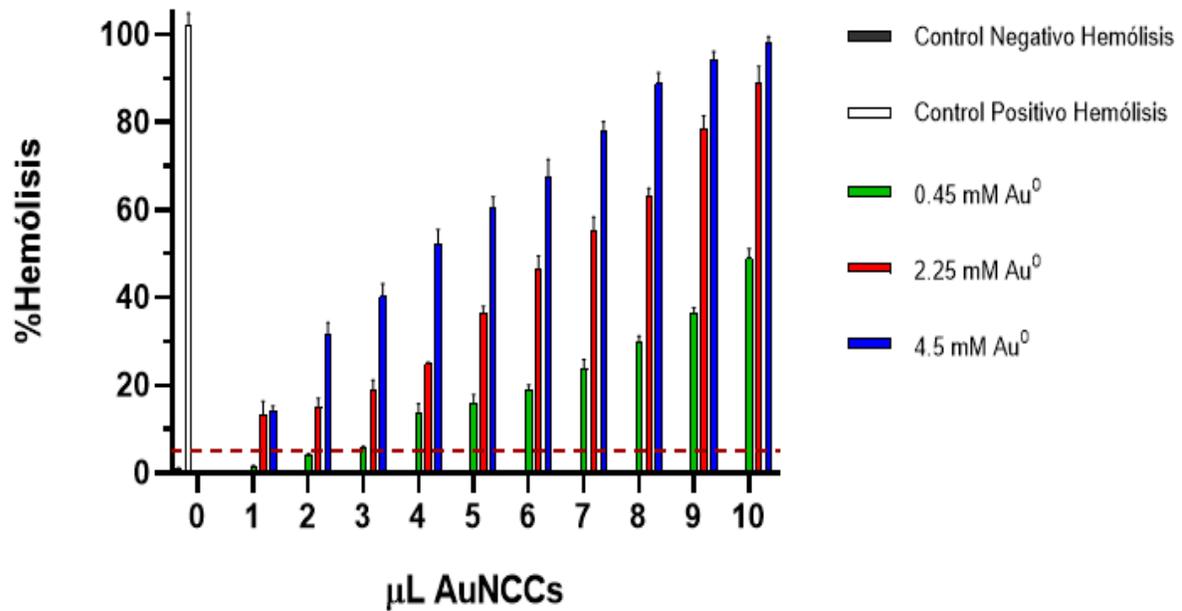


Figura 23. Porcentaje de hemólisis producida por la exposición a los AuNCCs grandes con diferentes concentraciones de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC. Control Negativo (Rojo), Control Positivo Tritón X-100 20% (Azul), 0.45 mM Au⁰ (Verde), 2.25 mM Au⁰ (Gris) y 4.5 mM Au⁰ (Morado). Cada barra indica el valor promedio \pm DE de un triplicado.

3.2.5 Evaluación del tipo de muerte celular en osteoblastos expuestos a los AuNCCs

La muerte celular es un proceso en el cual todas las funciones celulares son detenidas, debido a factores que provocan su cambio o mal funcionamiento, tales como: cambios morfológicos, producción exacerbada de especies de oxígeno altamente reactivas, daño en la membrana celular, daño al material genético, etc. Se evaluó el tipo de muerte celular causado por la exposición de los osteoblastos a los AuNCCs durante 48 horas (con la IC₅₀) buscando obtener información más precisa para explicar los cambios morfológicos obtenidos. El tipo de muerte celular fue evaluado por citometría de flujo.

Para todos los tamaños y concentraciones de AuNCCs, se obtuvo una mayor tendencia a una muerte celular por apoptosis temprana. Teniendo en cuenta que el mayor porcentaje de este efecto se encuentra en la concentración de 0.45 mM de Au⁰, conforme se aumentó la cantidad de AuNCCs, el porcentaje de muerte por necrosis también creció, aunque, siempre la apoptosis temprana fue la muerte más pronunciada.

Las gráficas y porcentajes de los distintos tipos de muerte celular encontrados para cada tamaño de AuNCCs se muestran en la **Figura 24** (AuNCCs pequeños), **Figura 25** (AuNCCs medianos) y **Figura 26** (AuNCCs grandes).

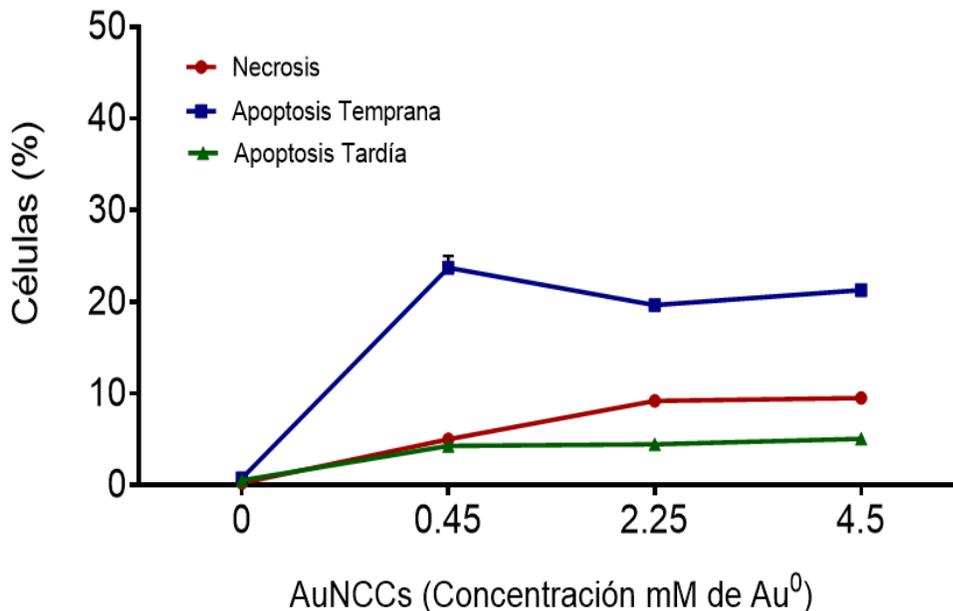


Figura 24. Porcentaje de células con los tipos de muerte celular de osteoblastos expuestos a AuNCCs pequeños en concentraciones 0.45, 2.25 y 4.5 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC por 48 horas. Tipos de muerte celular: Necrosis (Rojo), Apoptosis temprana (Azul) y Apoptosis tardía (Verde). Porcentajes graficados de los resultados obtenidos por citometría de flujo. Cada punto indica el valor promedio \pm DE de un triplicado.

Los osteoblastos expuestos a los AuNCCs pequeños por 48 horas, arrojaron que la muerte más pronunciada con todas las concentraciones de AuNCCs, es la apoptosis temprana. Los valores obtenidos de los tres tipos de muerte fueron se muestran en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Porcentajes de tipo de muerte celular obtenidos debido a la exposición de osteoblastos a los AuNCCs pequeños y sus diferentes concentraciones de Au⁰.

Concentración mM de Au ⁰	Porcentaje de apoptosis temprana	Porcentaje de apoptosis tardía	Necrosis
0.45 mM	25%	4%	5%
2.25 mM	20%	5%	9%
4.5 mM	22%	5%	9%

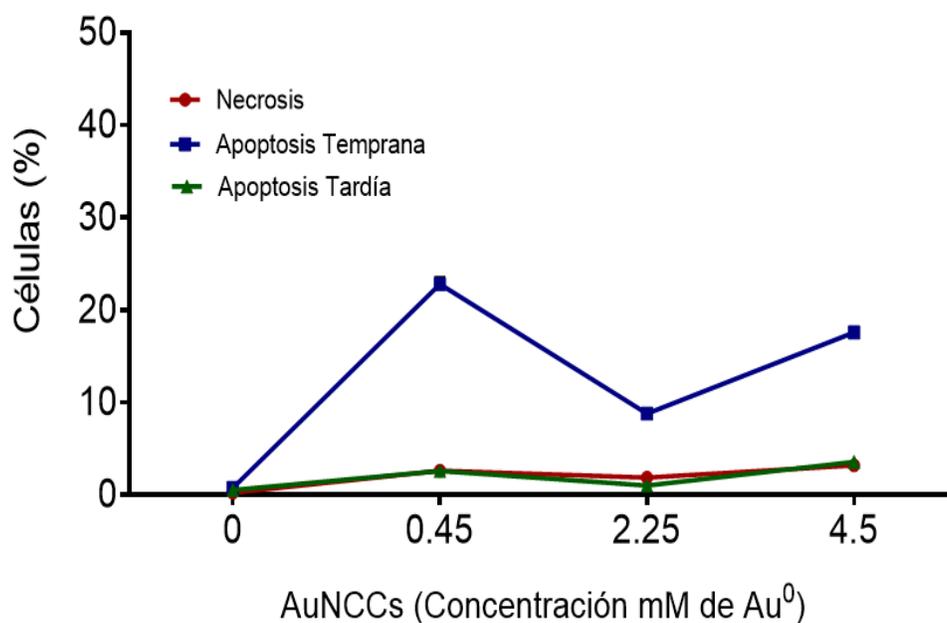


Figura 25. Porcentaje de células con los tipos de muerte celular de osteoblastos expuestos a AuNCCs medianos en concentraciones 0.45, 2.25 y 4.5 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC por 48 horas. Tipos de muerte celular: Necrosis (Rojo), Apoptosis temprana (Azul) y Apoptosis tardía (Verde). Porcentajes graficados de los resultados obtenidos por citometría de flujo. Cada punto indica el valor promedio \pm DE de un triplicado.

Para la exposición con los AuNCCs medianos por 48 horas, el tipo de muerte celular que contó con un mayor porcentaje fue la apoptosis temprana (**Figura 25**), con los porcentajes promedio mostrados en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Porcentajes de tipo de muerte celular debido a la exposición de osteoblastos a los AuNCCs mediante sus diferentes concentraciones de Au⁰.

Concentración mM de Au ⁰	Porcentaje de apoptosis temprana	Porcentaje de apoptosis tardía	Necrosis
0.45 mM	23%	3%	3%
2.25 mM	9%	1%	2%
4.5 mM	18%	4%	3%

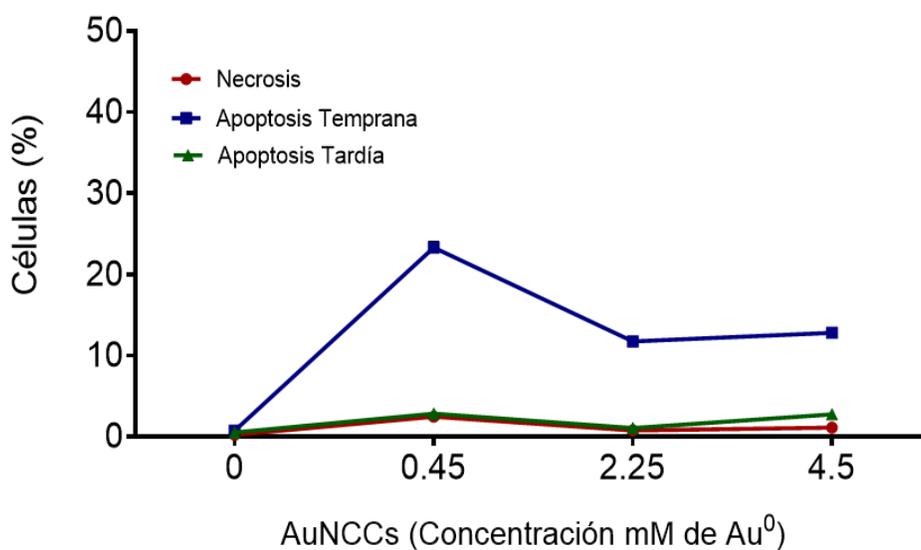


Figura 26. Porcentaje de células con los tipos de muerte celular de osteoblastos expuestos a AuNCCs grandes en concentraciones 0.45, 2.25 y 4.5 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC por 48 horas. Tipos de muerte celular: Necrosis (Rojo), Apoptosis temprana (Azul) y Apoptosis tardía (Verde). Porcentajes graficados de los resultados obtenidos por citometría de flujo. Cada punto indica el valor promedio \pm DE de un triplicado.

Nuevamente el tipo de muerte predominante cuando los osteoblastos fueron expuestos a los AuNCCs grandes fue la apoptosis temprana, seguida de la apoptosis tardía y por último la necrosis; los porcentajes obtenidos se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Porcentajes de tipo de muerte celular debido a la exposición de osteoblastos a los AuNCCs grandes y sus diferentes concentraciones de Au⁰.

Concentración mM de Au ⁰	Porcentaje de apoptosis temprana	Porcentaje de apoptosis tardía	Necrosis
0.45 mM	24%	3%	3%
2.25 mM	12%	1%	1%
4.5 mM	13%	3%	1%

Para los 3 tamaños y sus diferentes concentraciones, se realizó el análisis estadístico para corroborar que el tipo de muerte por apoptosis temprana tenía una diferencia significativa en comparación de la apoptosis tardía y necrosis, obteniendo un valor de $p < 0.05$, indicando que efectivamente hay diferencia con esta muerte.

Al final, se realizó una gráfica comparando los porcentajes de apoptosis temprana para todos los tamaños y concentraciones de AuNCCs (**Figura 27**), mostrando que hay un comportamiento similar cuando la concentración de AuNCCs es 0.45 mM de Au⁰. Al realizar análisis estadístico se obtiene un valor de $p > 0.05$, indicando que no hay diferencia significativa. Para las concentraciones de 2.25 y 4.5 mM de Au⁰, si existe diferencia significativa, con valor de $p < 0.05$, y diferencia de los porcentajes.

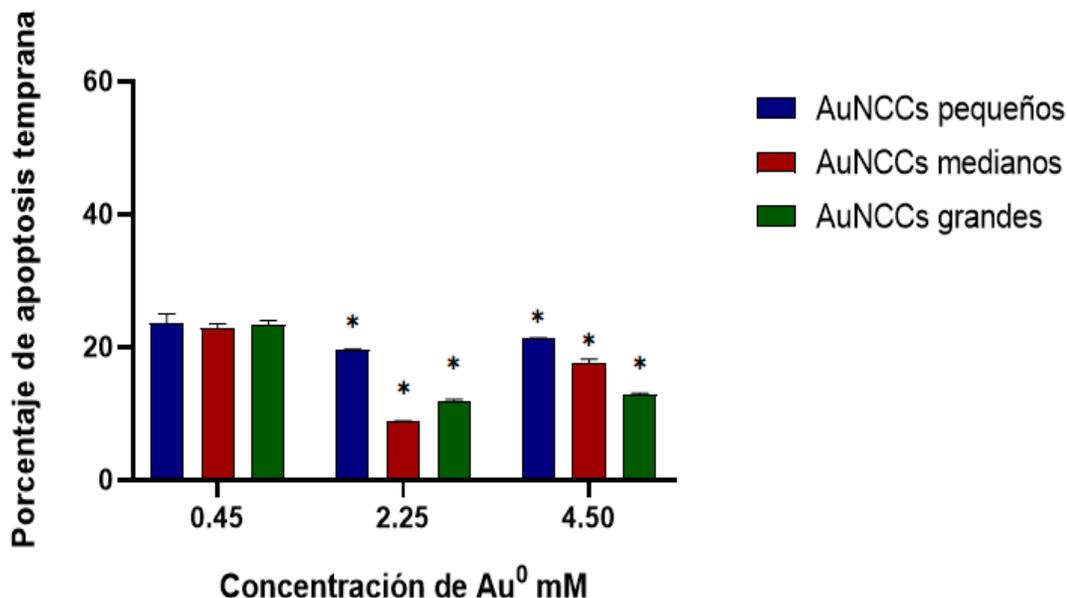


Figura 27. Porcentajes de apoptosis temprana obtenida con la exposición a los AuNCCs de distintos tamaños y concentraciones. AuNCCs pequeños (Azul), AuNCCs medianos (Rojo) y AuNCCs grandes (Verde). Cada barra indica el valor promedio \pm DE de un triplicado. Con $p > 0.05$, indicando que no existe diferencia significativa con 0.45 mM de Au⁰ (Todos los tamaños); y $p < 0.05$, indicando que existe diferencia significativa con las concentraciones de 2.25 y 4.5 mM de Au⁰ para los distintos tamaños.

3.2.6 Evaluación de la Internalización de los AuNCCs en osteoblastos

La internalización de una nanopartícula es muy importante en una evaluación toxicológica, ya que puede influir directamente en el proceso del tipo de muerte celular y los mecanismos que la desencadenan. Una célula puede cambiar su complejidad intracelular, debido a un aumento causado por la internalización de un nanomaterial que pueda llevarse a cabo, esto permite el incremento en la estructura interna, lo que modifica su grosor y tamaño, permitiendo que, mediante un haz de luz focalizado, el citómetro recoja todos estos parámetros y los compare con el control, permitiendo obtener los valores del porcentaje de cambio de complejidad celular.

En la **Figura 28** se muestra el porcentaje del cambio en la complejidad intracelular de los osteoblastos, después de haber sido expuestos a los distintos tamaños de AuNCCs y sus respectivas concentraciones, comparándolos con la complejidad intracelular intrínseca de las células vivas sin tratamiento alguno.

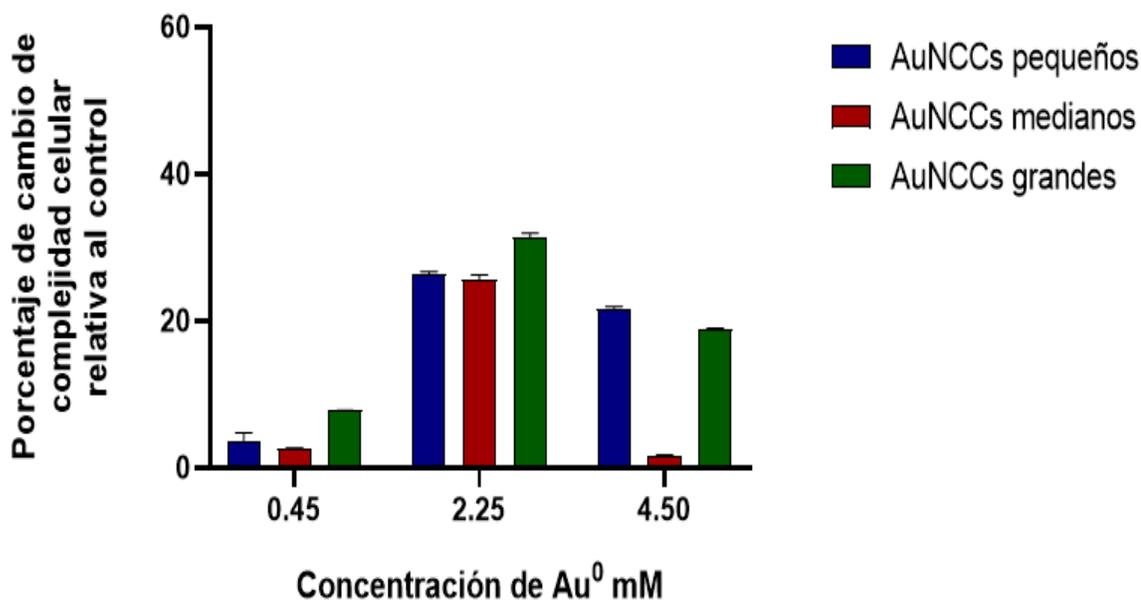


Figura 28. Porcentaje de cambio de complejidad celular producida por la exposición a los AuNCCs de distintos tamaños y concentraciones relativa al control. AuNCCs pequeños (Azul), AuNCCs medianos (Rojo) y AuNCCs grandes (Verde). Cada barra indica el valor promedio \pm DE de un triplicado. Con $p < 0.05$, indicando diferencia significativa con 2.25 mM de Au⁰ (Todos los tamaños), 4.5 mM de Au⁰ (Pequeños y Grandes) y 0.45 mM de Au⁰(Grandes).

Se observa que el menor porcentaje de diferencia es observado en los AuNCCs con concentración de 0.45 mM de Au⁰, seguido de 4.5 mM de Au⁰. En la concentración de 2.25 mM de Au⁰ es donde el porcentaje de complejidad tuvo un mayor cambio en todos los tamaños, observando una diferencia significativa con 2.25 mM y 4.5 mM de Au⁰ con relación al control.

Por lo tanto, el mayor porcentaje en cambio de complejidad sucedió con todos los tamaños en la concentración de Au⁰ 2.25 mM, siendo los AuNCCs grandes los que tuvieron mayor porcentaje en este cambio. Los porcentajes de cambio de complejidad celular para todas las concentraciones y tamaños se muestran en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Porcentajes de cambio de complejidad celular obtenidos por la exposición de osteoblastos a los AuNCCs de diferentes tamaños y concentraciones por citometría de flujo.

Concentración mM de Au⁰	AuNCCs pequeños	AuNCCs medianos	AuNCCs grandes
0.45 mM	4%	3%	8%
2.25 mM	26%	25%	31%
4.5 mM	22%	2%	19%

Capítulo 4. Discusión

4.1 Caracterización fisicoquímica de los AuNCCs

4.1.1 Tamaño de Partícula mediante TEM

El método reportado por el grupo de investigación de Romo-Herrera y colaboradores en el 2016, permite la variación del tamaño de AuNCCs, al modificar la cantidad de semillas añadidas a la solución de crecimiento. Esto permitió obtener los diferentes tamaños de cubos sintetizados, como lo muestran las micrografías TEM y la distribución de tamaños obtenidas (**Figura 3**). Los AuNCCs pequeños muestran una diferencia aproximada de 13 nm en el valor medio de arista con relación a los AuNCCs medianos y de 18 nm con los grandes. Entre los AuNCCs medianos y grandes se presenta una diferencia de valor medio de arista de 5 nm.

4.1.2 Intensidad del Plasmón de Superficie localizado

En la **Figura 4** se puede ver la intensidad de la absorbancia obtenido para los diferentes tamaños de AuNCCs sintetizados.

Se observa que el máximo del pico correspondiente al plasmón se encuentra en la longitud de onda para pequeños (607 nm), medianos (660 nm) y grandes (705 nm). Los valores obtenidos fueron comparados con estudios previos.

El monitoreo de la estabilidad de estos AuNCCs en dispersión coloidal acuosa para ser usados en los experimentos de viabilidad celular fue realizado gracias a la respuesta ante la luz de los AuNCCs debido a la excitación del mencionado LSPR.

De acuerdo con la **Figura 5**, la intensidad del LSPR para cada muestra con distintos tamaños de AuNCCs no presenta una variación notoria, ni tampoco una considerable en el desplazamiento de la longitud de onda. De lo cual podemos concluir que las dispersiones de AuNCCs con 0.45 mM de Au⁰ y CTAC 100 mM pueden

ser almacenadas en condiciones ambiente manteniéndose su estabilidad para su posterior uso en los distintos experimentos de toxicidad celular, sin presentarse agregación entre las mismas.

De manera similar los espectros UV-Vis permiten monitorear la estabilidad de los AuNCCs cuando el surfactante usado (CTAC) fue removido hasta alcanzar una concentración muy baja (0.1 mM). (Se recomienda utilizar los cubos con este proceso inmediatamente para los experimentos celulares). Al disminuir la concentración de CTAC para todos los tamaños de los AuNCCs, se observó que la señal del LSPR permanecía en una longitud de onda muy similar a la original (**Figura 6**). Por su parte la disminución en la intensidad de Absorbancia para estas muestras pudiera deberse a las pequeñas pérdidas de AuNCCs en la decantación del sobrenadante después de los centrifugados; no obstante, el plasmón obtenido para cada tamaño resultó satisfactorio. La estabilidad de estos cubos fue confirmada con la caracterización por potencial zeta y diámetro hidrodinámico.

Además de lo anterior, se logra observar que el pico máximo se encuentra más ancho en comparación de la dispersión original, siendo más notorio en los cubos de tamaños pequeño, seguido de los medianos y por último de los grandes.

4.1.3 Medición del Potencial Zeta mediante DLS

En la **Tabla 4** se obtuvieron valores positivos del potencial zeta, indicando que se tiene una carga positiva en la superficie de las nanopartículas. Lo cual se debe a que el CTAC, un surfactante (molécula anfifílica) catiónico, tiene a la formación de micelas de doble capa ante la presencia de NPs de oro en medio acuoso, recubriendo las NPs. Con esto, las secciones hidrofóbicas de las moléculas quedan al interior de la micela evitando que el agua y las secciones hidrofílicas de carácter positivo (por su carácter catiónico) se encuentren expuestas al agua en el interior de las micelas, confiriéndoles la carga superficial positiva registrada. Así mismo, puede observarse que, a mayor tamaño de los AuNCCs, el valor del potencial zeta incrementa debido a que, a mayor tamaño, se incrementa la cantidad de área superficial presente en cada nanopartícula y con ello la carga superficial presente.

Estas mediciones al igual que la respuesta del LSPR por UV-Vis se realizaron cada 15 días por 45 días, para monitorear la estabilidad de los cubos y así tener seguridad de poder usarlos durante las pruebas biológicas. En la **Tabla 5** se muestran las mediciones realizadas durante este tiempo, observándose que no existe prácticamente una variación del potencial zeta para los cubos pequeños; los cubos medianos

mostraron una ligera disminución de + 32.6 mV a + 28.3 mV; y por último los cubos grandes presentaron una disminución de 9.9 mV.

En la **Tabla 6**, se muestran los valores de potencial zeta antes y después de haber disminuido la concentración de CTAC en el coloide. Para los cubos pequeños y medianos el valor absoluto no varía mucho, mientras que, para los cubos grandes se registró una disminución de 8.5 unidades. Estos resultados nos indican que la mayor parte del CTAC removido del coloide se encontraba en exceso y no sobre la superficie de los AuNCCs recubriéndolos y dándoles estabilidad coloidal.

4.1.4 Medición del Diámetro Hidrodinámico mediante DLS

Con los resultados anteriores, se puede observar que el surfactante juega un papel importante al rodear los AuNCCs, lo cual está reportado por Kawasaki y colaboradores en 2017, por lo cual comúnmente se obtienen valores de diámetro hidrodinámico mayores al tamaño de las nanopartículas. Vale la pena mencionar que los modelos utilizados por los equipos de dispersión de luz dinámica (DLS) asumen una morfología esférica de las partículas presentes en el coloide; debido a lo cual no se puede aplicar para cuantificar el tamaño de las nanopartículas presentes en las muestras. No obstante, esta técnica resulta de utilidad en el presente trabajo para monitorear cualitativamente la formación de agregados de nanopartículas en el coloide ante los distintos pasos de disminución de surfactante (CTAC) o aumento en la concentración de AuNCCs, lo cual se vería reflejado en aumento del diámetro hidrodinámico del coloide.

Primeramente, se llevó a cabo el monitoreo del diámetro hidrodinámico por 45 días (cada 15 días) (**Tabla 9**).

El parámetro del diámetro hidrodinámico no presenta cambios significativos con respecto al 1er día de la síntesis de los AuNCCs en las 3 distintas muestras, indicando que no está ocurriendo agregación entre nanopartículas.

Al llevar a cabo la disminución de concentración del surfactante CTAC, de igual forma se hicieron mediciones del diámetro hidrodinámico para monitorear junto con las caracterizaciones anteriores, la estabilidad de los AuNCCs, verificando que el diámetro hidrodinámico no aumentará debido a agregados de AuNCCs. Para todos los tamaños de los cubos de oro, el diámetro hidrodinámico presentó cambio significativo.

Por último, se midieron los diversos valores de diámetro hidrodinámico cuando se aumentó la concentración de AuNCCs en presencia de 0.1 mM de CTAC (**Tabla 11**). Se observó que para los AuNCCs medianos y grandes se presentó un aumento del valor del diámetro hidrodinámico, presumiblemente debido a la formación de agregados cuya presencia modifica el valor medio del diámetro hidrodinámico sentido. Esto se presentó al aumentar la concentración de partículas de oro, causando un mayor acercamiento entre estas, lo que pudo facilitar cierta agregación. Por su parte, los AuNCCs pequeños presentaron una disminución en el diámetro hidrodinámico al aumentar la concentración de nanopartículas, lo cual pudiera provenir de algún fenómeno tipo maduración de Ostwald entre las nanopartículas. Sin embargo, con las caracterizaciones obtenidas por espectrofotometría de UV-Vis, se observa que no fue mucha la modificación sufrida.

4.2 Ensayos de Biocompatibilidad

4.2.1 Viabilidad celular de los osteoblastos murinos MC3T3-E1 expuestos a diferentes concentraciones y tamaños de AuNCCs, mediante la reducción de MTT

De acuerdo con los resultados mostrados en la **Figura 8**, para el método tradicional se necesita una menor cantidad de volumen de dispersión coloidal de cubos para causar un efecto adverso, comparado con el método alternativo, aun así, la muerte celular con los intervalos de volúmenes anteriores no presenta gran diferencia. Esto permite elegir cualquiera de los dos métodos como posible protocolo para efectuar los experimentos debido a que el método alternativo asemeja en mayor medida la impregnación de NPs en papel, se decidió seguir con este.

El siguiente paso fue evaluar la viabilidad celular por el método alternativo, para cada tamaño de los cubos y sus diferentes concentraciones de AuNCCs en dispersión y comparándolo con la muestra control sin AuNCCs con 0.1 mM de CTAC, lo cual sirvió para garantizar que se estaba observando el efecto de la presencia de los AuNCCs y no del CTAC.

Al observar la gráfica y los valores de las **Figuras 9, 10 y 11**, específicamente la tendencia color negra de la muestra control con las cantidades empleadas, no alcanzó la IC_{50} experimentalmente. Haciendo uso de la estadística Probit para hacer una estimación al valor necesario para este efecto se obtiene que el CTAC a esta concentración y cantidades de solución empleadas, causa en efecto tóxico no relevante. Para la **Figura**

9 de los AuNCCs de tamaño pequeño se encontró que conforme se aumentaba la concentración de AuNCCs, la IC_{50} se obtenía a menores volúmenes de coloide, entonces en esta situación, la concentración de AuNCCs presentes en el coloide, se encuentra ligado a la toxicidad celular. Este mismo ensayo se realizó para los AuNCCs medianos y grandes, obteniendo resultados similares a lo encontrado con las partículas pequeñas, con excepción en que los volúmenes necesarios para causar la IC_{50} para ambos casos son mayores en comparación con el menor tamaño, como se observa en la **Figura 10** y **Figura 11**.

Se concluye entonces que efectivamente la cantidad de nanocubos presentes en las dispersiones empleadas afecta el porcentaje de viabilidad celular a volúmenes menores de dispersión utilizada. Además, se observó una variable más que se encontraba ligada a la toxicidad, el tamaño de los cubos, ya que cubos de menor tamaño presentaban más toxicidad que los medianos y estos a su vez más que los grandes.

Las gráficas presentadas en las **Figuras 12, 13 y 14**, fueron construidas con los ensayos de viabilidad celular realizados, comparando los 3 tamaños de AuNCCs para cada una de las concentraciones de nanopartículas. Se visualiza el efecto tóxico relacionado al tamaño de los AuNCCs, encontrando en el análisis estadístico realizado $p < 0.05$ para las tres figuras, por lo que hay diferencia significativa en la toxicidad entre los tres tipos de cubos.

En la **Figura 12** se comparan los cubos pequeños, medianos y grandes, a una concentración de oro 0.45 mM. Se observa que para los cubos pequeños se obtuvo la IC_{50} con un valor menor a los cubos medianos, afirmando que el tamaño tiene relación con la toxicidad, entre menor tamaño los cubos más tóxicos son. Para las **Figuras 13 y 14** con distintas concentraciones de AuNCCs (2.25 mM y 4.5 mM) es corroborado que el tamaño en la toxicidad celular de los osteoblastos juega un papel importante con el patrón siguiente de toxicidad de los AuNCCs: Pequeños > Medianos > Grandes.

Aunque aún no existe literatura con nanocubos cóncavos de oro, si existen con otras morfologías de nanopartículas de oro, los cuales fortalecen los presentes resultados; por ejemplo, el grupo de Pislová y colaboradores en 2020, compararon el efecto en la cantidad de Au^0 usado en la síntesis de Nanoesferas (0.3 mM y 0.4 mM de oro), además de variaciones en su tamaño de 10 y 20 nm, con la línea celular de osteoblastos Saos-2 por exposición de 7 días, encontrando que efectivamente el tamaño y concentración de las nanopartículas, está ligado directamente a la toxicidad.

4.2.2 Cambios morfológicos de los osteoblastos murinos MC3T3-E1 expuestos a diferentes concentraciones y tamaños de AuNCCs

De acuerdo con diversos estudios como el del grupo de investigación de Steckiewicz en 2019, la exposición de osteoblastos de la línea celular MG63 y hFOB 1.19 a nanopartículas de oro como esferas, rodillos y estrellas, correlaciona una toxicidad con su cambio morfológico, al pasar de células alargadas a células con forma ovoide irregular. Por ello la evaluación de los cambios morfológicos resulta importante. En este caso los cambios para la línea celular de osteoblastos MC3T3-E1 con respecto a la exposición con los AuNCCs. Las células control sin tratamiento, muestran una morfología alargada y con pequeñas prolongaciones, características de células de forma de fibroblastos (Peck, *et al.*, 1964). Al exponer estas células por 48 horas con los AuNCCs pequeños y sus diferentes concentraciones, se obtuvieron los resultados mostrados en la **Figura 15**.

Teniendo en cuenta los ensayos de MTT y la IC_{50} obtenida, se observa en la columna de 0.45 mM de Au^0 que con 4.1×10^{14} partículas, la morfología permanece casi idéntica en relación con el control; cuando se adicionan 8.6×10^{14} partículas existe un gran cambio, pues adquieren una figura irregular semicircular; cuando la concentración se acerca a la IC_{50} , se puede ver que esta forma semicircular se torna irregular e incluso unas células son ovoides, además de que comienzan a presentar formaciones de puntos negros dentro de estas, esta irregularidad en la membrana celular es mucho mayor ya que no existe una forma específica y los gránulos negros son mucho mayores, además de que los restos celulares alrededor de esta son muy visibles (esto corresponde a una cantidad de partículas más allá de la concentración inhibitoria obtenida). Los efectos antes mencionados son muy notorios para las concentraciones de 2.25 y 4.5 mM de Au^0 , la irregularidad y restos celulares en los osteoblastos son observados con exposición a 2.2 y 4.3×10^{15} partículas respectivamente, la formación de los puntos negros también es mucho mayor, esto posiblemente debido a la gran cantidad de partículas que se encontraban en el medio debido a la alta concentración de oro en estas, además del tamaño pequeño que pudiese ser un factor de internalización en estas y así causar rápidamente el daño celular. Estas imágenes corroboran los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en los ensayos de MTT.

La misma observación morfológica se realizó para las exposiciones con los AuNCCs medianos y grandes, obteniendo resultados similares en cuanto a los cambios morfológicos, pero no a la cantidad de partículas necesarias para causar la IC_{50} y por lo tanto, cambios en la membrana celular. Para los cubos medianos y sus distintas concentraciones, el volumen empleado de la dispersión coloidal, fue mayor en comparación con los de tamaño pequeño, y menor con respecto a los grandes. Confirmando que el tamaño y la

concentración de AuNCCs, son factores importantes en los cambios morfológicos sufridos en los osteoblastos.

En la **Figura 16** correspondiente a los AuNCCs medianos se observa que existe un cambio morfológico en los osteoblastos con poco volumen añadido de dispersión de cubos, para las tres concentraciones. Las células se tornan circulares, además de que comienza a haber un cambio en la membrana celular, la cual comienza a tornarse amorfa y los gránulos negros comienzan a formarse dentro de estas. En las concentraciones mayores de AuNCCs (2.25 y 4.5 mM de Au⁰), estos cambios se observan en menores proporciones, debido a la cantidad de AuNCCs ante la exposición de los osteoblastos, lo que causa mayor toxicidad. Por último, en las células expuestas a los cubos de mayor tamaño **Figura 17**, se observa que los cambios morfológicos presentados son similares a los casos anteriores, pues la forma circular por parte de los osteoblastos está presente y la formación de gránulos color negro también, aunque en una menor cantidad en comparación con los cubos medianos y a su vez menos que en los pequeños. Por lo tanto, las modificaciones celulares circulares, se dan en todos los casos cuando se exponen con los cubos de cualquier tamaño y concentración, sin embargo, los cambios amorfos, los gránulos y restos celulares se van dando conforme se aumenta el tamaño de los AuNCCs y a su vez la concentración de AuNCCs.

Los cambios mencionados anteriormente, pueden ser producidos por la internalización de los AuNCCs y la relación a los iones de Au⁺ que puedan estar presentes dentro de la célula, pues Landgraf y colaboradores en el 2015 mencionan que moléculas con carga positiva pueden causar alteraciones en el citoesqueleto de las células. Por su parte Mironava y colaboradores en el 2014, hacen referencia a cambio en la polarización y modificación estructural de la membrana celular, derivada a los diferentes mecanismos de internalización ligados a los tamaños y formas de AuNPs como esferas y rodillos, así como a los iones de oro presentes derivados de las AuNPs. Los gránulos negros observados pueden deberse a algunos tipos de vacuolas presentes por mecanismos de internalización, las cuales encierran a los cubos durante su internalización y tránsito celular, como ha sido descrito en estudios realizados por Tang, *et al.* en el 2015 con AuNPs en forma de rodillos de 23 y 26 nm expuestas a células fibroblásticas.

4.2.3 Ensayo fluorimétrico de la producción de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS) mediante la reducción del reactivo diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA)

Las ROS (Especies de oxígeno altamente reactivas) participan en la regulación de la división celular y su supervivencia, ya que son moléculas importantes en la respiración celular por el transporte electrónico y reacciones de óxido-reducción. Derivado de esto, un estrés oxidativo produce una mayor actividad de las enzimas esterasas y mayor incremento en la producción electrónica del complejo I y III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, provocando el incremento de ROS.

La producción de estas especies químicas está dada por la reducción del oxígeno para convertirlo en el ión superóxido, el cual posteriormente genera peróxido de hidrógeno, según estudios realizados por Sies y colaboradores en el año 2020. Por ello, esta medición nos indicó el estrés celular y no tanto la respiración celular normal. Esta generación de especies de oxígeno altamente reactivas se muestra en las **Figuras 18, 19 y 20**, por la exposición de AuNCCs pequeños, medianos y grandes respectivamente. Donde al igual que el ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT, al aumentar la concentración de cubos y un incremento en los volúmenes de exposición, genera un mayor estrés por parte de los osteoblastos. La medición se comparó tomando en cuenta un 100% de producción generado normalmente, con una muestra control de osteoblastos sin tratamiento con AuNCCs. La tendencia máxima obtenida fue una producción de alrededor del 158% un incremento de casi 58%; con una tasa de incremento con respecto al volumen de coloide utilizado más rápida en los cubos de tamaño pequeño, seguido de los medianos y por último de los grandes; confirmándose que 4.5 mM de Au⁰ es más tóxico que 2.25 mM Au⁰ y por último 0.45 mM de Au⁰. Para complementar estos datos y descartar que el aumento en la producción de estas moléculas es debido también a su respiración por viabilidad, se llevó a cabo un análisis dividiendo los porcentajes de ROS producidas con la viabilidad celular de los experimentos anteriores, para así obtener el porcentaje relativo mostrado también en las **Figuras 18, 19 y 20**. Estos porcentajes relativos nos indican que la producción de ROS incrementa al disminuir la vida de los osteoblastos, descartando así una producción normal de ROS y confirmando un estrés celular aumentado. El incremento en ROS muestra una tendencia linealizada y constante en volúmenes de AuNCCs grandes. Notando el mayor incremento en este efecto con las muestras de 4.5 mM de Au⁰ en todos los tamaños. Además, esta toxicidad quedó mejor plasmada con este análisis de los datos, ya que concentraciones de 0.45 mM de Au⁰ muestran casi nula inclinación y porcentaje.

Indicando nuevamente la siguiente relación en toxicidad entre los tamaños y concentraciones: Pequeños > Medianos > Grandes; 4.5 mM Au⁰ > 2.25 mM Au⁰ > 0.45 mM Au⁰.

Se conoce que el incremento en ROS en línea celulares derivado de la exposición con diferentes AuNPs como esferas de 22.18 nm y osteoblastos MG-63 (Al-Saqr, *et al.*, 2021) o AuNPs de 40 nm conjugadas con Titanio y osteoblastos MCT3-E1 (Pissuwan, *et al.*, 2022); puede hacer que estas células produzcan una diferenciación inadecuada, debido a los daños morfológicos causados. Por ello, si los AuNCCs siguen el mismo camino para causar este daño, aplicaría el mecanismo que menciona la inhibición en las señales del complejo proteína fosfatidilinositol quinasa-3 / proteína quinasa-3 (PIK₃/AKT), impidiendo por lo mismo la diferenciación celular, lo cual a su vez activaría glucocorticoides que estimulan a FAS-ligando para activar FAS y este último a la CASPASA 8, responsable de la muerte celular por apoptosis (Shuang-Dei, *et al.*, 2019).

4.2.4 Ensayo de hemocompatibilidad de los AuNCCs en sus distintos tamaños y concentraciones

Los osteoblastos son células derivadas de las células madre pluripotenciales, por lo que, deben circular en parte de su vida media dentro del torrente sanguíneo. Además, al conformar parte del tejido óseo, requieren alta demanda de sangre para promover la angiogénesis en la reparación y renovación de los huesos (Pajevic, *et al.*, 2019). Por tal razón, fue precisa la evaluación de la hemocompatibilidad, según lo indicado en la norma ISO 10993-4:2017, donde los dispositivos médicos evaluados deben de presentar un porcentaje menor al 5% de hemólisis total. Con lo anterior indicado, se evaluaron los diferentes tamaños y concentraciones de AuNCCs. En la **Figura 21**, correspondiente a la exposición sanguínea con los cubos pequeños a sus distintas concentraciones, se observa que los AuNCCs pequeños expuestos no son hemocompatibles, pues presentan una toxicidad hacia los eritrocitos muy notoria. Para los nanocubos medianos (**Figura 22**) la única compatibilidad fue a la concentración 0.45 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC, utilizando 1 µL de coloide correspondiente a 1.1×10^{14} partículas con porcentaje de hemólisis del 4.9%. Por último, para los AuNCCs grandes (**Figura 23**) se encontró que la muestra con concentración 0.45 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC, al utilizarse 1 µL o 2 µL de coloide correspondiente a aproximadamente 7.2×10^{13} o 1.4×10^{14} nanopartículas. La tendencia encontrada sigue confirmando que los AuNCCs pequeños producen mayor toxicidad, seguido de los medianos y al último los grandes, aumentando cada vez en relación con los volúmenes utilizados y la concentración de AuNCCs.

Contrastando con estudios previos de AuNPs en eritrocitos humano, tenemos el realizado por Luma y colaboradores en el 2021, donde evaluaron nanoesferas con un tamaño aproximado de 10 nm. Encontraron que estas partículas son compatibles en concentraciones menores a $3 \frac{mg}{mL}$. El grupo de investigación de Huang en el 2021 encontró hemocompatibilidad con nanorodillos de aproximadamente 23 nm concentraciones menores a $8 \frac{mg}{mL}$.

Tomando en cuenta lo anterior, la forma de las AuNPs, su tamaño y concentración juegan un papel fundamental en la toxicidad con los eritrocitos.

4.2.5 Evaluación del tipo de muerte celular en osteoblastos expuestos a los AuNCCs

La evaluación del tipo de muerte celular causada por la exposición de los osteoblastos a los AuNCCs en un lapso de 48 horas fue de suma importancia, ya que con estos resultados se puede confirmar y analizar los cambios ocurridos a nivel morfológico, la producción alta de ROS y factores como la internalización a nivel celular.

De acuerdo con estudios previos, donde las diferentes formas de AuNPs como esferas de 10 nm en 10 $\mu g/mL$ por 48 h. (H-sun, *et al.*, 2018), rodillos de 10 nm en 9.85 $\mu g/mL$ por 48 hrs (Taylor, *et al.*, 2010) y estrellas de 34 nm en 400 $\mu g/mL$ por 24 hrs. (Favi, *et al.*, 2015), causan en su mayor proporción de muerte del tipo apoptótica.

El método de tinción con Anexina V – PI, indicó el tipo de muerte preferente para los osteoblastos expuestos a los cubos, teniendo como resultado una mayor proporción del tipo de muerte celular por apoptosis. Específicamente, una apoptosis temprana con todos los tamaños y concentraciones de AuNCCs, considerando siempre las concentraciones de IC_{50} usadas. En el análisis por citometría de flujo, la mayor densidad de eventos se produjo en el cuadrante (+, -), característico de apoptosis temprana, lo cual es confirmado en las **Figuras 24, 25 y 26** para AuNCCs pequeños, medianos y grandes respectivamente.

Además, se realizó un análisis estadístico entre cada tamaño y sus concentraciones de AuNCCs, obteniéndose en todos los casos un $p < 0.05$, indicando que hay diferencia significativa entre los tipos de muerte.

Con lo anterior, queda establecido que la apoptosis temprana es la vía de muerte causada en mayor proporción por los AuNCCs ante su exposición por 48 h. El valor mayor en el porcentaje de este tipo de muerte celular se presenta con la concentración de 0.45 mM de Au⁰ y disminuye un poco conforme la concentración de AuNCCs incrementa. El tamaño también influye, ya que los cubos pequeños presentan un valor mayor del porcentaje de apoptosis en relación con los otros tamaños. Esto también se ve reflejado con los resultados obtenidos en cambios morfológicos, pues en las **Figuras 15, 16 y 17** se nota que además de cambiar el aspecto celular, se pueden encontrar cuerpos circulares dentro de las células, posiblemente debido a los cuerpos apoptóticos formados confirmados por este ensayo. De igual manera, se presenta una disminución en el tamaño celular (característico de una muerte programada (Häcker-G, 2000)) al exponerse a un mayor volumen y concentración de partículas. Los restos celulares observados pueden ser debido a el pequeño porcentaje de necrosis y apoptosis tardía presentados (Chen-Q, *et al.*, 2018).

Se confirma también lo relacionado con la generación de ROS, ya que un incremento de ROS es característico de daño mitocondrial y muerte programada por apoptosis, posiblemente debido a la exposición con iones de oro, además de una posible internalización de los AuNCCs.

4.2.6 Evaluación de la internalización de AuNCCs en osteoblastos

La medición del parámetro del cambio en la complejidad celular por citometría de flujo es muy importante, ya que puede indicarnos si las AuNPS se internalizan en los osteoblastos. Estudios anteriores mencionan que nanoesferas de oro (AuNEs) tienden a internalizarse en osteoblastos (Tsai S-W, *et al.*, 2013); de igual manera, formas más complejas como rodillos y estrellas han presentado distinto grado de este fenómeno, dependiendo también de su tamaño (Pakravan, *et al.*, 2021). Por lo tanto, fue necesario medir el cambio en la complejidad causada por los AuNCCs a los osteoblastos su diferencia ante los diferentes tamaños y las distintas concentraciones de AuNCCs. Los resultados pueden ser consultados en la **Figura 28** y los porcentajes en la **Tabla 18**.

La posible internalización de los AuNCCs puede estar relacionada con el aumento en producción de las ROS obtenidas. Si la internalización de los AuNCCs es llevada a cabo en una mayor proporción, se favorece la exposición de iones de Au⁺ a la mitocondria celular (encargada de llevar el proceso oxidante), ocasionando que las especies altamente reactivas de oxígeno se vuelven más presentes. Por ende, una mayor concentración de AuNCCs pudiera provocar mayor actividad para la generación de ROS.

Estos resultados obtenidos, corroboran estudios previos con AuNPs de morfologías distintas, los cuales mencionan que la internalización por parte de estas partículas se lleva mayormente por la vía mediada por endocitosis y causan el efecto del incremento de ROS mencionado, el tipo de muerte celular y cambios morfológicos en líneas celulares de osteoblastos (Steckiewicz, *et al.*, 2019). Por lo tanto, resulta plausible que formas tipo AuNCCs pueden llevar a cabo internalización y depende mucho del número de partículas al que se exponen los osteoblastos. No obstante, en este trabajo el tipo de internalización realizado no se fue analizado.

Capítulo 5. Conclusiones

Se logró sintetizar tres tamaños diferentes de AuNCCs (pequeños, medianos y grandes) y su posterior caracterización mediante TEM, potencial zeta y diámetro hidrodinámico, incluyendo el monitoreo de su estabilidad durante el tiempo, durante la disminución de concentración del surfactante CTAC (para disminuir el efecto tóxico de este reactivo) y durante el aumento en la concentración de AuNCCs.

Los resultados muestran que las dispersiones coloidales de AuNCCs son estables, de acuerdo con los parámetros de potencial zeta y diámetro hidrodinámico obtenidos para las distintas muestras corroborando una casi nula agregación.

Al comparar los métodos de incubación celular con los AuNCCs, el método alternativo propuesto resulto el menos tóxico. Se encontró mediante los resultados por los ensayos de MTT y la IC_{50} correspondiente, la medición del porcentaje ROS generadas, la visualización de los cambios morfológicos y las pruebas del porcentaje de hemólisis en eritrocitos humanos, que, a una mayor cantidad de partículas en el medio, es decir existe una mayor toxicidad hacia los osteoblastos. Además, entre menor sea el tamaño de los AuNCCs empleados, mayor es la toxicidad generada. En resumen, al utilizar un menor tamaño y mayor concentración de AuNCCs, resulta más tóxico en los osteoblastos y en células sanguíneas para el caso del ensayo de hemólisis.

En cuanto al tipo de muerte celular y la internalización, se encontró que la apoptosis temprana es el tipo de muerte predilecta en todas las concentraciones y tamaños de AuNCCs, con una mayor proporción para 0.45 mM de Au^0 . Para la internalización, existe un porcentaje de cambio de complejidad celular en relación con el control de células vivas usado, que hace plausible una internalización de los AuNCCs de todos los tamaños a nivel celular, siendo más evidente para la concentración de 2.25 mM de Au^0 .

Como trabajo a futuro, se propone remover por completo el CTAC como estabilizante en la superficie de los AuNCCs, intercambiando por citrato de sodio. Esto permitiría realizar un estudio de toxicidad en función del estabilizante que recubre superficialmente los AuNCCs con la línea celular de osteoblastos murinos MC3T3-E1, tomando como ejemplo el ensayo mostrado en el **Anexo**.

Literatura citada

- al Saqr, A., Khafagy, E.-S., Alalaiwe, A., Aldawsari, M. F., Alshahrani, S. M., Anwer, Md. K., Khan, S., Lila, A. S. A., Arab, H. H., and Hegazy, W. A. H. 2021. Synthesis of Gold Nanoparticles by Using Green Machinery: Characterization and In Vitro Toxicity. *Nanomaterials*, 11(3), pp. 808. doi: 10.3390/nano11030808
- Alkilany, A. M. and Murphy, C. J. 2010. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research*, 12(7), pp. 2313–2333. doi: 10.1007/s11051-010-9911-8
- Ayoub, N., Jeyasekharan, A. D., Bernal, J. A., and Venkitaraman, A. R. 2008. HP1- β mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature*, 453(7195), pp. 682–686. doi: 10.1038/nature06875
- Becerril, I. B. 2019. Incorporación de nanopartículas metálicas en materiales de baja densidad. Tesis de doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C., 42 pp.
- Bhattacharjee, S. 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, pp. 337–351. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- Buzea, C., Pacheco, I. I., and Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), pp. MR17–MR71. doi: 10.1116/1.2815690
- Chang, D. E., Sørensen, A. S., Hemmer, P. R., and Lukin, M. D. 2006. Quantum Optics with Surface Plasmons. *Physical Review Letters*, 97(5), pp. 053002. doi: 10.1103/PhysRevLett.97.053002
- Chen, Q., Kang, J., and Fu, C. 2018. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1), pp. 18. doi: 10.1038/s41392-018-0018-5
- Chen, Y.-S., Hung, Y.-C., Liao, I., and Huang, G. S. 2009. Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 4(8), pp. 858. doi: 10.1007/s11671-009-9334-6
- Daley, E. J., Pajevic, P. D., Roy, S., and Trackman, P. C. 2019. Impaired Gastric Hormone Regulation of Osteoblasts and Lysyl Oxidase Drives Bone Disease in Diabetes Mellitus. *JBMR Plus*, 3(10). doi: 10.1002/jbm4.10212
- Deng, S., Dai, G., Chen, S., Nie, Z., Zhou, J., Fang, H., and Peng, H. 2019. Dexamethasone induces osteoblast apoptosis through ROS-PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, pp. 602–608. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.103
- Elahi, N., Kamali, M., and Baghersad, M. H. 2018. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*, 184, pp. 537–556. doi: 10.1016/j.talanta.2018.02.088
- Fan, M., Han, Y., Gao, S., Yan, H., Cao, L., Li, Z., Liang, X.-J., and Zhang, J. 2020. Ultrasmall gold nanoparticles in cancer diagnosis and therapy. *Theranostics*, 10(11), pp. 4944–4957. doi: 10.7150/thno.42471

- Favi, P. M., Gao, M., Johana Sepúlveda Arango, L., Ospina, S. P., Morales, M., Pavon, J. J., and Webster, T. J. 2015. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(11), pp. 3449–3462. doi: 10.1002/jbm.a.35491
- Gao, J., Sanchez-Purra, M., Huang, H., Wang, S., Chen, Y., Yu, X., Luo, Q., Hamad-Schifferli, K., and Liu, S. 2017. Synthesis of different-sized gold nanostars for Raman bioimaging and photothermal therapy in cancer nanotheranostics. *Science China Chemistry*, 60(9), pp. 1219–1229. doi: 10.1007/s11426-017-9088-x
- Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T., and Rotello, V. M. 2004. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chemistry*, 15(4), pp. 897–900. doi: 10.1021/bc049951i
- Gutiérrez-Araujo, M. I., Vázquez-Duhalt, R., and Juárez-Moreno, K. O. 2021. Respuestas celulares de macrófagos a nanopartículas de óxidos metálicos. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología*, 14(27), pp. 1e–16e. doi: 10.22201/ceiich.24485691e.2021.27.69661
- Häcker, G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*, 301(1), pp. 5–17. doi: 10.1007/s004410000193
- Huang, C., Dong, J., Zhang, Y., Chai, S., Wang, X., Kang, S., Yu, D., Wang, P., and Jiang, Q. 2021. Gold Nanoparticles-Loaded Polyvinylpyrrolidone/Ethylcellulose Coaxial Electrospun Nanofibers with Enhanced Osteogenic Capability for Bone Tissue Regeneration. *Materials & Design*, 212, pp. 110240. doi: 10.1016/j.matdes.2021.110240
- Huerta Plaza, B. A. 2018. Síntesis de nanopartículas de oro anisotrópicas, sus propiedades ópticas en un medio eutéctico y su anclaje a nanotubos de carbono. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B. C., 40 pp.
- Hutter, E. and Fendler, J. H. 2004. Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Advanced Materials*, 16(19), pp. 1685–1706. doi: 10.1002/adma.200400271
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), pp. 239–257. doi: 10.1038/bjc.1972.33
- Kierdorf, K., Masuda, T., Jordão, M. J. C., and Prinz, M. 2019. Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(9), pp. 547–562. doi: 10.1038/s41583-019-0201-x
- Klein-Nulend, J., Bacabac, R., and Bakker, A. 2012. Mechanical loading and how it affects bone cells: The role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. *European Cells and Materials*, 24, pp. 278–291. doi: 10.22203/eCM.v024a20
- Landgraf, L., Müller, I., Ernst, P., Schäfer, M., Rosman, C., Schick, I., Köhler, O., Oehring, H., Breus, V. v., Basché, T., Sönnichsen, C., Tremel, W., and Hilger, I. 2015. Comparative evaluation of the impact on endothelial cells induced by different nanoparticle structures and functionalization. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6, pp. 300–312. doi: 10.3762/bjnano.6.28

- Lewinski, N., Colvin, V., and Drezek, R. 2008. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small*, 4(1), pp. 26–49. doi: 10.1002/smll.200700595
- Li, J. J., Hartono, D., Ong, C.-N., Bay, B.-H., and Yung, L.-Y. L. 2010. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials*, 31(23), pp. 5996–6003. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.014
- Lopes, L. C., Lima, D., Mendes Hacke, A. C., Schweigert, B. S., Calaça, G. N., Simas, F. F., Pereira, R. P., Iacomini, M., Viana, A. G., and Pessôa, C. A. 2021. Gold nanoparticles capped with polysaccharides extracted from pineapple gum: Evaluation of their hemocompatibility and electrochemical sensing properties. *Talanta*, 223, pp. 121634. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121634
- Mironava, T., Hadjiargyrou, M., Simon, M., and Rafailovich, M. H. 2014. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Adipose Derived Stromal cells. *Nanotoxicology*, 8(2), pp. 189–201. doi: 10.3109/17435390.2013.769128
- Mohammadpour, R., Cheney, D. L., Grunberger, J. W., Yazdimamaghani, M., Jedrkiewicz, J., Isaacson, K. J., Dobrovolskaia, M. A., and Ghandehari, H. 2020. One-year chronic toxicity evaluation of single dose intravenously administered silica nanoparticles in mice and their Ex vivo human hemocompatibility. *Journal of Controlled Release*, 324, pp. 471–481. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.05.027
- Navya, P. N. and Daima, H. K. 2016. Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives. *Nano Convergence*, 3(1), pp. 1. doi: 10.1186/s40580-016-0064-z
- Ng, C. T., Tang, F. M. A., Li, J. J., Ong, C., Yung, L. L. Y., and Bay, B. H. 2015. Clathrin-Mediated Endocytosis of Gold Nanoparticles *In Vitro*. *The Anatomical Record*, 298(2), pp. 418–427. doi: 10.1002/ar.23051
- Noguez, C. 2007. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(10), pp. 3806–3819. doi: 10.1021/jp066539m
- Paino, I. M. M., Marangoni, V. S., de Oliveira, R. de C. S., Antunes, L. M. G., and Zucolotto, V. 2012. Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology Letters*, 215(2), pp. 119–125. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.09.025
- Pakravan, A., Salehi, R., and Mahkam, M. 2021. Comparison study on the effect of gold nanoparticles shape in the forms of star, hallow, cage, rods, and Si-Au and Fe-Au core-shell on photothermal cancer treatment. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 33, pp. 102144. doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102144
- Palocci, C., Valletta, A., Chronopoulou, L., Donati, L., Bramosanti, M., Brasili, E., Baldan, B., and Pasqua, G. 2017. Endocytic pathways involved in PLGA nanoparticle uptake by grapevine cells and role of cell wall and membrane in size selection. *Plant Cell Reports*, 36(12), pp. 1917–1928. doi: 10.1007/s00299-017-2206-0
- Peck, W. A., Birge, S. J., and Fedak, S. A. 1964. Bone Cells: Biochemical and Biological Studies after Enzymatic Isolation. *Science*, 146(3650), pp. 1476–1477. doi: 10.1126/science.146.3650.1476
- Pišlová, M., Kolářová, K., Vokatá, B., Brož, A., Ulbrich, P., Bačáková, L., Kolská, Z., and Švorčík, V. 2020. A new way to prepare gold nanoparticles by sputtering – Sterilization, stability and other properties. *Materials Science and Engineering: C*, 115, pp. 111087. doi: 10.1016/j.msec.2020.111087

- Pissuwan, D., Poomrattanagoon, S., and Chungchaiyart, P. 2022. Trends in Using Gold Nanoparticles for Inducing Cell Differentiation: A Review. *ACS Applied Nano Materials*, 5(3), pp. 3110–3120. doi: 10.1021/acsanm.1c04173
- Romo-Herrera, J. M., González, A. L., Guerrini, L., Castiello, F. R., Alonso-Nuñez, G., Contreras, O. E., and Alvarez-Puebla, R. A. 2016. A study of the depth and size of concave cube Au nanoparticles as highly sensitive SERS probes. *Nanoscale*, 8(13), pp. 7326–7333. doi: 10.1039/C6NR01155A
- Salata, O. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(1), pp. 1–6. doi: 10.1186/1477-3155-2-3
- Sani, A., Cao, C., and Cui, D. 2021. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, pp. 100991. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100991
- Scarabelli, L., Sánchez-Iglesias, A., Pérez-Juste, J., and Liz-Marzán, L. M. 2015. A “Tips and Tricks” Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6(21), pp. 4270–4279. doi: 10.1021/acs.jpcclett.5b02123
- Shang, L., Nienhaus, K., and Nienhaus, G. U. 2014. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*, 12(1), pp. 5. doi: 10.1186/1477-3155-12-5
- Sies, H. and Jones, D. P. 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), pp. 363–383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3
- Steckiewicz, K. P., Barcinska, E., Malankowska, A., Zauszkiewicz-Pawlak, A., Nowaczyk, G., Zaleska-Medynska, A., and Inkielewicz-Stepniak, I. 2019. Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in in vitro model. Evaluation of the safety of use and anti-cancer potential. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(2), pp. 22. doi: 10.1007/s10856-019-6221-2
- Suh, K. S., Lee, Y. S., Seo, S. H., Kim, Y. S., and Choi, E. M. 2013. Gold Nanoparticles Attenuates Antimycin A-Induced Mitochondrial Dysfunction in MC3T3-E1 Osteoblastic Cells. *Biological Trace Element Research*, 153(1–3), pp. 428–436. doi: 10.1007/s12011-013-9679-7
- Sun, H., Jia, J., Jiang, C., and Zhai, S. 2018. Gold Nanoparticle-Induced Cell Death and Potential Applications in Nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), pp. 754. doi: 10.3390/ijms19030754
- Taylor, U., Klein, S., Petersen, S., Kues, W., Barcikowski, S., and Rath, D. 2010. Nonendosomal cellular uptake of ligand-free, positively charged gold nanoparticles. *Cytometry Part A*, 9999A, pp. NA-NA. doi: 10.1002/cyto.a.20846
- Tolosa, L., Donato, M. T., and Gómez-Lechón, M. J. 2015. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26
- Tsai, S.-W., Liaw, J.-W., Kao, Y.-C., Huang, M.-Y., Lee, C.-Y., Rau, L.-R., Huang, C.-Y., Wei, K.-C., and Ye, T.-C. 2013. Internalized Gold Nanoparticles Do Not Affect the Osteogenesis and Apoptosis of MG63 Osteoblast-Like Cells: A Quantitative, In Vitro Study. *PLoS ONE*, 8(10), pp. e76545. doi: 10.1371/journal.pone.0076545

- Waseem, T., Duxbury, M., Ito, H., Ashley, S. W., and Robinson, M. K. 2008. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Surgery*, 143(3), pp. 334–342. doi: 10.1016/j.surg.2007.09.039
- Wu, Y., Ali, M. R. K., Chen, K., Fang, N., and El-Sayed, M. A. 2019. Gold nanoparticles in biological optical imaging. *Nano Today*, 24, pp. 120–140. doi: 10.1016/j.nantod.2018.12.006
- Xiao, J., Bai, X., Liao, L., Zhou, M., Peng, J., Xiang, Q., Ren, Z., Wen, H., Jiang, Z., Tang, Z., Wang, M., and Liu, L. 2019. Hydrogen sulfide inhibits PCSK9 expression through the PI3K/Akt-SREBP-2 signaling pathway to influence lipid metabolism in HepG2 cells. *International Journal of Molecular Medicine*. doi: 10.3892/ijmm.2019.4118
- Zhang, L. and Shi, G. 2011. Preparation of Highly Conductive Graphene Hydrogels for Fabricating Supercapacitors with High Rate Capability. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(34), pp. 17206–17212. doi: 10.1021/jp204036a
- Zhou, S., Huo, D., Goines, S., Yang, T.-H., Lyu, Z., Zhao, M., Gilroy, K. D., Wu, Y., Hood, Z. D., Xie, M., and Xia, Y. 2018. Enabling Complete Ligand Exchange on the Surface of Gold Nanocrystals through the Deposition and Then Etching of Silver. *Journal of the American Chemical Society*, 140(38), pp. 11898–11901. doi: 10.1021/jacs.8b06464
- Ziąbka, M., Dziadek, M., Menaszek, E., Banasiuk, R., and Królicka, A. 2017. Middle Ear Prosthesis with Bactericidal Efficacy—In Vitro Investigation. *Molecules*, 22(10), pp. 1681. doi: 10.3390/molecules22101681

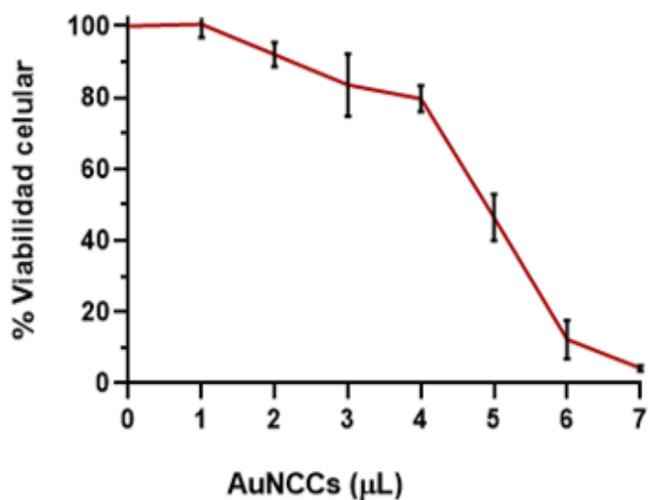
Anexo

Ensayos de viabilidad celular previos a los reportados en el trabajo de tesis experimental

Ensayos de viabilidad celular por exposición de AuNCCs medianos con concentración 0.45 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7.

Antes de comenzar con los ensayos de biocompatibilidad en la línea celular de osteoblastos MCT3-E1, se realizó una prueba con la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, utilizando AuNCCs de tamaño mediano con 0.45 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC, el método usado fue el formato Alternativo (**Figura 28**). Este ensayo sirvió para encontrar un rango de volumen a emplear para las pruebas con los osteoblastos. El tratamiento y exposición de las células a los AuNCCs, fue el mismo usado en el ensayo de viabilidad celular por formato Alternativo por 48 horas en los osteoblastos.

Para este ensayo, se encontró que en un rango de volumen de 6.188 a 6.495 μL aparecía la IC₅₀ en esta línea celular.

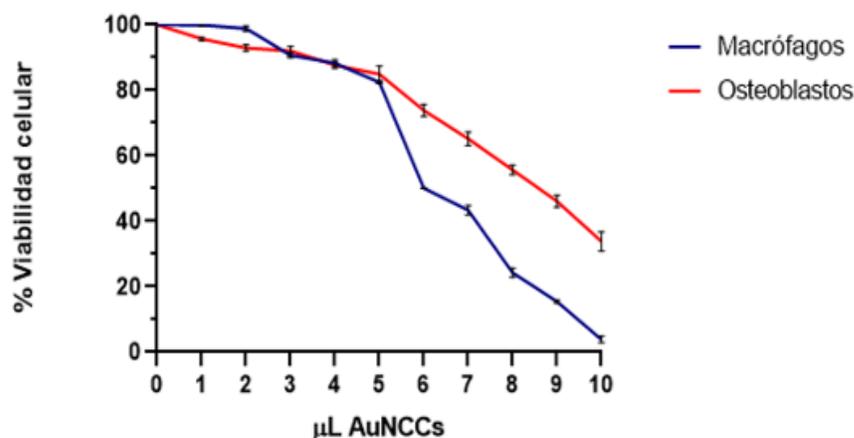


Intervalo de IC ₅₀ (μL)	IC ₅₀ (número de partículas)	r ² obtenida
6.188 a 6.495 μL	6.4×10^{14}	0.9836

Figura 29. Toxicidad de los AuNCCs medianos con 0.45 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo en macrófagos murinos RAW 264.7. Cada punto indica el valor promedio \pm DE de un triplicado.

Comparación de la toxicidad por exposición de AuNCCs medianos con concentración 0.45 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC en las líneas celulares de macrófagos murinos RAW 264.7 y Osteoblastos murinos MC3T3-E1.

Teniendo en cuenta el experimento anterior, y el volumen encontrado, se decidió comparar la viabilidad celular de los macrófagos con los osteoblastos, en un rango de volúmenes aproximado de la IC₅₀, el cual fue desde 1 a 10 μL (Figura 29). Al realizar este ensayo, se logró observar que los osteoblastos resistían un volumen mayor para la IC₅₀ en comparación con los macrófagos, esto debido a que los macrófagos son células del sistema inmune innato, que, en contacto con cuerpos ajenos al organismo, células muertas y dañadas, tienen una función de fagocitar, lo que provoca su activación e inducen su propia muerte (Kierdorf, *et al.*, 2019). Mediante análisis estadístico de varianza, se obtuvo un valor de $p < 0.05$, indicando que hay diferencia significativa entre ambas líneas celulares. Además de que este resultado se encontraba en los volúmenes arbitrariamente usados, por lo tanto, este rango de exposición fue usado en los ensayos de biocompatibilidad del presente trabajo de tesis.

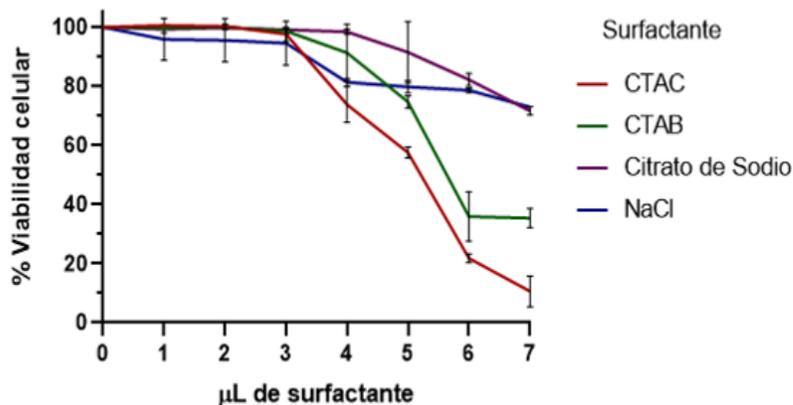


Línea Celular	Intervalo de IC ₅₀ (μL)	IC ₅₀ (número de partículas)	r ² obtenida
Macrófagos	6.188 a 6.495 μL	6.4 x 10 ¹⁴ partículas	0.9836
Osteoblastos	7.985 a 8.574 μL	8.6 x 10 ¹⁴ partículas	0.9728

Figura 30. Comparación de la toxicidad de los AuNCCs medianos con 0.45 mM de Au⁰ y 0.1 mM de CTAC, mediante el método alternativo en macrófagos murinos RAW264.7 y osteoblastos murinos MC3T3-E1. Macrófagos (Azul) y Osteoblastos (Rojo). Cada punto indica el valor promedio \pm DE de un triplicado. Con $p < 0.05$, lo que indica que hay diferencia significativa entre ambas líneas celulares.

Toxicidad de diferentes surfactantes a 0.1 mM en macrófagos murinos RAW 264.7

Con base en los estudios reportados de la toxicidad del CTAC, es posible confirmar que el CTAC causa toxicidad en la línea celular de macrófagos. Por lo tanto, se decidió realizar una evaluación de la toxicidad de diferentes surfactantes empleados en la síntesis de nanopartículas de oro, con una concentración de 0.1 mM, y así saber cuál parte estructural de éstos es la que causante del efecto tóxico. En la **Figura 30**, se muestran los resultados del ensayo de citotoxicidad de cada surfactante en donde se observa que a partir de un volumen de 4 μL de CTAC y CTAB se induce una toxicidad mayor en comparación que el citrato de sodio y el NaCl. Con datos estadísticos, entre el CTAC y CTAB no hay diferencia significativa, pues se obtuvo un valor de $p > 0.05$, sin embargo, al comparar la diferencia entre el citrato de sodio y NaCl, con CTAC y CTAB respectivamente cada uno, se encontró un valor de $p < 0.05$, indicando que si existe una diferencia entre estos. En la gráfica se observa que el citrato de sodio tiene un efecto constante en la viabilidad celular hasta una cantidad de 5 μL , donde hay una baja hasta aproximadamente 90%, un resultado benéficamente comparable con el CTAC. Entonces comparando estas estructuras, la cadena cetil del CTAC y CTAB es la que presenta toxicidad. Teniendo antecedentes que el citrato de sodio es el surfactante más usado en la síntesis de AuNPs, se concluye que, para futuras evaluaciones toxicológicas, es viable realizar el cambio de los AuNCCs de CTAC a citrato de sodio. Este experimento puede ser extrapolado con la línea celular de osteoblastos MC3T3-E1.



Surfactante	Intervalo de IC_{50} (μL)	r^2 obtenida
CTAC	4.895 a 5.175 μL	0.9815
CTAB	5.650 a 6.141 μL	0.9362
Citrato de Sodio	7.908 a 9.563 μL	0.8967
NaCl	9.399 a 20.66 μL	0.7524

Figura 31. Comparación de la toxicidad de diferentes surfactantes con concentración 0.1 mM en macrófagos murinos RAW 264.7. CTAC (Rojo), CTAB (Verde), Citrato de sodio (Morado) y NaCl (Azul). Cada punto indica el valor promedio \pm DE de un triplicado.