



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS, S. C.
POSGRADO

**EECTO DE NANOESTRUCTURAS ORO-SÍLICE EN
ARTRITIS REUMATOIDE INDUCIDA POR COLÁGENA**

Tesis que como requisito para obtener el Grado de Doctora en Ciencias de
Materiales presenta:

M.C. Rosa Isela Ruvalcaba Ontiveros

Director de tesis: Dra. Hilda Esperanza Esparza Ponce
Co-Director de tesis: Dr. José Alberto Duarte Möller

Agradecimientos

A mis hijas

Angelica, Gaby y Sofia por ser mi mayor motivación, por apoyarme y escucharme siempre, por esforzarse para no dormirse mientras practicaba mis presentaciones y sobre todo por siempre creer en mí, aun cuando yo no lo hacía. ¡Las amo!

A mis padres

Rosa y Leobardo por sus esfuerzos para brindarme una educación académica y personal, que fue el inicio de esta aventura. Por siempre creer en mí sin importar lo descabellado de mis planes. ¡Los amo!

A todos mis hermanos

Liz, Tito, Lily, Claudia, Janeth, Johanaly, Leobardo y Leonardo, por su apoyo y entusiasmo. Gracias por siempre estar al pendiente y por motivarme a seguir adelante en esta aventura. ¡Los amo!

A mis compañeros

Anel, Chavita, Luis, Beto, por tantos momentos llenos de risas que definitivamente hicieron de esta investigación una experiencia alegre y divertida.

Reconocimientos

A mi directora de Tesis

Dra. Hilda Esperanza Esparza Ponce, por el tiempo que dedicó para guiarme y compartir sus conocimientos desde que inicié la maestría. Por su paciencia y ayuda y sobre todo por la confianza que depositó en mí. ¡Gracias!

A mi director externo

Dr. José Alberto Duarte Möller, por haber compartido conmigo esta investigación que me ha llenado de satisfacciones. Por estar siempre presente e involucrarme en sus proyectos. ¡Gracias!

Al equipo de trabajo de PABIOM

Dr. Cesar Pacheco Tena, Dra. Susana Aideé González Chávez, Dr. Gerardo Pavel Espino Solís, Salma Marcela López Loeza, Q.B. P. María Fernanda Alvarado Jáquez, Dr. Alfredo Chávez Morales, Dra. Valeria Minet Ortiz Domínguez, Dra. Jasanai Sausamedá García, Dr. Rubén Cuevas Martínez, Q.B.P. Eduardo Chaparro Barrera, porque cada uno de ustedes aportó grandemente en el desarrollo de esta investigación. ¡Gracias!

Al comité tutorial

Dr. Erasmo Orrantía Borunda, Dra. Norma Rosario Flores Holguín, Dr. Cesar Cutberto Leyva Porras y Dra. Hilda Amelia Piñón Castillo, por todos los comentarios y críticas constructivas que me dieron durante todo el proceso, haciendo siempre de mi tesis un mejor trabajo. ¡Gracias!

Al equipo de trabajo del laboratorio de propiedades ópticas de los materiales

Dr. José Guadalupe Murillo Ramírez, Dr. José Antonio Medina Vázquez y Dra. Evelyn Yamel González Ramírez por su ayuda en la adquisición de las imágenes térmicas. ¡Gracias!

Al personal técnico de los laboratorios CIMAV

Carlos Elías Ornelas Gutiérrez, César Cutberto Leyva Porras, Karla Campos Venegas y Raúl Armando Ochoa-Gamboá por su disponibilidad y apoyo en el análisis de las muestras. ¡Gracias!

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por la beca otorgada para hacer posible la realización de mis estudios de doctorado.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 3 |
| 1.2. Hipótesis | 8 |
| 1.3. Objetivo general..... | 9 |
| 1.4. Objetivos específicos | 9 |
| 2. Marco teórico | 10 |
| 2.1. Biocompatibilidad..... | 10 |
| 2.2. Modelos animales | 12 |
| 2.3. Diseño experimental | 12 |
| 2.2. NEAu-Si para el acarreo y liberación de fármacos | 15 |
| 3. Materiales y métodos..... | 15 |
| 3.1. Consideraciones éticas | 16 |
| 3.2. Reactivos | 16 |
| 3.3. Síntesis de NEAu-Si | 17 |
| 3.4. Diseño del estudio experimental para evaluar el efecto antiinflamatorio | 19 |
| 3.5. Determinación de la dosis de NEAu-Si | 20 |
| 3.6. Definición de variables y unidades de medida | 20 |
| 3.7. Inducción de artritis por colágena y tratamiento con NEAu-Si..... | 22 |
| 3.8. Evaluación clínica de la artritis | 23 |
| 3.9. Distribución de las muestras | 24 |
| 3.10. Análisis de las membranas sinoviales por Microscopia electrónica de barrido | 25 |
| 3.11. Preparación de las muestras para ICP | 25 |
| 3.12. Evaluación histológica | 25 |
| 3.13. Microarreglo de ADN y análisis bioinformático..... | 26 |
| 3.14. Inmunohistoquímica..... | 28 |
| 3.15. Evaluación de citocinas proinflamatorias por citometría de flujo | 29 |
| 3.16. Análisis de densidad ósea por tomografía computarizada | 29 |
| 3.17. Análisis estadístico | 29 |
| 3.18. Evaluación de la eficiencia fototérmica | 30 |

| | | |
|------|--|----|
| 4. | Resultados y discusión | 31 |
| 4.1. | Morfología y distribución de diámetros de las NEAu-Si..... | 31 |
| 4.2. | Microestructura del oro y sílice que componen las NEAu-Si | 32 |
| 4.3. | Estabilidad de las NEAu-Si en solución coloidal | 33 |
| 4.4. | Biodistribución de las NEAu-Si y su penetración a la membrana sinovial | 34 |
| 4.5. | El tratamiento con NEAu-Si disminuye la severidad clínica e histológica de la AIC en ratones DBA/1 | 37 |
| 4.6. | El tratamiento con NEAu-Si redujo la expresión de genes inflamatorios, procesos biológicos y vías de señalización en las patas traseras de ratones DBA/1 con AIC.. | 42 |
| 4.7. | El tratamiento con NEAu-Si indujo la sub-expresión de marcadores inflamatorios en las articulaciones de rodillas y tarsos de ratones DBA/1 con AIC | 49 |
| 4.8. | Disminución de las citocinas TNF α e IL-6 en el suero de ratones DBA/1 con AIC debido al tratamiento con NEAu-Si..... | 52 |
| 4.9. | Efectos del tratamiento con NEAu-Si en la porosidad de las patas traseras de ratones DBA/1 con AIC | 53 |
| 5. | Conclusiones | 57 |
| 6. | Bibliografía..... | 58 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Ilustración esquemática del efecto ELVIS. Extravasación de nanoestructuras a través de vasculatura permeable y posterior secuestro mediado por células inflamatorias (Q. Wang & Sun, 2017)..... | 5 |
| Figura 2: Ventana óptica del cuerpo humano. HbO ₂ : oxihemoglobina; Hb: hemoglobina (Weissleder, 2001)..... | 6 |
| Figura 3: Efecto de la relación núcleo:shell en el corrimiento del pico de absorbancia de las NEAu-Si (Oldenburg et al., 1998) | 6 |
| Figura 4: Imagen representativa de la resonancia de un plasmón en una esfera metálica nanométrica (A. Yang et al., 2017) | 14 |
| Figura 5: Diagrama de flujo de actividades | 15 |
| Figura 6: Dimensiones de la jaula utilizada en el estudio experimental del modelo AIC | 19 |
| Figura 7: Etapas del experimento para evaluar el efecto de las NEAu-Si en AIC..... | 23 |
| Figura 8: Evaluación del grado de severidad de la AIC en la pata trasera derecha..... | 24 |
| Figura 9: Interpretación de la coloración durante la lectura de los resultados del microarreglo de ADN | 26 |
| Figura 10: a) Diagrama del sistema, b) arreglo instrumental para la medición de la eficiencia fototérmica de las NEAu-Si | 30 |
| Figura 11: (a, b y c) Micrografías FESEM de los núcleos de sílice con diámetros de 63, 83 y 132 nm respectivamente; y (d, e y f) micrografías MET de las NEAu-Si obtenidas de la decoración con oro de los núcleos de sílice presentados en las micrografías a, b y c. La distribución de sus diámetros fue calculada midiendo 200 partículas por muestra (imágenes interiores) | 31 |
| Figura 12: Efecto del volumen total de la síntesis en el diámetro de la partícula de sílice usando un ajuste polinomial de 2do orden..... | 32 |
| Figura 13: Micrografías HR-TEM y patrones de difracción de sílice amorfo sintetizado por el método Stöber y NPAu obtenidas por la modificación del método de deposición-precipitación desarrollado por Kah..... | 33 |
| Figura 14: Potencial zeta de esferas de sílice, sílice funcionalizado y NEAu-Si..... | 34 |
| Figura 16: (A) Micrografía FESEM de la membrana sinovial mostrando esferas de sílice embebidas en las fibras de colágeno y (B) Amplificación 3.25X de la micrografía FESEM para revelar las fibras y localización de las esferas | 35 |

- Figura 16:** Análisis elemental EDS del área de la membrana sinovial donde las partículas fueron encontradas..... 35
- Figura 17:** Efectos de las NEAu-Si en el análisis clínico de la AIC en ratones DBA/1. (A) Imágenes representativas de la manifestación clínica de la AIC en ratones del grupo control y los tratados con NEAu-Si; (B) Evaluación del curso clínico de la AIC. Se utilizó el análisis unidireccional de varianzas para medidas repetidas con el ajuste Bonferroni para comparar los grupos..... 37
- Figura 18:** Efectos de las NEAu-Si en el análisis histológico de la AIC en ratones DBA/1. (A) Imágenes representativas de los hallazgos histológicos en las articulaciones de rodillas y tarsos utilizando tinción H&E. Las flechas indican irregularidades en la superficie articular y pérdida de cartílago. HS: hiperplasia sinovial, MS: membrana sinovial, EC: Erosión de cartílago, H: hueso, II: infiltrado inflamatorio, C: cartílago, EC: erosión de cartílago, PO: proliferación ósea, EO: erosión ósea; (B) evaluación histológica de los efectos de las NEAu-Si en la inflamación y la remodelación de tejido. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 39
- Figura 19:** (A) Construcción de la red IPP con los genes pertenecientes a los grupos 1-3 obtenidos con los genes sobre-expresados mostrando la interacción de los genes relacionados con la AR. La lista de genes sobre-expresados (puntaje $Z \geq 1.5$ DE) fue analizada en las plataformas STRING y Cytoscape. Los grupos primarios de las subredes fueron obtenidos utilizando el complemento MCODE (cutoff = 0.4). El grosor de la línea indica la fuerza del soporte de datos; (B) Una ampliación de la red IPP mostrando la interacción de los genes relevantes a la AR. (C) Colores asignados a los nodos que representan las vías de señalización KEGG relevantes en la patogénesis de la AR. (D) Genes con las mayores interacciones en las vías de señalización de interés..... 47
- Figura 20:** (A) Construcción de la red IPP con los genes pertenecientes a los grupos 1-3 obtenidos con los genes sub-expresados mostrando la interacción de los genes relacionados con la AR. La lista de genes sobre-expresados (puntaje $Z \geq 1.5$ DE) fue analizada en las plataformas STRING y Cytoscape. Los grupos primarios de las subredes fueron obtenidos utilizando el complemento MCODE (cutoff = 0.4). El grosor de la línea indica la fuerza del soporte de datos; (B) Una ampliación de la red IPP mostrando la interacción de los genes relevantes a la AR. (C) Colores asignados a los nodos que representan las vías de señalización KEGG relevantes en la patogénesis de la AR. (D) Genes con las mayores interacciones en las vías de señalización de interés..... 48
- Figura 21:** Efecto de las NEAu-Si en la expresión tisular de $TNF\alpha$ e IL-6 en las articulaciones de ratones DBA/1 con AIC. Imágenes representativas de los hallazgos de IHQ. La inmunodetección se llevó a cabo usando estreptavidina peroxidasa y diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Las cuantificaciones se

ejecutaron con el software ImageJ e IHC toolbox. Para cada imagen, se extrajo el color DAB, así como los niveles de gris máximos y promedio. La densidad óptica (DO) de cada imagen se obtuvo con $\log_{10}(\text{valor de gris máximo}/\text{valor de gris promedio})$. El promedio y DE fueron calculadas y gráficamente representadas para cada grupo de estudio. Se utilizó la prueba T de Student para determinar las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ 50

Figura 22: Efecto de las NEAu-Si en la expresión tisular de NF κ B y VEGF en las articulaciones de ratones DBA/1 con AIC. Imágenes representativas de los hallazgos de IHQ. La inmunodetección se llevó a cabo usando estreptavidina peroxidasa y diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Las cuantificaciones se ejecutaron con el software ImageJ e IHC toolbox. Para cada imagen, se extrajo el color DAB, así como los niveles de gris máximos y promedio. La densidad óptica (DO) de cada imagen se obtuvo con $\log_{10}(\text{valor de gris máximo}/\text{valor de gris promedio})$. El promedio y DE fueron calculadas y gráficamente representadas para cada grupo de estudio. Se utilizó la prueba T de Student para determinar las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ 51

Figura 23: Efecto del tratamiento con NEAu-Si en los niveles de citocinas del suero de ratones DBA/1 con AIC. Los niveles de las citocinas proinflamatorias en el suero fueron determinados por citometría de flujo. * $p < 0.05$ 52

Figura 24: Imágenes de TC de patas traseras derechas de los grupos AIC-control y AIC-experimental con su respectivo volumen de poro. Ambas extremidades presentaron un puntaje clínico de 4 por 62 días consecutivos. 53

Figura 25: Imágenes térmicas obtenidas antes, durante y después de la irradiación de las NEAu-Si con núcleos de sílice de 63, 82 y 132 nm y una semicubierta de oro de ≈ 5 nm con láser de 852 nm 340 mW/cm^2 . El punto S1 indica donde se está dirigiendo el láser y su respectiva temperatura está indicada en la esquina superior izquierda de cada imagen 54

Figura 26: Cambio de temperatura en soluciones de NEAu-Si (47 mg/ml) con sintetizadas sobre núcleos de sílice con diámetros de (a) 132 nm (cuadros azules) y (b) 83 nm (triángulos rojos) irradiados con un láser de 852 nm y potencia de 340 mW/cm^2 56

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Comparación del efecto del diámetro / dosis / vía de administración del tratamiento con NPAu en AIC | 13 |
| Tabla 2: Volúmenes utilizados para la síntesis de NEAu-Si con diferentes diámetros . | 19 |
| Tabla 3: Definición de las variables del estudio y unidades de medida | 20 |
| Tabla 4: Puntaje para la evaluación subjetiva de la severidad de la artritis | 24 |
| Tabla 5: Comparativo del promedio de la distribución de oro y silicio en tejidos de ratones DBA/1 después de 21 días de la última dosis (n=5) | 36 |
| Tabla 6: Puntaje obtenido del análisis clínico de los ratones DBA/1 de grupo AIC-control durante el tratamiento con NEAu-Si. El número de ratón se compone del número de jaula · Número de ratón. MD: mano derecha, MI: mano izquierda, TM: Total manos, PD: pata derecha, PI: pata izquierda, TP: Total patas, T4: Total de las 4 extremidades | 40 |
| Tabla 7: Puntaje obtenido del análisis clínico de los ratones DBA/1 del grupo AIC-experimental durante el tratamiento con NEAu-Si. El número de ratón se compone del número de jaula · número de ratón. MD: mano derecha, MI: mano izquierda, TM: Total manos, PD: pata derecha, PI: pata izquierda, TP: Total patas, T4: Total de las 4 extremidades..... | 41 |
| Tabla 8: Procesos biológicos relacionados con AR y asociados con los genes sub-regulados por el tratamiento con NEAu-Si en AIC, con sus respectivos genes desregulados y valores p | 43 |
| Tabla 9: Procesos biológicos relacionados con AR y asociados con los genes sobre-regulados por el tratamiento con NEAu-Si en AIC, con sus respectivos genes desregulados y valores p | 44 |
| Tabla 10: Vías de señalización KEGG relacionados con AR y asociados con los genes sub-regulados por el tratamiento con NEAu-Si en AIC, con sus respectivos genes desregulados y valores p | 45 |
| Tabla 11: Vías de señalización KEGG relacionados con AR y asociados con los genes sobre-regulados por el tratamiento con NEAu-Si en AIC, con sus respectivos genes desregulados y valores p | 45 |

Resumen

Los iones de oro han sido utilizados exitosamente como tratamiento para la artritis reumatoide desde 1945. Sin embargo, debido a sus efectos secundarios y al desarrollo de tratamientos presumiblemente más efectivos, su uso ha ido disminuyendo. No obstante, los avances en nanotecnología han permitido la exploración de los efectos de nanomateriales de oro, presentándolos como opciones para terapias antiinflamatorias. En esta investigación se presenta la síntesis y caracterización de nanoestructuras coraza-núcleo oro-sílice (NEAu-Si) y se describen los efectos de la aplicación de su tratamiento sobre la artritis inducida por colágena (AIC) en ratones DBA/1.

Al final del tratamiento, las membranas sinoviales, riñones, hígados y bazos de los ratones DBA/1 fueron disectados y analizados por espectrometría de emisión atómica (ICP) mostrando que menos del 0.0001 y 0.1% de las dosis de oro y silicio respectivamente son retenidas en los órganos después de 21 días de la última dosis. Restos de las NEAu-Si fueron identificadas en la membrana sinovial por microscopia electrónica de barrido (MEB) y la densidad de hueso en las patas traseras fue visualizada por tomografía computarizada (TC) indicando una reducción de la porosidad de hueso en los ratones con AIC del grupo experimental con respecto al grupo control.

El análisis de los resultados del microarreglo de ADN se llevó a cabo con ARN obtenido de las patas traseras y mostró 2,628 genes expresados diferencialmente (GED) por las NEAu-Si. El análisis bioinformático mostró que estos genes están presentes en varias vías de señalización y procesos biológicos inflamatorios incluyendo quimiocinas, interacción citoquina-receptor de citoquina, fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3k-Akt), factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 17 (IL-17), factor nuclear Kappa B (NF- κ B), proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y artritis reumatoide. Los marcadores inflamatorios relevantes del proceso patogénico de la artritis como Tnf, interferón γ (Ifng), interleucina 6 (Il6) y quimiocina Cxcl5 fueron sub-regulados por el efecto de las NEAu-Si. Los análisis por citometría de flujo e inmunohistoquímica (IHQ) confirmaron una disminución estadísticamente significativa de las citocinas proinflamatorias TNF α , IL-6, NF κ B y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) entre las articulaciones de los grupos AIC-control y AIC-experimental por el efecto del tratamiento con NEAu-Si.

Además de valorar las propiedades antiinflamatorias de las NEAu-Si, también se evaluaron sus propiedades fototérmicas comprobando que inducen un incremento de temperatura suficiente para producir necrosis en tumores cancerígenos. Este efecto se produce cuando las NEAu-Si son irradiadas con longitudes de onda infrarrojo cercano (NIR), estando estas dentro del rango de la ventana óptica del cuerpo humano. Se comprobó que esta eficiencia fototérmica está directamente relacionada con el diámetro del núcleo de sílice y el espesor de la semicubierta de oro. De los diámetros analizados, los que presentaron el mayor incremento de temperatura fueron las NEAu-Si con núcleo de sílice de 132 nm y semicubierta de oro de \approx 5 nm alcanzando un incremento de temperatura de 4.4°C.

Abstract

Gold ions had been widely used as a treatment for rheumatoid arthritis since 1945. However, due to its side effects and to the development of treatments presumably more effective, its use has decreased. Nevertheless, the advances in nanotechnology allow for the exploration of the effects of gold nanomaterials, presenting them as options for anti-inflammatory therapies. In this investigation, the synthesis and characterization of shell-core gold-silica nanostructures (SGNs) along with the effects of their application as treatment for collagen-induced arthritis (CIA) in DBA/1 mice is presented.

At the end of the treatment, the synovial membranes, kidneys, livers, and spleens of the DBA/1 mice were dissected and analyzed by inductively coupled plasma mass spectroscopy showing that less than 0.0001 and 0.1% of the administered doses of Au and Si respectively were retained by the organs 21 days after the last dose. Remains of the SGNs were visually identified in the synovial membrane by scanning electron microscopy, and the bone density of the hind paws was observed by computerized tomography indicating a reduction in bone porosity in the CIA-experimental group when compared with the CIA-control group.

The DNA microarray analysis carried out with RNA obtained from the hind paws showed 2,628 differentially expressed genes by the SGNs. The bioinformatic analysis showed the effect of the treatment in several signaling pathways and inflammatory biological processes including chemokine, cytokine-cytokine receptor interaction, PI3K-Akt, TNF, IL-17, NF κ B, MAPK, and rheumatoid arthritis. SGNs down-regulated inflammatory markers relevant in the pathogenic process of rheumatoid arthritis like Tnf, Ifng, Il6, and Cxcl5. The flow cytometry and immunohistochemical analysis confirmed the statistically significant reduction of the proinflammatory cytokines TNF α , IL-6, NF κ B, and VEGF between the joints of the CIA-control and CIA-experimental groups by the effect of SGNs.

On the other hand, the photo-thermal properties of SGNs were evaluated, corroborating that they induce an increment in temperature high enough to initiate necrosis in cancerous tumors. This effect is produced while SGNs are irradiated with near infrared wavelengths, which are inside the biological window of the human body. It was proved that this photo-thermal efficiency is directly related to the relationship between the diameter of the silica core and gold semi-shell thickness. From the diameters analyzed, the particles with 132 nm with a shell of \approx 5nm presented the greater increment in temperature (4.4°C).

1. Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria autoinmune crónica que afecta a las articulaciones y causa un daño progresivo que, en la ausencia de un tratamiento adecuado, puede terminar en discapacidad. Se caracteriza por un reclutamiento excesivo de células inflamatorias dentro de la membrana sinovial que conlleva a hiperplasia sinovial, neovascularización, erosión secundaria de cartílago y hueso y posteriormente la destrucción de la articulación y su deformación. Además de las características articulares, la inflamación sistemática que presenta la AR repercute negativamente a nivel sistémico afectando varios órganos, incluyendo las estructuras cardiovasculares (McInnes & Schett, 2011).

Las sales de oro han demostrado ser eficaces en el control de algunos pacientes con AR (Massai et al., 2021) y otros padecimientos relacionados como el lupus eritematoso sistémico (Wallace, 2013) y la artritis psoriásica (Salvarani et al., 1989). Sin embargo, su uso ha sido limitado en las últimas décadas por la llegada de terapias presumiblemente más seguras y efectivas. Al aplicar estos tratamientos, los iones de oro se unen a la albúmina y su vida promedio esta entre los 5 y 7 días (Balfourier et al., 2020). Sin embargo, después de varios tratamientos, su vida media se eleva y sus trazas son detectables en varios tejidos incluyendo el hígado, riñones y membrana sinovial. Estas trazas pueden permanecer en el tejido por décadas (James et al., 2015) y probablemente de manera indefinida debido a que los iones de oro provenientes de las sales se combinan con el azufre formando aurosomas que aparecen como vesículas densas intracelulares (Yamashita, 2021).

Aun así, los efectos benéficos de las sales de oro en el control del proceso inflamatorio y la remisión sostenida por una porción de los pacientes siguen siendo de interés en la búsqueda de tratamientos efectivos para AR y condiciones relacionadas. Por esta razón y gracias a los avances en nanotecnología, se han desarrollado métodos alternativos para el tratamiento de la AR con oro, ya sea en forma de nanopartículas (Jhun et al., 2020; Kirdaite et al., 2019; Leonavičienė et al., 2012; Sumbayev et al., 2013) o nanoestructuras de oro combinadas con polímeros (Yaqoob et al., 2020) que podrían ser una estrategia más segura de acarrear compuestos de oro dentro de la membrana sinovial inflamada.

Los modelos animales son un paso crucial para evaluar nuevas terapias en AR (Hong et al., 2020). Particularmente, la AIC en ratones DBA/1 es ampliamente utilizada por su semejanza a la AR humana (Caplazi et al., 2015). Además de sus características clínicas y patogénicas, AIC y AR también comparten un perfil de respuesta a varios agentes terapéuticos. Por lo tanto, la AIC en ratones DBA/1 es un antecedente común de las etapas preclínicas en el desarrollo de nuevos medicamentos.

Estudios previos han analizado los efectos de las nanopartículas de oro (NPAu) en modelos animales (Costa Lima & Reis, 2015; Janakiraman et al., 2018; Kim et al., 2015; Rastinehad et al., 2019). Como resultado, es ahora claro que tanto el tamaño (Albanese et al., 2012), la forma (Li et al., 2016), la vía de administración (Zhang et al., 2010), dosis (Yuan et al., 2019), como la carga superficial e hidrofobicidad (Elci et al., 2016) de las NPAu tienen una gran influencia en su toxicidad, pues estos factores intervienen con su biodistribución (Stern et al., 2016). Por lo tanto, existe la necesidad de un protocolo estandarizado para la síntesis y estabilización de las NPAu, ya que estas tienden a aglomerarse cuando están a temperatura ambiente, lo que compromete su morfología (J. Dong et al., 2020). Una opción para su estabilización es adherirlas a esferas de sílice, formando NEAu-Si que mantienen sus características a temperatura ambiente en una solución coloidal. Vale la pena mencionar que las NEAu-Si ya han sido evaluadas en pruebas clínicas con humanos como un tratamiento potencial para varios tipos de cáncer (Balfourier et al., 2020; Rastinehad et al., 2019; Stern et al., 2016) y su uso está en proceso de evaluación por la Administración de Comida y Drogas de los Estados Unidos (FDA) (Pillai, 2014).

El primer paso para la síntesis de NEAu-Si es la formación de esferas de sílice amorfo utilizando el método Stöber (Ghimire & Jaroniec, 2021) que presenta una manera fácil de controlar el tamaño y la superficie de las partículas de sílice. Estas partículas no presentan toxicidad en tamaños superiores a los 30 nm de diámetro (X. Dong et al., 2020) y pueden ser decoradas con NPAu utilizando el método de deposición-precipitación publicado por Kah (Kah et al., 2008). Al utilizar este método, se logran ensamblar NEAu-Si con las dimensiones que mejor se ajustan a la aplicación, de tal manera que se acumulen pasivamente en el tejido de interés gracias a su permeabilidad mejorada (Pissuwan et al., 2006; Stern et al., 2016) y al efecto de retención debido a la extravasación a través de vasculatura permeable y el posterior secuestro mediado por células inflamatorias (ELVIS) (Q. Wang & Sun, 2017). En la Figura 1 se muestra como las células endoteliales incrementan su permeabilidad debido al alto flujo sanguíneo demandado por el tejido inflamado, permitiendo el paso de las nanoestructuras. Posteriormente, estas son “secuestradas” por células inflamatorias como macrófagos, células T, dendríticas, B y/o sinoviocitos tipo fibroblasto que transportan las nanoestructuras dentro de la membrana sinovial donde la inflamación y la vasculatura es más prominente. La intrincada vasculatura de un tejido inflamado permite la retención de las nanoestructuras y la liberación de su efecto. Sin embargo, los efectos de las NEAu-Si en AIC aún no han sido analizados.

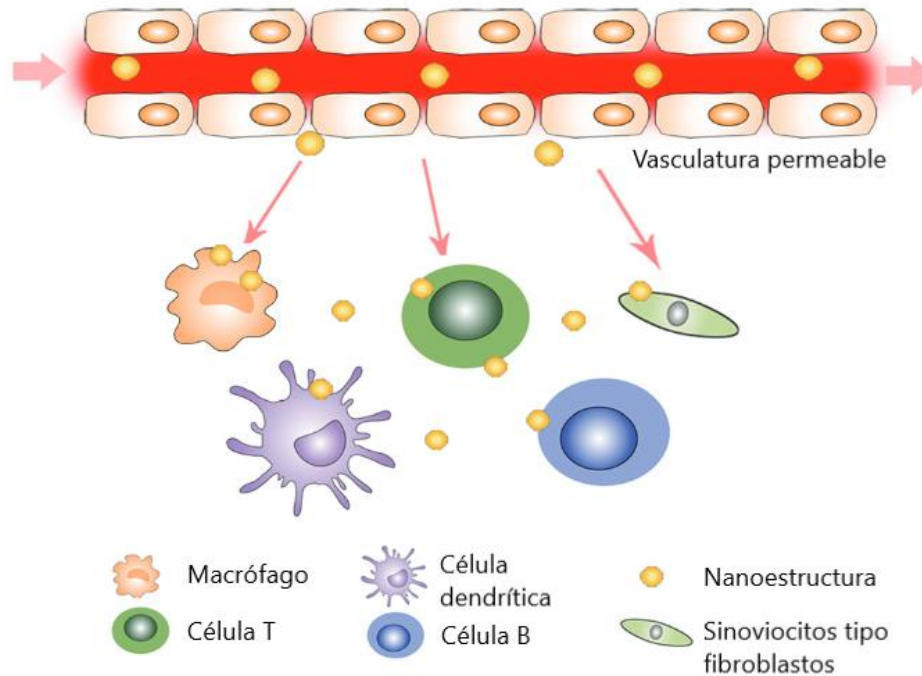


Figura 1: Ilustración esquemática del efecto ELVIS. Extravasación de nanoestructuras a través de vasculatura permeable y posterior secuestro mediado por células inflamatorias (Q. Wang & Sun, 2017)

Con la intención de incrementar las posibles aplicaciones de las NEAu-Si, además de valorar sus propiedades antiinflamatorias, también se comprobó su capacidad de convertir radiación con longitudes de onda en el rango NIR en calor. Estas longitudes de onda se encuentran dentro de la ventana óptica del cuerpo (Alabugin, 2019; Weissleder, 2001), como se muestra en la Figura 2, donde se puede observar que, en longitudes entre los 670 y 890 nm, tanto el agua como la hemoglobina y la oxihemoglobina presentan su absorbancia más baja. De tal manera que no existe pérdida significativa de la irradiación ni esta presenta efectos adversos en el tejido. Esto permite la utilización de las NEAu-Si en la ablación de tumores (Rastinehad et al., 2019), para la liberación localizada de fármacos (Pandey et al., 2019), o para una utilización simultánea en el teragnóstico (Mostafavi et al., 2022). Está comprobado que el corrimiento en el pico de absorbancia hacia el NIR de las NEAu-Si depende de la relación entre el diámetro del núcleo de sílice / espesor de la cobertura con NPAu, como lo planteó Halas y su equipo (Oldenburg et al., 1998). En la Figura 3 se puede deducir la importancia en el control de las dimensiones de las NEAu-Si para la mejora de su eficiencia térmica en longitudes de onda NIR.

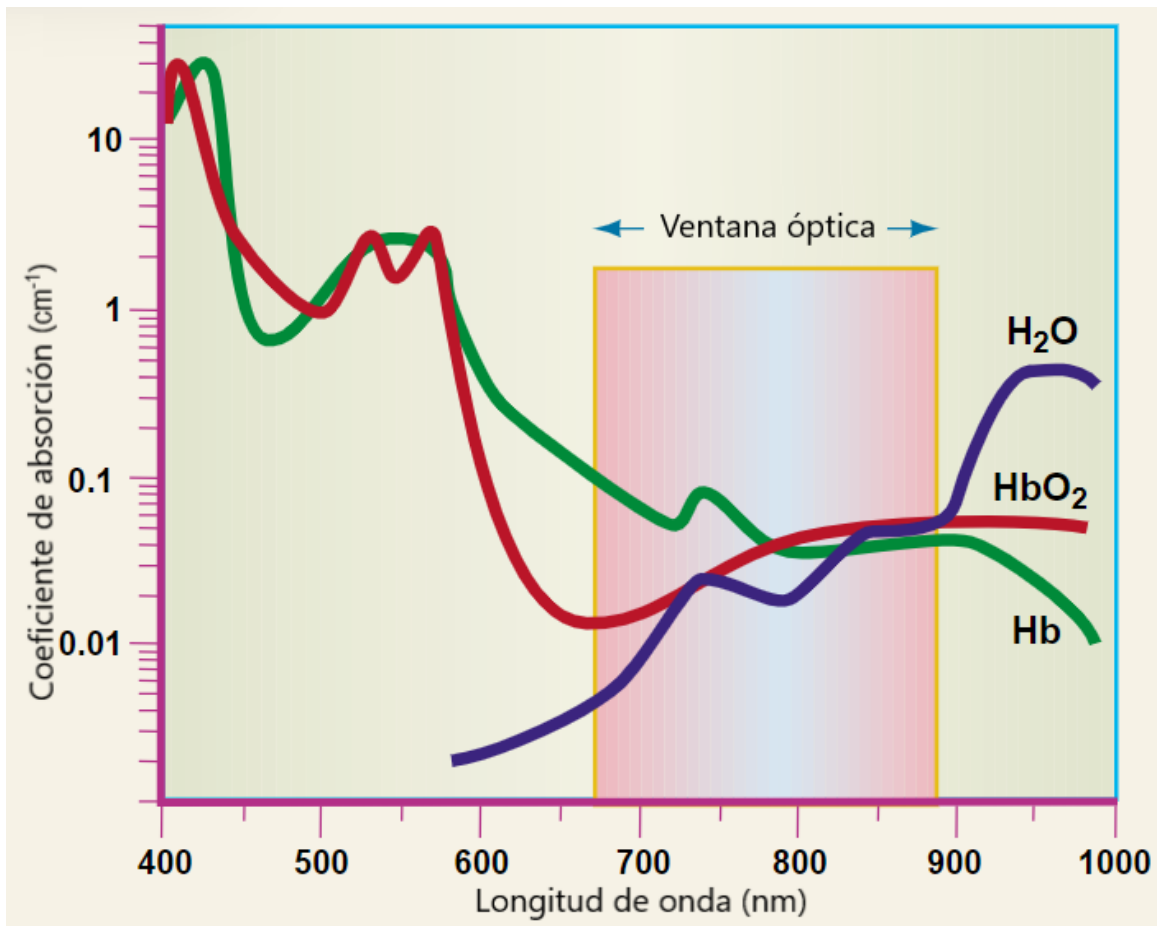


Figura 2: Ventana óptica del cuerpo humano. HbO₂: oxihemoglobina; Hb: hemoglobina (Weissleder, 2001)

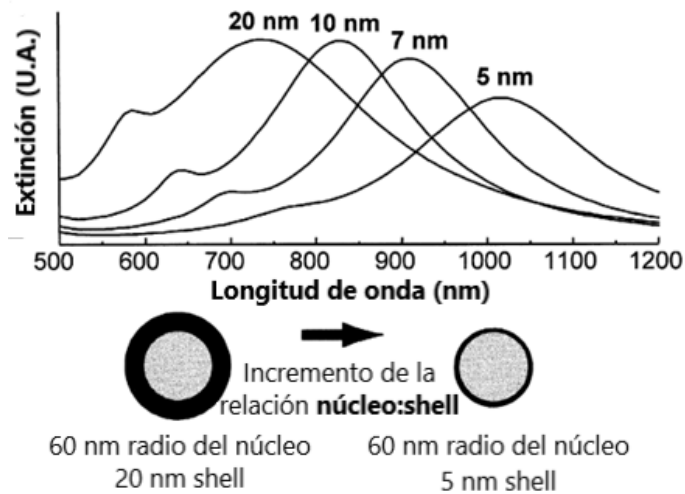


Figura 3: Efecto de la relación núcleo:shell en el corrimiento del pico de absorbancia de las NEAu-Si (Oldenburg et al., 1998)

Debido a lo expuesto anteriormente, el presente estudio está enfocado en el desarrollo de la estandarización de un proceso de síntesis que se pueda modificar para obtener NEAu-Si con diferentes dimensiones, la valoración de sus propiedades fototérmicas y la evaluación de los efectos de la administración intraperitoneal de las NEAu-Si sobre: 1) la expresión genética de las articulaciones de ratones DBA/ con AIC, 2) el análisis histológico de patas traseras y rodillas, 3) la expresión tisular de proteínas inflamatorias, 4) los cambios morfológicos óseos y 5) su efecto sistémico evaluado por citometría de flujo.

1.1. Justificación

Se ha demostrado que las nanopartículas de oro reducen la inflamación y la erosión de cartílago en modelos de ratones con AIC (Kirdaite et al., 2019). Sin embargo, debido a que estas deben mantenerse a temperaturas alrededor de los 4°C para mantener sus dimensiones y morfología, la aplicación de estos tratamientos, en la práctica, resultaría costoso e inconveniente.

Una solución para estabilizar las nanopartículas de oro es adherirlas sobre esferas de sílice produciendo NEAu-Si. Esto podría potencialmente contribuir en la mejora de la calidad de vida de pacientes con AR ya que las NEAu-Si:

- Ofrecen una alternativa más económica para la reducción de la inflamación debido a que sus costos de transporte y almacenamiento son menores comparados con los de las NPAu
- El efecto ELVIS permite que las nanoestructuras se concentren en la zona afectada sin necesidad de utilizar otros fármacos o ligandos que pudieran presentar toxicidad o aminorar los efectos superficiales del oro

Tanto las sales de oro, las nanopartículas de oro, como nanoestructuras oro-polímero han sido estudiadas para el tratamiento de AR, pero esta es la primera vez que se utilizan nanoestructuras de oro sobre núcleos de sílice.

Además de esto, las propiedades fototérmicas de las NEAu-Si amplían sus posibles aplicaciones.

1.2. Hipótesis

Las NEAu-Si se acumulan en la membrana sinovial disminuyendo los síntomas de AIC y además presentan actividad fototérmica.

1.3. Objetivo general

Sintetizar nanoestructuras de oro sobre esferas de sílice, evaluar y caracterizar su efecto antiinflamatorio, su acumulación dentro de la membrana sinovial en ratones DBA/1 con artritis reumatoide inducida por colágena, así como su actividad fototérmica.

1.4. Objetivos específicos

- Sintetizar NEAu-Si con diámetros de 71 ± 6 , 92 ± 8 y 155 ± 11 nm y caracterizarlas.
- Determinar la dosis adecuada de NEAu-Si para el diámetro de 71 ± 6 nm para ratones DBA/1 con AIC
- Diseñar el tratamiento con NEAu-Si para ratones DBA/1 con AIC, así como definir la distribución de las muestras
- Inducir artritis reumatoide por colágena en ratones DBA/1 y monitorear la evolución de la inflamación antes y durante el tratamiento
- Evaluar los efectos del tratamiento a través de histología, microscopía electrónica, tomografía, ICP, análisis bioinformático, citometría de flujo e inmunohistoquímica
- Evaluar la eficiencia fototérmica de las NEAu-Si sobre núcleos con diferentes diámetros

2. Marco teórico

En el desarrollo de biomateriales nanoestructurados, el uso del oro y la sílice amorfa han resultado de gran interés debido a que su biocompatibilidad se mejora al controlar sus dimensiones y las dosis utilizadas (Sibuyi et al., 2021). Sus aplicaciones más exploradas incluyen la mejora de imágenes de rayos X, fotoacústicas y térmicas (Moreira et al., 2018), el acarreo de fármacos (H. Lee et al., 2014) y su liberación a través de irradiación NIR y variaciones de pH (S.-M. Lee et al., 2013). Además, se ha evidenciado el efecto antioxidante de las NPAu en ratas con AIC (Kirdaite et al., 2019), lo que disminuye la erosión ósea y la inflamación (Bai et al., 2021). Por otra parte, se ha demostrado que las NPAu inhiben la proliferación de células cancerígenas (Arvizo et al., 2013), mientras que las NEAu-Si, al ser irradiadas con láser NIR, elevan su temperatura, logrando así la ablación de tumores de próstata (Rastinehad et al., 2019).

2.1. Biocompatibilidad

Las nanopartículas de oro pertenecen al grupo de partículas metálicas aprobadas por la FDA ya que pueden jugar una gran variedad de roles en la medicina (Sibuyi et al., 2021). Debido a esto, se han realizado amplias investigaciones evaluando la biocompatibilidad de sus diversos tamaños y morfologías. En particular, las nanoestructuras de oro esféricas pueden ser internalizadas por las células vía endocitosis o fagocitosis. Se ha constatado que nanopartículas pequeñas de 2.4 nm pueden entrar al núcleo celular, mientras que tamaños medianos (5.5 y 8.2 nm) se distribuyen en el citoplasma. Ambas situaciones aumentan la permeabilidad de la membrana celular reduciendo significativamente su viabilidad. Por el contrario, las partículas con dimensiones de 16 nm o mayores tienen una baja absorción por las células y se ubican en la periferia celular (P. Wang et al., 2015).

En el caso de las nanopartículas de sílice amorfo, estas se han utilizado como nanoacarreadores en aplicaciones médicas debido a su alta biocompatibilidad, hidrofobicidad y a la flexibilidad para modificar su superficie (Gonçalves, 2018). Esto las hace ideales como vehículos para la estabilización y acarreo de las nanopartículas de oro al formar nanoestructuras oro-sílice. Ya que, desafortunadamente, el sintetizar NPAu con diámetros homogéneos mayores a 16 nm es complicado (J. Dong et al., 2020), por lo que en esta investigación se optó por sintetizarlas de aproximadamente 5 nm de diámetro y estabilizarlas sobre nanopartículas de sílice con diámetros por encima de los 50 nm. Esto permite elevar el área superficial de las NEAu-Si para el posible acarreo de fármacos mientras que estas dimensiones incrementan su biocompatibilidad.

2.2. Propiedades de las NPAu

El oro nanoestructurado ha demostrado tener propiedades antioxidantes (Kirdaite et al., 2019; Leonavičienė et al., 2012) y antiinflamatorias (Ruvalcaba et al., 2022) debido a que inhiben citocinas como IL-6, TNF α y VEGF. La sobre expresión de estas citocinas es una característica de las enfermedades autoinmunes, por lo que el oro nanométrico ofrece una opción factible para su tratamiento (Koushki et al., 2021). La inhibición de citocinas a su vez promueve la restauración de las proteínas de regeneración ósea (Bai et al., 2021; Sul et al., 2010), frenan la proliferación de células cancerosas (Arvizo et al., 2013).

2.1. La artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica sistémica que ha sido tratada con oro nanoestructurado con buenos resultados. Clínicamente es una enfermedad poliarticular de inicio gradual y uno de sus mecanismos patológicos iniciales es la ruptura de la tolerancia inmunológica a autoantígenos articulares, lo que desencadena la respuesta inflamatoria. Sus principales síntomas son propiciados por la sobre producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF α y VEGF. Estas citocinas desencadenan el proceso patogénico de la AR que incluye el reclutamiento excesivo de células inflamatorias en la membrana sinovial, propiciando hiperplasia sinovial, neovascularización, erosión de cartílago y hueso que es seguida por la destrucción de la articulación y su deformación.

La inflamación de la articulación forma brechas endoteliales de hasta 700 nm en la membrana sinovial, lo que permite la extravasación y la retención de nanopartículas en el espacio intersticial (M. Yang et al., 2017). Además de las afecciones articulares, la inflamación sistémica en la AR tiene un efecto perjudicial en muchos otros órganos, incluyendo las estructuras cardiovasculares (McInnes & Schett, 2011). Los avances en la nanotecnología proporcionan diferentes métodos para llevar oro nanoestructurado a la membrana sinovial inflamada. La utilización de modelos animales permite la evaluación del efecto de estos tratamientos a nivel sistémico (González-Chávez et al., 2020; Hong et al., 2020; Schurgers et al., 2011; Vincent et al., 2012; Williams, 2005).

2.2. Modelos animales

Los modelos animales son un paso crítico para evaluar nuevas terapias potenciales en AR (Hong et al., 2020). Particularmente, AIC en ratones DBA/1 es ampliamente utilizado por su semejanza con la AR humana (Caplazi et al., 2015). Además de sus características clínicas y patológicas, AIC y AR también comparten un perfil de respuesta a varios agentes terapéuticos permitiendo la identificación de mecanismos fisiopatológicos de autoinmunidad, incluyendo el rol de los tipos de células involucradas en el inicio y la progresión de la enfermedad (Brand et al., 2007). Algunos de los mecanismos que comparten la AR y la AIC en ratones DBA/1 son la hiperplasia sinovial, el infiltrado de células mononucleares y la degradación de hueso y cartílago. Sin embargo, existen algunas características de la AR que no están presentes en la AIC en ratones DBA/1 como la ausencia del factor reumatoide, no hay preferencia de sexos y que la enfermedad es generalmente monofásica (Bevaart et al., 2010; Kollias et al., 2011). Por lo tanto, AIC en ratones DBA/1 es un antecedente común en las etapas preclínicas del desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la AR.

2.3. Diseño experimental

La eficacia del tratamiento con oro nanoestructurado en AIC depende tanto de la dosis administrada como del tamaño de la partícula y la vía de administración. Debido a que existen varias posibles combinaciones, muchos de los efectos secundarios de las nanopartículas son aún desconocidos. Es por esto que se han realizado varios estudios para evaluar diferentes tratamientos. La Tabla 1 presenta una breve recolección de experimentos donde se han utilizado tanto nanopartículas de oro como nanoestructuras con oro comparando los diámetros, dosis, vía de administración y su efecto. Al examinar los resultados, se evidenció que se tiene mayor tolerancia al tratamiento cuando los diámetros son mayores a los 50 nm, los cuales son suficientemente pequeños para atravesar por las brechas endoteliales de la membrana sinovial inflamada.

Tabla 1: Comparación del efecto del diámetro / dosis / vía de administración del tratamiento con NPAu en AIC

| Diámetro [nm] | Estructura | Peso del Au subministrado por dosis [µg] | Cepa del ratón (peso) [g] | Número de dosis | Vía de administración | Peso Au/Peso ratón ng/g | Efectos en el grupo experimental | Ref. |
|---------------|---------------------|--|---------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|---|--------------------------|
| 13 | NPAu | 1 | Wistar (195g) | 5 (1 diaria) | Intraarticular | 5.12 | Disminución de la inflamación sin efectos tóxicos | (Kirdaite et al., 2019) |
| 50 | NPAu | 3.76 | Wistar (195 g) | 5 (1diaria) | Intraarticular | 19.28 | Disminución de la inflamación y la degradación de cartílago sin efectos tóxicos | (Kirdaite et al., 2019) |
| 110 | Polímero/ Au | 0.15 | DBA/1 (30 g) | 1 | Intravenosa | 5.00 | Disminución de la inflamación y la degradación de cartílago sin efectos tóxicos | (S.-M. Lee et al., 2013) |
| 135 | Polímero / Au/Fe/Au | 0.15 | DBA/1 (30 g) | 1 | Intravenosa | 5.00 | Acumulación de las partículas en la articulación y disminución del infiltrado inflamatorio e hiperplasia sinovial sin efectos tóxicos | (Kim et al., 2015) |
| 50 | NPAu | 27,000 | ddY (27 g) | 1 | Intravenosa | 1M | Acumulación en el hígado (21.25 µg/g) y en el cerebro (9.12 µg/g) ** | (Sonavane et al., 2008) |
| 100 | NPAu | 27,000 | ddY (27 g) | 1 | Intravenosa | 1M | Acumulación en el hígado (27 µg/g) y en el pulmón (15 µg/g) ** | (Sonavane et al., 2008) |
| 200 | NPAu | 27,000 | ddY (27 g) | 1 | Intravenosa | 1M | Acumulación en el hígado (58 ug/g) y en el bazo (28 µg/g) ** | (Sonavane et al., 2008) |
| 13 | NPAu | 220 | ICR (27 g) | 14 | Intraperitoneal | 8148.15 | No se presentaron efectos tóxicos | (Zhang et al., 2010) |
| 13 | NPAu | 440 | ICR (27g) | 14 | Intraperitoneal | 16,296.30 | Pérdida de peso y baja concentración de NPAu en los órganos | (Zhang et al., 2010) |
| 37 | NPAu | 30 | BALB/C (27 g) | 21 | Intraperitoneal | 1,111.11 | Síntomas de toxicidad y fatiga. Murieron al día 21. Anormalidades en bazo, pulmón e hígado | (Chen et al., 2009) |
| 50 | NPAu | 30 | BALB/C (27 g) | 21 | Intraperitoneal | 1,111.11 | Sin indicios de toxicidad hasta el día 50 en que fueron sacrificados | (Chen et al., 2009) |
| 100 | NPAu | 30 | BALB/C (27 g) | 21 | Intraperitoneal | 1,111.11 | Sin indicios de toxicidad hasta el día 50 en que fueron sacrificados | (Chen et al., 2009) |

** µg de NPAu que se acumularon por peso en gramos del órgano

2.1. Propiedades fototérmicas de las NEAu-Si

Una de las aplicaciones más interesantes de las NEAu-Si es su implementación en el diagnóstico y la terapia fototérmica del cáncer (Rastinehad et al., 2019), que se lleva a cabo gracias a la resonancia de los plasmones de superficie del oro. Cuando una partícula metálica se expone a la luz, el campo electromagnético oscilante de la luz induce una oscilación colectiva coherente de los electrones libres de la banda de conducción. Esta oscilación de electrones en la superficie de la partícula causa una separación de cargas con respecto a la red iónica, provocando una oscilación dipolo en la dirección del campo eléctrico de la luz, como se ejemplifica en la Figura 1 (A. Yang et al., 2017). La amplitud de esta oscilación alcanza su máximo a una frecuencia específica, llamada resonancia de los plasmones de superficie, que induce una fuerte absorción de la luz incidente, que posteriormente es irradiada en forma de calor. La frecuencia específica de resonancia de las partículas depende del metal del que están compuestas, así como de su tamaño, forma y estructura (X. Huang & El-Sayed, 2010).

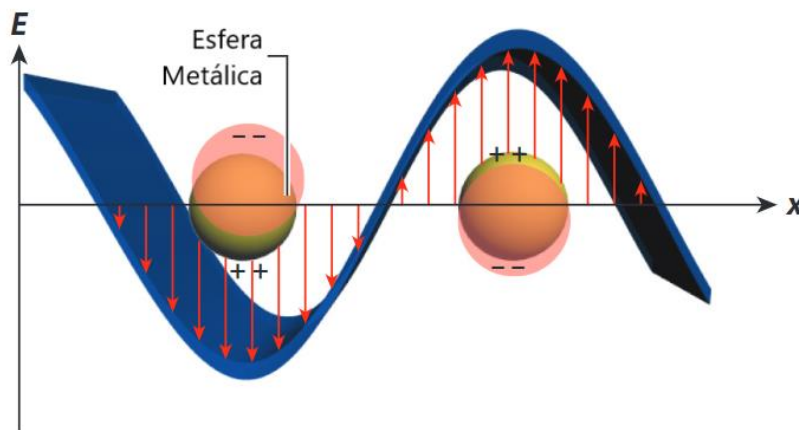


Figura 4: Imagen representativa de la resonancia de un plasmón en una esfera metálica nanométrica (A. Yang et al., 2017)

En el caso de las NEAu-Si, la resonancia máxima de los plasmones de superficie depende de la relación radio del núcleo de sílice / espesor de la capa de oro (Oldenburg et al., 1998). De tal manera que entre más grande es esta relación, mayor es la longitud de onda de la resonancia máxima de los plasmones de superficie (Figura 3), llegando a rangos del NIR. Es de interés que la radiación NIR en el rango de 650-900 nm es donde, tanto el agua, la oxihemoglobina, como la hemoglobina, tiene el menor coeficiente de absorción (Figura 2), por lo que a este rango se le conoce como la ventana óptica del cuerpo humano (Weissleder, 2001). Es por esto que las dimensiones de las NEAu-Si se diseñan de tal manera que la resonancia máxima de su plasmon superficial se alcance dentro de este intervalo. De tal manera que, mientras las nanoestructuras absorben al máximo, el tejido no se ve afectado, obteniendo así la mayor eficiencia fototérmica ya que un mayor porcentaje de la irradiación es convertido en calor.

2.2. NEAu-Si para el acarreo y liberación de fármacos

El acarreo y liberación de fármacos es una de las aplicaciones de las NE-Au-Si más utilizada debido a su amplia área superficial. La liberación de dichos fármacos se lleva a cabo al irradiar las nanoestructuras con longitudes de onda NIR. Estas, al calentarse, rompen los enlaces entre el oro y el fármaco, liberándolo únicamente en la zona irradiada. Para que este método sea eficiente, las dimensiones de las NPAu-Si deben ser tales que permitan tanto su acumulación en el área de interés, como su calentamiento con estas longitudes de onda (S.-M. Lee et al., 2013). De esta manera, se logra un efecto quimio-fototérmico que se ha empleado tanto para la AR (Kim et al., 2015), como para la ablación de tumores de próstata (Rastinehad et al., 2019).

3. Materiales y métodos

En este capítulo se detallarán el método de síntesis de las NEAu-Si, el diseño del estudio experimental con el que se evaluó su efecto antiinflamatorio en ratones DBA/1 con AIC, así como la valoración de la eficiencia fototérmica de NEAu-Si con diferentes diámetros (Figura 5).

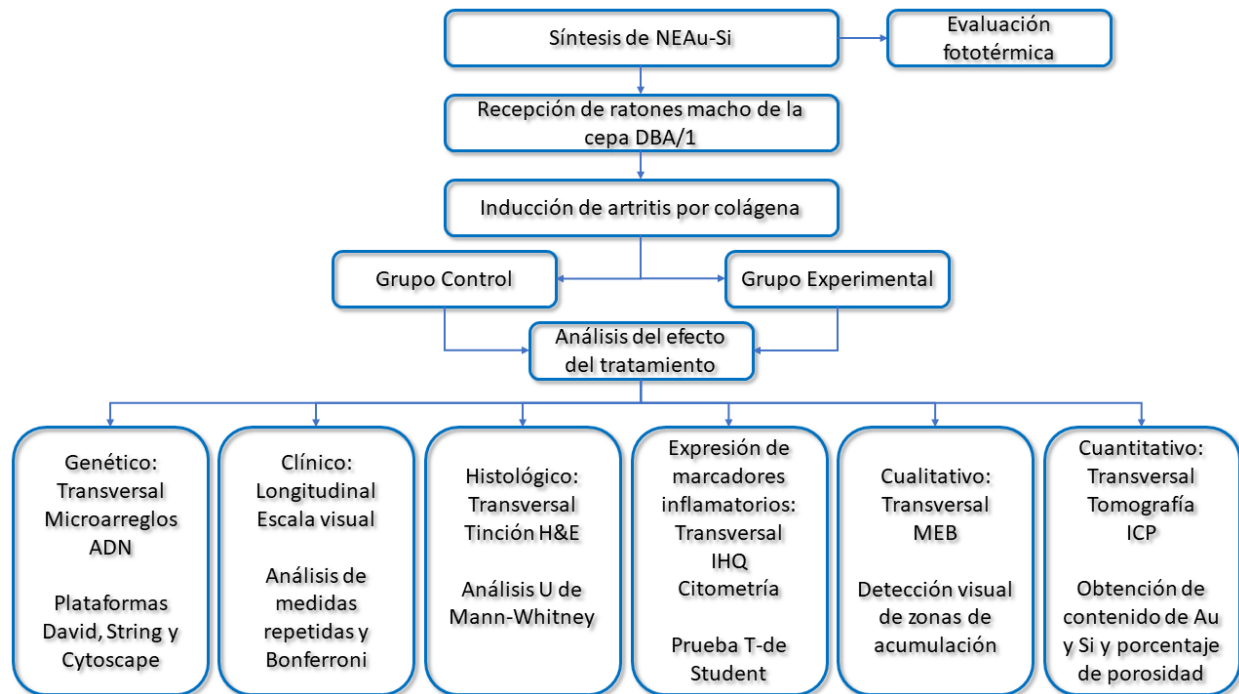


Figura 5: Diagrama de flujo de actividades

3.1. Consideraciones éticas

Debido a que la experimentación con ratones requiere de procedimientos, métodos y técnicas que deben atender las estipulaciones éticas pertinentes documentadas en las normas, reglamentos y/o manuales nacionales e internacionales para la realización de proyectos de investigación en animales, los siguientes documentos fueron utilizados:

- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio
- Guide for the care and use of laboratory animals (Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.), 2011)
- Norma Oficial Mexicana NOM 087-ECOL-SSA1-2002 para la protección ambiental -- Salud ambiental -- Residuos peligrosos-infecciosos -- Clasificación y especificaciones de manejo
- Comité CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio) de la Universidad Autónoma de Chihuahua con número de registro interno CI-051-21.

3.2. Reactivos

Los reactivos utilizados para la síntesis de las NEAu-Si y las pruebas de laboratorio fueron: tetraetil ortosilicato (TEOS) (98%), 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) (99%), ácido cloro áurico (HAuCl_4) (99%), ácido nítrico (HNO_3) (65-67%), adyuvante completo de Freund, colágena de tabique nasal bovino tipo II, trietoxietil silano, tritón, estreptavidina, diaminobencidina y tripsina de la marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.). El hidróxido de amonio (28%), hidróxido de sodio (98%) y etanol absoluto (99.9%) fueron de la marca J.T. Baker (Pennsylvania, E.U.). El Kit RNeasy lipid tissue fue de QIAGEN (Hilden, Alemania) y el kit de matriz de perlas citométricas para inflamación de ratón de BD Biosciences (San Diego, California, E.U.). La hematoxilina y eosina (H&E) fueron Merck, (Darmstadt, Alemania). Los anticuerpos primarios para la inmunohistoquímica (IHQ) se obtuvieron de SantaCruz Biotechnology (California, E.U.), mientras que los anticuerpos secundarios conjugados con estreptavidina-peroxidasa fueron de la marca Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc (Pensilvania, E.U.). Todos los reactivos son de grado analítico sin ninguna purificación previa a su uso.

3.3. Síntesis de NEAu-Si

La síntesis de las NEAu-Si consistió en la preparación de las esferas de sílice, su funcionalización y finalmente el depósito de NPAu. Para obtener las esferas de sílice con arreglo atómico de corto alcance se utilizó una modificación del método Stöber (Ghimire & Jaroniec, 2021). En esta investigación se sintetizaron núcleos de sílice de 63, 83 y 132 nm variando el volumen de etanol absoluto entre los 30 y 50 ml (Tabla 2). La síntesis consistió en mezclar diferentes cantidades de etanol, 5 ml agua desionizada y 1.5 ml de hidróxido de amonio a 50°C por 10 minutos con agitación magnética. Después se agregaron por goteo 1.5 ml de TEOS. La temperatura y agitación magnética se mantuvieron constantes por 2 horas. Las esferas de sílice obtenidas fueron centrifugadas 3 veces a 6000 rpm por 15 minutos y redispersadas etanol absoluto a un volumen final 40 ml.

Su diámetro se determinó mediante un microscopio electrónico de barrido con emisión de campo (FESEM) JEOL JSM7401F. La distribución de tamaño de partícula se realizó a través del software ImageJ midiendo al menos 200 partículas de cada muestra. Posteriormente, se calculó el número de partículas de sílice (C_s) sintetizadas utilizando la Ecuación 1, la cual asume monodispersidad en el diámetro de las partículas de sílice y la completa reacción del TEOS. La constante en la Ecuación 1 se obtuvo tomando en cuenta el peso molecular del TEOS (208.33 g/mol); su densidad (0.933 g/ml) (van Blaaderen & Vrij, 1993); y el volumen de la esfera de sílice, que varía de acuerdo a su diámetro (ds) en nanómetros.

$$C_s = \frac{2.58 \times 10^{20}}{ds^3} \chi \frac{\text{volumen de TEOS (ml)}}{\text{volumen total de solución (ml)}} = \frac{\text{partículas de sílice}}{\text{ml de solución de sílice}} \quad (\text{Ec. 1})$$

El propósito de la funcionalización de las partículas de sílice es cubrir su superficie con moléculas de APTES. Se recomienda agregar APTES en exceso, de tal manera que la relación del área cubierta por la molécula del organosilano entre el área total de la partícula de sílice sea 12 (Hirsch et al., 2005). Se usó la Ecuación 2 para calcular el volumen requerido de solución de 12mM APTES en etanol al 75% necesario para alcanzar esta relación. Se estimó que el área que cubre una molécula de APTES es de 0.6 nm² (Westcott et al., 1998). La constante utilizada en la Ecuación 2 toma en cuenta el peso molecular (221.37 g/mol) y la densidad (0.949 g/ml) del APTES y considera el área superficial de la esfera de sílice, que cambia con respecto a su diámetro (ds). Los diferentes volúmenes de solución de 12mM APTES necesarios para funcionalizar 40 ml de solución de partículas de sílice fueron agregados a la Tabla 2. El proceso de funcionalización consistió en mezclar con agitación magnética 40 ml de solución de partículas de sílice con el volumen de solución 12mM de APTES calculado con la Ecuación 2 a 70°C por 2 horas. La solución obtenida fue centrifugada 3 veces a 6000 rpm por 15 minutos y se redispersaron en 40 ml agua desionizada.

$$ml\ 12mM\ APTES = 8.69 \times 10^{-18} \times ds^2 \times Cs \times ml\ de\ solución\ de\ sílice\ usados \quad (Ec.\ 2)$$

Para cubrir las esferas de sílice funcionalizado con NPAu se utilizó una modificación del método deposición - precipitación publicado por Kah y su equipo (Kah et al., 2008). Este método consiste en mezclar una solución de pH \approx 8 constituida por 20 ml de 6.25mM HAuCl₄ y 6.65 ml de 0.1M NaOH a temperatura ambiente por 15 minutos y después calentarla a 95°C con agitación magnética. Una vez alcanzada esta temperatura, se agrega la solución de sílice funcionalizado manteniendo la temperatura y la agitación magnética por 30 minutos. Para determinar este volumen de sílice funcionalizado que se puede decorar exitosamente con NPAu contenidas en la solución de oro, se utilizó la Ecuación 3. En esta ecuación se usa una relación área transversal de NPAu de 5 nm a área superficial de partícula de sílice funcionalizada igual a 1.5, tal como fue exitosamente utilizada por Hirsch (Hirsch et al., 2005) y Brinson (Brinson et al., 2008). La constante de la Ecuación 3 fue obtenida considerando el peso molecular del HAuCl₄ (196.96 g/mol), la densidad del oro (19.3 g/cm³), y el volumen de una nanopartícula de oro de 5 nm de diámetro. Las NEAu-Si obtenidas fueron centrifugadas 3 veces a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C y redispersadas en 10 ml de agua desionizada.

$$ml\ sílice\ funcionalizado = \frac{3.25 \times 10^{17}}{Cs \times ds^2} \quad (Ec.\ 3)$$

Las NEAu-Si fueron usadas sin más modificaciones. Sus dimensiones fueron estimadas utilizando microscopia electrónica de transmisión (MET) en el microscopio Hitachi 7700 y el software ImageJ midiendo al menos 200 partículas de cada muestra. También se obtuvieron los patrones de difracción y micrografías de alta resolución empleando microscopia electrónica de transmisión (HR-MET) tanto de los núcleos de sílice como de las NPAu usando el microscopio JEOL JEM 2200FS+CS. Los potenciales zeta de los núcleos de sílice disueltos en etanol, de las partículas de sílice funcionalizadas disueltas en agua y de las NEAu-Si también disueltas en agua se obtuvieron utilizando el Malvern ZetaSizer Nano ZS. Su contenido de oro se cuantificó por ICP en el espectrómetro de emisión Thermo Scientific iCAP 6500. La solución coloidal fue esterilizada con un tratamiento de luz ultravioleta de 24 horas.

Tabla 2: Volúmenes utilizados para la síntesis de NEAu-Si con diferentes diámetros

| Diámetro del núcleo de sílice [nm] | Etanol [ml] | Volumen total de la síntesis de sílice [ml] | Partículas obtenidas (Cs) | 12mM APTES [ml] | Sílice Funcionalizado [ml] |
|------------------------------------|-------------|---|---------------------------|-----------------|----------------------------|
| 62.78±5.45 | 50 | 58 | 3.91x10 ¹³ | N/A | N/A |
| 63.42±5.25 | 45 | 53 | 3.79x10 ¹³ | 53.06 | 2.13 |
| 83.61±6.81 | 40 | 48 | 1.66x10 ¹³ | 40.25 | 2.81 |
| 132.23±10.9 | 35 | 43 | 4.18x10 ¹² | 25.45 | 4.44 |
| 157.96±15.08 | 30 | 38 | 2.45x10 ¹² | N/A | N/A |

3.4. Diseño del estudio experimental para evaluar el efecto antiinflamatorio

El efecto antiinflamatorio de las NEAu-Si se evaluó en un modelo animal utilizando ratones macho de la cepa DBA/1 de entre 8 y 12 semanas de vida al inicio del estudio. Estos fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua y fueron resguardados en una habitación a una temperatura de 22±2°C con un ciclo alternado de 12 horas luz/obscuridad. Se adecuaron jaulas estándar para mantener 4 ratones en un espacio de 9x25 cm o 56 cm² por ratón como se muestra en la Figura 6. Los animales tuvieron acceso libre a la alimentación e hidratación. El contenido nutricional del alimento es 23% proteína, 6.5% grasa, 1% calcio, 4% fibra y 0.65% fósforo (Formula b Chow 508 registro SAGARPA A-0207-050) y se hidrataron con agua purificada. El protocolo experimental para este trabajo fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación y por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales con aprobación número CI-051-21.

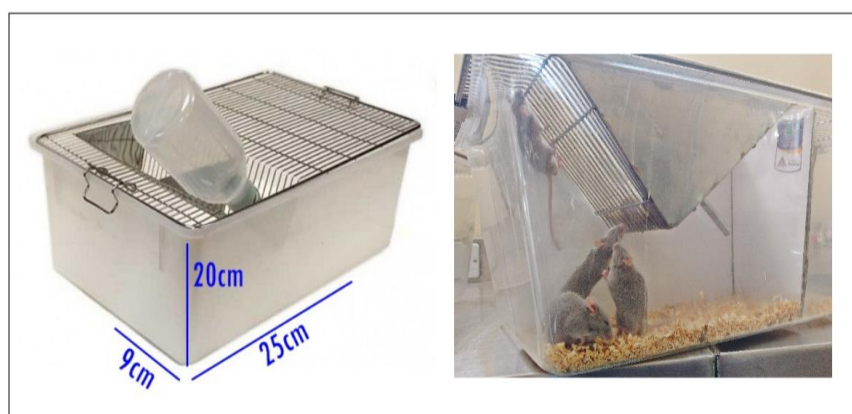


Figura 6: Dimensiones de la jaula utilizada en el estudio experimental del modelo AIC

3.5. Determinación de la dosis de NEAu-Si

Los tiempos y las dosis de NEAu-Si se determinaron con base en los usados por Kirdaite y su equipo (Kirdaite et al., 2019) y analizando la relación concentración de oro / toxicidad empleados por Zhang y su equipo (Zhang et al., 2010). Estos datos se muestran en la Tabla 1. Ya que en los experimentos utilizan diferentes cepas de ratón en las cuales los ratones tienen diferente peso, se calculó la relación ng de oro por gramo de peso del ratón para correlacionar la información con los ratones que se utilizaron en este experimento.

Los ratones a utilizar en el experimento de la cepa DBA/1 pesan aproximadamente 20g. Debido a su pequeño tamaño, se opta por inyectarlos vía de intraperitoneal. Se decidió inyectar NEAu-Si con un diámetro final de 71 ± 6 nm porque se encuentran en el rango de tamaño que se tiene evidencia penetra a través de la membrana sinovial y se acumula en la articulación, gracias al efecto de extravasación de nanoestructuras a través del efecto ELVIS (Q. Wang & Sun, 2017) como se ilustra en la Figura 1. La dosis de $64.25 \mu\text{g}$ de NEAu-Si ($3.21 \mu\text{g}$ NEAu-Si / g de peso de ratón) se consideró adecuada, ya que no hay conocimiento de toxicidad para esa concentración, tamaño y vía de administración. Esta dosis corresponde a $54.61 \mu\text{g}$ de oro y $9.63 \mu\text{g}$ de sílice.

3.6. Definición de variables y unidades de medida

Para realizar el análisis estadístico se consideraron variables cualitativas y cuantitativas de acuerdo a la naturaleza de cada experimento. En la Tabla 3 se definen las variables, sus indicadores y su escala de medición.

Tabla 3: Definición de las variables del estudio y unidades de medida

| Variable | Tipo de variable | Definición operacional | Indicadores | Escala de medición | Como se medirá la variable |
|-------------------------------|------------------|--|--|---|----------------------------|
| Variable independiente | | | | | |
| Modelo de Artritis | Cualitativa | Estrategia realizada en ratones que asemejan los procesos patogénicos presentes en la enfermedad humana. | Forma en la que se genera la artritis. | Nominal: 1. Ausente 2. Modelo de artritis inducida por colágena | Escala visual |

| Variable dependiente | | | | | |
|-----------------------------|--------------|---|---|---|---|
| Artritis clínica | Cualitativa | Hinchazón y deformidad en las extremidades. | Nivel de hinchazón y deformidad en las extremidades. | Ordinal: 0: ausente 1: inflamación en un dedo 2: inflamación de dos o más dedos 3: inflamación masiva en tobillo 4: inflamación y anquilosis | Escala visual |
| Artritis histológica | Cualitativa | Infiltrado inflamatorio. | Nivel de infiltrado inflamatorio. | Ordinal: 0: ausente 1: leve 2: moderado 3: severo | Observación microscópica de tinciones con H&E |
| | | Hiperplasia sinovial. | Nivel de hiperplasia encontrada en la observación histológica de las patas traseras. | | |
| | | Erosión del cartílago. | Erosión de cartílago en las extremidades traseras. | | |
| | | Erosión de hueso | Erosión de hueso en las extremidades traseras. | | |
| | | Neoformación de hueso | Observación de neo formación ósea en los tejidos de las extremidades inferiores en la histología. | | |
| Genes expresados | Cuantitativa | Genes transcritos a moléculas de ARN | Cantidad de genes sobre y sub expresados en hueso tarsal de ratón (puntuación Z \geq 1.1 desviaciones estándar) | De razón | Microarreglo de ADN |
| Vías de señalización | Cuantitativa | Grupo de genes asociados en vías de señalización ya descritas | Cantidad de vías sobre y bajo reguladas ($p < 0.05$) | De razón | Análisis bioinformático del microarreglo de ADN (DAVID bioinformatic resource v6.8) |
| | Cualitativa | | Nombre de la vía de señalización asociada | Nominal | |
| Procesos biológicos | Cuantitativa | Grupo de genes asociados en procesos biológicos ya descritos | Cantidad de procesos sobre y bajo regulados ($p < 0.05$) | De razón | |
| | Cualitativa | | Nombre de los procesos asociados | Nominal | |
| Niveles de expresión de ARN | Cuantitativa | Cuantificación relativa y/o absoluta de genes específicos | Expresión relativa y/o número de copias | De razón | |

3.7. Inducción de artritis por colágena y tratamiento con NEAu-Si

Se utilizaron un total de 18 ratones a los que se les indujo artritis por colágena, pero solo 14 ratones presentaron inflamación en las articulaciones. Estos resultados concuerdan con los reportados por Caplazi, ya que se espera solo un 80% de éxito en la inducción (Caplazi et al., 2015). El proceso de inducción consta de 2 inyecciones, la primera, con adyuvante completo de Freund que contiene *M. tuberculosis* y colágena y se aplicó el primer día del proceso. La segunda inyección de adyuvante incompleto de Freund (sin *M. tuberculosis*) fue aplicada el día 21, marcando el inicio de la fase pre-clínica en la que un 40% de los ratones empezaron a presentar síntomas de AIC (Brand et al., 2007).

Para la inducción primero se prepara el adyuvante completo de Freund, que es una mezcla de Arlacel A al 15% en aceite de parafina. A este se le agregaron 4 mg/ml de *M. tuberculosis* desactivado con calor. La colágena de tabique nasal bovino tipo II se disolvió en 0.05 M de ácido acético. Finalmente, ambas mezclas se combinaron en una relación 2:1 colágena:adyuvante. 50µl de esta emulsión fue inyectada el primer día de la inducción vía intradérmica en la base de la cola.

El adyuvante incompleto de Freund consiste en Arlacel A al 15% en aceite de parafina mezclado con colágena bovina tipo II disuelta en 0.05 M de ácido acético en una relación 1:1. 50µl de esta emulsión fue inyectada el día 21 de la inducción vía intradérmica. Las inyecciones para la inducción de artritis se realizaron bajo anestesia con isoflurano. Los animales fueron expuestos a isoflurano en una cámara y por monitoreo visual se determinó el punto en el cual se pudieron inyectar sin generar sufrimiento al animal. También se cuidó que las inyecciones de inducción tuvieran un espaciamiento de 1 cm y se evitó inyectar sobre tejido inflamado por la primera inmunización para evitar infecciones y/o lastimar al ratón.

Una vez que los ratones presentaron inflamación nivel 3, de acuerdo a los estándares utilizados en este método (Brand et al., 2007), fueron separados aleatoriamente en 2 grupos, AIC-control y AIC-experimental y se inició el tratamiento. Este consistió en 10 dosis de 100µl de agua desionizada con 64.25 µg de NEAu-Si para el grupo AIC-experimental y 100 µl de solución salina para el grupo AIC-control. Las inyecciones se aplicaron vía intraperitoneal tres veces por semana. Los animales fueron sacrificados 26 días después de la última dosis exponiéndolos a isoflurano hasta que perdieran sus signos vitales, evitando así su sufrimiento. La disposición final del animal se realizó conforme a la Norma NOM 087-ECOL-1987, en la cual se especifica que este debe ser depositado en congelador en bolsa amarilla hasta el momento de la disposición final. En la Figura 8 se muestra el desarrollo del experimento en relación al tiempo, indicándose los días en los que se realizó la inducción de la artritis, el tratamiento y el sacrificio de los ratones.

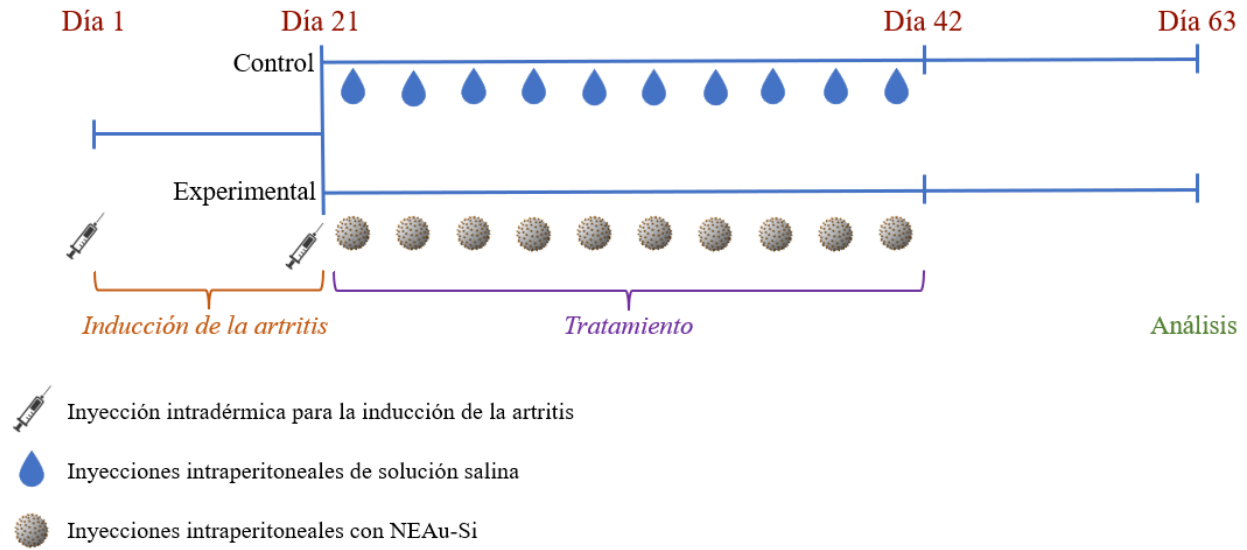


Figura 7: Etapas del experimento para evaluar el efecto de las NEAu-Si en AIC

3.8. Evaluación clínica de la artritis

Una vez que los ratones alcanzaron una inflamación nivel 3, se seleccionaron dos ratones con puntajes iguales o parecidos, uno para el grupo AIC-control y el otro para el grupo AIC-experimental, y se inició el tratamiento. Se realizó un registro de los niveles de inflamación para comparar los puntajes clínicos totales de ambos grupos, la evaluación se hizo los días en los que se les aplicó el tratamiento. Estos registros se realizaron como se indica en las Tablas 6 y 7 para el grupo AIC-control y AIC-experimental, respectivamente. Al grupo AIC-control se le aplicaron inyecciones de 100 μ l de agua salina tres veces por semana hasta alcanzar 10 dosis. Al grupo AIC-experimental se le aplicaron inyecciones con 64.25 μ g de NEAu-Si disueltas en 100 μ l de agua desionizada con la misma frecuencia y número de dosis.

La evaluación clínica de la inflamación de las patas traseras y delanteras de los ratones se realizó de manera semi-cuantitativa utilizando una escala del 0 al 4 (Tabla 4) en donde el 0 corresponde a las características clínicas de una pata normal y del 1 al 4 se emplearon para representar el grado de artritis de acuerdo con lo descrito por Brand et al., (Brand et al., 2007). La Figura 8 ejemplifica cada uno de estos grados de severidad. Las evaluaciones se realizaron de manera estandarizada y visual tres veces por semana a la misma hora del día.

Tabla 4: Puntaje para la evaluación subjetiva de la severidad de la artritis

| Puntuación de severidad | Grado de inflamación |
|-------------------------|--|
| 0 | No hay evidencia de eritema o hinchazón |
| 1 | Eritema e hinchazón leve confinados a las articulaciones de tarso o tobillo |
| 2 | Eritema e hinchazón leve que se extiende desde el tobillo hasta el tarso |
| 3 | Eritema y tumefacción moderada que se extiende desde el tobillo a las articulaciones de los metatarsos |
| 4 | Eritema e hinchazón severa que abarcan el tobillo, pie y dígitos, o anquilosis de la extremidad |



Figura 8: Evaluación del grado de severidad de la AIC en la pata trasera derecha

3.9. Distribución de las muestras

Después de 21 días de la última dosis, todos los ratones fueron anestesiados con isoflurano y se extrajo una muestra de sangre periférica por punción cardiaca que se centrifugó inmediatamente para obtener el suero. Posteriormente, los animales fueron humanamente sacrificados usando isoflurano. Sus riñones, hígados, bazo y membranas sinoviales fueron extraídos y fijados en solución McDowell-Trump (Murtey & Ramasamy, 2016). Las patas traseras y delanteras de dos de los ratones de cada grupo fueron fijadas en formol para ser luego analizadas por tomografía computacional. La mitad de las patas traseras restantes se colocaron en nitrógeno líquido, pulverizaron con un disruptor tisular y se almacenaron a -80°C hasta que se realizó la extracción de ARN. La otra mitad de las patas traseras se fijaron en formalina para su análisis histológico e inmunohistoquímico.

3.10. Análisis de las membranas sinoviales por Microscopia electrónica de barrido

Las membranas sinoviales obtenidas del grupo AIC-experimental previamente fijadas en solución McDowell-Trump fueron liofilizadas para preservar su estructura tisular. Para esto las membranas se adhirieron a un portamuestras conductivo, se sumergieron en nitrógeno líquido por 5 min, se introdujeron a un sistema de vacío llegando a una presión de 13Pa donde se mantuvieron por 17 min y finalmente se recubrieron con carbono por evaporación en un sistema Cressington 208. La morfología de las membranas fue analizada por FESEM y MEB. La composición elemental de las membranas sinoviales, riñones, hígados y bazos fueron determinadas por espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS) en el equipo Oxford x-MaxN y los datos obtenidos fueron procesados con el software Aztec v6.1.7601.

3.11. Preparación de las muestras para ICP

Los riñones, hígados y bazos fueron desecados por 3 horas a 60°C, pesados y digeridos en agua regia a 110°C durante 14 horas. La solución resultante fue filtrada y diluida en agua desionizada a un volumen final de 50ml. Después, esta solución que contiene iones de oro y silicio, fue analizada por ICP.

3.12. Evaluación histológica

Para la evaluación histológica, las patas traseras y rodillas fueron seccionadas en mitades, se les retiró la piel y se fijaron en formol al 10% en PBS 1X pH 7.4 en un volumen de al menos 50 veces mayor al tejido por un periodo de 48 horas a temperatura ambiente. Los huesos se descalcificaron en ácido nítrico al 5% a temperatura ambiente por 48 horas con cambio de la solución cada 12 horas (González-Chávez et al., 2013). La formación de los bloques de parafina se realizó en el centro de embebimiento en parafina EC-350 (Microm), utilizando los casetes Tissue-TEX (Sakura) y colocando un tejido por bloque. Luego se realizaron cortes de 3.0 µm en el microtomo con retracción HM325 (Microm). Los tejidos se colocaron en portaobjetos tratados con trietoxietil silano para favorecer la adherencia del tejido.

Las laminillas se colocaron a 60°C en el horno de desparafinación por 60 minutos y se tiñeron de acuerdo a los siguientes pasos: 3 baños de 8 minutos en xileno, 2 enjuagues en alcohol etílico de 96°, 1 enjuague con agua destilada, 1 baño de 5 minutos en hematoxilina, 1 enjuague en agua destilada, 1 enjuague en agua acidificada (1% HCl), 1 enjuague en agua destilada, 1 enjuague en agua amoniacada, 1 enjuague en agua destilada, 2 enjuagues en alcohol etílico de 96°, 1 baño de 30 segundos en eosina, 3

enjuagues en alcohol etílico de 96°, 1 enjuague en alcohol etílico absoluto y 2 enjuagues en xileno. Finalmente, se colocó la resina (Entellan, Merck) y el cubreobjetos.

Las tinciones de hematoxilina (colorante básico) y eosina (colorante ácido) tiñen de diferente color las estructuras de las muestras (el colágeno: presenta una coloración rosa pálido, el músculo: rosa fuerte, la queratina: rojo intenso, el citoplasma: rosado, los núcleos: azul oscuro o púrpura, los eritrocitos: color cereza). Posteriormente se revisaron en el microscopio óptico (Axiostar plus, Zeiss) donde se evaluaron de manera semicuantitativa los efectos del tratamiento con NEAu-Si usando la escala: 0=ausente, 1=leve, 2=moderado y 3=severo para el infiltrado inflamatorio, hiperplasia sinovial, erosión de cartílago, erosión de hueso y neoformación ósea.

3.13. Microarreglo de ADN y análisis bioinformático

El efecto del tratamiento con NEAu-Si en la expresión genética fue evaluado utilizando microarreglo de ADN para el análisis transcriptómico, comparando al grupo experimental con el grupo control. Este análisis se llevó a cabo por el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México, en donde a la muestra control se le agregó fluoróforo Cy3, cianina color verde y a la muestra experimental fluoróforo Cy5, cianina color rojo. Después se analizaron ambas muestras en un chip de microarreglo M22K_01 (UNAM, CDM) para genoma completo de ratón con 22,000 genes. Finalmente, se midió la sobre expresión de cada uno de los 22,000 genes con un lector de fluorescencia que calcula el puntaje Z de cada gen, siendo significativos aquellos puntajes ≥ 1.5 desviaciones estándar (DE) de diferencia entre el control con respecto al experimental como se muestra en la Figura 9.

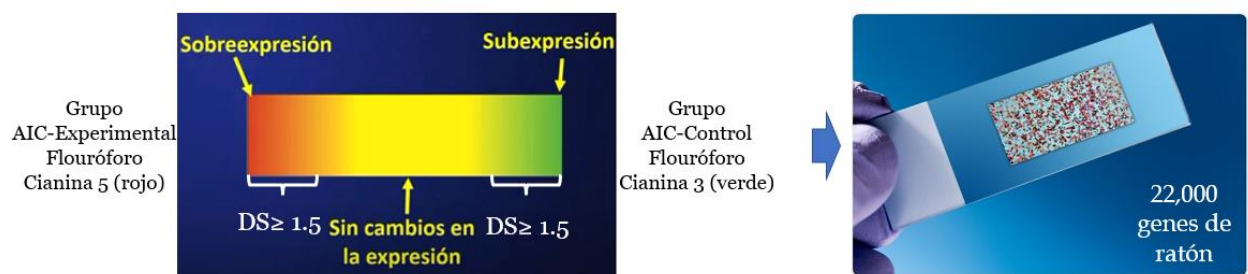


Figura 9: Interpretación de la coloración durante la lectura de los resultados del microarreglo de ADN

Para la obtención de ADN que se analizó por microarreglo se llevó a cabo el siguiente procedimiento con cada una de las patas traseras derechas del grupo control y grupo experimental. Primero, el ARN fue extraído de las patas traseras disectadas utilizando el kit RNeasy lipid tissue (Qiagen). Para esto, se pulverizó el tejido en nitrógeno líquido con ayuda del disruptor de tejido, el polvo se colocó en microtubo de 1.5 ml y se homogenizó con 1ml de QIAzol Lysis Reagent 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se agregaron 200 μ l de cloroformo. Se agitó vigorosamente por 15 segundos e incubó a temperatura ambiente por 2-3 minutos. Se centrifugó a 12,000 x g durante 15 minutos a 4°C

Nota: Después de la centrifugación, la muestra se separó en 3 fases: una superior incolora, fase acuosa que contiene el ARN; una interfase blanca; y una fase orgánica inferior, roja, con alto contenido de grasa. El volumen de la fase acuosa fue de aproximadamente 600 μ l.

Se transfirió la fase acuosa a un microtubo nuevo de 1.5 ml y se agregaron 600 μ l de etanol 70%. Se mezcló por vórtex y se transfirieron 700 μ l a la columna de centrifugación RNeasy Mini. Se centrifugaron los tubos a 8000 x g por 15 segundos a temperatura ambiente y se descartó el fluido del tubo de colección. Se cambió el tubo de colección y se repitieron los pasos anteriores hasta que todo el líquido pasó por la columna.

Luego, se agregaron a la columna 700 μ l de buffer RW1 y se centrifugaron a 8000 x g por 15 segundos a temperatura ambiente. Se descartó el fluido del tubo de colección y se cambió de tubo de colección. Se agregaron a la columna 500 μ l de buffer RPE y se centrifugaron a 8000 x g por 2 minutos. Se descartó el flujo del tubo de recolección, se cambió el tubo de recolección y se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto. Se colocó la columna en un microtubo de 1.5 ml y se agregaron a la columna 30 μ l de agua libre de ARNsas. Se centrifugó a 8000 x g por 1 minuto y se guardó el ARN eluído a -20°C para su posterior uso.

Para conocer la concentración, calidad e integridad del ARN en la muestra, se utilizó el Fluorometro Qubit Flex 4 (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el siguiente procedimiento con cada una de las muestras:

Se preparó la solución de trabajo diluyendo Qubit working solution 1:200 en Qubit buffer y se depositaron 180 μ l de la solución de trabajo en un vial de 1.5 ml con 20 μ l de la solución de ARN de cada muestra en viales separados. Se mezclaron todos los viales con vórtex por 2-3 segundos, se incubaron por 2 minutos a temperatura ambiente y se insertaron en el Fluorometro Qubit para tomar la lectura. Una vez obtenida la concentración de ARN en el fluido, se calculó el volumen de fluido necesario para tener la cantidad de necesaria de ARN para el análisis por microarreglo.

Para el microarreglo, se prepararon dos mezclas, una por grupo, con cantidades equimolares de ARN de cada ratón. El análisis del microarreglo fue realizado por el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México. El cADN fue sintetizado y marcado para su subsecuente hibridación en el microchip Rn5K que contiene 22,000 genes de ratón. El barrido y la adquisición de la señal se realizó utilizando el ScanArray 4000. El software GenArise fue utilizado para el análisis del barrido del microarreglo, obteniendo las listas de GED con puntaje $Z \geq 1.5$ desviaciones estándar (DE).

Para evaluar la relevancia biológica de los GED se utilizó la plataforma DAVID Bioinformatics Resources v6.8 (D. W. Huang et al., 2009) obteniendo las vías de señalización de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y los procesos biológicos con asociación significativa ($p \leq 0.05$). También se usó la base de datos STRING 11.5 (Szklarczyk et al., 2019) para obtener el análisis e integración de las interacciones proteína - proteína (IPP) directas e indirectas centradas en su asociación funcional. Los GED identificados en el microarreglo fueron cargados y sus interacciones seleccionadas con confianza mínima (puntaje de interacción > 0.4). La red de IPP obtenida fue analizada más a profundidad empleando el software Cytoscape versión 3.7.0 (Shannon et al., 2003) con el complemento de detección de complejos moleculares MCODE (Bader & Hogue, 2003) obteniendo agrupamientos de subredes primarias. Las tres primeras subredes obtenidas con el complemento MCODE para los genes sobre- y sub-regulados fueron cargados a STRING para identificar las vías de señalización KEGG asociadas con la patogenia de la AR. Estas vías fueron seleccionadas y marcadas con diferentes colores para identificar los genes con la mayor interacción dentro de las vías de interés.

3.14. Inmunohistoquímica

En el análisis inmunohistoquímico se utilizaron los anticuerpos TNF, IL-6, NF- κ B y VEGF. Para este análisis, las articulaciones fueron descalcificadas con 5% ácido nítrico por 24 horas (González-Chávez et al., 2013). Los tejidos fueron deshidratados en diferentes grados de etanol, embebidos en parafina, seccionados y finalmente desparafinados. Para la recuperación antigénica, se utilizó tripsina (0.05%) por 20 minutos a 37°C. La permeabilización se realizó con tritón al 0.2% en buffer de fosfato salino (PBS) por 20 minutos a temperatura ambiente, mientras que el bloqueo se realizó con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS por 30 minutos a 37°C. La inhibición de peroxidasa se realizó con agua oxigenada por 10 minutos a temperatura ambiente. Para el anticuerpo primario se utilizó una dilución 1:200 durante toda la noche a 37°C. El anticuerpo secundario biotinado diluido 1:400 se incubó por 30 minutos a 37°C. La solución de estreptavidina 1:800 se incubó por 5 minutos a 37°C y la diaminobencidina por 10 minutos a temperatura

ambiente. Finalmente, los tejidos fueron contrastados con hematoxilina, deshidratados y montados para su evaluación microscópica. Las imágenes se adquirieron utilizando una cámara digital acoplada al microscopio óptico (Axiostar plus, Zeiss) tomando al menos cinco campos microscópicos de cada sujeto de estudio. La cuantificación de la expresión de cada marcador se realizó con el programa ImageJ (Rasband, 2018) y la herramienta IHC toolbox (Shu et al., 2015) lo que permitió obtener las densidades ópticas y su posterior análisis estadístico.

3.15. Evaluación de citocinas proinflamatorias por citometría de flujo

Los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF α , IFN γ , IL-6, interleucina 10 (IL-10), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), e interleucina 12p-70 (IL-12p70) en el suero obtenido de la punción cardiaca fueron cuantificados por citometría de flujo utilizando el kit de inflamación para ratón BD Cytometric Bead Array (BD Bioscience). Las muestras fueron preparadas de acuerdo a los protocolos del fabricante y analizadas en el citómetro BD Accuri™ C6 Plus. El análisis se llevó a cabo por el Laboratorio Nacional de Citometría, cede Chihuahua.

3.16. Análisis de densidad ósea por tomografía computarizada

Las patas traseras previamente fijadas en formol tanto del grupo AIC-experimental como del grupo AIC-control fueron escaneadas usando un sistema de imagen de tomografía computacional (Nikon XT H225, Tokio, Japón) con voltaje de 90 kV, manteniendo la corriente a 90 μ A. Cada barrido estuvo compuesto por 4,096 proyecciones y 32 marcos/proyección. Las imágenes fueron procesadas con el software VSD Studio Max v3.4 y para la cuantificación del volumen de porosidad se utilizó el módulo EasyPore.

3.17. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el software IBM SPSS Statistics v28 (Armonk, NY, EU). Se aproximaron medidas de tendencia central para cada variable. El efecto de las NEAu-Si se determinó al comparar las variables entre los grupos AIC-control y AIC-experimental. La evaluación clínica, el puntaje de inflamación total de los grupos AIC-control y AIC-experimental fueron comparados utilizando el análisis unidireccional de varianzas para medidas repetidas con el ajuste Bonferroni. Los puntajes histológicos de las patas traseras y rodillas de infiltrado inflamatorio, hiperplasia sinovial, erosión de cartílago y erosión ósea fueron comparados por la prueba no-paramétrica U de Mann-Whitney. La expresión tisular de marcadores inflamatorios fue comparada utilizando la prueba T-de Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

3.18. Evaluación de la eficiencia fototérmica

La eficiencia fototérmica fue evaluada en el laboratorio de propiedades ópticas de materiales irradiando las NEAu-Si con una luz láser de longitud de onda de 852 nm y una potencia de 340 mW/cm^2 utilizando una fuente láser multi-canal Multi-Channel Fiber-Coupled Laser Source Thorlabs. La conversión de luz en calor fue registrada con la cámara térmica Agilent Keysight TrueIR U5855A tomando imágenes antes, durante y después de la irradiación. Las NEAu-Si, con una concentración de 47 mg/ml, fueron contenidas en un tubo capilar. La temperatura del laboratorio fue mantenida a $\approx 24^\circ\text{C}$ y todas las fuentes de luz fueron extinguidas mientras se tomaban las imágenes térmicas. Todos los instrumentos fueron montados y sujetos a una mesa de trabajo antivibración, la distancia entre el láser y el tubo capilar fue de $\approx 1\text{cm}$ como se muestra en la ampliación de la Figura 10b. La irradiación se mantuvo hasta que se dejó de registrar un cambio de temperatura, luego las imágenes fueron tomadas manualmente. En la Figura 10a se puede apreciar el diagrama del sistema, mientras que en la Figura 10b muestra como fue montado el experimento sobre la mesa.

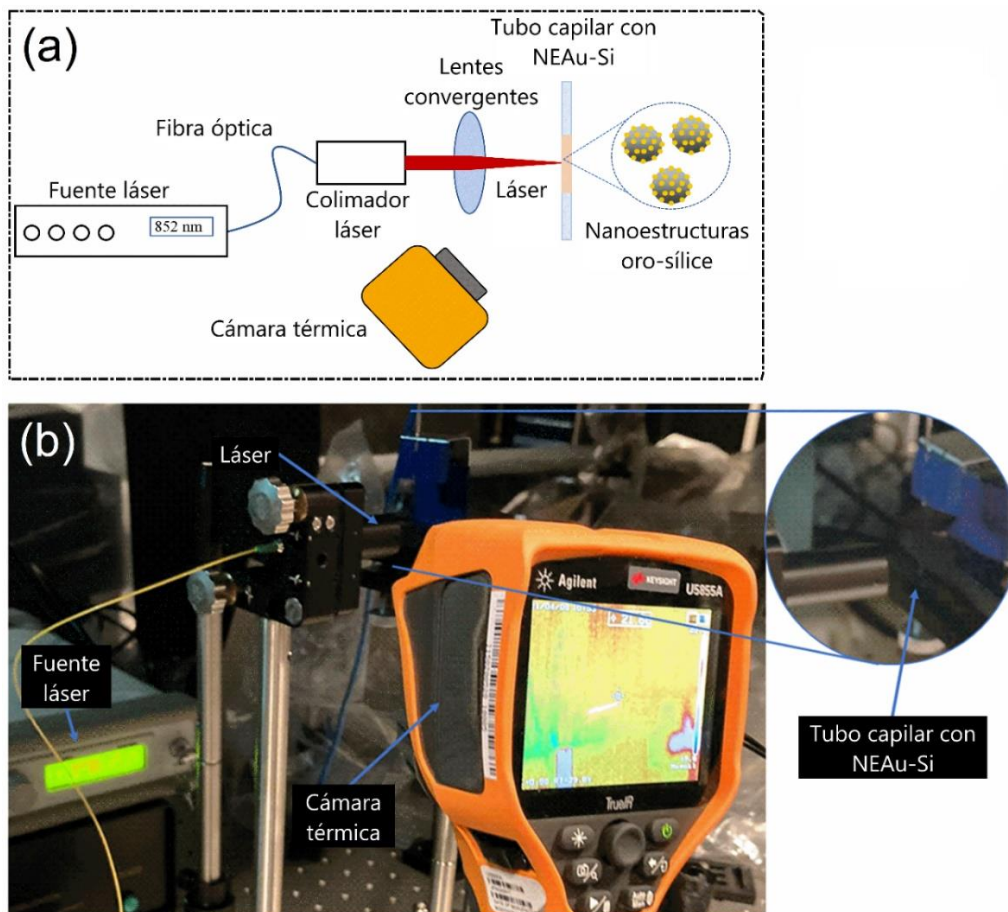


Figura 10: a) Diagrama del sistema, b) arreglo instrumental para la medición de la eficiencia fototérmica de las NEAu-Si

4. Resultados y discusión

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de cada uno de los métodos descritos y análisis realizados, así como su discusión.

4.1. Morfología y distribución de diámetros de las NEAu-Si

Las nanopartículas de sílice sintetizadas utilizando los volúmenes de etanol presentados en la Tabla 2 se obtuvieron con diámetros de 63.42 ± 5.25 nm, 83.61 ± 6.81 nm y 132.23 ± 10.9 nm y después de ser decorados con NPAu, las NEAu-Si tienen diámetros de 71.79 ± 6.21 nm, 92.58 ± 8.98 nm y 155.01 ± 11.9 nm, respectivamente. Mientras que el diámetro de las NPAu depositadas sobre las partículas de sílice de 63, 83 y 132 nm son de 5, 5 y 7 nm aproximadamente (Figura 11). Con este experimento, se confirmó que cuando el volumen total de la solución de síntesis es reducido, la interacción entre las moléculas de TEOS se incrementa y, por lo tanto, los diámetros de las partículas de sílice también se incrementan (Kharchenko et al., 2017). Al graficar los datos presentados en la Tabla 2 y usando el método de mínimos cuadrados (Figura 12), se puede apreciar que la relación entre el volumen final de síntesis y el diámetro resultante de las partículas de sílice tiene un comportamiento exponencial decreciente.

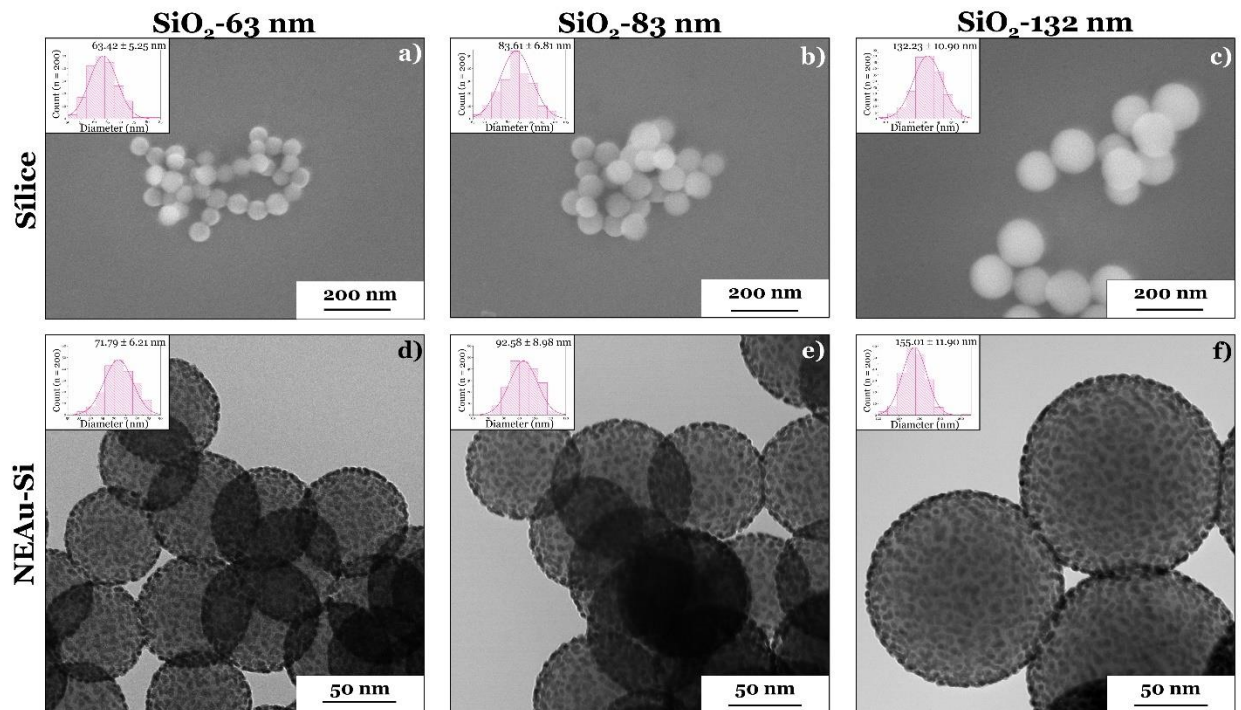


Figura 11: (a, b y c) Micrografías FESEM de los núcleos de sílice con diámetros de 63, 83 y 132 nm respectivamente; y (d, e y f) micrografías MET de las NEAu-Si obtenidas de la decoración con oro de los núcleos de sílice presentados en las micrografías a, b y c. La distribución de sus diámetros fue calculada midiendo 200 partículas por muestra (imágenes interiores)

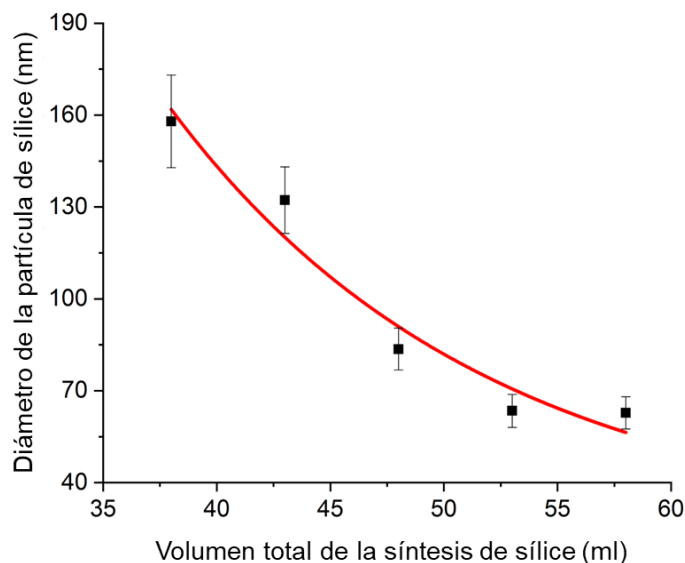


Figura 12: Efecto del volumen total de la síntesis en el diámetro de la partícula de sílice usando un ajuste polinomial de 2do orden

En la Figura 11 se puede apreciar que, aun cuando la esfera de sílice no está completamente cubierta con NPAu, hay una capa suficientemente homogénea en todas las partículas. Esta capa de oro se obtuvo al elevar la temperatura, recomendada por Kah (Phonthammachai et al., 2008) en el proceso de deposición-precipitación, de 70°C a 95°C. Además, no se utilizó el paso de crecimiento del semillado de oro desarrollado por Halas (Oldenburg et al., 1998). Al hacer esto, el tiempo de síntesis se optimizó en un 83%, obteniendo un recubrimiento con NPAu de 5nm de diámetro aproximadamente y, de acuerdo con los resultados obtenidos por ICP, su composición elemental es de 85% en peso de oro y 13% en peso de silicio.

4.2. Microestructura del oro y sílice que componen las NEAu-Si

Para corroborar la seguridad del uso de las partículas de sílice en aplicaciones biomédicas, se analizó su patrón de difracción, ya que la sílice cristalina es altamente tóxica y causa silicosis (Pollard, 2016). En la Figura 13 se puede observar que las partículas de sílice sintetizadas por el método Stöber (Ghimire & Jaroniec, 2021) tienen un arreglo atómico de corto alcance. Esto las hace seguras para usarse en aplicaciones biomédicas (Gonçalves, 2018). Por otra parte, las NPAu sintetizadas por la modificación del método de deposición-precipitación propuesto por Kah y su equipo (Kah et al., 2008) presentan una disposición atómica cristalina (Figura 11) con un espacio interplanar de 0.235 nm, el cual corresponde con el plano del oro 111 (Nakamura et al., 2008).

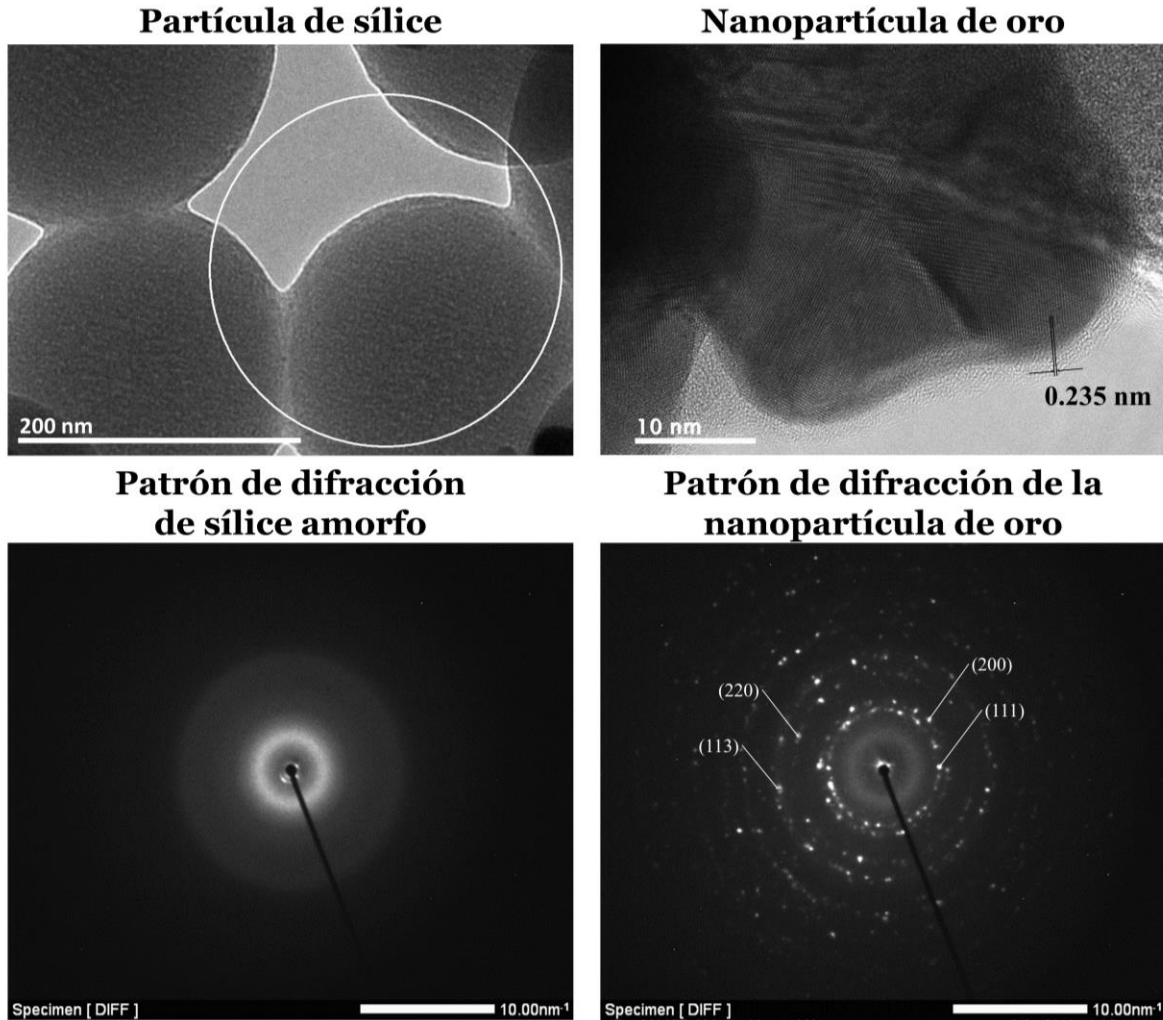


Figura 13: Micrografías HR-TEM y patrones de difracción de sílice amorfo sintetizado por el método Stöber y NPAu obtenidas por la modificación del método de deposición-precipitación desarrollado por Kah

4.3. Estabilidad de las NEAu-Si en solución coloidal

Se determinó la estabilidad de las partículas a lo largo de su síntesis mediante la obtención de su potencial zeta (Figura 14). Los datos obtenidos muestran que las esferas de sílice redispersadas en etanol tienen el valor más elevado de potencial zeta, seguidos de las NEAu-Si con valores de -50.43 y -22.63 mV respectivamente. Por lo tanto, estas permanecerán dispersas en una solución coloidal (Clogston & Patri, 2011). Por otra parte, el potencial zeta de la sílice funcionalizada es neutro, lo que significa que estas partículas precipitaran en minutos; sin embargo, en nuestra experiencia, estas partículas pueden redispersarse fácilmente sin presentar cambios en su estructura. Aun cuando las NEAu-Si tienen un valor de potencial zeta negativo, y podrían ser repelidas por la membrana celular, estas logran penetrarla, como lo reporto Duan (Duan & Li, 2013).

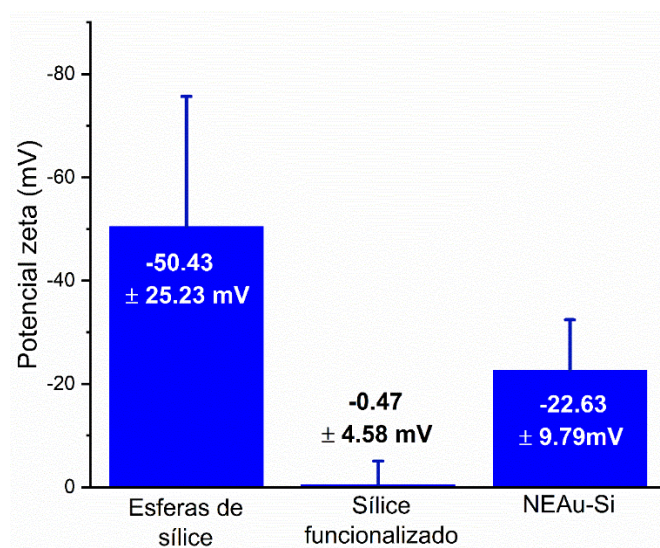


Figura 14: Potencial zeta de esferas de sílice, sílice funcionalizado y NEAu-Si

4.4. Biodistribución de las NEAu-Si y su penetración a la membrana sinovial

La micrografía FESEM de la membrana sinovial de los ratones del grupo AIC-experimental que fueron tratados intraperitonealmente con NEAu-Si y su amplificación 3.25X son mostradas en la Figura 15A y Figura 15B respectivamente. Estas muestran esferas alineadas con las fibras de colágeno, cuyas dimensiones corresponden con el tamaño de las NEAu-Si que fueron usadas en el tratamiento. La presencia de oro y silicio fue semi-cuantificada en el tejido por EDS. Los elementos detectados en el área analizada son presentados en la Figura 16.

Esta evidencia muestra que las NEAu-Si, con diámetro de 71 ± 6 nm, pueden penetrar y acumularse dentro de la membrana sinovial sin el uso de ligandos o preparación superficial. Sus dimensiones y carga superficial prueban ser adecuados para pasar a través de la membrana y acumularse en el tejido inflamado, confirmando su capacidad para la focalización pasiva gracias al efecto ELVIS (Q. Wang & Sun, 2017). Las NEAu-Si se acumularon en las fibras de colágeno, y posteriormente el oro se separó de la partícula de sílice, probablemente debido a la naturaleza ácida del tejido inflamado (Rajamäki et al., 2013). De acuerdo a los resultados obtenidos por ICP, las NEAu-Si tienen aproximadamente un 85% en peso de oro y un 13% en peso de silicio; sin embargo, como se observa en el análisis elemental EDS, la presencia de silicio es mayor que la del oro. Esta información sugiere que el oro es absorbido y procesado más rápidamente, mientras que las partículas de sílice se aglomeran en la subíntima.

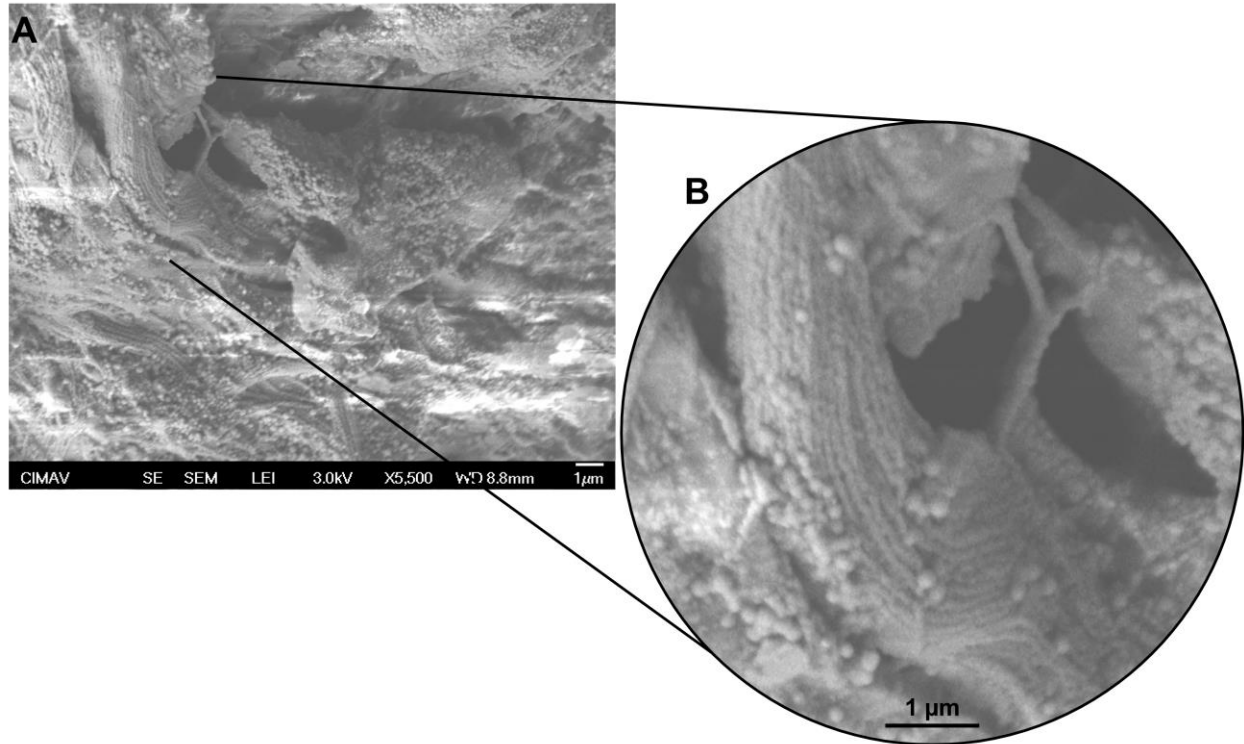


Figura 15: (A) Micrografía FESEM de la membrana sinovial mostrando esferas de sílice embebidas en las fibras de colágeno y (B) Amplificación 3.25X de la micrografía FESEM para revelar las fibras y localización de las esferas

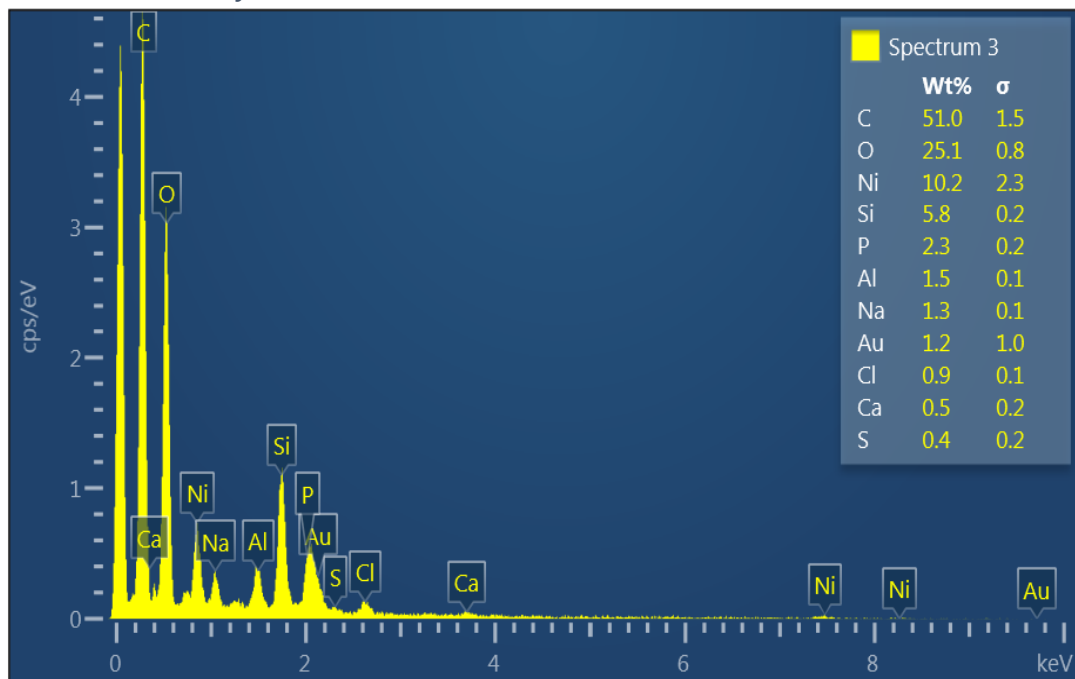


Figura 16: Análisis elemental EDS del área de la membrana sinovial donde las partículas fueron encontradas

La información cuantitativa de la acumulación de oro y silicio en los riñones, hígados y bazo, obtenida por ICP, está reportada en la Tabla 5. Estos resultados fueron comparados con el peso total de los órganos y el peso total del oro y silicio administrado a lo largo de las 10 dosis del experimento. Las membranas sinoviales de los grupos AIC-control y AIC-experimental reportaron tener 0.0 y 49.09 ppm de oro, así como 4,775.53 y 24,607.41 ppm de silicio, respectivamente.

Tabla 5: Comparativo del promedio de la distribución de oro y silicio en tejidos de ratones DBA/1 después de 21 días de la última dosis (n=5)

| Tejido | ng Au / mg de tejido | Au % de dosis aplicada | ng Si / mg de tejido | Si % de dosis aplicada |
|--------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| Bazo | 3.7311 | 0.00591 | 10.37 | 0.107 |
| Hígado | 0.0506 | 0.000133 | 2.71 | 0.047 |
| Riñón | 0.1187 | 0.000421 | 1.47 | 0.034 |

Trazas de oro y silicio indican la existencia de NPAu-Si en los bazo, hígados y riñones 21 días después de la última dosis. Su presencia fue detectada principalmente en los bazo; sin embargo, estas concentraciones no causaron ninguna reacción tóxica en los ratones, como los efectos tóxicos reportados previamente (Chen et al., 2009) donde los ratones presentaron pérdida del apetito, cambio en el color del pelaje, pérdida de peso e inclusive la muerte. Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con otros ya publicados (Sibuyi et al., 2021), que muestran que NPAu con diámetros entre 50 y 100 nm no inducen efectos tóxicos en los ratones. Además, la evaluación de toxicidad de nanoestructuras oro-sílice con diámetro de 155 nm anteriormente evaluada (Gad et al., 2012) tampoco revela evidencia de toxicidad, falta de tolerancia o efectos inmunológicos.

Después de 21 días de la última dosis, solo 0.00591% de la dosis administrada de oro fue encontrado en el bazo. Al comparar esto con el 0.05% de la dosis administrada de oro (Sonavane et al., 2008) en los bazo de los ratones después de 24 horas de la única dosis, se puede concluir que el oro, cuando es administrado en diámetros entre los 50 y 100 nm, será desechado por el cuerpo sin ninguna complicación (Hornos Carneiro & Barbosa, 2016).

4.5. El tratamiento con NEAu-Si disminuye la severidad clínica e histológica de la AIC en ratones DBA/1

Para el análisis clínico, se utilizó el promedio de los puntajes de inflamación de los ratones de cada grupo obtenidos durante el experimento comparando los puntajes del grupo AIC-control (Tabla 6) con el grupo AIC-experimental (Tabla 7). Existe una observable reducción en la inflamación de las patas traseras de los ratones tratados con NEAu-Si (Figura 17A) la cual se mantuvo más baja durante el curso del tratamiento, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.500$) (Figura 17B).

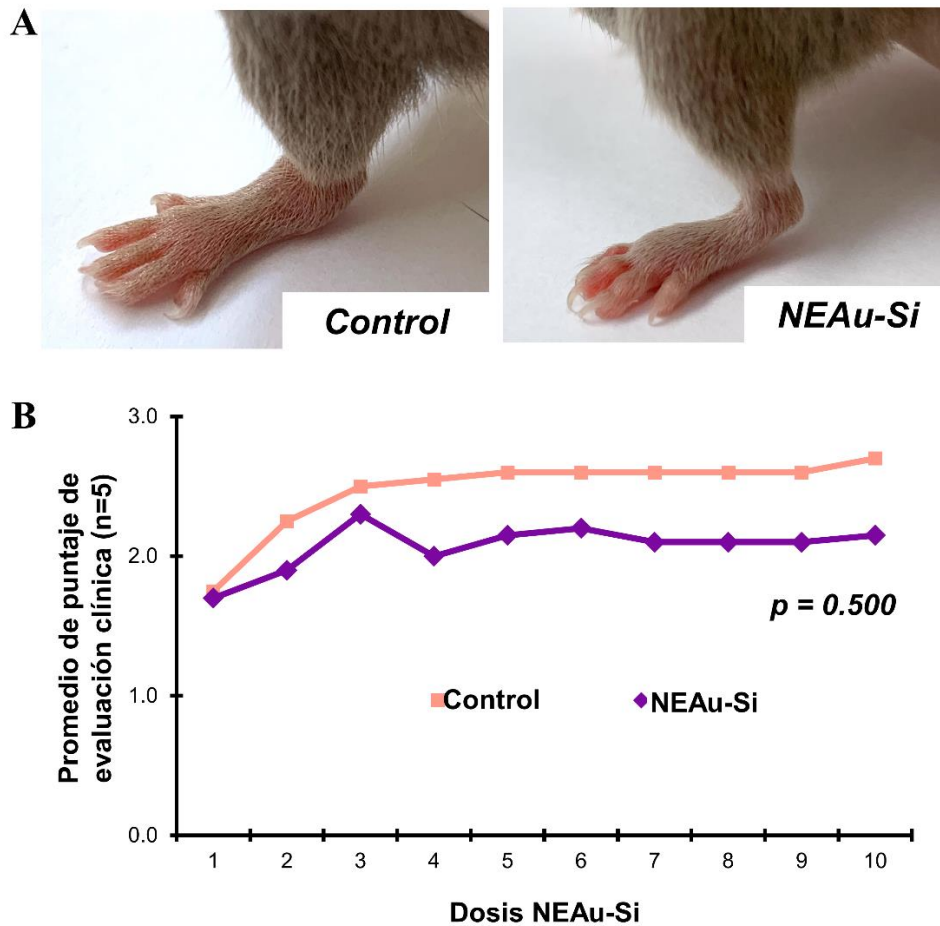


Figura 17: Efectos de las NEAu-Si en el análisis clínico de la AIC en ratones DBA/1. (A) Imágenes representativas de la manifestación clínica de la AIC en ratones del grupo control y los tratados con NEAu-Si; (B) Evaluación del curso clínico de la AIC. Se utilizó el análisis unidireccional de varianzas para medidas repetidas con el ajuste Bonferroni para comparar los grupos

Los parámetros significativos para analizar histológicamente son el infiltrado inflamatorio, hiperplasia sinovial, erosión de cartílago y erosión ósea. Para esta evaluación se utilizó hematoxilina y eosina para la tinción. Las imágenes que comparan histológicamente al grupo AIC-control con el grupo AIC-experimental se presentan en la Figura 18A en donde los parámetros de interés se detectaron como se explica a continuación.

Infiltrado inflamatorio (II): en las imágenes se puede distinguir donde termina el hueso (H) y empieza el cartílago (C) por la diferente coloración, evidenciando la disminución del líquido sinovial que está presente entre los dos huesos debido al infiltrado inflamatorio.

Hiperplasia sinovial (HS): En este caso se puede observar como la membrana sinovial (MS) presenta cambios en forma y tamaño del tejido adiposo al comparar las muestras entre ambos grupos.

Erosión de cartílago (EC): En este caso se observa como el cartílago tiene porosidad, la cual es indicativo de su desgaste y en algunas áreas exposición del hueso.

Erosión ósea (EO): Se evidencia en los lugares donde el tejido inflamatorio ha empezado a erosionar el hueso lo cual es una de las características principales de esta enfermedad en sus etapas más severas.

El análisis histológico (Figura 18B) presenta una reducción estadísticamente significativa en infiltrado inflamatorio ($p=0.023$), hiperplasia sinovial ($p=0.035$), erosión de cartílago ($p=0.023$) y erosión ósea ($p=0.002$) en el grupo AIC-experimental. Considerando estos resultados histológicos, se puede decir que las NEAu-Si disminuyen la severidad de la AIC.

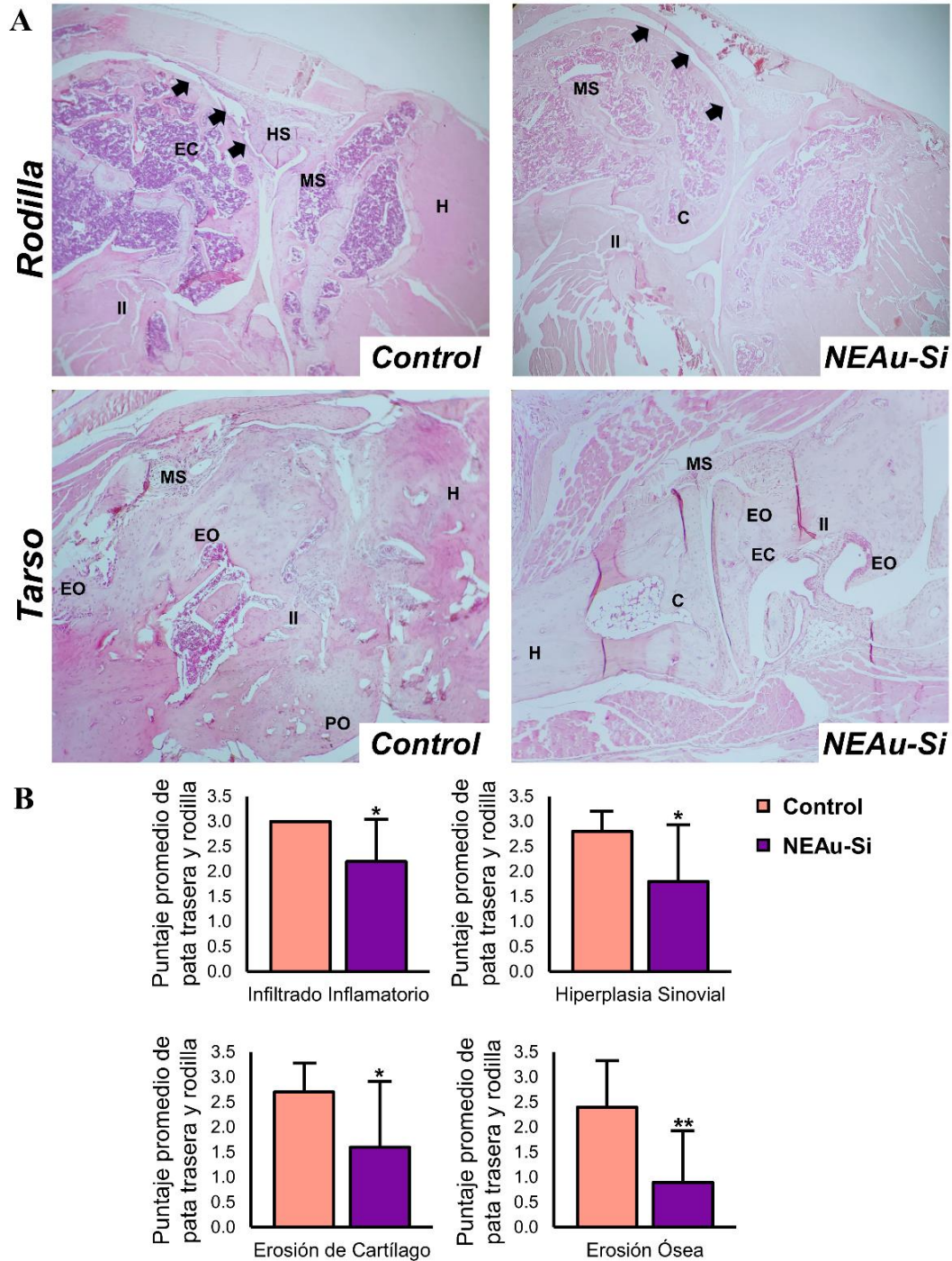


Figura 18: Efectos de las NEAu-Si en el análisis histológico de la AIC en ratones DBA/1. (A) Imágenes representativas de los hallazgos histológicos en las articulaciones de rodillas y tarsos utilizando tinción H&E. Las flechas indican irregularidades en la superficie articular y pérdida de cartílago. HS: hiperplasia sinovial, MS: membrana sinovial, EC: Erosión de cartílago, H: hueso, II: infiltrado inflamatorio, C: cartílago, EC: erosión de cartílago, PO: proliferación ósea, EO: erosión ósea; (B) evaluación histológica de los efectos de las NEAu-Si en la inflamación y la remodelación de tejido. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Tabla 6: Puntaje obtenido del análisis clínico de los ratones DBA/1 de grupo AIC-control durante el tratamiento con NEAu-Si. El número de ratón se compone del número de jaula · Número de ratón. MD: mano derecha, MI: mano izquierda, TM: Total manos, PD: pata derecha, PI: pata izquierda, TP: Total patas, T4: Total de las 4 extremidades

| Dosis | | | 1 | | | | | | | 2 | | | | | | | 3 | | | | | | |
|-----------------|-------------|-------|-----------|----|----|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|----|----|------------|----|----|----|----|----|----|
| Fecha de inicio | Grupo | Ratón | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 |
| 3/18/2020 | AIC-control | 8.2 | 3 | 4 | 7 | 0 | 2 | 2 | 9 | 4 | 4 | 8 | 0 | 1 | 1 | 9 | 4 | 4 | 8 | 0 | 2 | 2 | 10 |
| 3/18/2020 | AIC-control | 6.1 | 3 | 4 | 7 | 0 | 0 | 0 | 7 | 4 | 4 | 8 | 0 | 1 | 1 | 9 | 4 | 4 | 8 | 2 | 1 | 3 | 11 |
| 3/23/2020 | AIC-control | 8.1 | 0 | 4 | 4 | 0 | 3 | 3 | 7 | 0 | 4 | 4 | 0 | 4 | 4 | 8 | 0 | 4 | 4 | 1 | 4 | 5 | 9 |
| 4/3/2020 | AIC-control | 3.1 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 0 | 4 | 0 | 3 | 3 | 7 | 4 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 | 8 |
| 4/6/2020 | AIC-control | 10.2 | 3 | 3 | 6 | 0 | 3 | 3 | 9 | 4 | 4 | 8 | 0 | 4 | 4 | 12 | 4 | 4 | 8 | 0 | 4 | 4 | 12 |
| | | | Media 7.0 | | | | | | | Media 9.0 | | | | | | | Media 10.0 | | | | | | |
| | | | DE 2.45 | | | | | | | DE 1.87 | | | | | | | DE 1.58 | | | | | | |

| Dosis | | | 4 | | | | | | | 5 | | | | | | | 6 | | | | | | |
|-------------|-------|--|------------|----|----|----|----|----|----|------------|----|----|----|----|----|----|------------|----|----|----|----|----|----|
| Grupo | Ratón | | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 |
| AIC-control | 8.2 | | 4 | 4 | 8 | 0 | 2 | 2 | 10 | 4 | 4 | 8 | 0 | 2 | 2 | 10 | 4 | 4 | 8 | 0 | 2 | 2 | 10 |
| AIC-control | 6.1 | | 4 | 4 | 8 | 2 | 1 | 3 | 11 | 4 | 4 | 8 | 3 | 1 | 4 | 12 | 4 | 4 | 8 | 3 | 1 | 4 | 12 |
| AIC-control | 8.1 | | 0 | 4 | 4 | 2 | 4 | 6 | 10 | 0 | 4 | 4 | 2 | 4 | 6 | 10 | 0 | 4 | 4 | 2 | 4 | 6 | 10 |
| AIC-control | 3.1 | | 4 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 | 8 | 4 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 | 8 | 4 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 | 8 |
| AIC-control | 10.2 | | 4 | 4 | 8 | 0 | 4 | 4 | 12 | 4 | 4 | 8 | 0 | 4 | 4 | 12 | 4 | 4 | 8 | 0 | 4 | 4 | 12 |
| | | | Media 10.2 | | | | | | | Media 10.4 | | | | | | | Media 10.4 | | | | | | |
| | | | DE 1.48 | | | | | | | DE 1.67 | | | | | | | DE 1.67 | | | | | | |

| Dosis | | | 7 | | | | | | | 8 | | | | | | | 9 | | | | | | |
|-------------|-------|--|------------|----|----|----|----|----|----|------------|----|----|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|----|----|
| Grupo | Ratón | | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 |
| AIC-control | 8.2 | | 4 | 4 | 8 | 0 | 2 | 2 | 10 | 4 | 4 | 8 | 0 | 2 | 2 | 10 | 4 | 4 | 8 | 0 | 2 | 2 | 10 |
| AIC-control | 6.1 | | 4 | 4 | 8 | 3 | 1 | 4 | 12 | 4 | 4 | 8 | 3 | 1 | 4 | 12 | 4 | 4 | 8 | 3 | 1 | 4 | 12 |
| AIC-control | 8.1 | | 0 | 4 | 4 | 2 | 4 | 6 | 10 | 0 | 4 | 4 | 2 | 4 | 6 | 10 | 0 | 3 | 3 | 2 | 3 | 5 | 8 |
| AIC-control | 3.1 | | 4 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 | 8 | 4 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 | 8 | 3 | 0 | 3 | 0 | 4 | 4 | 7 |
| AIC-control | 10.2 | | 4 | 4 | 8 | 0 | 4 | 4 | 12 | 4 | 4 | 8 | 0 | 4 | 4 | 12 | 4 | 3 | 7 | 0 | 4 | 4 | 11 |
| | | | Media 10.4 | | | | | | | Media 10.4 | | | | | | | Media 9.6 | | | | | | |
| | | | DE 1.67 | | | | | | | DE 1.67 | | | | | | | DE 2.07 | | | | | | |

| Dosis | | | 10 | | | | | | |
|-------------|-------|--|------------|----|----|----|----|----|----|
| Grupo | Ratón | | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 |
| AIC-control | 8.2 | | 4 | 4 | 8 | 0 | 2 | 2 | 10 |
| AIC-control | 6.1 | | 4 | 4 | 8 | 3 | 1 | 4 | 12 |
| AIC-control | 8.1 | | 0 | 3 | 3 | 2 | 3 | 5 | 8 |
| AIC-control | 3.1 | | 3 | 0 | 3 | 0 | 4 | 4 | 7 |
| AIC-control | 10.2 | | 4 | 3 | 7 | 2 | 4 | 6 | 13 |
| | | | Media 10.0 | | | | | | |
| | | | DE 2.55 | | | | | | |

Tabla 7: Puntaje obtenido del análisis clínico de los ratones DBA/1 del grupo AIC-experimental durante el tratamiento con NEAu-Si. El número de ratón se compone del número de jaula · número de ratón. MD: mano derecha, MI: mano izquierda, TM: Total manos, PD: pata derecha, PI: pata izquierda, TP: Total patas, T4: Total de las 4 extremidades.

| Dosis | | | 1 | | | | | | | 2 | | | | | | | 3 | | | | | | |
|-----------------|---------|-------|----|----|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|----|----|----|
| Fecha de inicio | GRUPO | Ratón | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 |
| 3/18/2020 | AIC-exp | 9.1 | 4 | 4 | 8 | 2 | 2 | 4 | 12 | 4 | 4 | 8 | 3 | 2 | 5 | 13 | 4 | 4 | 8 | 4 | 3 | 7 | 15 |
| 3/18/2020 | AIC-exp | 10.1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 8 | 8 |
| 3/23/2020 | AIC-exp | 3.2 | 2 | 3 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 | 4 | 3 | 7 | 0 | 0 | 0 | 7 | 4 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| 4/3/2020 | AIC-exp | 7.1 | 4 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 | 4 | 4 | 8 | 1 | 0 | 1 | 9 | 4 | 4 | 8 | 1 | 0 | 1 | 9 |
| 4/6/2020 | AIC-exp | 2.1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 3 | 0 | 4 | 4 | 2 | 0 | 2 | 6 |
| Media 6.8 | | | | | | | | | Media 7.6 | | | | | | | Media 9.2 | | | | | | | |
| DE 3.421 | | | | | | | | | DE 3.715 | | | | | | | DE 3.421 | | | | | | | |

| Dosis | | | 4 | | | | | | | 5 | | | | | | | 6 | | | | | | |
|----------|-------|----|----|----|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|----|----|--|
| GRUPO | Ratón | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | |
| AIC-exp | 9.1 | 4 | 4 | 8 | 3 | 2 | 5 | 13 | 4 | 4 | 8 | 4 | 2 | 6 | 14 | 4 | 4 | 8 | 4 | 2 | 6 | 14 | |
| AIC-exp | 10.1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 7 | 7 | |
| AIC-exp | 3.2 | 4 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 | 4 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 | 4 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 | |
| AIC-exp | 7.1 | 4 | 4 | 8 | 1 | 0 | 1 | 9 | 4 | 4 | 8 | 2 | 0 | 2 | 10 | 4 | 4 | 8 | 3 | 0 | 3 | 11 | |
| AIC-exp | 2.1 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | |
| Media 8 | | | | | | | | | Media 8.6 | | | | | | | Media 8.8 | | | | | | | |
| DE 3.391 | | | | | | | | | DE 3.715 | | | | | | | DE 3.834 | | | | | | | |

| Dosis | | | 7 | | | | | | | 8 | | | | | | | 9 | | | | | | |
|-----------|-------|----|----|----|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|----|----|-----------|----|----|----|----|----|----|--|
| GRUPO | Ratón | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | |
| AIC-exp | 9.1 | 3 | 3 | 6 | 4 | 1 | 5 | 11 | 3 | 3 | 6 | 3 | 1 | 4 | 10 | 3 | 3 | 6 | 3 | 1 | 4 | 10 | |
| AIC-exp | 10.1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 7 | 7 | |
| AIC-exp | 3.2 | 4 | 4 | 8 | 0 | 0 | 0 | 8 | 4 | 4 | 8 | 0 | 2 | 2 | 10 | 4 | 4 | 8 | 0 | 2 | 2 | 10 | |
| AIC-exp | 7.1 | 4 | 4 | 8 | 4 | 0 | 4 | 12 | 3 | 4 | 7 | 4 | 0 | 4 | 11 | 3 | 4 | 7 | 4 | 0 | 4 | 11 | |
| AIC-exp | 2.1 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | |
| Media 8.4 | | | | | | | | | Media 8.4 | | | | | | | Media 8.4 | | | | | | | |
| DE 3.209 | | | | | | | | | DE 2.881 | | | | | | | DE 2.881 | | | | | | | |

| Dosis | | | 10 | | | | | | |
|-----------|-------|----|----|----|----|----|----|----|--|
| GRUPO | Ratón | MD | MI | TM | PD | PI | TP | T4 | |
| AIC-exp | 9.1 | 3 | 3 | 6 | 3 | 1 | 4 | 10 | |
| AIC-exp | 10.1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 7 | 7 | |
| AIC-exp | 3.2 | 4 | 4 | 8 | 0 | 3 | 3 | 11 | |
| AIC-exp | 7.1 | 3 | 4 | 7 | 4 | 0 | 4 | 11 | |
| AIC-exp | 2.1 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 | |
| Media 8.6 | | | | | | | | | |
| DE 3.05 | | | | | | | | | |

4.6. El tratamiento con NEAu-Si redujo la expresión de genes inflamatorios, procesos biológicos y vías de señalización en las patas traseras de ratones DBA/1 con AIC

El análisis por microarreglo de transcriptoma completo identificó un grupo de GED en las articulaciones de las patas traseras de ratones DBA/1 del grupo AIC-experimental en comparación con el grupo AIC-control. Un total de 2,628 genes fueron diferencialmente expresados (puntaje $Z \geq 1.5$ DE) en los ratones tratados con NEAu-Si, de los cuales 1,176 fueron sobre-regulados y 1,452 sub-regulados. Una lista completa con los GED se encuentra en el siguiente enlace <https://www.rsc.org/suppdata/d2/bm/d2bm00498d/d2bm00498d1.pdf>. AK012938 (Tmem107) y NM_018860 (Rpl41) fueron los genes más significativamente sobre- y sub-regulados por las NEAu-Si, respectivamente. El análisis de los GED en la base de datos DAVID muestra que están significativamente asociados ($p \leq 0.05$) en 144 procesos biológicos (79 sobre-regulados y 65 sub-regulados) y 29 vías de señalización KEGG (19 sobre-regulados y 10 sub-regulados). Los procesos biológicos sub- y sobre-regulados por el tratamiento con NEAu-Si se presentan en las Tablas 8 y 9, respectivamente. Las vías de señalización sub- y sobre-reguladas por el tratamiento con NEAu-Si, relevantes en la patogénesis de AR se muestran en las Tablas 10 y 11, respectivamente. Una amplia variedad de procesos de interés en la AR fue desregulada por el tratamiento con NEAu-Si; resulta de interés que algunos de los genes sub-regulados incluyendo Cd28, Cxcl5, Ifn γ , Il6, Tgfb3, y Tnf están asociados con procesos oxidación-reducción, quimiotaxis, angiogénesis, respuesta inmune y vías de señalización TNF.

Dentro de los efectos de las NEAu-Si en los procesos biológicos y vías de señalización relacionados con la AR, los más relevantes son: los procesos de oxidación reducción, que al estar sub-regulados, disminuyen la presencia de radicales libres (Quiñonez-Flores et al., 2016); la sub-regulación de la activación de la cinasa JUN, la cual propicia la destrucción de la articulación (de Launay et al., 2012); la reducción de quimiotaxis que atrae linfocitos y monocitos a la articulación artrítica y es fundamental para la estimulación de la inflamación (Woo et al., 2018); y la disminución de angiogénesis. Estos resultados corroboran los efectos antiinflamatorios del oro debido a su afinidad con las proteínas que contienen tiol, afectando su potencial interacción con ligandos o sustratos. También sugieren el potencial beneficio de las NEAu-Si como una estrategia terapéutica antiinflamatoria e autoinmune en AIC pues estas también inhiben las especies reactivas de oxígeno (Kirdaite et al., 2019) y la activación de enzimas lisosomales (Zhou et al., 2018).

Tabla 8: Procesos biológicos relacionados con AR y asociados con los genes sub-regulados por el tratamiento con NEAu-Si en AIC, con sus respectivos genes desregulados y valores p

| Procesos biológicos sub-regulados (15) | Genes asociados | Valor p |
|---|-----------------|-----------|
| Proceso de oxidación-reducción: Decr1, Higd1a, Tdh, Ndufa4, Ndufa8, Sh3pxd2a, Aox1, Aox3, Akr1b3, Akr1e1, Alkbh8, Alox12, Bco1, Cbr1, Cyp11b2, Cyp21a1, Cyp3a41a, Cyp4a10, Cyp51, Cyp7a1, Cybb, Cyb561d1, Cyct, Dhrs13, Dhdh, Dhodh, Etfdh, Fdx1, Ftmt, Gsto2, Gpd2, Gmpr, Hsd17b3, Ifi30, Idh1, Me3, Miox, Pxdn, Prdx6, Ptgr2, Rtn4ip1, Rpe65, Sesn2, Sc5d, Sdhb, Tdo2, Uqcrb, Uqcrh | 48 | 1.60 E-03 |
| Regulación negativa de la proliferación de fibroblastos: Agrt2, Dab2ip, Ifi30, Ifng, Lta, Nf1, Sfrp1 | 7 | 2.50 E-03 |
| Activación de la cinasa JUN: Ccr7, Dab2ip, Gab1, Spag9, Syk, Tnfsf11, Wnt7b | 7 | 3.50 E-03 |
| Quimiotaxis: Rac2, Ccl11, Ccl28, Ccl4, Ccr2, Ccr7, Cxcl11, Cxcl16, Cxcl5, Hrg, Parva, Pla2g6, Zfp580 | 13 | 6.20 E-03 |
| Respuesta celular a la interleucina 1: Rora, RbmX, Tank, Ccl11, Ccl4, Dab2ip, Fn1, Hyal1, Il6, Sfrp1 | 10 | 8.90 E-03 |
| Angiogénesis: Klf5, Rora, Arhgap24, Ccr2, Dab2ip, Emcn, Fgfr1, Fn1, Gdf2, Hrg, Hoxb13, Mcam, Meox2, Ncl, Parva, Pgf, Scg2, Syk, Tmem100, Wnt7b | 20 | 1.10 E-02 |
| Regulación de la cascada MAPK: Bmp10, Bmp6, Bmp8b, Gdf2, Nf1, Ren1, Stk40, Tgfb3 | 8 | 1.50 E-02 |
| Respuesta inmune: Cd28, Tgtp1, Bmp6, Ccl11, Ccl28, Ccl4, Ccr2, Ccr7, Cxcl11, Cxcl5, H2-Oa, Ifng, Il6, Ilf2, Lta, March1, Prg4, Tnfsf11, Tnfsf14, Tnfsf8, Tnf | 21 | 1.90 E-02 |
| Vía de señalización mediada por el factor de necrosis tumoral: Lta, Txndc17, Tnfsf11, Tnfsf14, Tnf | 5 | 2.30 E-02 |
| Respuesta a la citocina: Avpr2, Relb, Cxcl16, Pml, Pgg1b, Rara, Serpina1e, Srf, Stat6 | 9 | 2.70 E-02 |
| Diferenciación de osteoblastos: RbmX, Bmp6, Cltc, Ccdc47, Gdf2, Nf1, Rras2, Sfrp1, Snai1, Snai2, Tnc | 11 | 2.90 E-02 |
| Regulación positiva de la señalización de la quinasa I-Kappa b / NF-kappa b: Clec4n, Mier1, Ndfip1, Adipoq, Brd4, Irak4, Rhoc, Rnf31, Trim62, Trim8, Tnfsf11, Tnf, Zc3hav1 | 13 | 3.40 E-02 |
| Regulación positiva de la cascada JNK: Rassf2, Taok2, Cdc42, Dab2ip, Dusp19, Tnfsf11, Tnf, Wnt7b | 8 | 3.50 E-02 |
| Regulación de la diferenciación de osteoclastos: Rassf2, Tnfsf11, Tnf, Ubash3b | 4 | 3.70 E-02 |
| Regulación positiva de la angiogénesis: Btg1, Adm, Alox12, Ccl11, Cybb, Erap1, Gdf2, Hyal1, Plcg1, Pgf, Runx1 | 11 | 4.30 E-02 |

Tabla 9: Procesos biológicos relacionados con AR y asociados con los genes sobre-regulados por el tratamiento con NEAu-Si en AIC, con sus respectivos genes desregulados y valores p

| Procesos biológicos sobre-regulados (11) | Genes asociados | Valor p |
|--|-----------------|-----------|
| Señalización mediada por fosfatidilinositol: Gpr143, GlcNAc, Npr3, Ngf, Ncs1, Pik3c2a, Pik3cb, Pik3cg | 8 | 6.10 E-04 |
| Proceso metabólico del fosfatidilinositol: Drd1, Drd2, Galr2, Pip4k2a, Pip4k2b, Pikfyve | 6 | 3.30 E-03 |
| Regulación positiva de la cascada ERK 1 y ERK 2: Bmper, Cd44, Ccl1, Ccl12, Ccl17, Ccl21a, Ccl9, F2r11, C3, Drd2, Fgf2, Fgfr3, Ntsr2, Pten, Pdgfc, Ptpn22, Slamf1 | 17 | 5.40 E-03 |
| Quimiotaxis de neutrófilos: Fcgr3, Ccl1, Ccl12, Ccl17, Ccl21a, Ccl9, Itga1, Itga9, Vav3 | 9 | 7.70 E-03 |
| Quimiotaxis de monocitos: Ccl1, Ccl12, Ccl17, Ccl21a, Ccl9, Ptpo | 6 | 2.40 E-02 |
| Regulación negativa del proceso metabólico de especies reactivas de oxígeno: Birc3, Cryab, Pax2, Prdx2, Trim30a | 5 | 3.10 E-02 |
| Regulación de la señalización de la quinasa I-kappa b / NF-kappa b: Lime1, Capn3, F2r11, Sqstm1 | 4 | 3.20 E-02 |
| Vía de señalización del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos: Iqgap1, Fgf12, Fgf2, Fgfr3, Frs3, Trim71 | 6 | 3.20 E-02 |
| Respuesta celular al estímulo de citocinas: Jak3, Csf3, Itga4, Nos2, Nfkbia | 5 | 4.70 E-02 |
| Quimiotaxis de linfocitos: Ccl1, Ccl12, Ccl17, Ccl21a, Ccl9 | 5 | 4.70 E-02 |
| Angiogénesis: Ephb4, Anpep, Angptl6, Ccl12, Eng, Esm1, Fgf2, Grem1, Nos3, Ovol2, Pten, Pik3cg, Plcd3, Pdcd10, Ptpnb, Wars, Vav3, Vhl | 18 | 2.30 E-02 |

Tabla 10: Vías de señalización KEGG relacionados con AR y asociados con los genes sub-regulados por el tratamiento con NEAu-Si en AIC, con sus respectivos genes desregulados y valores p

| Vías de señalización KEGG sub-reguladas (3) | Genes asociados | Valor p |
|--|-----------------|-----------|
| Interacción citoquina-receptor de citoquina: Ccl11, Ccl28, Ccl4, Ccr2, Ccr7, Cxcl11, Cxcl16, Cxcl5, Ifna4, Ifna5, Ifng, Il10rb, Il15ra, Il6, Lta, Tgfb3, Tnfsf11, Tnfsf14, Tnfsf8, Tnf | 20 | 9.40 E-03 |
| Artritis reumatoide: Atp6v0e2, Cd28, Cxcl5, H2-Oa, Ifng, Il6, Tgfb3, Tnfsf11, Tnf | 9 | 2.60 E-02 |
| Enfermedad inflamatoria intestinal: Rora, H2-Oa, Ifng, Il6, Stat6, Tgfb3, Tnf | 7 | 4.3 E-02 |

Tabla 11: Vías de señalización KEGG relacionados con AR y asociados con los genes sobre-regulados por el tratamiento con NEAu-Si en AIC, con sus respectivos genes desregulados y valores p

| Vías de señalización KEGG sobre-reguladas (6) | Genes asociados | Valor p |
|--|-----------------|-----------|
| Vía de señalización PI3K-Akt: Jak3, Col6a1, Col6a4, Csf3, Efna5, Fgf12, Fgf2, Fgfr3, Gng11, Itga1, Itga4, Itga5, Itga8, Itga9, Ifnar1, Il2ra, Lamb1, Lama3, Lama5, Lamc2, Lpar2, Lpar6, Ngf, Nos3, Pten, Pik3cb, Pik3cg, Pdgfc, Rptor, Rps6, Them4, Ywhab, Ywhae | 33 | 9.80 E-05 |
| Interacción ECM-receptor: Cd44, Col6a1, Col6a4, Gp9, Itga1, Itga4, Itga5, Itga8, Itga9, Lamb1, Lama3, Lama5, Lamc2 | 13 | 5.30 E-04 |
| Vía de señalización de quimiocinas Grk5, Itk, Jak3, Adcy7, Adcy8, Ccl1, Ccl12, Ccl17, Ccl21a, Ccl9, Cxcl12, Gng11, Hck, Nfkbia, Pik3cb, Pik3cg, Vav3 | 17 | 1.50 E-02 |
| Vía de señalización de TNF Birc3, Casp7, Ccl12, Il18r1, Mmp9, Mapk9, Map2k7, Map3k14, Nfkbia, Pik3cb, Pik3cg | 11 | 2.40 E-02 |
| Diferenciación de osteoclastos Fcgr1, Fcgr3, Ifnar1, Mitf, Mapk9, Map2k7, Map3k14, Nfkbia, Pik3cb, Pik3cg, Sqstm1, Tnfrsf11a | 12 | 2.60 E-02 |
| Sistema de señalización de fosfatidilinositol Cds2, Impa2, Pten, Pik3c2a, Pik3cb, Pip4k2a, Pip4k2b, Pikfyve, Pik3cg, Plcd3 | 10 | 3.00 E-02 |

Las redes IPP resultantes de los tres primeros grupos de regiones altamente interconectadas obtenidas de Cytoscape se muestran en las figuras 19A y 20A para los genes sobre-regulados y sub-regulados, respectivamente. Del análisis de asociación de las vías de señalización KEGG realizado en STRING (Szklarczyk et al., 2021), se señalaron aquellas de interés en AR (Figuras 19C y 20C). Los nodos se marcaron con diferentes colores, uno por cada vía de señalización, obteniendo como resultado la identificación de los genes con la mayor interacción en las vías de señalización de interés (Figuras 19D y 20D). De acuerdo con este análisis, tanto los genes sobre- y sub-regulados están asociados con procesos relacionados a la inflamación de las articulaciones y a su remodelado, incluyendo quimiocina, TNF, migración transendotelial de leucocitos, AR, NF-Kappa B, receptor de células T, vías de señalización de IL-17, indicando una desregulación del proceso patogénico de la artritis. En particular, existen vías de señalización de interés que están solamente asociadas con genes sobre-regulados como fosfatidilinositol 3'-quinasa (PI3K) – vía de señalización Akt, o con genes sub-regulados como la vía de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Los genes sobre-regulados que resultaron con el mayor número de interacciones incluyen Pik3cb, Mapk9, Map3k14, Cxcl12, Ccl12 y Traf3. Sin embargo, los hallazgos más importantes están enfocados en los genes sub-regulados con las mayores interacciones que incluyen TNF, Il6, Ifng, Plcg1 y Cxcl5; dos de estos genes codifican proteínas de importancia substancial en la patogénesis de AR.

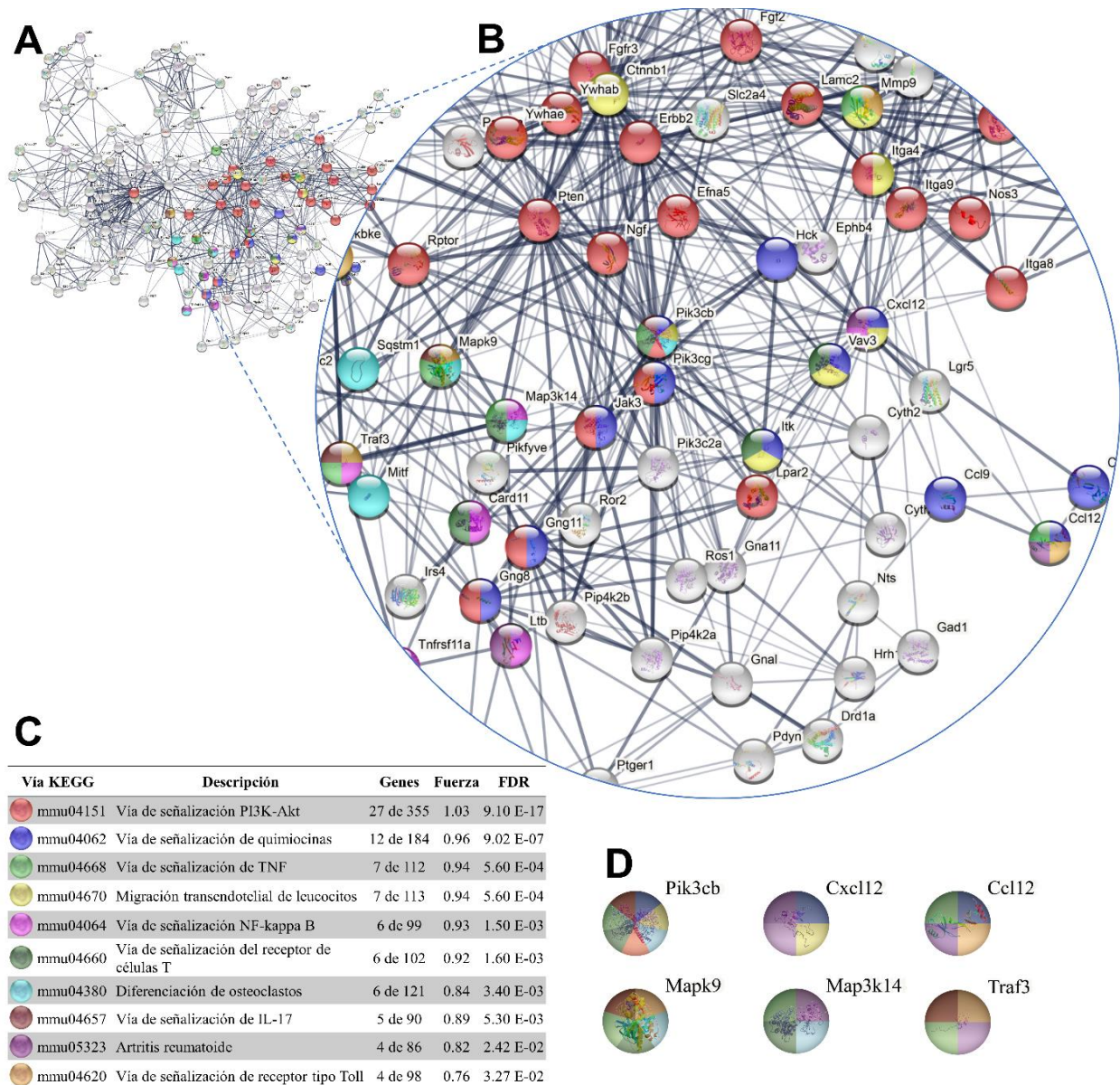


Figura 19: (A) Construcción de la red IPP con los genes pertenecientes a los grupos 1-3 obtenidos con los genes sobre-expresados mostrando la interacción de los genes relacionados con la AR. La lista de genes sobre-expresados (puntaje $Z \geq 1.5$ DE) fue analizada en las plataformas STRING y Cytoscape. Los grupos primarios de las subredes fueron obtenidos utilizando el complemento MCODE (cutoff = 0.4). El grosor de la línea indica la fuerza del soporte de datos; (B) Una ampliación de la red IPP mostrando la interacción de los genes relevantes a la AR. (C) Colores asignados a los nodos que representan las vías de señalización KEGG relevantes en la patogénesis de la AR. (D) Genes con las mayores interacciones en las vías de señalización de interés.

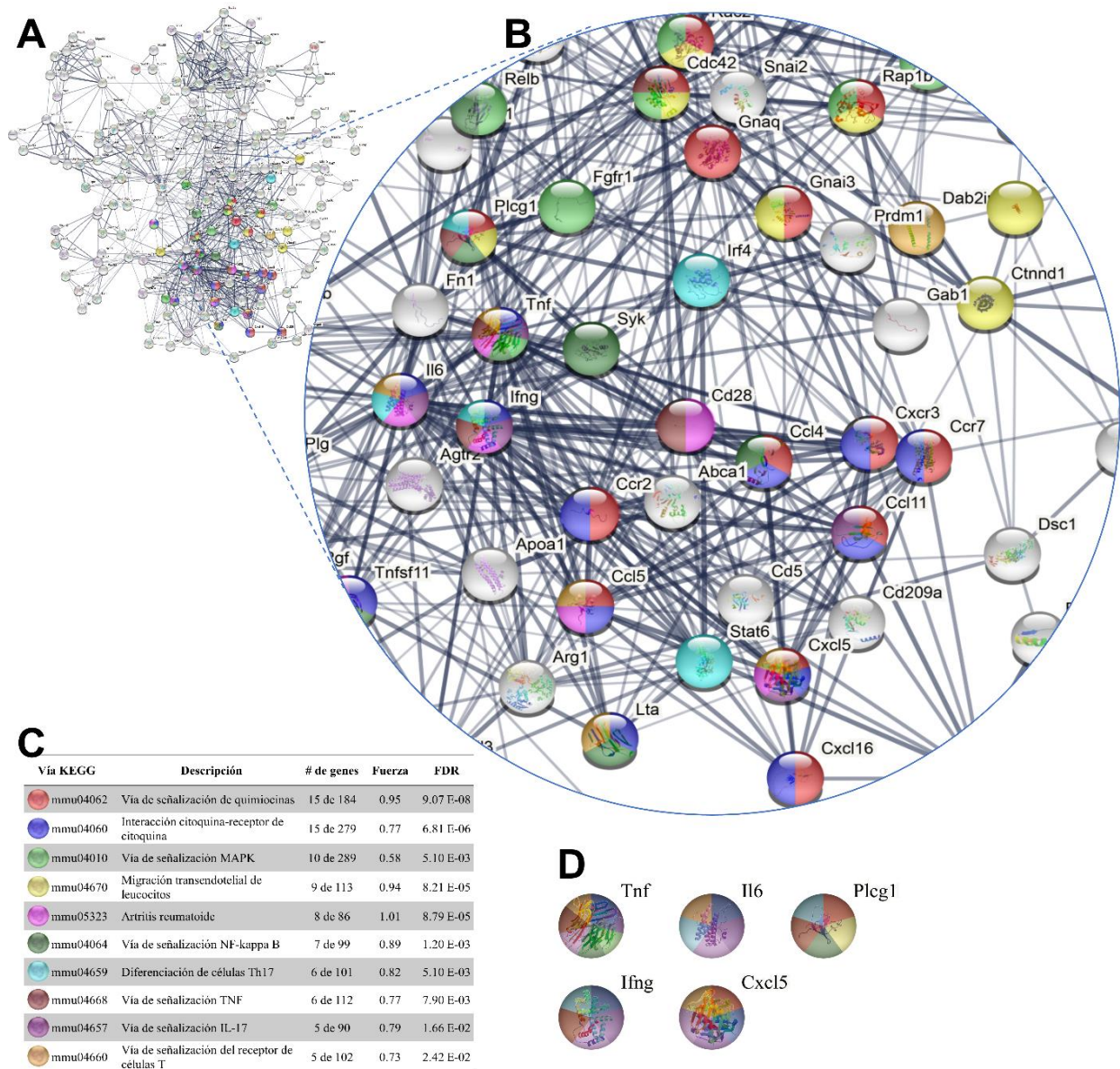


Figura 20: (A) Construcción de la red IPP con los genes pertenecientes a los grupos 1-3 obtenidos con los genes sub-expresados mostrando la interacción de los genes relacionados con la AR. La lista de genes sobre-expresados (puntaje $Z \geq 1.5$ DE) fue analizada en las plataformas STRING y Cytoscape. Los grupos primarios de las subredes fueron obtenidos utilizando el complemento MCODE (cutoff = 0.4). El grosor de la línea indica la fuerza del soporte de datos; (B) Una ampliación de la red IPP mostrando la interacción de los genes relevantes a la AR. (C) Colores asignados a los nodos que representan las vías de señalización KEGG relevantes en la patogénesis de la AR. (D) Genes con las mayores interacciones en las vías de señalización de interés.

4.7. El tratamiento con NEAu-Si indujo la sub-expresión de marcadores inflamatorios en las articulaciones de rodillas y tarsos de ratones DBA/1 con AIC

La inmunohistoquímica demostró que las NEAu-Si disminuyeron significativamente la expresión de TNF, IL-6 (Figura 21), NFκB y VEGF (Figura 22) en las articulaciones tarsales y rodillas en ratones con AIC. TNF fue la citocina con mayor expresión tisular y sobre la cual se obtuvo el mayor efecto con el tratamiento con las nanoestructuras. Su expresión fue distribuida en toda la estructura de la articulación, incluyendo la membrana sinovial, hueso y cartílago. Por otra parte, la expresión de IL-6 puede ser observada con gran intensidad en las áreas con proliferación de cartílago. Estos resultados concuerdan con los propuestos anteriormente (Koushki et al., 2021), donde los efectos inmunomoduladores del oro inhiben la expresión de NFκB, lo cual sub-regula la producción de citocinas proinflamatorias como TNFα e IL-17.

La inhibición de la citocina proinflamatoria TNFα debido al tratamiento para la AR con NEAu-Si es de importancia debido a que la sobreproducción de esta citocina activa los fibroblastos sinoviales que promueven hiperplasia sinovial y el reclutamiento de células inflamatorias. La sobre producción de fibroblastos también tiene como resultado la destrucción de cartílago y hueso. Por otra parte, TNFα está relacionada con el desarrollo de otras enfermedades autoinmunes como artritis psoriásica, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis e uveítis no infecciosa (Jang et al., 2021).

En el caso de IL-6, además de ser también una citocina proinflamatoria relacionada con AR, está relacionada con otras enfermedades autoinmunes como artritis idiopática juvenil, enfermedad de Still del adulto, arteritis de células gigantes y enfermedad de Castleman. En estos casos, IL-6 incrementa la expresión de proteínas RANKL en la superficie de las células T, lo que permite que las células T se unan a las proteínas RANK en la superficie de los preosteoblastos y los convierte en osteoblastos activados. Este exceso de osteoblastos promueve la osteoporosis y la destrucción de cartílago y de hueso (Choy et al., 2020).

La importancia de la proteína NFκB en el proceso de inflamación radica en que, siendo activada por TNFα, a su vez promueve la producción de citocinas proinflamatorias, como TNFα, IL-6, e IFNγ, lo que incrementa la inflamación en el tejido. Es por esto que los inhibidores de esta proteína se utilizan para mejorar los síntomas de enfermedades autoinmunes como AR aun cuando, debido a su importancia sistémica, sus efectos tienden a ser inmunosupresores. Algunas otras enfermedades autoinmunes en las que NFκB tiene un papel importante son osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, espondiloartropatías y enfermedad de Crohn (O'Sullivan et al., 2007).

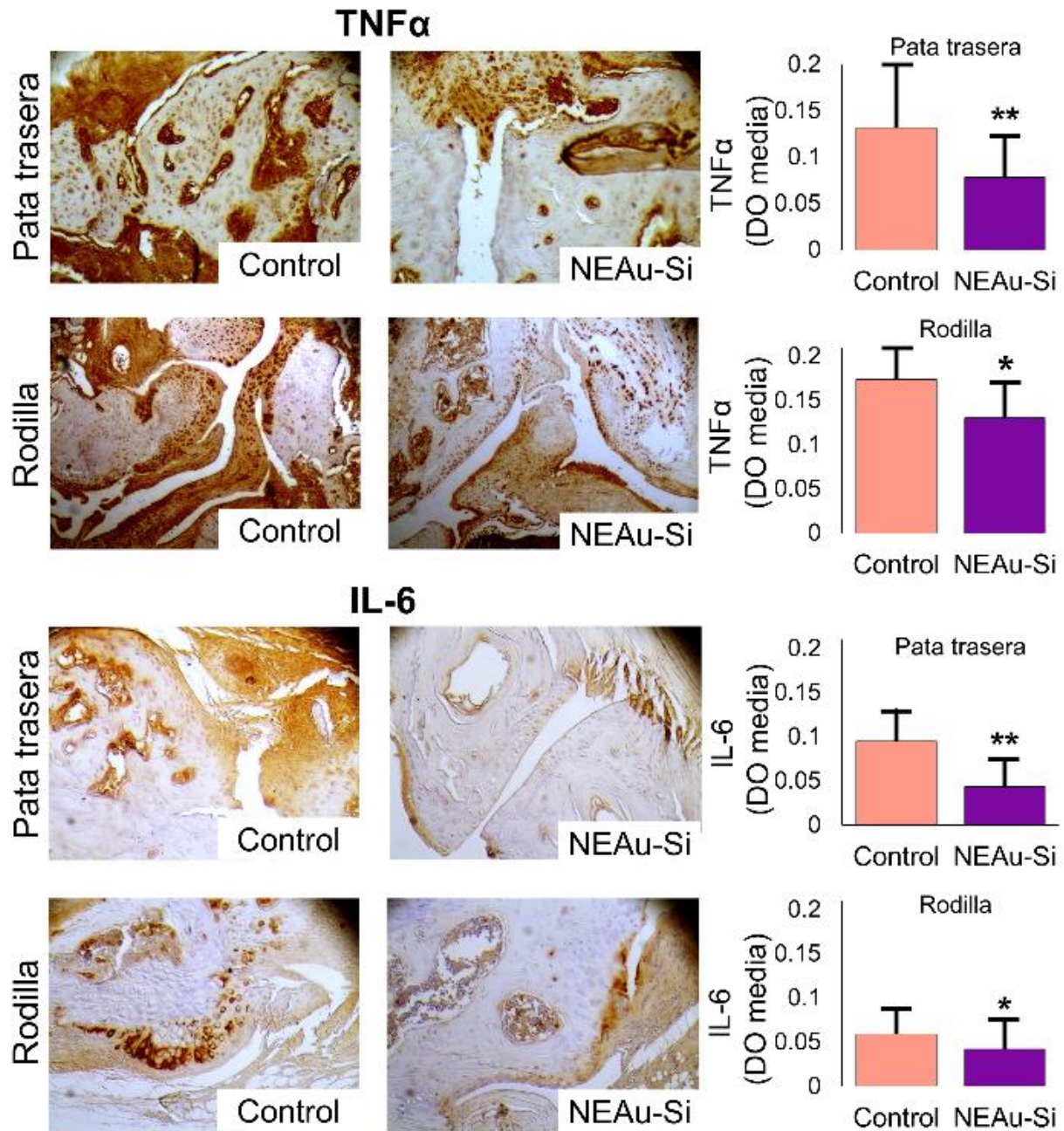


Figura 21: Efecto de las NEAu-Si en la expresión tisular de TNF α e IL-6 en las articulaciones de ratones DBA/1 con AIC. Imágenes representativas de los hallazgos de IHQ. La inmunodetección se llevó a cabo usando estreptavidina peroxidasa y diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Las cuantificaciones se ejecutaron con el software ImageJ e IHC toolbox. Para cada imagen, se extrajo el color DAB, así como los niveles de gris máximos y promedio. La densidad óptica (DO) de cada imagen se obtuvo con $\log_{10}(\text{valor de gris máximo}/\text{valor de gris promedio})$. El promedio y DE fueron calculadas y gráficamente representadas para cada grupo de estudio. Se utilizó la prueba T de Student para determinar las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

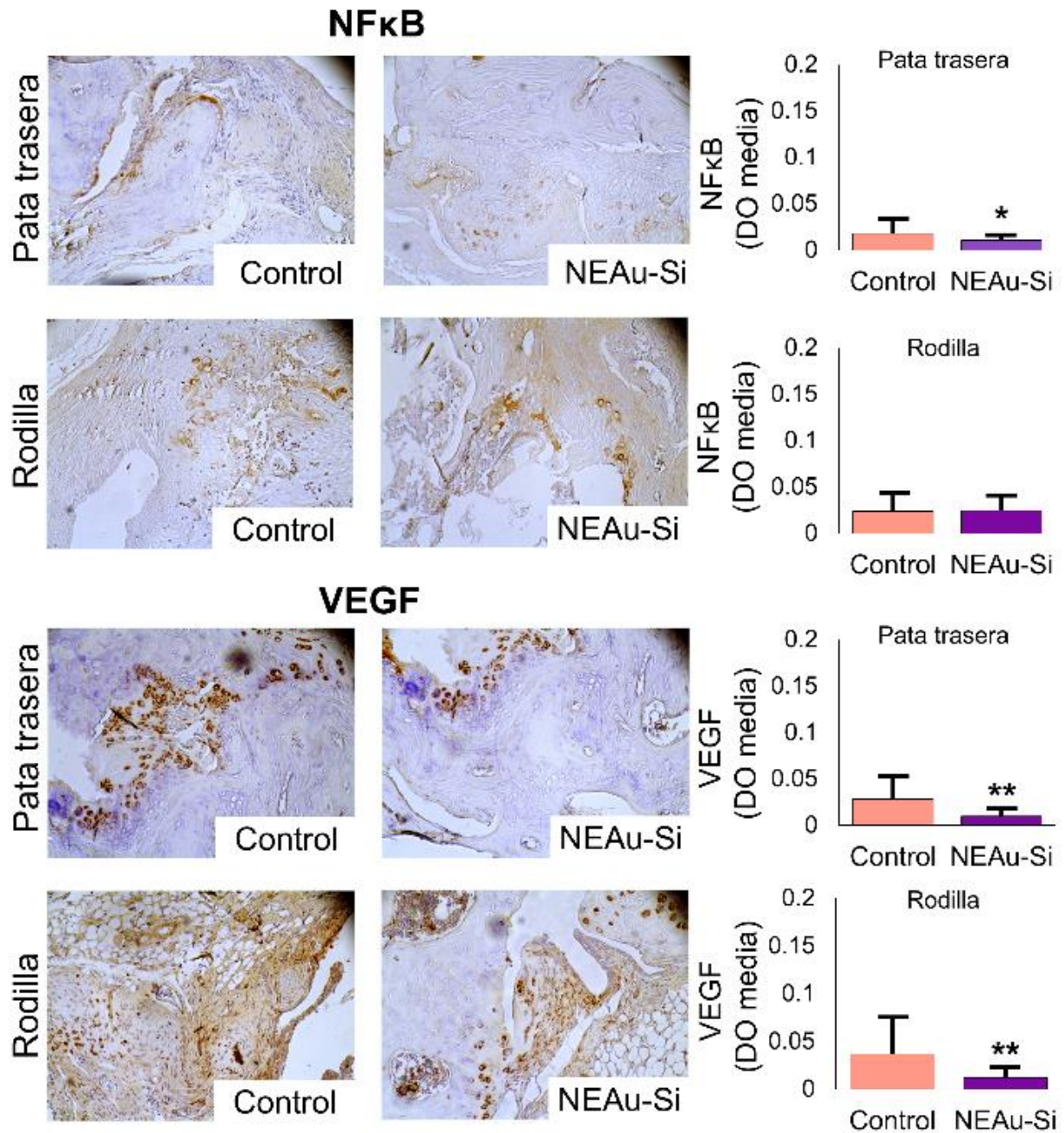


Figura 22: Efecto de las NEAu-Si en la expresión tisular de NFκB y VEGF en las articulaciones de ratones DBA/1 con AIC. Imágenes representativas de los hallazgos de IHQ. La inmunodetección se llevó a cabo usando estreptavidina peroxidasa y diaminobencidina (DAB) como cromógeno. Las cuantificaciones se ejecutaron con el software ImageJ e IHC toolbox. Para cada imagen, se extrajo el color DAB, así como los niveles de gris máximos y promedio. La densidad óptica (DO) de cada imagen se obtuvo con $\log_{10}(\text{valor de gris máximo}/\text{valor de gris promedio})$. El promedio y DE fueron calculadas y gráficamente representadas para cada grupo de estudio. Se utilizó la prueba T de Student para determinar las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

Las funciones de la proteína VEGF son principalmente la migración de las células endotélicas, vasodilatación, elongación y proliferación endotelial. Para esto, promueve la movilización de células inflamatorias, como los macrófagos, para la reparación o remodelación de tejido. Es segregada principalmente por células endotélicas u otras células debido a la falta de oxígeno. Sin embargo, en enfermedades autoinmunes como el cáncer, AR, esclerosis sistémica, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, síndromes vasculíticos, enfermedad inflamatoria intestinal, espondiloartropatías, psoriasis, entre otras (Carvalho et al., 2007), la angiogénesis excesiva da paso al crecimiento desordenado y al enredamiento de vasos sanguíneos de gran tamaño y con perforaciones. Esto posibilita la expansión del problema, por lo que tratamientos inhibidores de VEGF son de gran interés para el tratamiento de estos padecimientos (Melincovici et al., 2018).

4.8. Disminución de las citocinas TNF α e IL-6 en el suero de ratones DBA/1 con AIC debido al tratamiento con NEAu-Si

La cuantificación de citocinas proinflamatorias a través de citometría de flujo mostró que TNF α e IL-6 fueron significativamente más bajas ($p \leq 0.05$) en el suero obtenido del grupo AIC-experimental con respecto al grupo AIC-control. Esto verifica los resultados arrojados en el análisis bioinformático, donde se deduce que estas dos citocinas se ven reducidas debido al tratamiento con NEAu-Si. Por otra parte, la citocina IFN γ también presentó una disminución con el tratamiento, pero esta no fue estadísticamente significativa. Los datos obtenidos se presentan en la Figura 23.

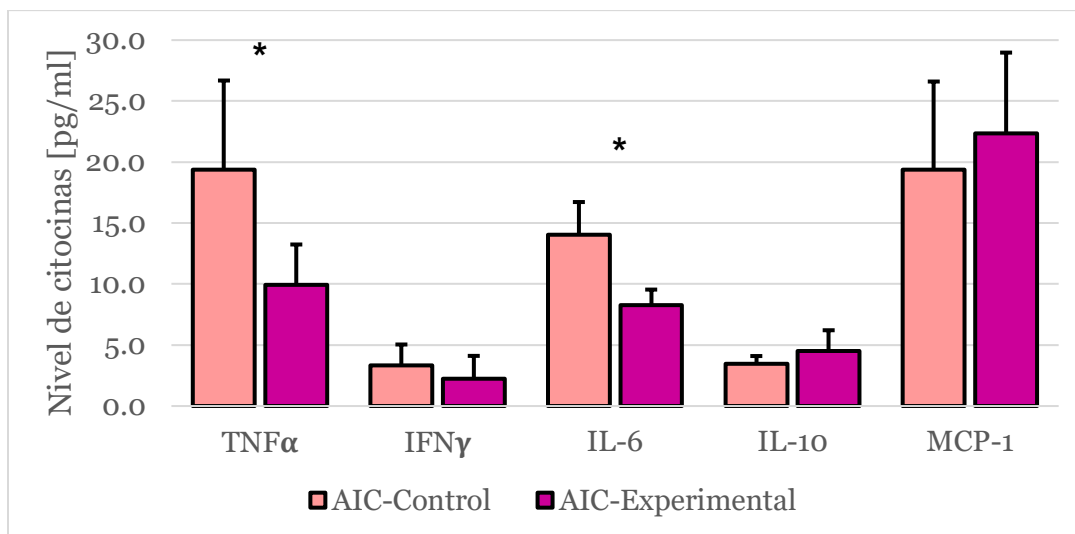


Figura 23: Efecto del tratamiento con NEAu-Si en los niveles de citocinas del suero de ratones DBA/1 con AIC. Los niveles de las citocinas proinflamatorias en el suero fueron determinados por citometría de flujo. * $p < 0.05$

4.9. Efectos del tratamiento con NEAu-Si en la porosidad de las patas traseras de ratones DBA/1 con AIC

Las imágenes de las tomografías de patas traseras derechas tanto del grupo AIC-control como AIC-experimental se muestran en la Figura 24 seguidas de imágenes que revelan su porosidad y respectiva cuantificación del volumen de poro. Ambas extremidades presentaron eritema e inflamación severa o anquilosis de la extremidad durante 62 días consecutivos, lo que permite la comparación de su porosidad ósea. En las imágenes se puede observar una reducción en la porosidad en la pata trasera del ratón que fue sometido al tratamiento con NEAu-Si. Esto se puede corroborar al comparar el volumen total de los poros de cada extremidad, siendo de 0.35749 mm^3 en la pata del ratón AIC-control y de 0.14487 mm^3 en la pata del ratón AIC-experimental. Estos resultados pueden ser atribuidos a la inhibición de citocinas proinflamatorias, ya que esto balancea la cantidad de osteoclastos con la cantidad de osteoblastos, reduciendo así la degradación de hueso (Jeong & Park, 2021). Además, están de acuerdo con los reportados por Bai (Bai et al., 2021) donde el tratamiento con NPAu a ratones con erosión ósea inducida por lipopolisacáridos incremento su densidad ósea un 14% en comparación con el grupo AIC-control que no recibió NPAu.

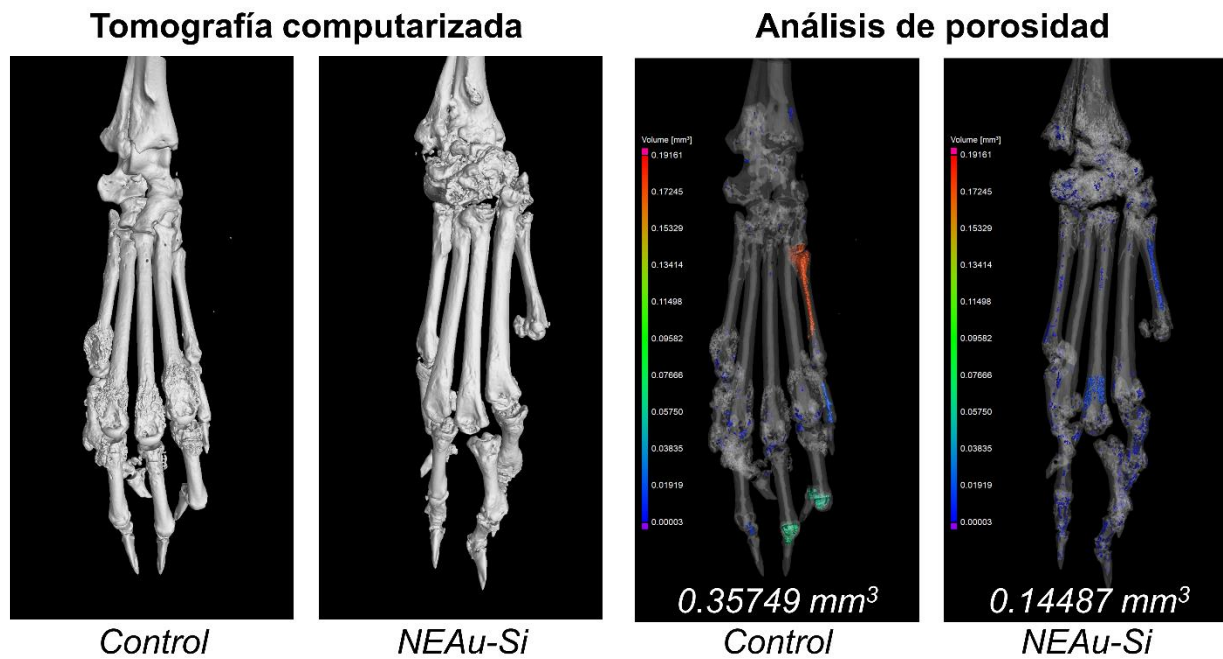


Figura 24: Imágenes de TC de patas traseras derechas de los grupos AIC-control y AIC-experimental con su respectivo volumen de poro. Ambas extremidades presentaron un puntaje clínico de 4 por 62 días consecutivos.

4.10. Evaluación de la eficiencia fototérmica de las NEAu-Si

La eficiencia fototérmica, de las diferentes dimensiones de NEAu-Si, fue evaluada irradiándolas con láser de 852 nm y una potencia de 340 mW/cm². Las imágenes térmicas obtenidas con la cámara térmica True IR (Agilent Keysight) antes, durante y después de la irradiación se muestran en la Figura 25. Al utilizar el método de síntesis propuesto en esta investigación, el arreglo núcleo / semicubierto con la mayor eficiencia fototérmica corresponde a las NEAu-Si con un núcleo de sílice de 132 nm y una semicubierta de 7 nm. Aun cuando las NEAu-Si no cuentan con una cubierta completa de oro, al compararlas con las partículas originalmente desarrolladas por Halas y su equipo (Westcott et al., 1998), las NEAu-Si si tienen significativas propiedades fototérmicas.

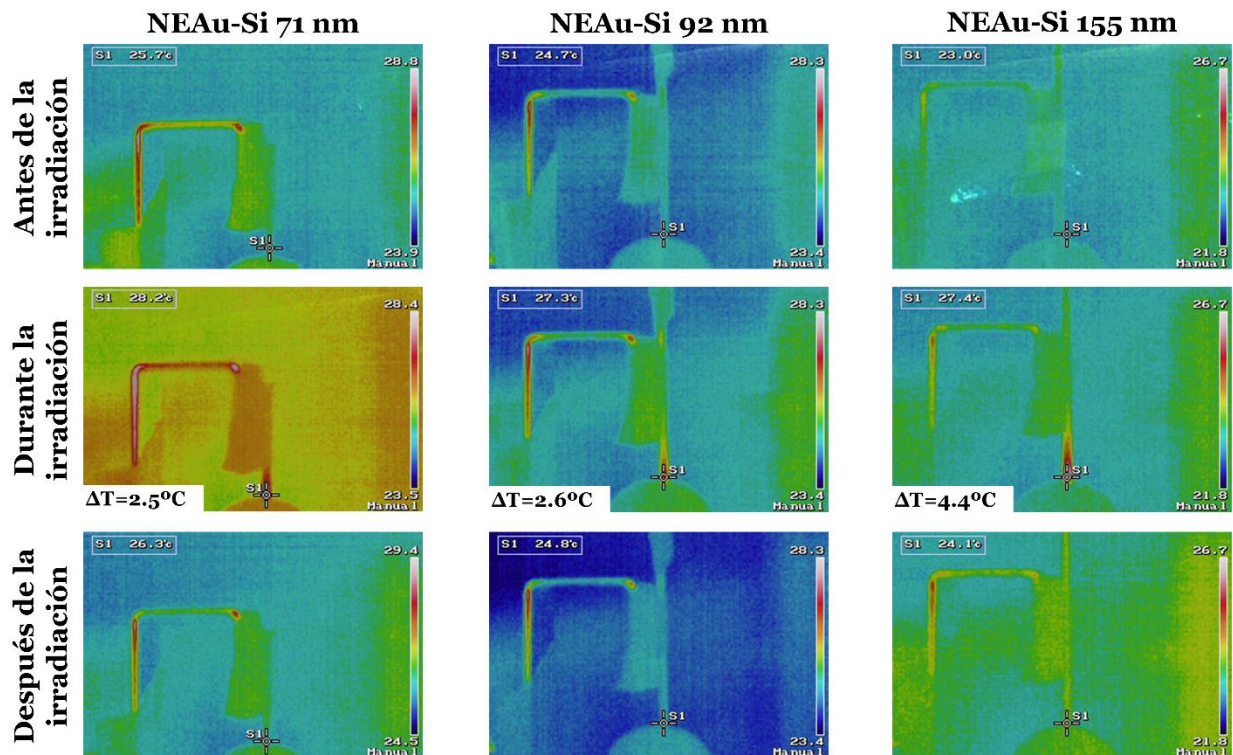


Figura 25: Imágenes térmicas obtenidas antes, durante y después de la irradiación de las NEAu-Si con diámetros de 71, 92 y 155 nm y semicubierta de oro de ≈ 5 nm con láser de 852 nm 340 mW/cm². El punto S1 indica donde se está dirigiendo el láser y su respectiva temperatura está indicada en la esquina superior izquierda de cada imagen

La Figura 25 muestra el calentamiento y enfriamiento de las NEAu-Si con núcleo de 63, 83 y 132 nm. Las NEAu-Si con núcleo de 63 nm elevaron su temperatura 2.5°C en 10 minutos y este calor fue dispersado en aproximadamente 3 min. Para las NEAu-Si con núcleo de 83nm, se obtuvo un incremento de temperatura de 2.6°C en 19 minutos, el cual se dispersó en 3 min. Mientras que las NEAu-Si que presentaron una mayor eficiencia fototérmica tienen un núcleo de 132 nm e incrementaron su temperatura 4.4°C en 8 minutos, regresando a temperatura ambiente en 3 minutos aproximadamente. La Figura 26 muestra los dos ciclos típicos de calentamiento-enfriamiento para las NEAu-Si con núcleos de sílice de 132 nm (cuadros azules) y 83 nm (triángulos rojos). Los cuadros y los triángulos representan la medición de los datos, mientras que las líneas representan el mejor ajuste de curva utilizando el método de mínimos cuadrados. El primer paso corresponde al proceso de calentamiento, que fue completado en 8 minutos para las NEAu-Si con núcleo de 132 nm y 19 minutos para las NEAu-Si con núcleo de 83 nm. La etapa de enfriamiento inició inmediatamente después de apagar el láser y concluyó en aproximadamente 3 minutos para ambos casos. Es importante mencionar que la etapa de enfriamiento corresponde a la ley de enfriamiento de Newton, que está dada por la Ecuación 4:

$$\Delta T = (T(t) - T_s) = (T_0 - T_s)e^{-t/\tau} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde ΔT es el cambio de temperatura, $T(t)$ es la temperatura en el tiempo t , T_0 es la temperatura inicial de las NEAu-Si, T_s es la temperatura ambiente y τ es la constante térmica. Con los datos expuestos en la Figura 26, el mejor ajuste de curva exponencial para las NEAu-Si con núcleo de 132 nm está dada por la Ecuación 5:

$$\Delta T = 4.37 \times (e^{-t/0.71})^\circ\text{C} \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde $T_s = 23^\circ\text{C}$, $T_0 = 27.4^\circ\text{C}$ y la constante térmica $\tau = 0.71$ minutos. Los resultados obtenidos nos permiten proponer a las NEAu-Si con núcleo de 132 nm como una potencial estructura para los tratamientos fototérmicos, ya que un incremento en temperatura de 4.4°C es más que suficiente para inducir necrosis en el tejido (Khan & Brown, 2002). Aun cuando el tejido canceroso inicia necrosis a temperaturas de 40-44 °C (Ahmed et al., 2015), la elevada actividad metabólica y flujo sanguíneo presente en el tejido canceroso, incrementa la temperatura corporal de 37°C a 39-40°C (Mital & Scott, 2007). Por lo tanto, un incremento de temperatura de 4.4°C debe ser suficiente para inducir necrosis en las células cancerígenas. Además, la baja potencia necesitada para alcanzar esta temperatura (340 mW/cm²) asegura que el tejido aledaño no sufrirá ningún daño. Adicionalmente, el rápido enfriamiento de estas NEAu-Si permite un buen control sobre el procedimiento.

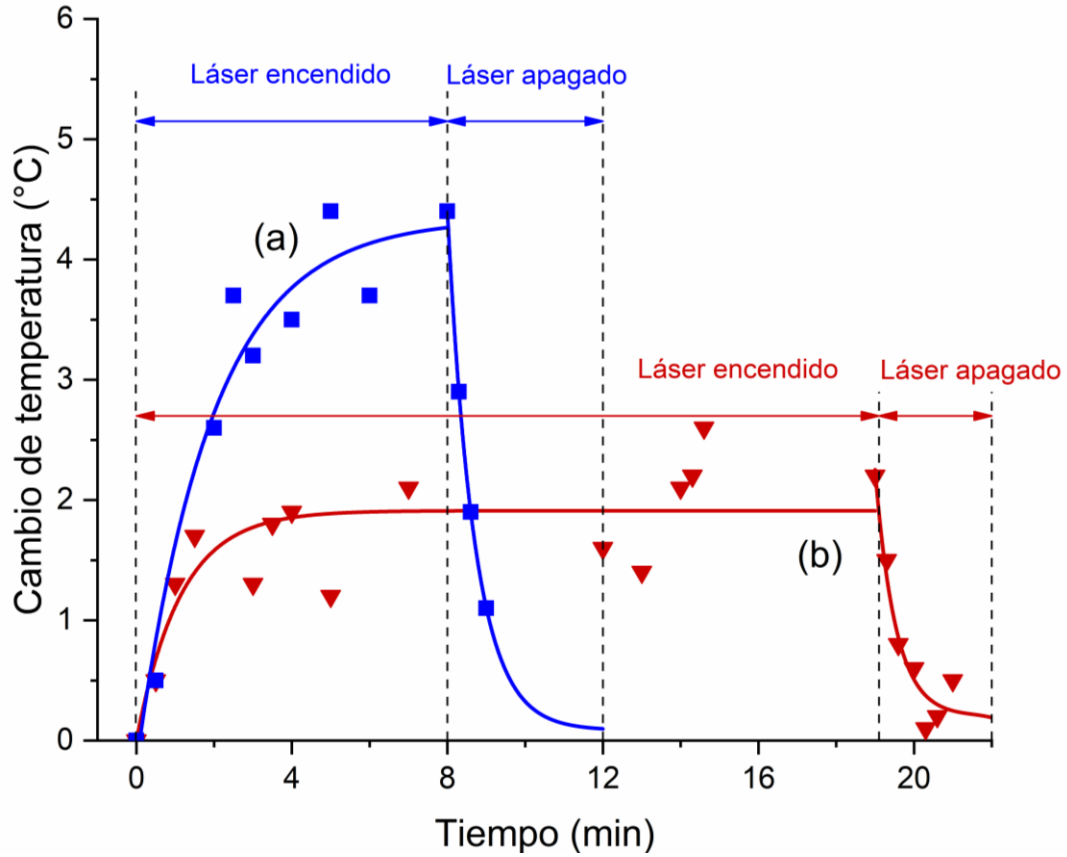


Figura 26: Cambio de temperatura en soluciones de NEAu-Si (47mg/ml) con sintetizadas sobre núcleos de sílice con diámetros de (a) 132nm (cuadros azules) y (b) 83nm (triángulos rojos) irradiados con un láser de 852 nm y potencia de 340 mW/cm²

5. Conclusiones

En esta investigación se sintetizaron NEAu-Si, se evaluó y caracterizó su efecto antiinflamatorio, su acumulación dentro de la membrana sinovial en ratones DBA/1 con AIC, así como su actividad fototérmica. Lo más relevante de la utilización de NEAu-Si en ratones con AIC fue que se logró la disminución de la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF α e IL-6, siendo estas importantes en el proceso patogénico de la artritis.

Se sintetizaron y caracterizaron NEAu-Si con diámetros de 71 ± 6 , 92 ± 8 y 155 ± 11 nm logrando optimizar el tiempo del proceso en un 83% con respecto a los publicados por otros autores. También se dedujeron fórmulas que permiten controlar tanto las dimensiones resultantes de las partículas como la distribución homogénea de las NPAu sobre las esferas de sílice.

Se determinó que la dosis adecuada de NEAu-Si para el diámetro de 71 ± 6 nm para ratones DBA/1 con AIC es de $64.25\ \mu\text{g}$ ($3.21\ \mu\text{g}$ NEAu-Si / g de peso de ratón). De esta dosis solo el 0.00591, 0.000133 y 0.000421 % se encontró en los bazo, hígados y riñones respectivamente, 21 días después de la última dosis. Ya que los ratones no presentaron falta de tolerancia, pérdida de pelaje o decoloración, pérdida de peso, fatiga o muerte, se concluyó que estas acumulaciones no son tóxicas.

Se diseñó un tratamiento de 10 dosis de NEAu-Si administradas vía intraperitoneal para los ratones DBA/1 con AIC, y se definió la distribución de las muestras. Este tratamiento redujo los niveles de citocinas proinflamatorias sin ocasionar efectos tóxicos en los ratones permitiendo su supervivencia y bienestar.

Se indujo artritis reumatoide por colágena en ratones DBA/1 y se monitoreo la evolución de la inflamación antes y durante el tratamiento. Los datos recabados mostraron una disminución, aunque no estadísticamente significativa, de la inflamación causada por el efecto del tratamiento con NEAu-Si.

Se evaluó el efecto del tratamiento con NEAu-Si a través de histología, microscopía electrónica, tomografía, ICP, análisis bioinformático, citometría de flujo e inmunohistoquímica. Los resultados del análisis bioinformático, IHQ y citometría de flujo mostraron la habilidad de las NEAu-Si para disminuir los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF α e IL-6, para desregular varios procesos biológicos y vías de señalización KEGG asociados con AR como procesos de oxidación-reducción, angiogénesis y artritis reumatoide. Además, las imágenes por tomografía computacional revelaron que las NEAu-Si disminuyen la degeneración de hueso al reducir su porosidad.

Se evaluó la eficiencia fototérmica de las NEAu-Si con diámetros de 71 ± 6 , 92 ± 8 y 155 ± 11 nm determinando que las NEAu-Si de 155 ± 11 nm presentan la máxima eficiencia fototérmica ya que incrementaron la temperatura de sus alrededores 4.4°C . Este incremento de temperatura es suficiente para inducir necrosis celular en tejido cancerígeno.

6. Bibliografía

- Ahmed, K., Tabuchi, Y., & Kondo, T. (2015). Hyperthermia: An effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis*, 20(11), 1411–1419. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1168-3>
- Alabugin, A. (2019). Near-IR Photochemistry for Biology: Exploiting the Optical Window of Tissue. *Photochemistry and Photobiology*, 95(3), 722–732. <https://doi.org/10.1111/php.13068>
- Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. W. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14, 1–16. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>
- Andrade, K. N., Pérez, A. M. P., & Arízaga, G. G. C. (2019). Passive and active targeting strategies in hybrid layered double hydroxides nanoparticles for tumor bioimaging and therapy. *Applied Clay Science*, 181(July), 105214. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105214>
- Arvizo, R. R., Saha, S., Wang, E., Robertson, J. D., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2013). Inhibition of tumor growth and metastasis by a self-therapeutic nanoparticle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6700–6705. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214547110>
- Bader, G. D., & Hogue, C. W. V. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4, 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-4-2>
- Bai, X., Chen, D., Dai, Y., Liang, S., Song, B., Guo, J., Dai, B., Zhang, D., & Feng, L. (2021). Bone formation recovery with gold nanoparticle-induced M2 macrophage polarization in mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 38, 102457. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102457>
- Balfourier, A., Kolosnjaj-Tabi, J., Luciani, N., Carn, F., & Gazeau, F. (2020). Gold-based therapy: From past to present. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(37), 22639–22648. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007285117>
- BarathManiKanth, S., Kalishwaralal, K., Sriram, M., Pandian, S. R. K., Youn, H., Eom, S., & Gurunathan, S. (2010). Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *Journal of Nanobiotechnology*, 8(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-16>
- Bevaart, L., Vervoordeldonk, M. J., & Tak, P. P. (2010). Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: How does it relate to rheumatoid arthritis? In *Arthritis*

and Rheumatism (Vol. 62, Issue 8, pp. 2192–2205).
<https://doi.org/10.1002/art.27503>

- Brand, D. D., Latham, K. A., & Rosloniec, E. F. (2007). Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols*, 2(5), 1269–1275. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.173>
- Brinson, B. E., Lassiter, J. B., Levin, C. S., Bardhan, R., Mirin, N., & Halas, N. J. (2008). Nanoshells made easy: Improving Au layer growth on nanoparticle surfaces. *Langmuir*, 24(24), 14166–14171. <https://doi.org/10.1021/la802049p>
- Caplazi, P., Baca, M., Barck, K., Carano, R. A. D., DeVoss, J., Lee, W. P., Bolon, B., & Diehl, L. (2015). Mouse Models of Rheumatoid Arthritis. *Veterinary Pathology*, 52(5), 819–826. <https://doi.org/10.1177/0300985815588612>
- Carvalho, J. F., Blank, M., & Shoenfeld, Y. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in autoimmune diseases. *Journal of Clinical Immunology*, 27(3), 246–256. <https://doi.org/10.1007/s10875-007-9083-1>
- Chen, Y. S., Hung, Y. C., Liao, I., & Huang, G. S. (2009). Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 4(8), 858–864. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9334-6>
- Choy, E. H., De Benedetti, F., Takeuchi, T., Hashizume, M., John, M. R., & Kishimoto, T. (2020). Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nature Reviews Rheumatology*, 16(6), 335–345. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0419-z>
- Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta Potential Measurement. In S. E. McNeil (Ed.), *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (Vol. 79, Issue 3, pp. 63–70). Humana Press. <https://doi.org/10.3797/scipharm.br-11-01>
- Costa Lima, S. A., & Reis, S. (2015). Temperature-responsive polymeric nanospheres containing methotrexate and gold nanoparticles: A multi-drug system for theranostic in rheumatoid arthritis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 133, 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.048>
- de Launay, D., van de Sande, M. G. H., de Hair, M. J. H., Grabiec, A. M., van de Sande, G. P. M., Lehmann, K. A., Wijbrandts, C. A., van Baarsen, L. G. M., Gerlag, D. M., Tak, P. P., & Reedquist, K. A. (2012). Selective involvement of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases in early rheumatoid arthritis (1987 ACR criteria compared to 2010 ACR/EULAR criteria): a prospective study aimed at identification of diagnostic and prognostic biomarkers as well as th. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(3), 415–423. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.143529>

- Dong, J., Carpinone, P. L., Pyrgiotakis, G., Demokritou, P., & Moudgil, B. M. (2020). Synthesis of Precision Gold Nanoparticles Using Turkevich Method. *KONA Powder and Particle Journal*, 37(37), 2020011. <https://doi.org/10.14356/kona.2020011>
- Dong, X., Wu, Z., Li, X., Xiao, L., Yang, M., Li, Y., Duan, J., & Sun, Z. (2020). The Size-dependent Cytotoxicity of Amorphous Silica Nanoparticles: A Systematic Review of in vitro Studies. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 9089–9113. <https://doi.org/10.2147/IJN.S276105>
- Duan, X., & Li, Y. (2013). Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 9(9–10), 1521–1532. <https://doi.org/10.1002/sml.201201390>
- Elci, S. G., Jiang, Y., Yan, B., Kim, S. T., Saha, K., Moyano, D. F., Yesilbag Tonga, G., Jackson, L. C., Rotello, V. M., & Vachet, R. W. (2016). Surface Charge Controls the Suborgan Biodistributions of Gold Nanoparticles. *ACS Nano*, 10(5), 5536–5542. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02086>
- Gad, S. C., Sharp, K. L., Montgomery, C., Payne, J. D., & Goodrich, G. P. (2012). Evaluation of the Toxicity of Intravenous Delivery of Auroshell Particles (Gold–Silica Nanoshells). *International Journal of Toxicology*, 31(6), 584–594. <https://doi.org/10.1177/1091581812465969>
- Ghimire, P. P., & Jaroniec, M. (2021). Renaissance of Stöber method for synthesis of colloidal particles: New developments and opportunities. *Journal of Colloid and Interface Science*, 584, 838–865. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.10.014>
- Gonçalves, M. C. (2018). Sol-gel Silica Nanoparticles in Medicine: A Natural Choice. Design, Synthesis and Products. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(8), 1–26. <https://doi.org/10.3390/molecules23082021>
- González-Chávez, S. A., Pacheco-Tena, C., Macías-Vázquez, C. E., & Luévano-Flores, E. (2013). Assessment of different decalcifying protocols on Osteopontin and Osteocalcin immunostaining in whole bone specimens of arthritis rat model by confocal immunofluorescence. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6(10), 1972–1983.
- González-Chávez, S. A., Pacheco-Tena, C., Quiñonez-Flores, C. M., Espinosolis, G. P., Burrola-De Anda, J. I., & Muñoz-Morales, P. M. (2020). Positive transcriptional response on inflammation and joint remodelling influenced by physical exercise in proteoglycan-induced arthritis: An animal study. *Bone and Joint Research*, 9(1), 36–48. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.91.BJR-2019-0055.R2>

- Hirsch, L. R., Halas, N. J., & West, J. L. (2005). Whole-Blood Immunoassay Facilitated by Gold Nanoshell–Conjugate Antibodies. In S. J. Rosenthal & D. W. Wright (Eds.), *NanoBiotechnology Protocols* (Vol. 303, pp. 101–112). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-901-X:101>
- Hong, J.-I., Park, I. Y., & Kim, H. A. (2020). Understanding the Molecular Mechanisms Underlying the Pathogenesis of Arthritis Pain Using Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 533–557. <https://doi.org/10.3390/ijms21020533>
- Hornos Carneiro, M. F., & Barbosa, F. (2016). Gold nanoparticles: A critical review of therapeutic applications and toxicological aspects. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 19(3–4), 129–148. <https://doi.org/10.1080/10937404.2016.1168762>
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>
- Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.), N. I. of H. (U. S.). (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (N. A. P. US, Ed.; 8th ed.). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12910>
- James, L. R. A., Xu, Z. Q., Sluyter, R., Hawksworth, E. L., Kelso, C., Lai, B., Paterson, D. J., de Jonge, M. D., Dixon, N. E., Beck, J. L., Ralph, S. F., & Dillon, C. T. (2015). An investigation into the interactions of gold nanoparticles and anti-arthritis drugs with macrophages, and their reactivity towards thioredoxin reductase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 142, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.09.013>
- Janakiraman, K., Krishnaswami, V., Rajendran, V., Natesan, S., & Kandasamy, R. (2018). Novel nano therapeutic materials for the effective treatment of rheumatoid arthritis-recent insights. *Materials Today Communications*, 17(January), 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2018.09.011>
- Jang, D.-I., Lee, A.-H., Shin, H.-Y., Song, H.-R., Park, J.-H., Kang, T.-B., Lee, S.-R., & Yang, S.-H. (2021). The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>

- Jeong, M., & Park, J. H. (2021). Nanomedicine for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Molecular Pharmaceutics*, *18*(2), 539–549. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00295>
- Jhun, J., Moon, J., Ryu, J., Shin, Y., Lee, S., Cho, K. H., Kang, T., Cho, M. La, & Park, S. H. (2020). Liposome/gold hybrid nanoparticle encoded with CoQ10 (LGNP-CoQ10) suppressed rheumatoid arthritis via STAT3/Th17 targeting. *PLoS ONE*, *15*(11 November), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241080>
- Kah, J. C. Y., Phonthammachai, N., Wan, R. C. Y., Song, J., White, T., Mhaisalkar, S., Ahmadb, I., Sheppard, C., & Olivoc, M. (2008). Synthesis of gold nanoshells based on the deposition-precipitation process. *Gold Bulletin*, *41*(1), 23–36. <https://doi.org/10.1007/BF03215620>
- Khan, V. R., & Brown, I. R. (2002). The effect of hyperthermia on the induction of cell death in brain, testis, and thymus of the adult and developing rat. *Cell Stress & Chaperones*, *7*(1), 73–90. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2002\)007<0073:teohot>2.0.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2002)007<0073:teohot>2.0.co;2)
- Kharchenko, A., Myronyuk, O., Melnyk, L., & Sivolapov, P. (2017). Analysis of methods of regulation of silicon dioxide particles size obtained by the Stober method. *Technology Audit and Production Reserves*, *2*(3(40)), 9–16. <https://doi.org/10.15587/2312-8372.2018.128571>
- Kim, H. J., Lee, S., Park, K.-H., Mun, C. H., Park, Y., & Yoo, K. (2015). Drug-loaded gold/iron/gold plasmonic nanoparticles for magnetic targeted chemo-photothermal treatment of rheumatoid arthritis. *Biomaterials*, *61*, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.018>
- Kirdaite, G., Leonaviciene, L., Bradunaite, R., Vasiliauskas, A., Rudys, R., Ramanaviciene, A., & Mackiewicz, Z. (2019). Antioxidant effects of gold nanoparticles on early stage of collagen-induced arthritis in rats. *Research in Veterinary Science*, *124*, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.02.002>
- Kollias, G., Papadaki, P., Apparailly, F., Vervoordeldonk, M. J., Holmdahl, R., Baumans, V., Desaintes, C., di Santo, J., Distler, J., Garside, P., Hegen, M., Huizinga, T. W. J., Jüngel, A., Klareskog, L., McInnes, I., Ragoussis, I., Schett, G., Hart, B. T. T., Tak, P. P., ... Gay, S. (2011). Animal models for arthritis: Innovative tools for prevention and treatment. In *Annals of the Rheumatic Diseases* (Vol. 70, Issue 8, pp. 1357–1362). <https://doi.org/10.1136/ard.2010.148551>
- Koushki, K., Keshavarz Shahbaz, S., Keshavarz, M., Bezsonov, E. E., Sathyapalan, T., & Sahebkar, A. (2021). Gold Nanoparticles: Multifaceted Roles in the Management

- of Autoimmune Disorders. *Biomolecules*, 11(9), 1289.
<https://doi.org/10.3390/biom11091289>
- Lee, H., Lee, M.-Y., Bhang, S. H., Kim, B.-S., Kim, Y. S., Ju, J. H., Kim, K. S., & Hahn, S. K. (2014). Hyaluronate-gold nanoparticle/tocilizumab complex for the treatment of rheumatoid arthritis. *ACS Nano*, 8(5), 4790–4798.
<https://doi.org/10.1021/nn500685h>
- Lee, S.-M., Kim, H. J., Ha, Y.-J., Park, Y. N., Lee, S.-K., Park, Y.-B., & Yoo, K.-H. (2013). Targeted Chemo-Photothermal Treatments of Rheumatoid Arthritis Using Gold Half-Shell Multifunctional Nanoparticles. *ACS Nano*, 7(1), 50–57.
<https://doi.org/10.1021/nn301215q>
- Leonavičienė, L., Kirdaitė, G., Bradūnaitė, R., Vaitkienė, D., Vasiliauskas, A., Zabulytė, D., Ramanavičienė, A., Ramanavičius, A., Ašmenavičius, T., & Mackiewicz, Z. (2012). Effect of gold nanoparticles in the treatment of established collagen arthritis in rats. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 48(2), 91–101.
<https://doi.org/10.3390/medicina48020016>
- Li, Z., Tang, S., Wang, B., Li, Y., Huang, H., Wang, H., Li, P., Li, C., Chu, P. K., & Yu, X. F. (2016). Metabolizable Small Gold Nanorods: Size-dependent Cytotoxicity, Cell Uptake and in Vivo Biodistribution. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2(5), 789–797. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00538>
- Massai, L., Grguric-Sipka, S., Liu, W., Bertrand, B., & Pratesi, A. (2021). Editorial: The Golden Future in Medicinal Chemistry: Perspectives and Resources From Old and New Gold-Based Drug Candidates. *Frontiers in Chemistry*, 9(March), 665244.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2021.665244>
- McInnes, I. B., & Schett, G. (2011). The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*, 365(23), 2205–2219.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1004965>
- Melincovici, C. S., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I. M., Roman, A. L., & Mişu, C. M. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie*, 59(2), 455–467.
- Mital, M., & Scott, E. P. (2007). Thermal detection of embedded tumors using infrared imaging. *Journal of Biomechanical Engineering*, 129(1), 33–39.
<https://doi.org/10.1115/1.2401181>
- Moreira, A. F., Rodrigues, C. F., Reis, C. A., Costa, E. C., & Correia, I. J. (2018). Gold-core silica shell nanoparticles application in imaging and therapy: A review.

Microporous and Mesoporous Materials, 270(April), 168–179.
<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.05.022>

- Mostafavi, E., Zarepour, A., Barabadi, H., Zarrabi, A., Truong, L. B., & Medina-Cruz, D. (2022). Antineoplastic activity of biogenic silver and gold nanoparticles to combat leukemia: Beginning a new era in cancer theragnostic. *Biotechnology Reports*, 34(February), e00714. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00714>
- Murtey, M. Das, & Ramasamy, P. (2016). Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy – Life Sciences. In M. Janecek & R. Kral (Eds.), *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences* (pp. 161–185). InTechOpen. <https://doi.org/10.5772/61720>
- Nakamura, T., Mochidzuki, Y., & Sato, S. (2008). Fabrication of gold nanoparticles in intense optical field by femtosecond laser irradiation of aqueous solution. *Journal of Materials Research*, 23(4), 968–974. <https://doi.org/10.1557/jmr.2008.0115>
- Oldenburg, S. J., Averitt, R. D., Westcott, S. L., & Halas, N. J. (1998). Nanoengineering of optical resonances. *Chemical Physics Letters*, 288(2–4), 243–247. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(98\)00277-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(98)00277-2)
- O’Neal, D. P., Hirsch, L. R., Halas, N. J., Payne, J. D., & West, J. L. (2004). Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer Letters*, 209(2), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.02.004>
- O’Sullivan, B., Thompson, A., & Thomas, R. (2007). NF-κB as a therapeutic target in autoimmune disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(2), 111–122. <https://doi.org/10.1517/14728222.11.2.111>
- Pandey, P. K., Maheshwari, R., Raval, N., Gondaliya, P., Kalia, K., & Tekade, R. K. (2019). Nanogold-core multifunctional dendrimer for pulsatile chemo-, photothermal- and photodynamic- therapy of rheumatoid arthritis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 544, 61–77. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.02.073>
- Phonthammachai, N., Kah, J. C. Y., Jun, G., Sheppard, C. J. R., Olivo, M. C., Mhaisalkar, S. G., & White, T. J. (2008). Synthesis of Contiguous Silica–Gold Core–Shell Structures: Critical Parameters and Processes. *Langmuir*, 24(9), 5109–5112. <https://doi.org/10.1021/la703580r>
- Pillai, G. (2014). Nanomedicines for Cancer Therapy: An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development. *SOJ Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.15226/2374-6866/1/2/00109>

- Pissuwan, D., Valenzuela, S. M., & Cortie, M. B. (2006). Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 24(2), 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.12.004>
- Pollard, K. M. (2016). Silica, Silicosis, and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 7(MAR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00097>
- Quiñonez-Flores, C. M., González-Chávez, S. A., Del Río Nájera, D., & Pacheco-Tena, C. (2016). Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *BioMed Research International*, 2016(2), 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2016/6097417>
- Rajamäki, K., Nordström, T., Nurmi, K., Åkerman, K. E. O., Kovanen, P. T., Öörni, K., & Eklund, K. K. (2013). Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(19), 13410–13419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.426254>
- Rasband, W. S. (2018). *ImageJ*. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <https://imagej.nih.gov/ij/>
- Rastinehad, A. R., Anastos, H., Wajswol, E., Winoker, J. S., Sfakianos, J. P., Doppalapudi, S. K., Carrick, M. R., Knauer, C. J., Taouli, B., Lewis, S. C., Tewari, A. K., Schwartz, J. A., Canfield, S. E., George, A. K., West, J. L., & Halas, N. J. (2019). Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(37), 18590–18596. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906929116>
- Ruvalcaba, R. I., González-Chávez, S. A., Carrasco-Hernández, A. R., López-Loeza, S. M., Castellanos-Ponce, I., Vázquez-Olvera, G., Neri-Flores, M. A., Espino-Solís, G. P., Duarte-Moller, J. A., Pacheco-Tena, C., & Esparza-Ponce, H. E. (2022). Treatment with silica-gold nanostructures decreases inflammation-related gene expression in collagen-induced arthritis. *Biomaterials Science*, 2019-Novem. <https://doi.org/10.1039/D2BM00498D>
- Salvarani, C., Zizzi, F., Macchioni, P., Mantovani, W., Rossi, F., Baricchi, R., Bellelli, A., Capozzoli, N., Frizziero, L., & Portioli, I. (1989). Clinical response to auranofin in patients with psoriatic arthritis. *Clinical Rheumatology*, 8(1), 54–57. <https://doi.org/10.1007/BF02031069>
- Schurgers, E., Billiau, A., & Matthys, P. (2011). Collagen-Induced Arthritis as an Animal Model for Rheumatoid Arthritis: Focus on Interferon- γ . *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(12), 917–926. <https://doi.org/10.1089/jir.2011.0056>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for

- integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Shu, J., Qiu, G., & Ilyas, M. (2015). *Immunohistochemistry (IHC) Image Analysis Toolbox*. <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/ihc-toolbox/index.html>
- Sibuyi, N. R. S., Moabelo, K. L., Fadaka, A. O., Meyer, S., Onani, M. O., Madiehe, A. M., & Meyer, M. (2021). Multifunctional Gold Nanoparticles for Improved Diagnostic and Therapeutic Applications: A Review. *Nanoscale Research Letters*, 16(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03632-w>
- Sonavane, G., Tomoda, K., & Makino, K. (2008). Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66(2), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.07.004>
- Stern, J. M., Kibanov Solomonov, V. V., Sazykina, E., Schwartz, J. A., Gad, S. C., & Goodrich, G. P. (2016). Initial Evaluation of the Safety of Nanoshell-Directed Photothermal Therapy in the Treatment of Prostate Disease. *International Journal of Toxicology*, 35(1), 38–46. <https://doi.org/10.1177/1091581815600170>
- Sul, O.-J., Kim, J.-C., Kyung, T.-W., Kim, H.-J., Kim, Y.-Y., Kim, S.-H., Kim, J.-S., & Choi, H.-S. (2010). Gold Nanoparticles Inhibited the Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL)-Induced Osteoclast Formation by Acting as an Antioxidant. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(11), 2209–2213. <https://doi.org/10.1271/bbb.100375>
- Sumbayev, V. V., Yasinska, I. M., Garcia, C. P., Gilliland, D., Lall, G. S., Gibbs, B. F., Bonsall, D. R., Varani, L., Rossi, F., & Calzolari, L. (2013). Gold Nanoparticles Downregulate Interleukin-1 β -Induced Pro-Inflammatory Responses. *Small*, 9(3), 472–477. <https://doi.org/10.1002/sml.201201528>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. von. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D605–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>

- van Blaaderen, A., & Vrij, A. (1993). Synthesis and Characterization of Monodisperse Colloidal Organo-silica Spheres. *Journal of Colloid and Interface Science*, 156(1), 1–18. <https://doi.org/10.1006/jcis.1993.1073>
- Vincent, T. L., Williams, R. O., Maciewicz, R., Silman, A., Garside, P., Bevan, S., Chanalaris, A., Chapman, V., Cope, A., Cruwys, S., Dell'Accio, F., Gaskin, P., Gilroy, D., Glasson, S., Hegen, M., McDougall, J., Moore, A., du Sert, N. P., Perretti, M., ... Williams, N. (2012). Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models. *Rheumatology (United Kingdom)*, 51(11), 1931–1941. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes035>
- Vines, J. B., Yoon, J.-H., Ryu, N.-E., Lim, D.-J., & Park, H. (2019). Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Frontiers in Chemistry*, 7(APR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00167>
- Wallace, D. J. (2013). Specialized Treatment Approaches and Niche Therapies for Lupus Subsets. In *Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes* (Eighth Ed., pp. 626-632.e12). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1893-5.00051-0>
- Wang, P., Wang, X., Wang, L., Hou, X., Liu, W., & Chen, C. (2015). Interaction of gold nanoparticles with proteins and cells. *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(3). <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/3/034610>
- Wang, Q., & Sun, X. (2017). Recent advances in nanomedicines for the treatment of rheumatoid arthritis. *Biomaterials Science*, 5(8), 1407–1420. <https://doi.org/10.1039/c7bm00254h>
- Weissleder, R. (2001). A clearer vision for in vivo imaging. *Nature Biotechnology*, 19(4), 316–317. <https://doi.org/10.1038/86684>
- Westcott, S. L., Oldenburg, S. J., Lee, T. R., & Halas, N. J. (1998). Formation and adsorption of clusters of gold nanoparticles onto functionalized silica nanoparticle surfaces. *Langmuir*, 14(19), 5396–5401. <https://doi.org/10.1021/la980380q>
- Williams, R. O. (2005). Models of Rheumatoid Arthritis. In *Animal Models of T Cell-Mediated Skin Diseases* (Issue 50, pp. 89–117). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-26811-1_5
- Woo, S. J., Noh, H. S., Lee, N. Y., Cheon, Y.-H., Yi, S. M., Jeon, H. M., Bae, E. J., Lee, S.-I., & Park, B.-H. (2018). Myeloid sirtuin 6 deficiency accelerates experimental rheumatoid arthritis by enhancing macrophage activation and infiltration into synovium. *EBioMedicine*, 38, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.005>

- Yamashita, M. (2021). Auranofin: Past to Present, and repurposing. *International Immunopharmacology*, 101(Pt B), 108272. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108272>
- Yang, A., Wang, D., Wang, W., & Odom, T. W. (2017). Coherent Light Sources at the Nanoscale. *Annual Review of Physical Chemistry*, 68, 83–99. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-052516-050730>
- Yang, M., Feng, X., Ding, J., Chang, F., & Chen, X. (2017). Nanotherapeutics relieve rheumatoid arthritis. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 252, 108–124. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.032>
- Yaqoob, A. A., Ahmad, H., Parveen, T., Ahmad, A., Oves, M., Ismail, I. M. I., Qari, H. A., Umar, K., & Mohamad Ibrahim, M. N. (2020). Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review. *Frontiers in Chemistry*, 8(May), 341. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00341>
- Yuan, Q., Zhao, Y., Cai, P., He, Z., Gao, F., Zhang, J., & Gao, X. (2019). Dose-Dependent Efficacy of Gold Clusters on Rheumatoid Arthritis Therapy. *ACS Omega*, 4(9), 14092–14099. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02003>
- Zhang, X.-D., Wu, H.-Y., Wu, D., Wang, Y.-Y., Chang, J.-H., Zhai, Z.-B., Meng, A.-M., Liu, P.-X., Zhang, L.-A., & Fan, F.-Y. (2010). Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), 771–781. <https://doi.org/10.2147/IJN.S8428>
- Zhou, H., Gong, X., Lin, H., Chen, H., Huang, D., Li, D., Shan, H., & Gao, J. (2018). Gold nanoparticles impair autophagy flux through shape-dependent endocytosis and lysosomal dysfunction. *Journal of Materials Chemistry. B*, 6(48), 8127–8136. <https://doi.org/10.1039/c8tb02390e>