

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Funcionalización de Óxido de Grafeno con Lactosa para el
Reconocimiento Específico en un Modelo *In vitro* de
Carcinoma Hepatocelular**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Kevin Ricardo Díaz Gálvez

Hermsillo, Sonora

Junio de 2018

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Kevin Ricardo Diaz Galvez hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado funcionalización de óxido de grafeno con lactosa para el reconocimiento específico en un modelo *In vitro* de carcinoma hepatocelular y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Atentamente:



Dr. Jose Andre-i Sarabia Sainz

Presidente



M.C. José Rogelio Ramos Enríquez

Secretario



M.C Iracema del Carmen Rodríguez Hernández

Vocal



Dr. Alexel Jesús Burgara Estrella

Suplente

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue posible gracias a la colaboración colectiva de conocidos, desconocidos, familiares y amigos, quienes me ofrecieron apoyo incondicional prestando tiempo, conocimiento y esfuerzo.

Agradezco a la Universidad de Sonora, mi alma mater por el apoyo brindado durante mi formación académica.

Agradezco especialmente a los profesores que realizan investigación en el Laboratorio de Biofísica del Departamento de Investigación de Física de la Universidad de Sonora, por haberme otorgado la oportunidad de colaborar en este trabajo, al igual que toda la atención y apoyo recibido.

Con profundo respeto agradezco al Dr. José Andre-i Sarabia Sainz por haberme brindado la oportunidad de adquirir experiencia, así mismo por la confianza y el apoyo brindado.

Agradezco a todo mi comité al Dr. José Andre-i Sarabia Sainz, al M.C. José Rogelio Ramos Enríquez, a la M.C. Iracema del Carmen Rodríguez Hernández y al Dr. Alexel Jesús Burgara Estrella por su conocimiento y apoyo brindado.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Ricardo Díaz León y Elva Nidia Gálvez Chan por todo el apoyo y amor brindado en las diferentes etapas de formación academia, así mismo por ser fuente de inspiración y motivación, por haberme enseñado valores y principios, y por forjar el ciudadano que hoy en día soy.

Agradezco especialmente y dedico este trabajo a Nayelli Guadalupe Terán Saavedra, por ser una excelente asesora y guía, por haber compartido tiempo, conocimiento y esfuerzo, y por haberme enseñado tanto en tan poco tiempo. Así mismo agradezco por ser una gran compañera y amiga, por haberme ayudado tanto en la parte experimental como teórica, pues sin ella este trabajo no hubiese tenido la calidad que tiene.

También agradezco al resto de mi familia, a mis hermanos Ricardo Díaz Gálvez y Patrick Andree Díaz Gálvez por haber permanecido a mi lado y por sus palabras de motivación.

Agradezco con mucho aprecio al M.C. José Rogelio Ramos Enríquez y a la Dra. María Del Refugio Falcón Villa por creer en mí y brindarme la oportunidad de participar en sus trabajos, fortaleciendo así mi formación académica y orientación profesional.

Finalmente agradezco a mis compañeros y amigos José Ramón Flores León, Daniel Flores Ruiz y Esteban López Chavarin, por ser grandes personas con quienes compartí grandes experiencias, por haberme brindado confianza y aprecio. Así mismo agradezco a José Carlos Acosta, por ser un gran amigo fiable y trabajador, por haberme prestado su tiempo y esfuerzo. A todos ellos muchas gracias. También agradecimientos especiales a los Doctores Daniel, Mónica, Erika y Pedroza.

CONTENIDO

Votos aprobatorios.....	i
Agradecimientos.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Lista de figuras.....	vi
Resumen.....	vii
1. Introducción.....	1
2. Hipótesis.....	2
3. Objetivos.....	3
4. Antecedentes.....	4
4.1. Nanotecnología en la farmacología.....	4
4.1.1 Sistemas de liberación controlada	4
4.1.2 Matrices poliméricas para transporte de fármacos.....	5
4.1.3 Óxido de grafeno funcionalizado.....	6
4.1.3.1 Estructura.....	6
4.1.3.2 Síntesis	7
4.1.3.3 Propiedades	8
4.1.4 Óxido de grafeno funcionalizado y su aplicación en el cáncer.....	8
4.2. Hepatocarcinoma.....	9
4.2.1 Epidemiología.....	9
4.2.2 Alteraciones tisulares en el CHC.....	10
4.2.3 Alteraciones moleculares en el CHC.....	11
4.2.3.1 Receptor de asialoglicoproteínas.....	11
4.2.3.1.1 Expresión.....	12

4.2.3.1.2 Estructura.....	12
4.2.3.1.3 Unión ligando – receptor.....	13
4.2.3.1.4 Ligandos del RAGP.....	13
4.3. Óxido de grafeno modificado con lactosa y potencial terapéutica hacia CHC	13
5. Métodos.....	15
5.1 Oxidación de grafito.....	15
5.2 Exfoliación de óxido de grafito	15
5.3 Lactosilación de óxido del grafeno.....	15
5.4 Caracterización de óxido de grafeno.....	16
5.4.1 Espectroscopia infrarroja FT-IR	16
5.4.2 Microscopia de fuerza atómica.....	16
5.4.3 Microscopía electrónica de barrido SEM acoplado a EDS.....	16
5.4.4 Ensayo de biorreconocimiento del óxido de grafeno lactosilado con <i>Ricinus communis</i> aglutinina.....	16
5.5 Cultivo celular de HEPG2 y HeLa.....	17
5.6 Efecto citotóxico del óxido de grafeno lactosilado mediante MTT.....	17
5.7 Ensayo de biorreconocimiento del óxido de grafeno lactosilado en células HEPG2.....	17
5.8 Análisis estadístico.....	18
6. Resultados y discusiones.....	19
7. Conclusiones.....	26
8. Referencias.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de un sistema de liberación controlada de fármaco contra sistema de administración convencional.

Figura 2. Representación de nanoestructuras para el transporte y liberación de fármacos.

Figura 3. Estructura química del grafeno y óxido de grafeno.

Figura 4. Proceso de obtención de óxido de grafeno.

Figura 5. Representación esquemática del aumento de la permeabilidad y retención (EPR).

Figura 6. Receptores sobre-expresados en el CHC.

Figura 7. Representación esquemática de la estructura y relación geométrica del sitio de unión del RAGP.

Figura 8. Análisis de la estructura química de OGAL mediante FT-IR.

Figura 9. Caracterización morfológica de OGAL y OG mediante AFM.

Figura 10. Caracterización morfológica de OGAL, OGA Y OG mediante SEM.

Figura 11. Ensayo de biorreconocimiento del OGAL por RCA mediante ELLAs.

Figura 12. Efecto citotóxico de OGAL, OGA y OG mediante MTT.

Figura 13. Ensayo de biorreconocimiento celular con OGAL.

RESUMEN

El uso de matrices poliméricas capaces de transportar fármacos selectivamente es una apuesta favorable. El óxido de grafeno posee la capacidad de interactuar con gran diversidad de moléculas de forma covalente o no covalente. La funcionalización del óxido de grafeno con lactosa, le permite interactuar con receptores específicos para este carbohidrato y abre la posibilidad de transportar fármacos selectivamente a tejidos diana. En este contexto, los hepatocitos en el carcinoma hepatocelular presentan gran cantidad de receptores de asialoglicoproteínas, los cuales reconocen específicamente a la galactosa, carbohidrato presente en la lactosa. En este trabajo modificamos óxido de grafeno (OG) con lactosa, para obtener óxido de grafeno lactosilado (OGAL). Posterior a su síntesis, se evaluó la glicación de OG con lactosa mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y para determinar la integridad de la galactosa presente en la lactosa. También se realizaron ensayos de biorreconocimiento usando la aglutinina I de *Ricinus communis* (RCA). Posteriormente se evaluó la citotoxicidad mediante la técnica de MTT y ensayos de bioreconocimientos en células hepáticas. Los resultados sugieren que el óxido de grafeno lactosilado es un potencial nanovector para el transporte de fármacos dirigidos al carcinoma hepatocelular.

1. INTRODUCCIÓN

La convergencia de la nanotecnología con otras disciplinas como la ciencia de los materiales, la biología celular, farmacéutica y medicina, han generado un gran impacto en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, principalmente el cáncer (Kumor y cols., 2013).

El uso de óxido de grafeno (OG) ha generado gran interés en el campo de la nanotecnología, gracias a su estructura bidimensional capaz de inmovilizar un gran número de moléculas. El OG muestra estabilidad coloidal principalmente en solución acuosa y posee grupos funcionales que sirven como sitios de modificación química o funcionalización, que a su vez puede emplearse para interactuar con diversos fármacos a través de enlaces covalentes o no covalentes (Chen y cols., 2010). Por lo anterior, el uso de OG en biomedicina proporciona oportunidades como un potencial transportador de fármacos, principalmente anticancerígenos (Liu y cols., 2015). Publicaciones recientes han informado que la funcionalización del OG con derivados de lactosa es un potencial transportador de doxorubicina, un anticancerígeno de amplio espectro para el carcinoma hepatocelular (CHC) (Cao y cols., 2015). El empleo de lactosa como ligando es debido a que las células hepáticas tienen una alta expresión del receptor de asialoglicoproteína (RAGP) (500,000 RAGP por hepatocito), el cual es prácticamente exclusivo del hígado (D' Sousa y Devarajan, 2015).

Usando esta información, se ha planteado utilizar al OG lactosilado como transportador de fármacos antitumorales para tratar el CHC. Sin embargo, aún no se cuenta con suficiente información para poder concluir lo anterior. Por ello se busca realizar mayor investigación, desde la caracterización de OG funcionalizado, la evaluación del biorreconocimiento específico por los RAGP's, descartando reconocimiento con células libres de RAGP's. De esta manera, apoyar al conocimiento científico factibilidad del uso de este nanomaterial en la farmacología contra el CHC (Moghimi y cols., 2005, Cao y cols., 2015).

2. HIPÓTESIS

La modificación de óxido de grafeno con lactosa promoverá el bioreconocimiento específico de los receptores de asialoglicoproteínas de células provenientes de CHC (HEPG2).

3. OBJETIVOS

Principal:

- ✚ Sintetizar y caracterizar óxido de grafeno lactosilado (OGAL) para el reconocimiento específico en un modelo *In vitro* de carcinoma hepatocelular.

Particulares:

- ✚ Sintetizar OG mediante exfoliación ácida de grafito y lactosilarlo mediante glicación térmica.
- ✚ Caracterizar óxido de grafeno lactosilado (OGAL) mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía electrónica de barrido con detector EDS (SEM-EDS) y ensayo con lectina ligando a enzima (ELLA).
- ✚ Evaluar el efecto citotóxico del OGAL en la línea celular HEPG2 mediante MTT.
- ✚ Evaluar la interacción específica del OGAL con la línea celular HEPG2 mediante un ensayo de biorreconocimiento, competencia e inhibición con microscopía confocal fluorescente.

4. ANTECEDENTES

4.1 Nanotecnología en la farmacología

La nanotecnología es un campo emergente que tiene un gran impacto en áreas como electrónica, materiales y especialmente medicina (Mnyusiwalla y cols., 2003). La nanotecnología aplicada a la medicina, también conocida como nanomedicina se encuentra en búsqueda del diagnóstico, monitoreo y control de sistemas biológicos. Sin embargo, actualmente se enfoca en desarrollar nuevos tratamientos farmacológicos (Moghimi y cols., 2005). Esto consta del diseño y formulación de nanomateriales, los cuales están revolucionando la industria farmacéutica. Los nanomateriales son compuestos coloidales que varían en tamaño de 1 a 1000 nm (1 μm), a pesar de esto, los más usados en la farmacéutica se encuentran alrededor de 100 nm o menos (Bobo y cols., 2016). Los nanomateriales ofrecen la posibilidad de transportar fármacos poco solubles, proteger las moléculas terapéuticas, y modificar su distribución en tejidos. De hecho, se espera que la nanotecnología en la farmacéutica represente un avance significativo en el desarrollo de tratamientos de diversas enfermedades, especialmente el cáncer (Hirsjarvi y cols., 2011).

4.1.1 Sistemas con liberación controlada

En la actualidad, los sistemas de liberación de fármacos han evolucionado con el fin de proporcionar beneficios al paciente (Rojas y cols., 2016). La nanomedicina propone que la entrega de fármacos sea de forma controlada, evitando las desventajas de la terapia tradicional. Esta terapia tiene una distribución sistémica que puede provocar efectos no deseados, entre ellos, alcanzar concentraciones tóxicas en sangre y diluirse drásticamente en circulación (Liechty y cols., 2010). La falta de control de la distribución en el organismo de los medicamentos administrados, provoca que varios tipos de enfermedades, entre ellas, el cáncer, no se trate adecuadamente o no sean eficientes (Hirsjarvi y cols., 2011).

Los sistemas con liberación controlada permiten transportar múltiples fármacos dentro de matrices poliméricas, y a su vez controlar su liberación (Wang y cols., 2010). Estos sistemas representan una serie de ventajas frente al tratamiento convencional, debido a que poseen la capacidad de actuar más tiempo sobre células específicas, sin alcanzar concentraciones tóxicas y por ende disminuir los efectos secundarios (figura 1) (Rojas y cols., 2016). En este sentido, los nanomateriales ofrecen una plataforma innovadora en la entrega de fármacos revolucionando la industria farmacéutica (Hirsjarvi y cols., 2011; Rojas y cols., 2016).



Figura 1. Comparación de un sistema de liberación controlada de fármaco contra sistema de administración convencional (Liechty y cols., 2010).

4.1.2 Matrices poliméricas para transporte de fármacos

El uso de matrices poliméricas posee una gran cantidad de aplicaciones en los sistemas con administración controlada. Existen varios tipos de nanoestructuras poliméricas para el transporte y liberación de fármacos (figura 2). Se han usado matrices poliméricas, tanto sintéticas como naturales en la elaboración de nanomateriales biodegradables (Kamaly y cols., 2016). Entre los polímeros naturales están la albúmina, gelatina, alginato, colágeno y quitosano (Panyam y Labhasetwar, 2003).

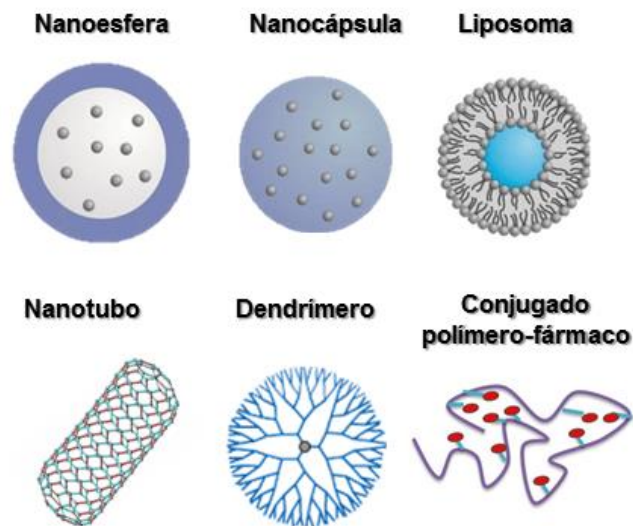


Figura 2. Representación de nanoestructuras para el transporte y liberación de fármacos (Liu, 2015).

En el caso de los sintéticos, los más utilizados para elaborar nanocompuestos incluyen los copolímeros de poliacrilatos, policaprolactonas y OG (Panyam y Labhassetwar, 2003, Cao y cols., 2015). Este último, tiene la ventaja de sostener la liberación del agente terapéutico encapsulado durante un mayor período en comparación con los naturales, por ello, su amplio uso en la farmacología (Kamaly y cols., 2016).

4.1.3 Óxido de grafeno funcionalizado

El uso de nanomateriales a base de grafeno supone una amplia gama de aplicaciones biomédicas relacionadas como agente terapéutico en modelos *In vitro* e *In vivo* (McCallion y cols., 2015). El OG posee gran capacidad de interactuar con diversas sustancias debido a su estructura planar bidimensional. Esta propiedad permite que el OG se considere un buen material para una amplia gama de aplicaciones en la farmacología (Liu y cols., 2013). Por otro lado, la funcionalización del OG con moléculas que promuevan la selectividad hacia receptores de órganos, puede generar especificidad y eficacia terapéutica, así como seguridad debido a la disminución efectos secundarios en el organismo (Cao y cols., 2015).

4.1.3.1 Estructura

El OG es una lámina atómica de grafito conformada por varios grupos funcionales oxigenados en los bordes y planos basales, generando una estructura híbrida que contiene tanto los estados π conductores de los dominios sp^2 , como también los estados σ de los dominios de carbono sp^3 (Krishnamoorthy y cols., 2012; Loh y cols., 2010). Las regiones intercaladas con carbonos sp^3 hibridados, contienen grupos funcionales hidroxilos y epóxidos en la superficie superior e inferior de cada hoja, mientras que los dominios sp^2 contienen grupos carboxilos y carbonilos principalmente en los bordes de la hoja (Stankovich y cols., 2006).

El OG exhibe una forma única bidimensional con morfología planar que no encuentran en los sistemas biológicos (Liu y cols., 2013). El OG es un precursor del grafito que está constituido covalentemente por grupos funcionales que contienen oxígeno, ya sea en el plano basal o en los bordes, es decir, posee una mezcla de carbonos hibridados sp^2 y sp^3 (Loh y cols., 2010). Los dominios sp^3 en el OG se debe a la oxidación como resultado del arreglo de diferentes tipos de grupos funcionales tales como hidroxilos, carbonilos, carboxilos y epóxilos. La presencia de estos grupos oxigenados hace que el OG sea de naturaleza hidrófila, es decir, puede dispersarse fácilmente en agua para formar suspensiones coloidales estables (Stankovich y cols., 2006). Esto hace que el OG sea viable para funcionalizarlo con materiales químicamente similares (Veerapandian y cols., 2012).

La estructura atómica de las películas del OG se asemeja a una hoja 2D, en su mayoría amorfa con átomos de carbono donde algunos se encuentran unidos al oxígeno, en lugar de una lámina de grafeno que solamente tiene oxidación superficial (Figura 3) (Mkhoyan y cols., 2009). El OG resulta ser un modelo ideal para estudiar de cerca su morfología y estructura (Kou y cols., 2011).

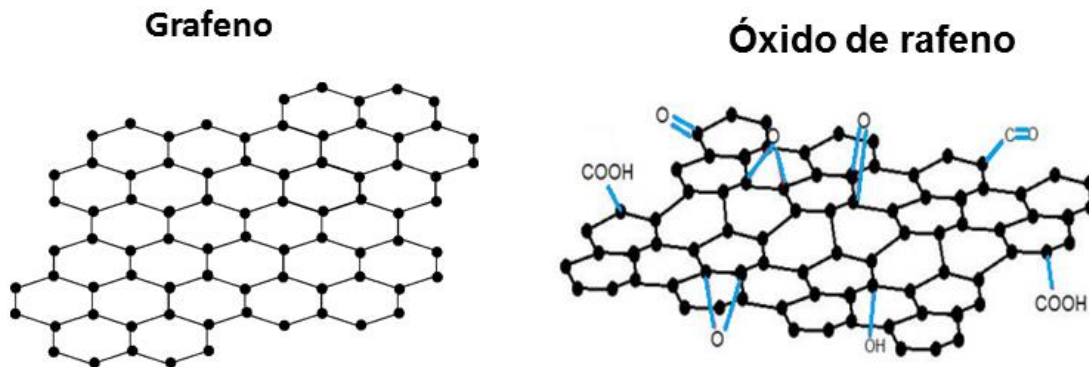


Figura 3. Estructura química del grafeno y óxido de grafeno (Liu., 2013).

4.1.3.2 Síntesis

El OG es producido por el tratamiento oxidativo del grafito a través de tres métodos principales: Staudenmeier, Brodie y Hummers (Stankovich y cols., 2007). Estos, consisten en la generación de OG por la fuerte exfoliación acida del grafito. Estos métodos se consideran eficientes para producir láminas de OG.

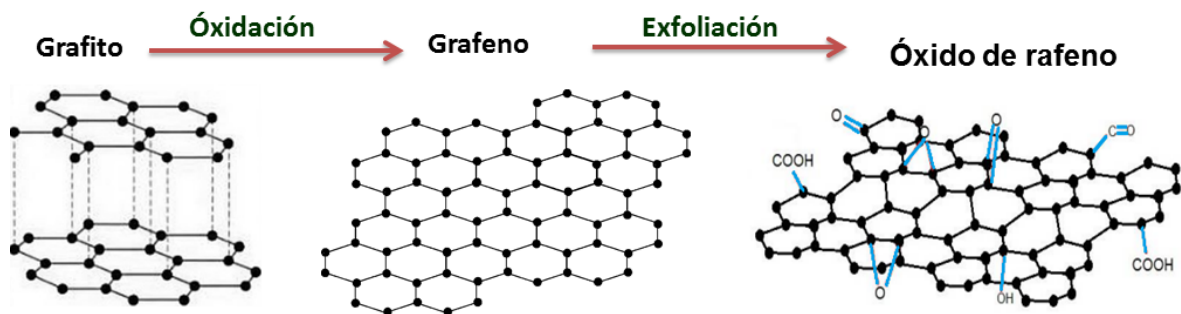


Figura 4. Proceso de obtención de óxido de grafeno (Liu., 2013).

Sin embargo, el método de Hummers es el de elección común por ser sencillo y de bajo costo (Long y cols., 2010). Para la generación de OG se parte del grafito, el cual, por un proceso de

oxidación se obtendrá óxido de grafito. Después por medio de una exfoliación ácida, el óxido grafito pasa a OG (figura 4) (Chatterjee y cols., 2015).

El método de Staudenmaier usa ácido nítrico fumante y ácido sulfúrico concentrado. Una limitante de este método es que su reacción necesita un periodo de 4 días (Chen y cols., 2013). El método de Brodie consiste en una serie de pasos los cuales generan materiales con diferentes grados de oxidación (Talyzin y cols., 2017). Dicha reacción usa ácido nítrico fumante a una temperatura de 0°C. Así mismo, la reacción dura aproximadamente 24 horas (Brodie, 1859). El método de Hummers es un proceso que se realiza en alrededor de dos horas manteniendo una temperatura inferior a 45°C (Hummers y cols., 1958). Dicho método presenta ventaja frente a las otras técnicas debido a que es el más rápido (Chen y cols., 2013).

4.1.3.3 Propiedades

El OG posee una gran cantidad de propiedades, desde eléctricas, ópticas, térmicas hasta biomédicas. Esto es debido a la existencia de grupos funcionales oxigenados en su estructura (Chen y cols., 2012). Una de las propiedades más atractivas del OG es que posee una estructura porosa para transportar moléculas (Park y cols., 2007; Huang y cols., 2009). Además, otras moléculas (ligandos) pueden interactuar con sus grupos funcionales y así funcionalizarlo. Aunado a lo anterior, la suspensión coloidal en agua le confiere gran utilidad en la biomedicina, principalmente la farmacología, visualizándolo como un posible transportador de fármacos contra el cáncer (Mkhoyan y cols., 2009, Cao y cols., 2015).

4.1.4 Óxido de grafeno funcionalizado y su aplicación en el cáncer

Las diversas matrices poliméricas obtenidas de la funcionalización del OG se logran mediante enlaces covalentes o no covalentes. El modelo de Lerf-Klinowski sugiere que los grupos funcionales reactivos en el OG son carbonilo, hidroxilo, epoxi, carboxilo y éster. La mayoría de funcionalizaciones ocurren en más de un tipo de grupo oxigenado (Gao y cols., 2015). El OG funcionalizado produce una nueva clase de nanocompuesto, estos tienen mejor solubilidad y procesabilidad tanto en disolventes orgánicos y en agua. Además, la funcionalización disminuye drásticamente el efecto tóxico del OG. Las matrices poliméricas del OG funcionalizado tienen gran capacidad de transportar moléculas activas. De hecho, publicaciones actuales reportan funcionalización del OG con ligandos que tienen una receptor diana en el organismo. Esto, en la farmacología se espera que sea usado en terapias vectorizadas contra el cáncer.

4.2. Hepatocarcinoma

El CHC es la neoplasia primaria de hígado que ocurre más frecuentemente (Forner y cols., 2016). El CHC afecta únicamente a los hepatocitos, formando tumores hipervascularizados atreves del hígado (Aguilar y cols., 2015). Aparece aproximadamente en el 80% de pacientes con hígados cirróticos. El 20 % restante se relaciona con infecciones crónicas por el virus de la hepatitis B y C, el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas, obesidad, diabetes tipo 2, cirrosis alcohólica y tabaquismo (Aguilar y cols., 2015).

4.2.1 Epidemiología

El CHC es el sexto cáncer más común en el mundo y la tercera causa de muertes relacionadas con el cáncer (Deng y cols., 2015; Aguilar y cols., 2015). Además, es un importante problema de salud pública, ya que más de 700 000 casos se diagnostican anualmente en el mundo (Bruix y cols., 2014). El CHC es uno de los pocos cánceres cuya incidencia ha aumentado continuamente en la última década (Huang y cols., 2017). La incidencia del CHC, en la mayoría de los países tiene un número similar a los obtenidos en la tasa de mortalidad, esto nos indica que la falta de terapias efectivas es urgente (Aguilar y cols., 2015).

Su distribución mundial es muy heterogénea y está estrechamente relacionada con la prevalencia de los diferentes factores de riesgo asociados al desarrollo del CHC (Forner y cols., 2016). La incidencia es máxima en el Sudeste Asiático y África, mientras que en Europa y América la prevalencia es mucho menor. En Estados Unidos es la novena causa de muerte por cáncer (Forner y cols., 2016, Balogh y cols., 2016).

En México se ha observado un incremento en la incidencia del CHC desde hace varias décadas. Globocan y el consenso mexicano de diagnóstico y manejo del CHC han reportado una incidencia de aproximadamente 6 mil casos y una mortalidad similar (Uribe y cols., 2010; León y cols., 2011). La mayor mortalidad se observó casi exclusivamente en poblaciones de 60 años o más, presentando una incidencia de 45 casos por cada 100,000 habitantes, con una tasa de mortalidad similar en hombres y en mujeres (Méndez y cols., 2008; González y Sánchez, 2014). El CHC es un tipo de cáncer mortal debido a las alteraciones a nivel tisular e incluso molecular, generando un daño prácticamente irreparable y una tasa de mortalidad muy alta con una baja esperanza de vida.

4.2.2 Alteraciones tisulares en el CHC

En el CHC, el hígado exhibe nódulos regenerativos de tamaños mayor a 1 cm, que resultan de una proliferación descontrolada de hepatocitos (Balogh y cols., 2016). Además de los hepatocitos, el tumor de CHC está formado por células estromales, incluidos fibroblastos, macrófagos, linfocitos y adipocitos. Cada tipo de célula tiene sus propias funciones y todas están incrustadas en la matriz extracelular compuesta de colágeno y proteoglicanos, que proporciona una matriz hidratada para apoyar el crecimiento tumoral.

Los hepatocitos tumorales requieren mayor cantidad de energía y sustrato para la síntesis de *novo* de nucleótidos, lípidos y proteínas para una rápida proliferación, por lo tanto, es necesaria la hipervascularización (Ebrahimkhani y cols., 2014). En el tumor de CHC se presentan vasos sanguíneos con diámetros y estructuras irregulares. Estos están compuestos de células endoteliales, células murales y membranas basales (Ebrahimkhani y cols., 2014). Sin embargo, algunas regiones focales incluso carecen de células endoteliales o membranas basales, aumentando la permeabilidad, generando el aumento de la permeabilidad y retención (EPR por sus siglas en inglés) (Ebrahimkhani y cols., 2014).

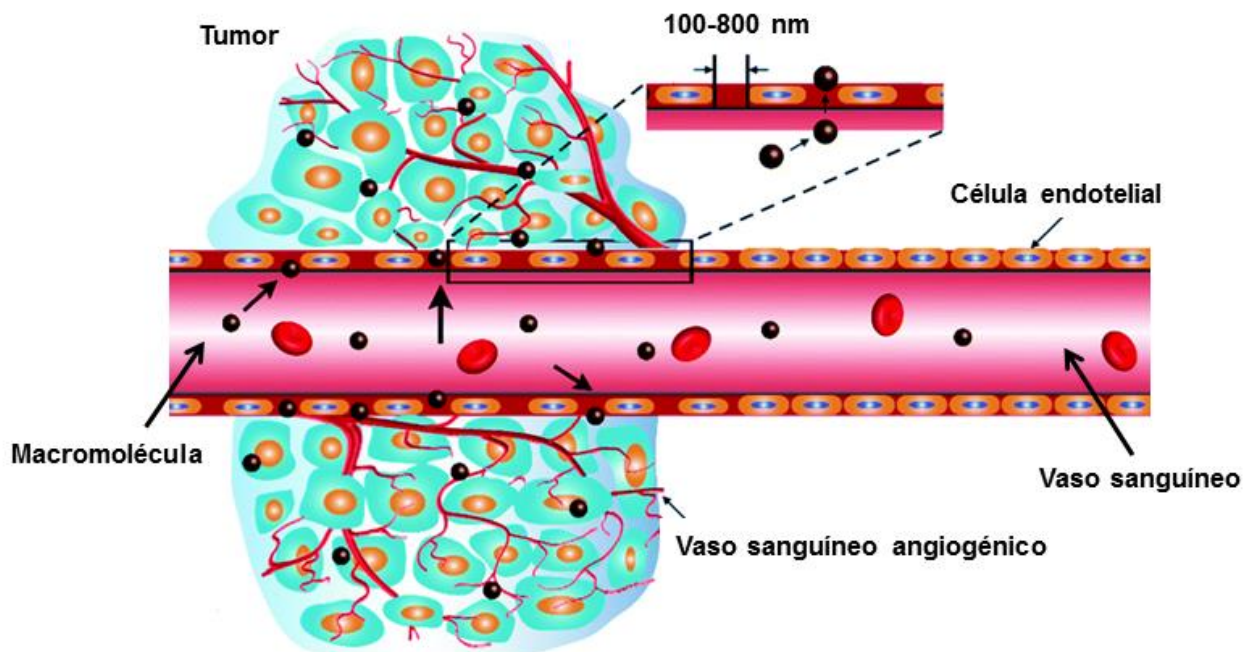


Figura 5. Representación esquemática del aumento de la permeabilidad y retención (EPR) (Ebrahimkhani y cols., 2014).

El efecto EPR fue descrito por primera vez por Al-Meda en 1986. El EPR es una propiedad por la cual partículas grandes, incluyendo proteínas, macromoléculas, liposomas, micelas y otras partículas solubles tienden a acumularse y prolongar su tiempo de retención en los tejidos tumorales mucho más que en los normales. La razón de este fenómeno es la vasculatura tumoral hiperpermeable. Las macromoléculas en el rango de tamaño de 20-200 nm tienden a penetrar dentro del espacio intersticial debido a las células endoteliales defectuosas mal alineadas. Además, la eliminación de las macromoléculas del espacio intersticial del tejido tumoral tiende a ser lenta debido a la escasez de drenaje linfático en el tejido tumoral (figura 5) (Danhier, 2016).

4.2.3 Alteraciones moleculares en el CHC

Los hepatocitos presentes en el CHC sobreexpresan diferentes receptores presentes en su membrana celular (Ebrahimkhani y cols., 2014).

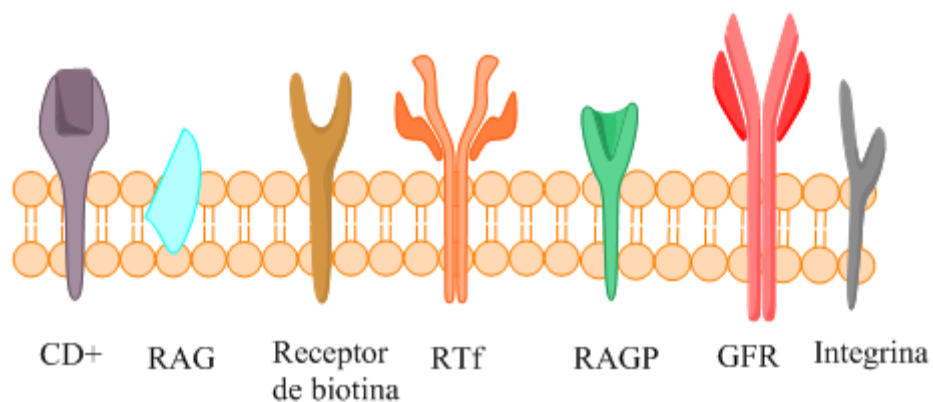


Figura 6. Receptores sobre-expresados en el CHC (Liu y cols., 2016).

En la figura 6 se muestran los más importantes, entre ellos, el receptor de ácido glicirretínico (RAG), integrinas, receptor de transferrina (RTf), CD+, receptor de biotina, receptor de factor de crecimiento (GFR, por sus siglas en inglés) y el RAGP. Sin embargo, este último es el que predomina en abundancia e importancia, por encima de los demás (D'Souza y Devarajan, 2015; Wang y cols., 2015).

4.2.3.1 Receptor de asialoglicoproteínas

El RAGP o también conocido como "receptor Ashwell-Morell", fue la primera lectina de mamífero que se identificó. Fue descubierta por Ashwell, Morell y sus colaboradores en los

años sesenta durante sus estudios sobre el metabolismo de las glicoproteínas plasmáticas en mamíferos (Huang y cols., 2017).

4.2.3.1.1 Expresión

El RAGP se expresa en los lados basales de los hepatocitos. Se ha reportado que contienen 500 000 receptores por hepatocito (Liu y cols., 2017). También se ha encontrado en células extrahepáticas como monocitos, macrófagos peritoneales, espermatozoides y células intestinales en humanos (D'Souza y Devarajan, 2015). A pesar de eso, su expresión no es significativa comparada con los hepatocitos.

4.2.3.1.2 Estructura

La estructura del RAGP varía en algunos seres vivos. En el caso de los humanos, tiene dos subunidades de 50 kDa (H1) y una de 46 kDa (H2) (Figura 7) (Huang y cols., 2017). Tienen el dominio citoplasmático muy corto, con un amino terminal. La región del tallo consistente en repeticiones de estructuras en espiral helicoidal (Grewal, 2010). El tallo une la membrana de la región donde se lleva a cabo la señal, los dominios de reconocimiento de carbohidratos (CDRs).

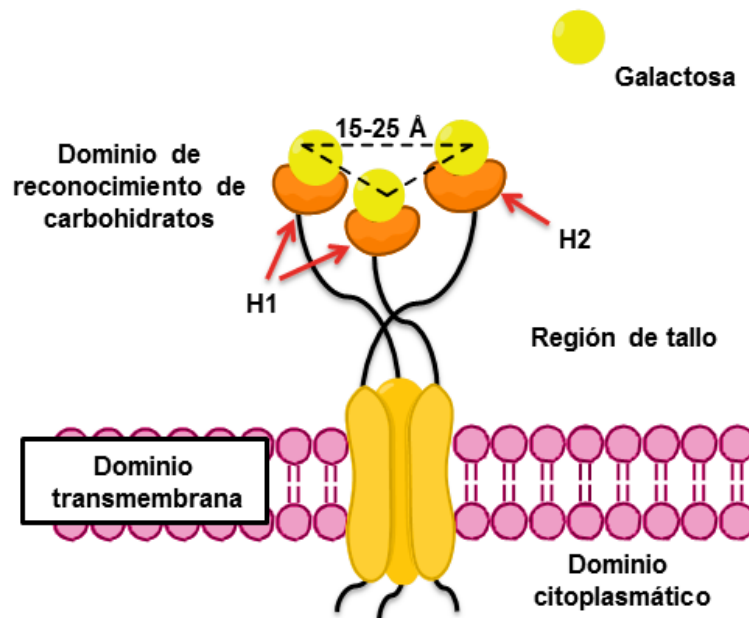


Figura 7. Representación esquemática de la estructura y relación geométrica del sitio de unión del RAGP (Huang y cols., 2017^a modificado).

En los CDR se encuentra un centroide que está formado por los aminoácidos ácido aspártico 241, ácido aspártico 265, asparagina 264, ácido glutámico 252, glutamina 239 y triptófano 243.

Este es el sitio de unión al ligando, donde se forman puentes de hidrógeno de los grupos 3- y 4-hidroxilo de galactosa. Además, existe una interacción hidrófoba con átomos C3, C4, C5 y C6 pertenecientes al triptófano 243 de RAGP, que le confiere estabilidad a la interacción con la galactosa (D'Souza y Devarajan, 2015).

4.2.3.1.3 Unión ligando – receptor

Factores como las formas isoméricas del carbohidrato, la densidad, ramificación y enlaces de galactosa son clave en la interacción con el RAGP (D'Souza y Devarajan, 2015). En el caso de las formas isoméricas, es importante que se presente en D-galactosa, debido a que, en el caso de su isómero, L-galactosa, no formará los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas correctas con el RAGP. Con respecto al segundo factor, entre mayor densidad de superficie de galactosa se asocia con mayor fuerza de unión. Esto es debido a que el receptor tiene tres CDRs, por lo tanto, tres sitios de unión al ligando. Por ello, entre más densidad de galactosa, más posibilidad de interaccionar. Ocurre algo similar con ligandos ramificados con galactosa, existe más posibilidad de unión. En el caso de los enlaces de galactosa, se ha reportado que los β -Gal (β 1-4) tienen mayor afinidad que otros tipos de enlaces. Se observó que los α -Gal (α 1-3) disminuye la afinidad de 50 a 250 veces en comparación al β 1-4 (Grewal, 2010; D'Souza y Devarajan, 2015).

4.2.3.1.4 Ligandos del RAGP

Los ligandos basados en carbohidratos exhiben una alta afinidad al RAGP. Arabinogalactano (AG), un polímero a base de galactosa y pululano, un polímero a base de glucosa, se encuentran entre los ligandos de carbohidratos ampliamente estudiados para la vectorización mediada por RAGP. Sin embargo, la lactosa ha demostrado tener mayor afinidad, especificidad y avidez al receptor que otros ligandos debido a que su estructura cumple con los factores clave en la interacción con el RAGP (Grewal, 2010; D'Souza y Devarajan, 2015).

4.3. Óxido de grafeno modificado con lactosa y potencial terapéutica hacia CHC

La vectorización de un fármaco utilizando un transportador unido a un ligando que será reconocido por el RAGP está revolucionando el tratamiento del CHC (Peer y cols., 2007). Actualmente se reconoce que el uso de transportadores de fármacos vectorizados puede contribuir significativamente a crear terapias más efectivas, mejorando el resultado clínico (Bertrand y cols., 2014).

Existen publicaciones donde se reporta que el OG funcionalizado con derivados de la lactosa es un potencial transportador de fármacos con vectorización activa hacia CHC (Ebrahimkhani y

cols., 2014). Entre ellas se encuentra la publicación de Cao y cols. (2015), donde demostraron que el óxido de grafeno funcionalizado con quitosano lactosilado (OG-QL) transporta de forma correcta al fármaco anticancerígeno. También observaron que OG-QL tiene biorreconocimiento específico a la línea celular de CHC QGY-7703. Esta información demuestra que la lactosa o derivados de la misma, puede ser un excelente ligando para el direccionamiento del OG a las células de CHC, y de esta forma, ser un acarreador de fármacos vectorizados al sitio del tumor hepático. Sin embargo, para apoyar lo anterior se necesitan más estudios donde se evalúe con la línea celular HEPG2, las cuales son células de CHC que expresan también RAGP. Además, el sintetizar OG lactosilado de manera más eficaz y eficiente para obtener mayor rendimiento y efectividad.

5. MÉTODOS

5.1 Oxidación de grafito

La oxidación del grafito fue llevada a cabo mediante el método de Hummers modificado (Botas y cols., 2012). Brevemente, se añadió una mezcla grafito (0.25 gr), nitrato de sodio (0.25 gr) y 15 mL de ácido sulfúrico concentrado. Dicha mezcla fue llevada a una temperatura de 0°C. A continuación, se añadió lentamente 1.2 gr de permanganato de potasio a una temperatura de reacción menor a los 20°C, obteniendo óxido de grafito (Botas y cols., 2013). La purificación del óxido de grafito se realizó usando una solución de hidróxido de sodio y posterior lavado con ácido clorhídrico y finalmente con agua (Thomas y cols., 2013).

La solución resultante fue sometida a agitación mecánica a una temperatura de 35°C durante 60 min, para posteriormente añadir lentamente 5 mL de peróxido de hidrogeno al 3%. Dicha reacción generó un gran efecto exotérmico alcanzando una temperatura de alrededor de 73°C. A la mezcla final se le adicionó 25 ml agua milli-Q para posteriormente ser centrifugada (10,000 rpm, 5 min, 15°C) realizando así los lavados de la muestra y conseguir un pH neutro.

5.2 Exfoliación de óxido de grafito

Para la exfoliación de la solución de óxido de grafito reducido se adicionaron 20 mL de agua mili-Q para posteriormente ser sometida a ultrasonificación durante 15 min/ 30 pulsos y amplitud del 35%. La suspensión se centrifugó a 10, 000 rpm durante 5 min a 15°C. El precipitado y el sobrenadante obtenido fue deshidratado en una estufa durante Xdías manteniendo una temperatura de 60°C.

5.3 Lactosilación del óxido de grafeno

Seguido de la obtención del OG, se procedió a realizar la glicación térmica con lactosa como reporta (Sarabia-Sainz y cols., 2011). Brevemente, se pesaron 50 mg de OG por triplicado a quienes se les adicionaron 30 mL de etanol. Se añadieron 50 uL de 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) manteniéndolo en agitación a temperatura ambiente durante 24 hrs.

Se realizarón lavados con agua mili-Q en ambas muestras, sin embargo, solo se añadió lactosa (50 mg) a una de ellas, mientras que la otra permaneció sin modificación, obteniendo de esta manera OG con APTES (OGA), como control. La muestra lactosilada se dejó a una temperatura de 40°C durante 96 hrs (4 días) para posteriormente someterse a lavado con agua mili-Q. Una vez obtenida la muestra con OGAL y OGA, se eliminó el agua sobrenadante por centrifugación (4900 rpm/8 min/9 de aceleración, 7 desaceleración) para mantenerse en secado durante 24 hrs a 37°C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se obtuvo OGA y OGAL en forma de láminas las cuales fueron puestas en solución. Para la muestra de OG (control) se pesaron 50 mg y se diluyeron en 30 mL de agua mili-Q, manteniéndolo en solución. Todas las muestras fueron sometidas a ultrasonificación durante 10 min, 30 amplitud y pulsos de 45 segundos (encendido) y 15 segundos (apagado). Este procedimiento fue repetido 3 veces. Finalmente se obtuvo la muestra lactosilada (OGAL) y los controles (OG y OGA).

5.4 Caracterización de óxido de grafeno

5.4.1 Espectroscopía infrarroja FT-IR

El análisis de grupos funcionales presentes en OG, OGA y OGL se realizó mediante FT-IR (Guler y cols., 2016). Los espectros de infrarrojo se obtuvieron mediante un espectrómetro FT-IR con un módulo UATR (Spectrum Two, Perkin Elmer, USA) a una resolución de 4 cm^{-1} en un rango de $500 - 4000\text{ cm}^{-1}$.

5.4.2 Microscopía de fuerza atómica

Las morfologías de OG, OGA y OGL se examinaron mediante AFM (sistema XE-Bio, Park Systems Corp, Suwon, Corea), utilizando imágenes de escaneo de $1.5 \times 15\ \mu\text{m}$. Las imágenes obtenidas por el equipo se analizaron en el software Gwyddion versión 2.49.

5.4.3 Microscopía electrónica de barrido SEM acoplado a EDS

La técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó para visualizar las características morfológicas de OG y OGL (Kim y cols., 2016). Las muestras previamente liofilizadas fueron colocadas en una cinta carbón de la superficie del SEM para posteriormente incidir un haz de emisión sobre la muestra con un equipo SEM (JSM-7800F, JEOL, Japan) a 0.6 KV de voltaje de aceleración y una resolución de 1.5000 y 10,000X.

5.4.4 Ensayo de biorreconocimiento del óxido de grafeno lactosilado con *Ricinus communis* aglutinina (RCA)

El ensayo de biorreconocimiento del OGL con RCA se analizó por medio de un ELLAs (Sarabia y cols., 2011). La muestra se fijó con glutaraldehído y tras la adición de los reactivos se realizaron lavados con PBS. La interacción se evidenció mediante la producción de una solución colorida debido a la reacción de la peroxidasa y el OPD analizada a 450 nm.

5.5 Cultivo celular de HEPG2 y HeLa

Las líneas celulares HEPG2 y HeLa fueron adquiridas de ATCC (Manassas, VA, USA). El uso de la línea celular hepatoma humano HEPG2 se debe a que tiene una densidad de 76.000 de RAGP, mientras que el control fue la línea celular HeLa, por su carencia de este tipo de receptor. Los cultivos de las dos líneas celulares se realizaron de forma similar usando medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con 10% de suero fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich), se incubó a 37°C, con 5% de CO₂ y 90% de humedad (Quan y cols., 2015).

5.6 Efecto citotóxico del óxido de grafeno lactosilado mediante MTT

El efecto citotóxico de OGAL, OGA y OG sobre la línea celular HEPG2 se evaluó mediante el método previamente descrito en Thao y cols., 2017. Las células se mantuvieron en DMEM suplementado con FBS al 10%, se sembraron en placas de 48 pozos a una densidad de 1×10^4 células/pozo y se incubaron durante 24 h. El medio se reemplazó con DMEM exento de suero fresco y se añadieron los nanocompuestos con concentraciones desde 0-100 µg/mL durante 24 h. La citotoxicidad *In vitro* se determinó usando un ensayo basado en bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) y se calculó una concentración inhibidora del 50% (IC₅₀).

5.7 Ensayo de biorreconocimiento del óxido de grafeno lactosilado en células HEPG2

Para el ensayo de biorreconocimiento primeramente se parte de conjugar al OGL con FITC y a los controles. Para ello, se pesó 1 mg de la muestra disolviéndola en 750 uL de etanol y 250 uL de agua mili-Q. Dicha solución fue sometida a agitación, baño de sonicación e incubación. Una vez realizado lo anterior, se agregó el FITC para posteriormente ser utilizada en el biorreconocimiento celular.

En el análisis de biorreconocimiento se sometió 10 uL/100 mL de la muestra lactosilada y de los controles en interacción con las células HEPG2 y el control, células HeLa. Dicho ensayo consta de tres procedimientos: biorreconocimiento, competencia e inhibición. Para cada una de ellas se realizó una siembra de 10, 000 células/ 200 uL DMEM, en placas de 48 pozos. Una vez realizada la siembra, se llevó a incubación durante 24 horas a una temperatura de 37°C en condiciones de 5% de CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar lavados por triplicado con solución salina.

Para el ensayo de biorreconocimiento, se pusieron en interacción OGAL con las células HEPG2. En el ensayo de competencia se añadió de manera simultánea lactosa y OGAL a las células HEPG2, mientras que en el ensayo de inhibición se adicionó primero el inhibidor lactosa, se incubó durante 30 minutos para posteriormente agregar OGAL. Una vez realizado el sembrado de células, se realizaron sus respectivas incubaciones y lavados, se procedió a analizar la muestra por microscopía, usando un microscopio confocal fluorescente (Nikon TiEclipse C2+) (Thao y cols., 2017).

5.8 Análisis estadístico

Los datos se presentaron como media \pm desviación estándar. Se determinaron diferencias significativas usando la prueba t de Student. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Caracterización del óxido de grafeno lactosilado

- Análisis químico por FT-IR:

Es una técnica que, mediante espectros de reflexión, muestran los grupos funcionales de las muestras analizadas. En el caso del OGAL se busca detectar posibles cambios estructurales por el efecto de glicación del OGA. Para ello se realizaron comparaciones del OGAL con los espectros de los controles OGA y OG con el fin de observar las diferencias composicionales.

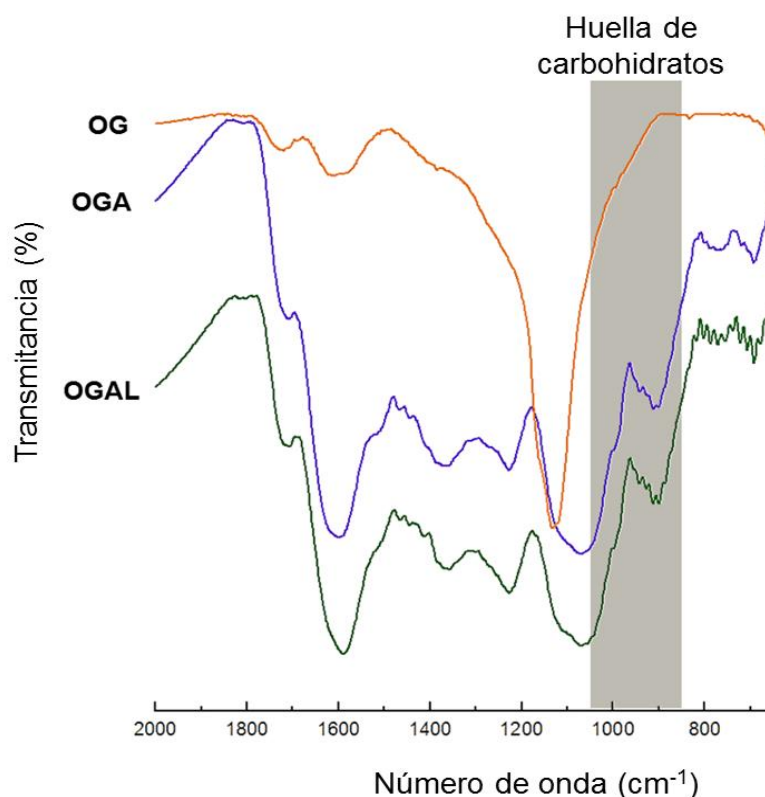


Figura 8. Análisis de la estructura química de OGAL mediante FT-IR. Banda verde OGAL, banda azul: OGA y banda roja: OG. La franja gris, indica la región de 900-1199 cm^{-1} , la cual es reconocida como huella dactilar para los carbohidratos.

La figura 8 muestra los espectros obtenidos mediante FT-IR del óxido de grafeno (OG), después de modificar APTES (OGA) y posterior a la modificación APTES y lactosa (OGAL). El análisis de OGA y OGAL muestran las bandas características del APTES Si-O-Si (1050cm^{-1}), Si-O-C (780cm^{-1}), y -NH (1630cm^{-1}), siendo visibles en ambos espectros (Aneja y cols., 2017). Esto indica que la funcionalización con APTES y por lo tanto la aminación se llevó a cabo. La banda más característica reportada para los carbohidratos se encuentra entre los 900 -1199 cm^{-1} (Gallegos y cols., 2016). Por lo tanto, no es posible encontrar diferencias entre OGA y OGAL,

que indiquen la presencia de la lactosa. Sin embargo, la altura de los $1000 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ se observa un pico marcado atribuido al enlace C-N (Jian y cols., 2016). Además, en el caso de OGAL y OGA se identifica el grupo amino a la misma altura del espectro, aproximadamente $1700 - 1400 \text{ cm}^{-1}$, y el grupo trimetoxisilano en los $1000 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ lo cual podemos asociar este incremento de bandas a la glicación, deduciendo con ello que el OGA fue conjugado satisfactoriamente con lactosa formando así un nuevo producto factible para el transporte biocompatible.

- Morfología del OGAL mediante AFM y SEM:

El análisis morfológico del OGAL, OGA y OG se realizó mediante AFM (figura 9) y SEM (figura 10).

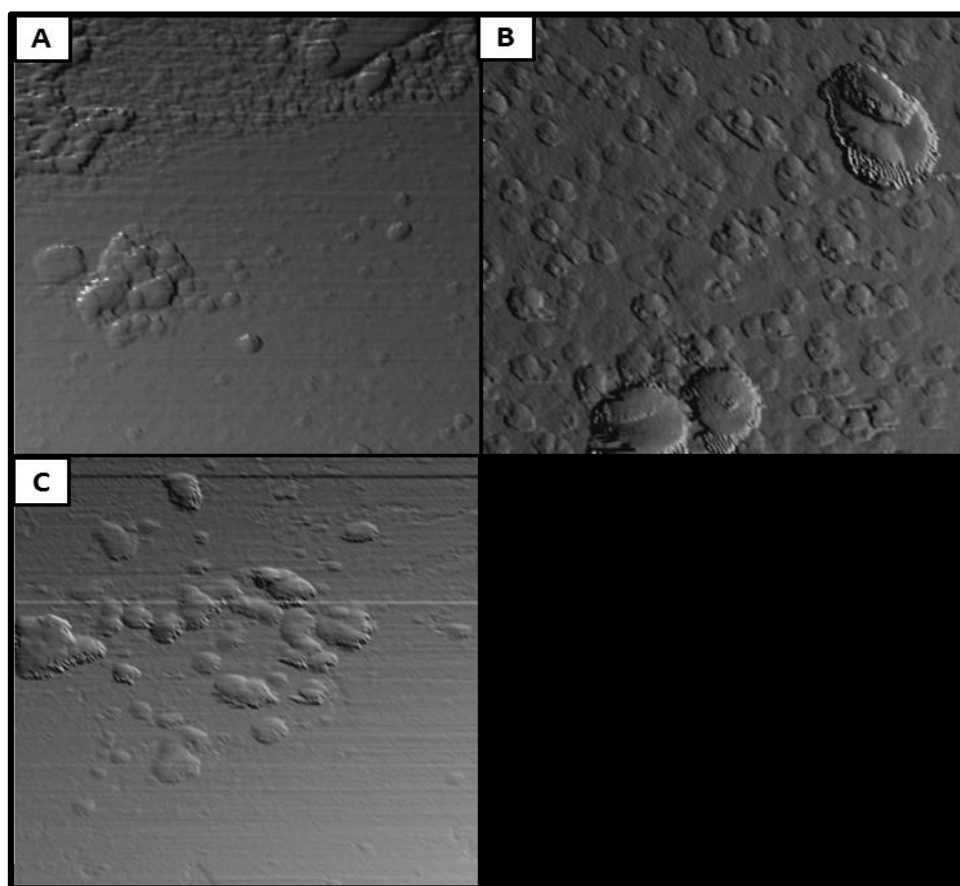


Figura 9. Caracterización morfológica de OGAL y OG mediante AFM. A.- Láminas de OGAL mediante AFM; B.- Láminas de OG mediante AFM; C.- Láminas de OGA mediante AFM.

Los resultados obtenidos por SEM muestran al OGAL (figura 10: A y B) con una estructura bidimensional con morfología planar de aspecto monocristalino agrupados entre sí, cuyo tamaño aproximado es de 200 nm y $10 \mu\text{m}$, lo cual concuerda con trabajos realizados por Long

y cols., (2010). Contrastando estas imágenes con las muestras de OG (figura 10 C y D), se observa como las láminas sin funcionalizar se apilan en la interfaz y mantienen un aspecto aterciopelado con relieve irregular como señala Kou y cols. (2011)

En los análisis obtenidos por AFM se observan imágenes láminas planas con superficie semi-redondeada. La muestra de OGAL (Figura 9 A) se muestra más definida con aspecto laminar respecto a las de OGA y OG (Figura 9 B y C) que muestra aspecto de bordes irregulares semi-redondeados similares a los publicados por Mkhoyan y cols. (2009).

Así mismo se observan cúmulos de láminas poco aisladas, así como agrupadas, presentando un diámetro que oscila entre los 100 nm hasta 1 μm , similares a las mostradas por Liu y cols. (2013). En ambas microscopias se observa que son estructuras planares bidimensionales que van desde tamaños nanométricos. Estas características les permiten interactuar en gran medida con compuestos bioactivos y posiblemente transportarlos en circulación sanguínea.

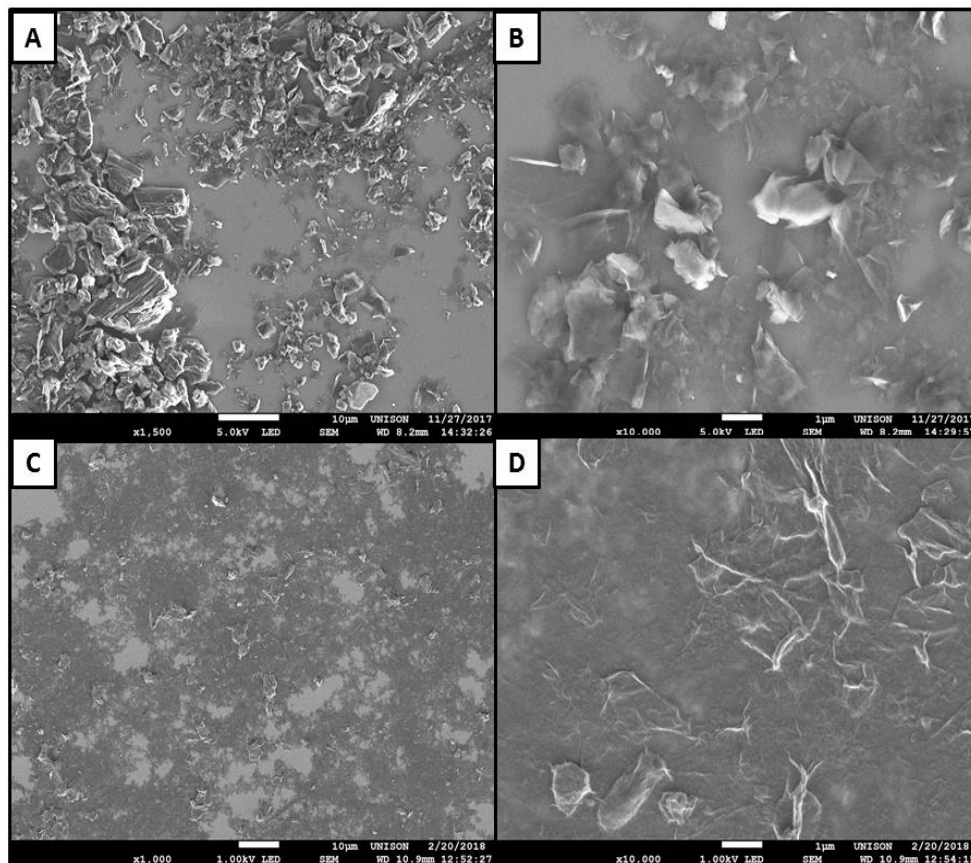


Figura 10. Caracterización morfológica de OGAL, OGA y OG mediante SEM. A.- Láminas de OGAL mediante SEM; B.- Láminas de OGAL mediante SEM; C.- Láminas de OG mediante SEM; D.-Laminas de OGA mediante SEM.

- Ensayo de biorreconocimiento del GOL con RCA:

La glicación OGA con lactosa fue corroborada mediante FT-IR. Posterior a ello, se evaluó su reconocimiento biológico con un análisis de afinidad molecular (figura 11). La lactosilación de OGA, en la cual, el disacárido participa con una unión covalente de glucosa que reacciona el grupo amino del OG tratado con APTES, dejando disponible galactosa para una posible interacción (Sarabia y cols., 2011). Dicha disponibilidad fue evaluada mediante un ensayo cuantitativo ELLAs, donde el uso de RCA (aglutinina con reconocimiento hacia galactosa), evidenció la interacción específica con galactosa presente en el OGAL (Gallegos y cols., 2016). Como control se usó OG y OGA. Los resultados obtenidos mostraron que la RCA interaccionó específicamente con los carbohidratos de OGAL. En el ELLAs, la densidad óptica de OGAL fue mayor a la de OG y OGA, lo cual muestra el reconocimiento específico de la RCA con la galactosa presente en el nanocompuesto similar a la publicación de Huang y cols. (2007). Lo anterior indica que el proceso de glicación se llevó a cabo y además, no se alteró la estructura de la galactosa, por lo que el OGAL es un atractivo candidato como posible transportador selectivo.

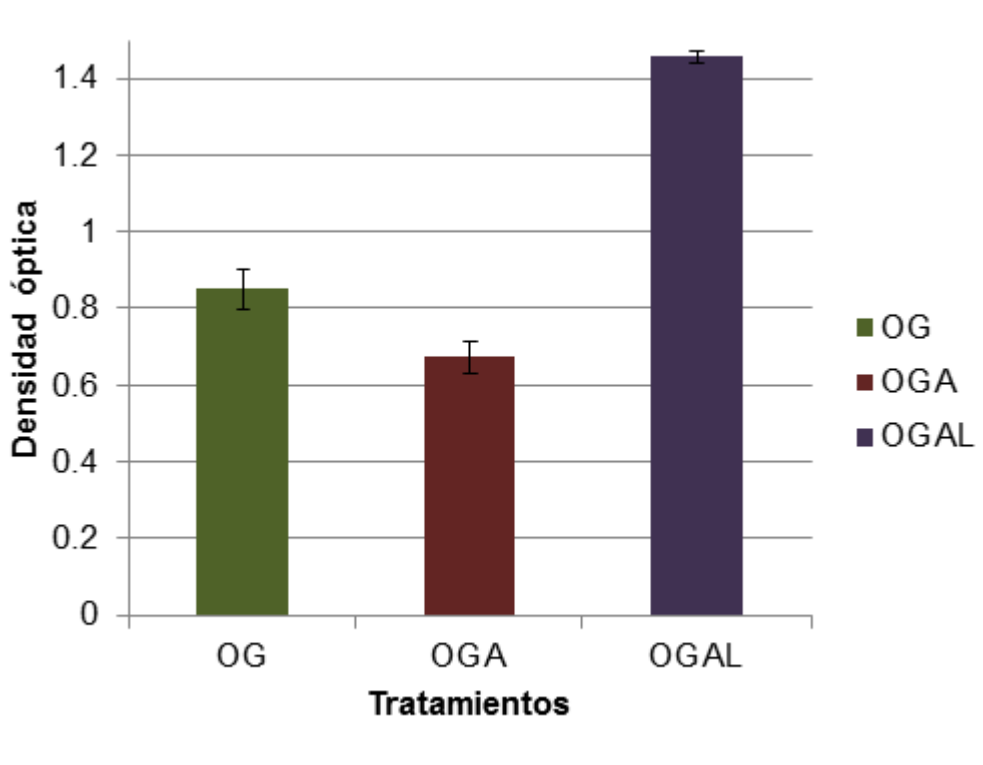


Figura 11. Ensayo de biorreconocimiento del OGAL por RCA mediante ELLAs.

- Efecto citotóxico del GOL sobre la línea celular HEP2:

El efecto citotóxico se evaluó en la línea celular HEPG2, mediante la técnica del MTT. En los resultados obtenidos en la figura 12, al aumentar la concentración de OGAL, no disminuye la viabilidad celular, lo que indica, que la lactosilación del OGA generó un compuesto no citotóxico para las células hepáticas. Por lo tanto, se puede inferir que este polímero lactosilado puede ser usado como un nano-vehículo de transporte farmacológico, principalmente de compuestos bioactivos como la doxorubicina. Debido a que es el fármaco quimioterapéutico usado en el tratamiento contra el CHC. Aunado a lo anterior, González y Keeffe, (2011) han reportado que la doxorubicina interacciona en gran medida con el OG, gracias su estructura laminar bidimensional.

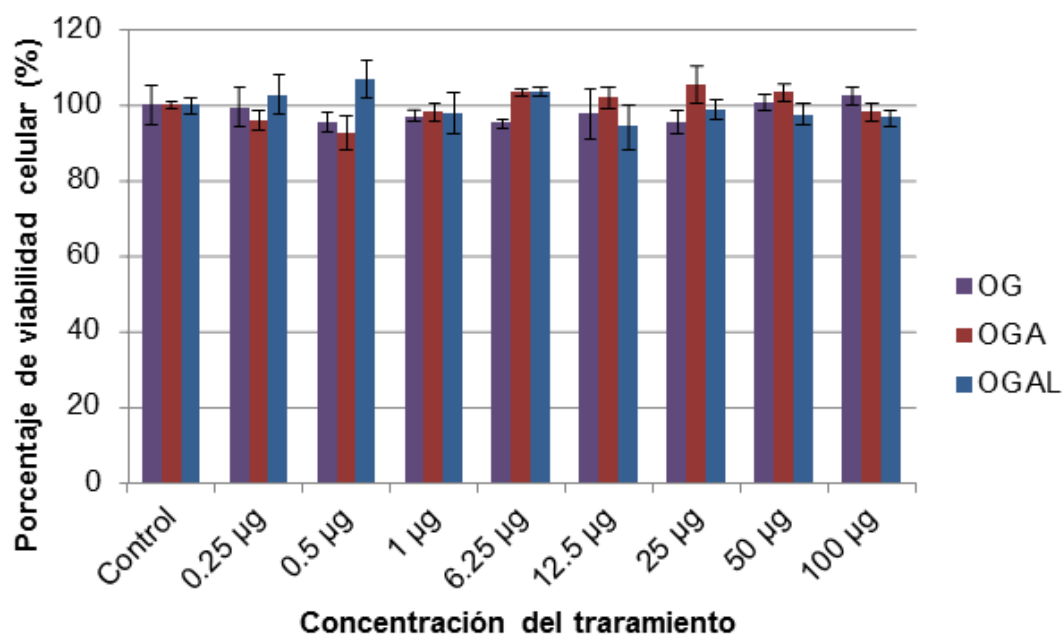


Figura 12. Efecto citotóxico de OGAL, OGA y OG mediante MTT.

Como controles se evaluó el efecto citotóxico de OGA y OG, donde se observó la misma tendencia que el OGAL. Estos resultados son de esperarse en el caso de OGA, debido a que varias publicaciones reportan que la funcionalización del OG provoca disminución de citotoxicidad del nanocompuesto. Esto es, debido que al ser funcionalizado genera una nueva clase de nanocompuesto. Estos tienen mejor solubilidad y procesabilidad tanto en disolventes orgánicos y en agua (Kou y cols., 2011). También se ha reportado que OG funcionalizado no es tóxico en modelos murinos, y se excreta por vía renal. Por ello, el OGAL y OGA, no fueron citotóxicos. En el caso de OG, los resultados fueron inusuales a lo que se esperaba. El OG, es

un compuesto tóxico por naturaleza, sin embargo, en este caso podría deberse a que son bajas concentraciones del compuesto o que no es citotóxico para la línea celular HEPG2 dado los resultados obtenidos.

- Ensayo de biorreconocimiento células HEPG2-GOAL:

Durante el ensayo de biorreconocimiento celular del OGAL se usaron dos tipos de líneas celulares, HEPG2 (células que expresan el RAGP) y HeLa (células que no expresan el RAGP) mediante microscopia confocal fluorescente (figura 13). Las células HEPG2 con OGAL mostraron una intensa fluorescencia verde lo que indica que la lactosa presente en este nanocompuesto es reconocida por el RAGP. En el caso de OGA, no mostraron fluorescencia. Esto podría deberse a que el OGA no es reconocido por las células hepáticas debido a que no presentan la lactosa.

Para confirmar el reconocimiento específico del OGAL con el RAGP, se hicieron ensayos de competencia e inhibición. En el ensayo de competencia se muestra una fluorescencia poco intensa, esto es debido a que el OGAL y la lactosa fueron reconocidas por los RAGP en las células HEPG2 (Roggenbuck y cols., 2012), por lo tanto, solo una porción de los receptores interaccionaron con las NPs y mostraron fluorescencia. En el ensayo de inhibición, el reconocimiento celular de OGAL por células HEPG2 disminuyó totalmente en presencia del inhibidor, lactosa, evitando que el nanocompuesto interaccione con las células hepáticas. Esto corrobora que los RAGP reconocen específicamente la galactosa presente en la lactosa (Quan y cols., 2015).

En la línea celular HeLa, el OGAL y OGA no se muestran fluorescencia, lo que confirma que no hubo biorreconocimiento de las células con OGAL debido a que estas células no presentan el RAGP, evitando así que OGAL sea reconocido por las células cérvico-uterinas.

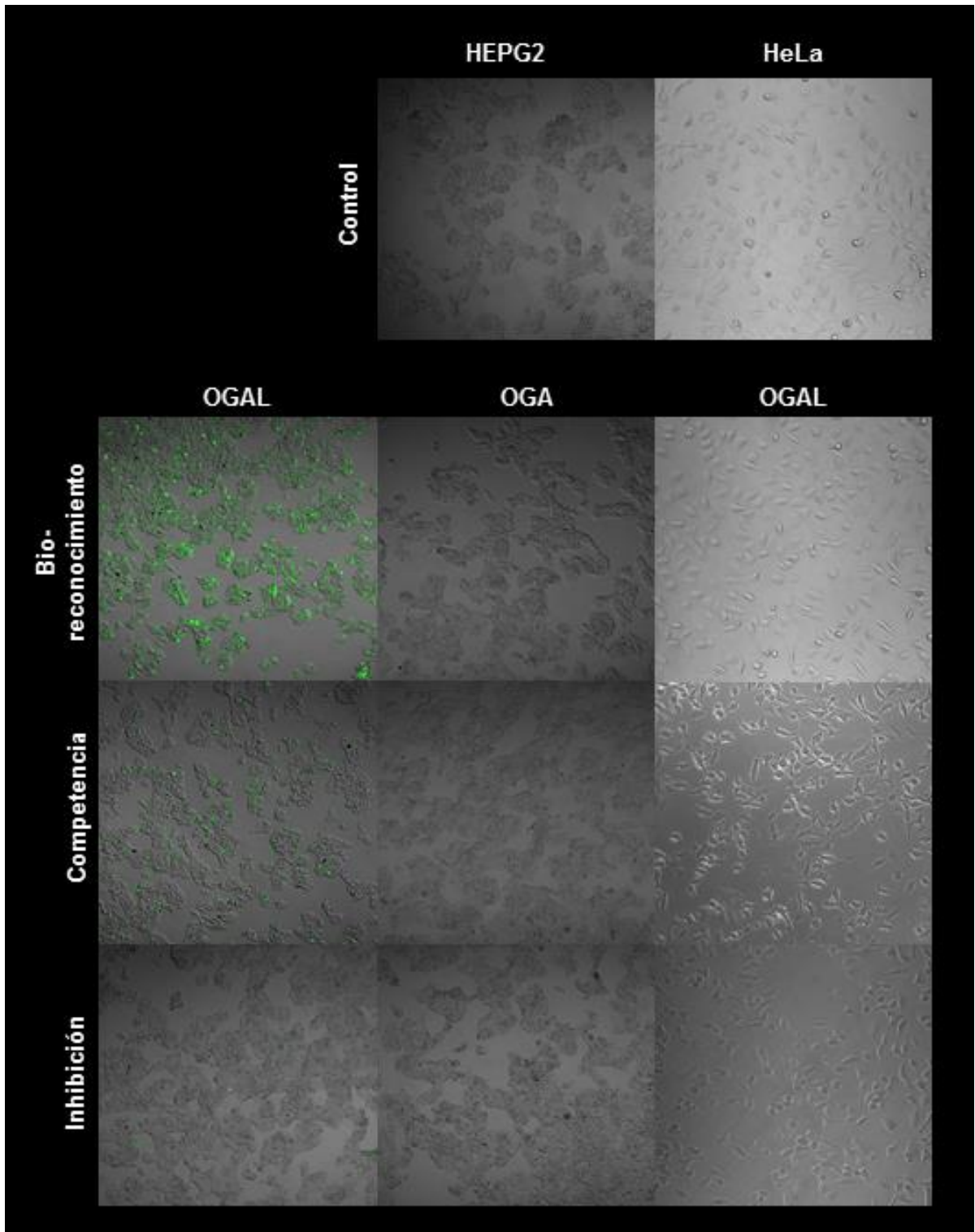


Figura 13. Ensayos de biorreconocimiento celular con OGAL.

7. Conclusiones

Fue posible la obtención de láminas de óxido de grafeno funcionalizadas con lactosa y su potencial aplicación como transportador. La funcionalización de óxido de grafeno se logró mediante glicación térmica posterior a un proceso de exfoliación en medio ácido.

El óxido de grafeno lactosilado mostró baja citotoxicidad así como un reconocimiento específico hacia lectinas y a los receptores específicos de membrana celular de carcinoma hepatocelular.

Por lo anterior, el óxido de grafeno es un gran candidato como sistema de vectorización activa de fármacos contra el carcinoma hepatocelular.

8. Referencias

1. Aguilar, N. E., Gutiérrez, Y., Motola, M., Lavenant, I., Uribe, M. y Méndez, N. 2015. Prevalencia del carcinoma hepatocelular en hígado no cirrótico. *Rev Invest Med Sur Mex.* 22(3): 124-126.
2. Talyzin A., Mercier, G., Klechikov, A., Hedenstrom, M. 2017. Brodie vs Hummers graphite oxides for preparation of multi-layered materials, carbon.
3. Mnyusiwalla A., Daar, A. S., Singer, P. A. 2003. Mind the gap: science and ethics in nanotechnology. *Nanotechnology.*
4. Brodie, B. C. 1859. On the Atomic Weight of Graphite, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* 149: 249-259.
5. Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. y Farokhzad, O. C. 2014. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv. Rev.* 66: 2-25.
6. Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J. y Corrie, S. R. 2016. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm Res.* 33(10): 2373-2387.
7. Bruix, J., Gores, G. J. y Mazzaferro, V. 2014. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut.* 0:1-12.
8. Botas, P. Álvarez, P. Blanco, M. Granda, C. Blanco, R. Santamaría, L.J. Romasanta, R. Verdejo, M.A. López-Manchado, R. Menéndez, 2013. Graphene materials with different structures prepared from the same graphite by the Hummers and Brodie methods. *Carbon* 65, 156-164.
9. McCallion, C., Burthem, J., Rees, K., Golovanov, A., Pluen, A. 2016. Grphene in therapeutics delivery: problems, solutions and future opportunities. *Eur J Pharm Biopharm.*
10. Chen J., Yao B., Li C., Shi G. 2013. An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide, 225
11. Deng, G. L., Zeng, S. y Shen, H. 2015. Chemotherapy and target therapy for hepatocellular carcinoma: New advances and challenges. *World J Hepatol.* 7(5): 787.
12. Roggenbuck, D., Mytilinaiou, M. G. 2012. Asialoglycoprotein receptor (ASGPR): a peculiar target of liver-specific autoimmunity.
13. D'Souza, A. A. y Devarajan, P. V. 2015. Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting - Strategies and applications. *J Control Release.* 203: 126-139.
14. Long, D., Li, W., Ling, L., Miyawaki, J. 2010. Preparation of Nitrogen-Doped Graphene Sheets by a Combined Chemical and Hydrothermal Reduction of Graphene Oxide.
15. Wang, D., Kou, R., Choi, D., Yang, Z., Nie, Z., Li, J. 2010. Ternary Self-Assembly of Ordered Metal Oxide Graphene Nanocomposites for Electrochemical Energy Storage

16. Ebrahimkhani, M. R., Neiman, J. A. S., Raredon, M. S. B., Hughes, D. J. y Griffith, L. G. 2014. Bioreactor technologies to support liver function in vitro. *Adv Drug Deliv Rev.* 69: 132-157.
17. Danhier, 2016. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine. *J Control Release.*
18. Forner, A., Reig, M., Varela, M., Burrel, M., Feliu, J., Briceño, J., Sastre, J., Martí-Bonmati, L., Llovet, J. M., Bilbao, J. I. Sangro, B., Pardo, F., Ayuso, C., Bru, C., Taberno, J. y Bruix, J. 2016. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Actualización del documento de consenso de la AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH. *Med Clin.* 146(11): 1-22.
19. Gallegos-Tabanico, J.A. Sarabia-Sainz, M. Acosta-Elías, H.M. SarabiaSainz, R.C. Carrillo-Torres, A.M. Guzmán-Partida, G. Ramos-Clamont Montfort, E. Silva-Campa, A.J. Burgara-Estrella, M. Pedroza-Montero, L. Vazquez-Moreno. Síntesis y caracterización de nanopartículas de albúmina para el biorreconocimiento de RCA y bacterias *E. coli* K88+.
20. González, S. A. y Keeffe, E. B. 2011. Chronic viral hepatitis: epidemiology, molecular biology, and antiviral therapy. *Front. Biosci.* 16: 225-250.
21. González, M. S. y Sánchez, J. F. 2014. Consenso mexicano de diagnóstico y manejo del carcinoma hepatocelular. *Rev Gastroenterol Mex.* 79(4): 250-262.
22. Grewal, P. K. 2010. Chapter Thirteen-The Ashwell–Morell Receptor. *Methods in enzymology.* 479: 223-241.
23. Guler, G.; Vorob'ev, M.; Vogel, V. and Mantele, W. (2016). Proteolytically-induced changes of secondary structural protein conformation of bovine serum albumin monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A*, vol. 161, p. 8-18. DOI: 10.1016/j.saa.2016.02.013.
24. Hirsjarvi, S., Passirani, C. y Benoit, J. P. 2011. Passive and active tumour targeting with nanocarriers. *Curr Drug Discov Technol.* 8(3): 188-196.
25. Thomas, S.P. Day, W.E. Woodruff, C. Vallés, R.J. Young, I.A. Kinloch, G.W. Morley, J.V. Hanna, N.R. Wilson, J.P. Rourke, 2013. Deoxygenation of Graphene Oxide: Reduction or Cleaning. *Chemistry of Materials* 25, 3580-3588.
26. Huang, S. Y.; Ganesan, P.; Park, S.; Popov, B. N. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 13898–13899.
27. Huang, C., Li, N. M., Gao, P., Yang, S., Ning, Q., Huang, W., Li, Z. P., Ye, P. J., Xiang, L., He, D. X., Tan, X. W. y Yu, C. Y. 2017. In vitro and in vivo evaluation of macromolecular prodrug GC-FUA based nanoparticle for hepatocellular carcinoma chemotherapy. *Drug Deliv.* 24(1): 459-466
28. Jian, W.; He, J.; Sun, Y.; Pang, J., Comparative studies on physicochemical properties of bovine serum albumin-glucose and bovine serum albumin-mannose conjugates formed via Maillard reaction. *LWT-Food Science and Technology* 2016, 69, 358-364.
29. Liu, J., Cui, L., Losic, D. 2013. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater*

30. Balogh, j., Asham, E., Burroughs, S. G. 2016. Hepatocellular carcinoma: a review. *HepatoCellular Carcinoma*.
31. Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Yun, K., Kim, S. 2012. The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation, 38
32. Aneja, K., Bohm, S., Khanna A. 2017. Graphene based anticorrosive coatings for Cr(VI) replacement, nanoscale.
33. Mkhoyan K., Contryman, A. W., Silcox, J., Stewart, D. 2009. Atomic and Electronic Structure of Graphene-Oxide, 1061.
34. Kumor, Mansour, Friedman and Blough, 2013. Nanomedicine in drug delivery. *Nanomedicine*.
35. León, A. G., Herrera, T. M., Salazar, S. E., Sánchez, D. M., Alcalá, O. R. y Barrón, L. E. 2011. Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. *SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD*. 37-52.
36. Liu, X., Han, M., Xu, J., Geng, S., Zhang, Y., Ye, X., Gou, J., Yin, T., He, H. y Tang, X. 2017. Asialoglycoprotein receptor-targeted liposomes loaded with a norcantharimide derivative for hepatocyte-selective targeting. *Int J Pharm*. 520(1): 98-110.
37. Loh KP, Bao Q, Eda G, Chhowalla M. 2010. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nat Chem* 2010; 2:1015–24.
38. Méndez, N., Villa, A. R., Vázquez, G., Ponciano, G. y Uribe, M. 2008. Mortality trends for liver cancer in Mexico from 2000 to 2006. *Ann Hepatol*. 7(3): 226-229.
39. Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., Farokhzad, O. C. 2016. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical reviews*.
40. Park, K.W.; Seol, K.S. 2007. *Electrochem. Commun.* ,9,2256–2260.
41. Panyam, J., y labhasetwar, V. 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 55(3): 329-347.
42. Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R. y Langer R. 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2:751–760.
43. Quan, G.; Pan, X.; Wang, Z.; Wu, Q.; Li, G.; Dian, L.; Chen, B. and Wu, C. (2015). Lactosaminated mesoporous silica nanoparticles for asialoglycoprotein receptor targeted anticancer drug delivery. *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 13, no. 7, p. 1-12. DOI: 10.1186/s12951-015-0068-6.
44. Kou, R., Shao, Y., Mei, D., Nie, Z., Wang, D., Wang, C. 2011. Stabilization of Electrocatalytic Metal Nanoparticles at Metal-Metal Oxide-Graphene Triple Junction Points, 2542.
45. Sarabia, A.; Ramos, G.; Winzerling, J. and Vázquez, L. (2011). Bacterial recognition of thermal glycation products derived from porcine serum albumin with lactose. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 58, p. 95-100. DOI: 10.1016/0039-6257(86)90094-9.

46. Stankovich, S., Dmitriy A. Dikin, Richard D. Piner, Kevin A. Kohlhaas, Alfred Kleinhammes, Yuanyuan Jia, Yue Wu, SonBinh T. Nguyen, Rodney S. Ruoff, 2007. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide, carbon.
47. Chatterjee, S. G., Chatterjee, S., Ray, A., Chakraborty, A. 2015. Graphene–metal oxide nanohybrids for toxic gas sensor: A review.
48. Moghimi, S. M., Hunter, A. C., Murray, J. 2005. Nanomedicine: current status and future prospects. *Faseb*.
49. Stankovich, S.; Piner, R. D.; Chen, X. Q.; Wu, N. Q.; Nguyen, S. T.; Ruoff, R. S. 2006. Stable Aqueous Dispersions of Graphitic Nanoplatelets via the Reduction of Exfoliated Graphite Oxide in the Presence of Poly(sodium 4-styrenesulfonate). *J. Mater. Chem.*, 16, 155– 15
50. Thao, L.; Lee, C.; Kim, B.; Lee, S.; Kim, T.; Kim, J.; Lee, E.; Oh, K.; Choi, H.; Yoo, S. and Youn, Y. (2017). Doxorubicin and paclitaxel co-bound lactosylated albumin nanoparticles having targetability to hepatocellular carcinoma. *Colloids and Surfaces B*, vol. 152, p. 183–191. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.01.017.
51. Uribe, M., García, M., Chávez, N. y Román, J. J. 2010. Carcinoma hepatocelular. *Rev Gastroenterol Mex.* 2(75): 168-176.
52. Veerapandian M, Lee M-H, Krishnamoorthy K, Yun K Synthesis, characterization and electrochemical properties of functionalized graphene oxide. *Carbon* 2012; 50:4228-38.
53. Gao, W. 2015. *The Chemistry of Graphene Oxide*, 61
54. Hummers, W. S., Offeman, R. E. 1957. Preparation of Graphitic Oxide, 1339.
55. Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., Peppas, A. N. 2010. *Polymers for Drug Delivery Systems. Nanomedicine*.
56. Huang, X., Leroux, J. C., Castagner, B. 2016. Well Defined Multivalent Ligands for Hepatocytes Targeting via Asialoglycoprotein Receptor. *Bioconjug Chem*.
57. Cao X., Zheng S., Zhang S., Wang Y., Yang X., Duan H., Huang Y., Yongshen C. 2015. Functionalized Graphene Oxide with Hepatocyte Targeting as Anti-Tumor Drug and Gene Intracellular Transporters. *Nanoscience and Nanotechnology*.
58. Rojas Y., Aguirre K., Gonzáles I. 2016. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la revolución de la terapia contra el cáncer?. *Educ. quim* vol 27 no 4