



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Biosíntesis de Nanopartículas de Oro mediante extractos de
Psilocybe cubensis y su evaluación bioestimulante en células
Neuro2a

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Biólogo

Manuel Jesús Vergara Cabrera

Concepción, abril 2026



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Botánica,
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción



Prof. Guía

Dr. Felipe Galleguillos

Prof. Evaluadores

Dr. Víctor Hernández Santander

Dr. José Becerra Allende

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

Concepción, abril 2026

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis padres, por todo el sacrificio y esfuerzo que han realizado para que hoy pueda estar donde estoy; su apoyo incondicional ha sido el pilar fundamental de mi camino. A mis hermanos y familia, quienes me han acompañado y guiado en cada etapa de mi formación académica y profesional.

Un agradecimiento especial a mis amigos, quienes con su compañía y lealtad me permitieron construir un verdadero hogar en el Gran Concepción, haciendo este tránsito mucho más llevadero. A mi profesor guía, el Dr. Felipe Galleguillos, por brindarme la oportunidad de explorar un campo de estudio desconocido para mí y por entregarme las herramientas necesarias para mi aprendizaje y crecimiento científico. Asimismo, agradezco a todo el equipo del laboratorio por su disposición y ayuda constante, especialmente a Bastián, Lyen, Amanda y Gabriel. De igual manera, extiendo mi gratitud al Profesor Nolart por su valiosa instrucción y apoyo en la fase final de este trabajo, junto a Eder del Laboratorio de Biología Molecular, cuya colaboración fue fundamental para completar esta etapa. Finalmente, agradezco el financiamiento otorgado por los proyectos FONDECYT 11230014, los cuales proporcionaron los recursos y el sustento económico necesarios para llevar a cabo todas las actividades experimentales de esta tesis.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
Pregunta de investigación	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
<i>Objetivo general</i>	18
<i>Objetivos específicos</i>	19
METODOLOGÍA	19
1. <i>Obtención y preparación del material biológico</i>	19
2. <i>Preparación de los extractos fúngicos</i>	20
3. <i>Síntesis y optimización de nanopartículas de oro (AuNPs)</i>	21
4. <i>Caracterización de nanopartículas</i>	22
5. <i>Evaluación del efecto neuroregenerativo de AuNPs</i>	23
6. <i>Análisis estadístico</i>	24
RESULTADOS	26
Discusión	50
CONCLUSIÓN	63
BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Espectros de absorción UV-Vis de AuNP biosintetizadas por el cuerpo fructífero de *Psilocybe cubensis*. Comparativa de la cinética de formación a las (A) 4 horas y (B) 24 horas de reacción, utilizando diferentes concentraciones de H_{Au}CL₄. Se observa la estabilización de la banda de resonancia plasmónica superficial (SPR) en la región de 540-560 nm a 0,3mM, confirmando la presencia de nanopartículas de oro monodispersas. 27
- Figura 2.** Espectros de absorción UV-Vis de AuNPs del medio líquido micelio. Comparativa de la cinética de formación a las (A) 4 horas y (B) 24 horas de reacción, utilizando diferentes concentraciones de H_{Au}CL₄..... 28
- Figura 3.** Micrografía electrónica de transmisión (TEM) de AuNPs sintetizadas con los metabolitos del cuerpo fructífero de *Psilocybe cubensis*. Barras de escala de 20 (A), 50 (B) y 100 (C) nanómetros..... 29
- Figura 4.** Histograma de distribución Gaussiana del tamaño de las AuNPs. El análisis morfométrico de nanopartículas reveló un diámetro promedio de $18,94 \pm 5,28$ nm. La curva de distribución muestra una población mono-dispersa, consistente con los datos obtenidos mediante espectroscopía UV-Vis. 29
- Figura 5.** Caracterización Físicoquímica de las Nanopartículas de oro (AuNPs) biosintetizadas. (A) Distribución del Potencial Zeta, mostrando un valor promedio de -31,0 mV, lo que confirma una alta estabilidad coloidal y repulsión electrostática. (B) Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS, con un diámetro hidrodinámico promedio de 18,55 nm. 31
- Figura 6.** Espectros FTIR de los componentes del sistema. (A) Extracto acuoso de *Psilocybe cubensis* utilizado como agente reductor y estabilizante. (B) Nanopartículas de oro (NpS Oro) funcionalizadas con los metabolitos del hongo. 33
- Figura 7.** Espectros FTIR superpuestos del extracto acuoso de *Psilocybe cubensis* (línea roja) y las nanopartículas de oro biosintetizadas (línea azul). 33

Figura 8. Efecto de la suplementación con AuNPs biosintetizadas a partir de *Psilocybe cubensis* sobre la proliferación de células N2a. Los ensayos se realizaron con una densidad inicial de 1250 células/pozo durante un periodo de 0 a 48 h bajo diferentes concentraciones de AuNPs. (A) Cinética de proliferación relativa al número de células. (B) Área total de confluencia (%). (C) Proliferación relativa a la confluencia. (D) Porcentaje de muerte celular. (E) Excentricidad total. (F-J) Análisis estadístico al punto final (48 h): Comparación de medias mediante ANOVA de una vía y post-hoc de Dunnett para las métricas de proliferación (F, G), muerte celular (H), ocupación de área (I) y morfología (J). Las barras representan media \pm SEM (*p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,0001; ns: no significativo). (K-M) Micrografías representativas: Registro visual a las 0, 24 y 48 horas del Control (K), la dosis bioestimulante de 91,63 $\mu\text{g/mL}$ (L) y la dosis de toxicidad aguda de 733 $\mu\text{g/mL}$ (M). La fluorescencia verde indica eventos de muerte celular..... 38

Figura 9. Efecto de la suplementación con AuNPs biosintetizadas a partir de *Psilocybe cubensis* sobre la proliferación de células N2a. Los ensayos se realizaron con una densidad inicial de 2500 células/pozo durante un periodo de 0 a 48 h bajo diferentes concentraciones de AuNPs. (A) Cinética de proliferación relativa al número de células. (B) Área total de confluencia (%). (C) Proliferación relativa a la confluencia. (D) Porcentaje de muerte celular. (E) Excentricidad total. (F-J) Análisis estadístico al punto final (48 h): Evaluación mediante ANOVA de una vía y post-hoc de Dunnett. Se observa un incremento significativo en la proliferación relativa (F, G) y área de confluencia (I) para el rango 22,91-183,25 $\mu\text{g/mL}$. La excentricidad (J) permanece estable excepto en la dosis máxima (1466 $\mu\text{g/mL}$), indicando preservación de la arquitectura celular en dosis bajas e intermedias. (K-M) Micrografías representativas: Comparativa visual entre el Control (K), la dosis de máximo estímulo de 91,63 $\mu\text{g/mL}$ (L) y la dosis citotóxica de 733 $\mu\text{g/mL}$ (M), evidenciando una red neuronal más densa en el tratamiento bioestimulante. 41

Figura 10. Efecto de la suplementación con AuNPs biosintetizadas a partir de *Psilocybe cubensis* sobre la proliferación de células N2a. Los ensayos se realizaron con una densidad inicial de 5000 células/pozo durante un periodo de 0 a 48 h bajo diferentes concentraciones de AuNPs. (A) Cinética de proliferación relativa al número de células. (B) Área total de confluencia (%). (C) Proliferación relativa a la confluencia. (D) Porcentaje de muerte celular.

(E) Excentricidad total. El efecto cooperativo celular permite una respuesta pro-proliferativa robusta incluso a dosis de 183,25 $\mu\text{g/mL}$, desplazando el umbral de toxicidad observado en densidades menores. (F-J) Análisis estadístico al punto final (48 h): Cuantificación mediante ANOVA de una vía y post-hoc de Dunnett. Se ratifica un aumento superior al 20% en la proliferación (F, G) y una duplicación del área de confluencia (I) respecto al control en el rango óptimo. La muerte celular (H) se mantiene en niveles basales o inferiores al control en dosis bajas. (K-M) Micrografías representativas: Evidencia visual del Control (K), la dosis de 91,63 $\mu\text{g/mL}$ (L) y 733 $\mu\text{g/mL}$ (M). 45

Figura 11. Caracterización estructural de neuronas N2a mediante microscopía holotomográfica 3D. El registró de imágenes se inició tras 42 horas pre-cultivo celular definido como Tiempo 0 del equipo, realizándose un seguimiento de 6 horas hasta completar las 48 horas de incubación total. Grupo control (A-D). Las micrografías en vista de corte (XY slice view). (E-F) Las reconstrucciones 3D. A dosis 45,81 $\mu\text{g/mL}$ (G–J): Las secciones XY, (K-L) Representan las imágenes en 3D. Para la dosis 91,63 $\mu\text{g/mL}$ (M-R) Los cortes ópticos XY slice view y (Q-R) reconstrucción 3D. La escala temporal del ensayo correlaciona el tiempo de registro del software (T) con el tiempo total de crecimiento biológico (h) de la siguiente manera: T0 = 42 h; T2 = 44h; T4 = 46h y T6 = 48h. Todas las imágenes fueron capturadas mediante la medición del índice de refracción (RI) sin el uso de marcadores fluorescentes. 49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. NCBI: National Center for Biotechnology Information. ITS: Espaciador Transcrito Interno (región secuenciada). Los números de acceso corresponden a las secuencias depositadas en la base de datos GenBank. El valor E (E-value) de 0.0 denota la máxima significancia estadística en el alineamiento, confirmando la identidad de la especie. ____26

Tabla 2. Asignación de bandas de absorción IR según estándares UPV/EHU. _____34

RESUMEN

La nanotecnología verde aplicada a la neurociencia ofrece soluciones innovadoras para el tratamiento de patologías del Sistema Nervioso Central. El presente estudio reporta la biosíntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) utilizando extractos del hongo productor de psilocibina *Psilocybe cubensis* y la evaluación de su potencial neuroestimulante. Las AuNPs fueron sintetizadas mediante la reducción biológica de H₂AuCl₄ y caracterizadas mediante espectroscopia UV-Vis, TEM, DLS y FTIR. Los resultados fisicoquímicos confirmaron la obtención de nanopartículas esféricas monodispersas con un diámetro promedio de 18,94 nm y una alta estabilidad coloidal (Potencial Zeta: -31,0 mV). El análisis FTIR sugirió que los metabolitos fúngicos conforman la corona orgánica estabilizadora del nanomaterial.

La bioactividad se evaluó en el modelo neuronal Neuro2a (N2a) mediante la plataforma de monitoreo en tiempo real IncuCyte® y microscopía holotomográfica 3D. Se identificó un comportamiento hormético dosis-dependiente: concentraciones entre 22,91 y 183,25 µg/mL indujeron un incremento significativo en la proliferación y viabilidad celular sin compromiso morfológico, mientras que dosis \geq 733,0 µg/mL resultaron en citotoxicidad aguda. La holotomografía 3D validó que el tratamiento bioestimulante (91,63 µg/mL) promueve un fenotipo con extensiones citoplasmáticas activas, compatible con estadios iniciales de neuritogénesis. En conclusión, las AuNPs de *P. cubensis* constituyen un sistema nanoterápico prometedor con capacidad neuroprotectora y pro-proliferativa, sentando las bases para futuras aplicaciones en medicina regenerativa y neurorehabilitación.

Palabras clave: Síntesis verde, Nanopartículas de oro, *Psilocybe cubensis*, Neuroregeneración, Holotomografía.

ABSTRACT

Green nanotechnology applied to neuroscience offers innovative solutions for treating Central Nervous System pathologies. This study reports the green synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) using extracts from the psilocybin-producing mushroom *Psilocybe cubensis* and evaluates their neurostimulatory potential. AuNPs were synthesized through the biological reduction of H₂AuCl₄ and characterized using UV-Vis spectroscopy, TEM, DLS, and FTIR. Physicochemical results confirmed the production of monodisperse spheroidal nanoparticles with an average diameter of 18.94 nm and high colloidal stability (Zeta Potential: -31.0 mV). FTIR analysis suggests that fungal metabolites constitute the bioactive organic capping of the nanomaterial.

Bioactivity was assessed in the Neuro2a (N2a) neuronal model using the IncuCyte® live-cell analysis system and 3D holotomographic microscopy. A dose-dependent hormetic behavior was identified: concentrations between 22.91 and 183.25 µg/mL induced a significant increase in cell proliferation and viability without morphological compromise, while doses ≥ 733.0 µg/mL resulted in acute cytotoxicity. 3D holotomography validated that the biostimulatory treatment (91.63 µg/mL) promotes a phenotype with active cytoplasmic extensions, consistent with early stages of neuritogenesis. In conclusion, *P. cubensis* mediated AuNPs constitute a promising nanotherapeutic system with neuroprotective and pro-proliferative capabilities, laying the groundwork for future applications in regenerative medicine and neurorehabilitation.

Keywords: Green synthesis, Gold nanoparticles, *Psilocybe cubensis*, Neuroregeneration, Holotomography.

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología, según el Instituto de Investigación Nacional del Genoma Humano (NIH, 2024), se define como la comprensión y manipulación de la materia a escala atómica y molecular para diversos fines industriales. Esta manipulación a escala nanométrica, que abarca desde aproximadamente 1 hasta 100 nanómetros, tiene el potencial de generar aplicaciones innovadoras en una amplia gama de campos, que incluyen la genómica, la ingeniería, la ciencia de la computación y la medicina (Simoes et al. 2017).

El estudio de los diferentes métodos de síntesis de nanopartículas (NPs) es un importante componente para el desarrollo de las investigaciones en nanociencia y nanoingeniería. La síntesis de nanopartículas metálicas reviste gran importancia debido a sus prometedoras aplicaciones, especialmente en relación con sus propiedades optoelectrónicas, térmicas, magnéticas y su alta capacidad catalítica (Gurunathan et al. 2015). Las nanopartículas metálicas se definen como agregados aislados de átomos de metales rodeados de una cápsula o estabilizadora que evita su aglomeración (Lewis 1993).

Estas partículas presentan propiedades físicas, químicas y biológicas únicas. Por ejemplo, las nanopartículas de oro son ampliamente utilizadas en campos médicos como el diagnóstico y tratamiento del cáncer, el tratamiento farmacológico, los biosensores, la detección de ADN, proteínas, y la eliminación de microorganismos patógenos del agua contaminada (Iranmanesh et al. 2020). La síntesis biológica de nanopartículas, particularmente mediante hongos, ha surgido como un método de interés debido a su evitación del uso de químicos tóxicos y condiciones drásticas de reacción, lo que lo convierte en un enfoque más sustentable y respetuoso con el medio ambiente (Simoes et al. 2017).

Los métodos de síntesis de nanopartículas se clasifican como top-down (métodos físicos, procesos de molienda) y como bottom-up (métodos químicos en disolución coloidal, procesos de formación de partículas a partir de una disolución). Los métodos top-down reducen el tamaño de agregación del material hasta llegar a un tamaño nanométrico con un consumo considerable de energía, mientras que los métodos bottom-up involucran la obtención de partículas de tamaño nanométrico partiendo de una dispersión molecular. (Gómez et al. 2013).

La convergencia entre la nanotecnología y la biología fúngica ha dado lugar a la Miconanotecnología, campo definido como la producción de nanopartículas mediada por hongos y su aplicación en sectores sanitarios, ambientales y agrícolas (Rai et al. 2021). En este contexto, los hongos tanto levaduras como filamentosos actúan como “Biofábricas” naturales de gran versatilidad metabólica. Estos organismos poseen la ventaja de secretar grandes cantidades de enzimas y metabolitos capaces de hidrolizar sustratos complejos (Castro-Longoria et al. 2017), permitiendo la biosíntesis de nanopartículas a través de mecanismos tanto intracelulares como extracelulares.

Sin embargo, la síntesis extracelular presenta ventajas significativas, ya que facilita el proceso de obtención y purificación de las nanopartículas, evitando los complejos métodos de extracción requeridos para recuperar el material desde el interior de la biomasa fúngica (Dorchech et al. 2016). La diversidad de especies fúngicas empleadas va en aumento, abarcando desde Ascomicetes hasta Basidiomicetes. Algunos ejemplos incluyen el uso del hongo *Neurospora crassa* para la producción de NPs de oro, plata y platino aplicadas en biología celular y detección molecular (Castro-Longoria et al. 2011; Quester et al. 2013). Más recientemente, se ha reportado el uso de géneros como *Lentinus* y *Ganoderma* para sintetizar NPs de plata y cobre, así como especies de *Trichoderma* con aplicaciones en biorremediación agrícola (García- Marín et al. 2023).

Diversos estudios demuestran que las nanopartículas pueden mejorar la regeneración neuronal in vivo, estas nanopartículas actúan modulando el microambiente inmune, promoviendo la diferenciación neuronal, protegiendo contra el daño oxidativo y facilitando la integración de factores de crecimiento (Ren et al. 2021; Lu et al. 2025).

Por ejemplo, el estudio realizado por Ren et al. (2021) empleó nanopartículas de hidróxido doble laminar (LDH) con el objetivo de potenciar la migración y diferenciación de células madre neurales, los autores observaron que la implantación de estas nanopartículas estimuló la neurogénesis y favoreció la recuperación funcional. Por su parte, Paviolo & Stoddart (2017) emplearon nanopartículas de oro funcionalizadas con biomoléculas para modular la actividad eléctrica de las neuronas, inducir neuroprotección y favorecer la regeneración tanto de nervios periféricos como centrales. Además, reportaron que estas nanopartículas regulan la polarización de la microglía y estimulaban la neurogénesis.

En el campo de la nanomedicina, las nanopartículas de oro (AuNPs) han emergido como herramientas prometedoras debido a sus propiedades fisicoquímicas excepcionales, tales como su biocompatibilidad y sus propiedades optoelectrónicas únicas, destacando la Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) (Pattnaik S et al. 2023). Revisiones recientes subrayan que gran parte de su atractivo radica en que sus tamaños y formas son altamente modulables, permitiendo además la funcionalización de su superficie con múltiples moléculas de direccionamiento o terapéuticas de manera simultánea (Haro-Martínez et al. 2025).

A diferencia de otros metales, el oro a nanoescala es químicamente inerte y resistente a la oxidación, lo que lo convierte en un candidato ideal para aplicaciones biomédicas que requieren alta estabilidad. Por ejemplo, el estudio de Bhat et al. (2013) demostró que las nanopartículas de oro presentaron propiedades anticancerígenas efectivas frente a líneas celulares tumorales. En el ámbito de la regeneración de tejidos, las AuNPs han surgido como una estrategia para superar las limitaciones de las terapias convencionales en la reparación del sistema nervioso (Paviolo et al. 2014). El desarrollo de tratamientos efectivos para enfermedades neurodegenerativas y daño neuronal se ve severamente obstaculizado por la barrera hematoencefálica (BHE), la cual restringe el paso de la inmensa mayoría de los agentes terapéuticos hacia el sistema nervioso central (Haro-Martínez et al. 2025) (Paviolo et al. 2017).

Sin embargo, debido a su tamaño nanométrico, los dispositivos basados en oro pueden interactuar con sistemas biológicos a nivel molecular y con altas especificidad espacial. A través de modificaciones superficiales, estas nanopartículas logran incrementar su tiempo de circulación y cruzar exitosamente la BHE para administrar sus cargas protectoras directamente a células específicas (Paviolo et al. 2017; Haro- Martínez et al. 2025).

Diversas investigaciones han demostrado que las AuNPs tienen la capacidad de potenciar el crecimiento de neuritas, un proceso fundamental para restablecer la conectividad en redes neuronales dañadas. Este efecto regenerativo se ha evidenciado mediante diferentes mecanismos, que van desde la estimulación fototérmica que activa factores de diferenciación, hasta la incorporación de AuNPs en andamios para guiar la elongación axonal (Papastefanaki et al 2015; Paviolo et al. 2017). Estudios *in vitro* recientes validan que las AuNPs,

particularmente con morfologías esféricas y estrelladas, logran cruzar las barreras celulares e interactuar directamente con la membrana plasmática, induciendo neuritogénesis y neuroprotección. La modulación del tamaño y la forma es un factor crítico, ya que determina su distribución y minimiza la citotoxicidad (Haro-Martínez et al. 2025). Bajo este control morfológico, estas nanopartículas han demostrado ser eficaces en la inhibición de mecanismos de muerte celular, resguardando la integridad de neuronas corticales incluso ante procesos de toxicidad severa (Ibarra Ramírez et al. 2025).

Dentro del creciente interés por los métodos de síntesis verde en nanotecnología, destaca la utilización de hongos no solo como agentes reductores y estabilizadores de nanopartículas metálicas, sino también como fuentes de compuestos bioactivos con potencial terapéutico. Entre estos, los hongos del género *Psilocybe*, pertenecientes a la división Basidiomycota, agrupan a más de 150 especies distribuidas a nivel mundial (Strauss et al. 2022). Desde el punto de vista ecológico, habitan regularmente en sustratos como suelo, madera, musgo y estiércol, desempeñando un rol crucial en la degradación de materia orgánica a través de estilos de vida saprotróficos o de descomposición de la madera (Kurzbaum et al. 2025).

Estas setas que han sido veneradas por las culturas indígenas de todo el mundo durante milenios, siendo utilizados en rituales sagrados para inducir experiencias espirituales y curativas. El género ha adquirido gran relevancia científica actual no solo por la síntesis de compuestos psicoactivos como la psilocibina, psilocina, baeocistina y aeruginascina (Van Court et al. 2022), sino también por su potencial para modular procesos biológicos a nivel neuronal (Kurzbaum et al. 2025).

Dentro de este diverso género, *Psilocybe cubensis*, documentada por primera vez en 1906 en Cuba, ha cobrado especial relevancia. Ecológicamente, es una especie coprófila que prospera sobre el estiércol de animales herbívoros en ambientes subtropicales húmedos. Esta característica biológica facilita enormemente su domesticación y permite una abundante producción de cuerpos fructíferos en condiciones de laboratorio. Sumado a su perfil bioquímico único, altamente rico en alcaloides triptamínicos, *P. cubensis* se posiciona como un modelo accesible y robusto para la investigación científica. Esta convergencia entre micronanotecnología, compuestos neuroactivos y aplicaciones en neurociencia ofrece un

nuevo campo de investigación, particularmente en estrategias de regeneración neuronal (Mandrake K et al. 2016); (Cantante R et al. 2018) (Kurzbaum et al. 2025).

Este potencial biomédico ha impulsado un creciente interés en la actualidad científica. Según los datos de publicación recuperados de PubMed en los últimos años, la investigación sobre hongos psicoactivos ha experimentado un notable resurgimiento, especialmente en torno a las especies productoras de psilocibina (Kurzbaum et al. 2025).

Desde el año 2020, el número de publicación científica sobre esta sustancia ha crecido exponencialmente, alzando un pico en 2025 (647 publicaciones) y una fuerte continuación en 2026 (201 publicaciones hasta ahora). Este fenómeno refleja un renovado interés en el potencial terapéutico de la psilocibina para el tratamiento de trastornos psiquiátricos resistentes, como la depresión, la ansiedad, el trastorno de estrés postraumático (TEPT) y las adicciones (Bogenschutz M.P et al. 2022; Lin M.C.Q. et al. 2022; 2023; Lowe H et al. 2021).

La psilocibina y la psilocina son los principales alcaloides que se encuentran en los hongos psicoactivos (Wieczorek et al. 2015). La psilocina ejerce un efecto neurológico al unirse a los receptores de serotonina subtipo 2A(5-HT_{2A}) produciendo efectos neuropsicológicos y psicodélicos (Hasler et al. 2004). La psilocibina se biosintetiza a partir de L-triptófano, mayormente por la vía del ácido shikímico (Mahmood, 2013). Este aminoácido se transforma en triptamina mediante descarboxilación, luego en 4-hidroxitriptamina por hidroxilación, y finalmente es fosforilada y metilada para formar psilocibina.

En este proceso participan varias enzimas específicas (Friecke et al. 2017; Torrens-Spence et al. 2018). Además de la psilocibina y psilocina, la ruta biosintética del hongo genera otros compuestos indólicos relacionados, como la baeocistina, norbaeocistina, norpsilocina y aeruginascina. Investigaciones metabolómicas recientes han detectado y cuantificado consistentemente estos metabolitos en diversas cepas de *Psilocybe cubensis*. Estos estudios confirman que dichos compuestos no solo poseen actividad biológica, sino que representan un abanico de triptaminas con alto potencial terapéutico, las cuales podrían actuar en sinergia con la psilocibina potenciando sus efectos clínicos. Cabe destacar que la acumulación de estos alcaloides indólicos es altamente dependiente de la matriz fúngica, presentándose en

concentraciones significativamente mayores en los cuerpos fructíferos maduros en comparación con el micelio (Kurzbaum et al. 2025; Cohen et al. 2025).

Tras su administración oral, la psilocibina es metabolizada rápidamente por enzimas intestinales, como la fosfatasa alcalina, convirtiéndose en psilocina, su forma activa (Dinis-Oliveira, 2017). Este compuesto atraviesa la barrera hematoencefálica y actúa como un agonista de alta afinidad de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} (Rickli et al. 2016; López-Giménez & González-Maeso, 2017), afectando especialmente regiones clave como la corteza prefrontal (PFC), el hipocampo (HC) y la ínsula (Cohen et al. 2025). Esta interacción no solo desencadena sus característicos efectos psicoactivos y neuromoduladores, sino que estudios recientes revelan una compleja modulación de la arquitectura funcional del cerebro, lo cual subyace a su prometedor potencial terapéutico (Smausz et al. 2022).

Esta activación desencadena una cascada intracelular que modifica la transmisión sináptica y promueve la liberación de factores neurotróficos, como el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), que están directamente relacionados con la plasticidad neuronal y la regeneración de conexiones sinápticas (Monosov et al. 2008; Smausz et al. 2022.)

Uno de los efectos más relevantes de esta activación es la modulación de la red por defecto (*default mode network*, DMN), una red funcional cerebral implicada en la autorreferencia, los pensamientos repetitivos y el procesamiento emocional (Gusnard DA et al. 2001; Smausz et al. 2022). En condiciones patológicas como la depresión, la DMN se encuentra hiperconectada, generando rigidez cognitiva. La psilocina reduce esta hiperconectividad, disminuyendo el control top-down de la PFC sobre regiones límbicas como la amígdala y el hipocampo, permitiendo una mayor influencia de las señales emocionales y sensoriales ascendentes. Este reordenamiento funcional favorece una mayor flexibilidad cognitiva y emocional, abriendo la posibilidad de procesos de reestructuración sináptica (Mason et al. 2020).

Además, estudios de neuroimagen han mostrado que la administración de psilocibina incrementa la conectividad global del cerebro, favoreciendo la formación de nuevas rutas de comunicación neuronal (Jiang et al. 2026). A nivel estructural, se ha observado que puede inducir el crecimiento de neuritas, el aumento en la densidad de espinas dendríticas y la

reorganización sináptica, elementos clave en la regeneración neuronal (Monosov et al. 2008). Esta capacidad de inducir neuroplasticidad en adultos posiciona a la psilocibina como una molécula prometedora no solo en salud mental, sino también en contextos de daño o degeneración neuronal (Smausz et al. 2022).

En este escenario, el uso de nanopartículas de oro como sistemas de liberación controlada cobra relevancia, ya que podría permitir una administración más dirigida, localizada y sostenida de psilocibina u otro metabolito activo, optimizando su efecto terapéutico y minimizando efectos adversos sistémicos.

A su vez, investigaciones recientes han comparado la composición química entre el micelio y los cuerpos fructíferos de *Psilocybe spp.*, revelando perfiles metabolómicos cualitativa y cuantitativamente distintos (Waldbillig et al. 2023). Los cuerpos fructíferos concentran compuestos como psilocibina, baeocistina y ergotioneína. Este último actúa como un potente antioxidante que, junto con los grupos amina y fosfato de los alcaloides indólicos, posee un alto potencial redox y capacidad quelante, características críticas para la reducción eficiente y la estabilización de las nanopartículas (Ishimoto et al. 2022). Por el contrario, el micelio presenta un perfil dominado por metabolitos primarios como N-acetilglucosamina y trimetilglicina (Waldbillig et al. 2023), lo que sugiere que la síntesis en esta matriz estaría mediada por mecanismos químicos alternativos que podrían influir en la estabilidad final del nanomaterial.

El uso de los metabolitos de *Psilocybe cubensis* como agente biológico para la síntesis de nanopartículas de oro representa una intersección innovadora entre biotecnología, psicofarmacología y nanotecnología. Si bien se ha demostrado que tanto el micelio como el cuerpo fructífero contienen metabolitos con potencial neuroactivo, persiste una importante brecha en la literatura respecto al efecto del extracto fúngico en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las nanopartículas obtenidas. A esto se suma la ausencia de estudios que evalúen de manera comparativa el efecto de dichas nanopartículas sobre procesos específicos como la regeneración neuronal.

Por lo tanto, la investigación propuesta es un avance en la síntesis verde de nanopartículas a partir de distintas matrices del hongo, evaluando su impacto funcional en modelos biológicos, lo que podría abrir nuevas vías terapéuticas dentro de la neurociencia regenerativa.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Difieren las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad coloidal de las nanopartículas de oro biosintetizadas a partir del cuerpo fructífero y del medio de cultivo líquido de *Psilocybe cubensis*?

¿Ejercen las nanopartículas de oro biosintetizadas con extractos de *Psilocybe cubensis* un efecto neuroestimulante sobre la proliferación, viabilidad y morfología de células Neuro2a in vitro?

HIPÓTESIS

Las nanopartículas de oro sintetizadas a partir del cuerpo fructífero y los extractos del medio líquido de *Psilocybe cubensis* exhibirán distintas actividades neuroestimulante en un modelo neuronal in vitro.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el potencial neuroestimulante de nanopartículas de oro biosintetizadas mediante extractos de *Psilocybe cubensis*, caracterizando su efecto sobre la dinámica de proliferación y estabilidad estructural en un modelo celular N2a.

Objetivos específicos

1. Sintetizar nanopartículas de oro mediante síntesis verde utilizando extractos provenientes de micelio y cuerpo fructífero de *P. cubensis*.
2. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas mediante espectrofotometría UV-Vis, microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopía infrarroja (FTIR), análisis DLS y potencial Z.
3. Caracterizar la cinética de crecimiento y diferenciación neuronal utilizando el sistema IncuCyte para determinar el perfil de citotoxicidad, proliferación relativa, confluencia celular en células Neuro2a expuestas a un gradiente de concentraciones de AuNps de *Psilocybe cubensis*.
4. Caracterizar cualitativamente la morfología celular y la arquitectura tridimensional de las neuronas N2a mediante microscopía holotomográfica.

METODOLOGÍA

1. Obtención y preparación del material biológico

1.1. Fuente de Cuerpos Fructíferos

Se realizó la extracción de ADN y la secuenciación de la región ITS completa del hongo. Se utilizaron cuerpos fructíferos de *Psilocybe cubensis* en estado maduro, los ejemplares fueron deshidratados en condiciones ambientales protegidas de la luz hasta alcanzar peso constante. Posteriormente, la biomasa seca fue pulverizada manualmente mediante un mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo, el cual fue almacenado en frascos herméticos en oscuridad hasta su uso para la extracción de metabolitos.

1.2. Establecimiento del Cultivo Líquido

El cultivo líquido se obtuvo a partir de esporas aisladas de cuerpos fructíferos en estado de madurez.

- Fase Sólida: Se realizaron subcultivos en placas Petri con agar Extracto de Malta (MEA) bajo condiciones estériles en cámara de flujo laminar. Las placas fueron incubadas a 23°C en oscuridad durante 15 días hasta observar la colonización completa del micelio.
- Fase Líquida: A partir del cultivo sólido, se inocularon explantes de micelio de 2x2 cm en matraces Erlenmeyer de un litro conteniendo medio líquido de YMG y Extracto de Malta (MEB) al 2% a un pH de 6,5. Los cultivos se mantuvieron en agitación orbital constante a 130 rpm y temperatura ambiente en un agitador durante 15 días para favorecer la producción de biomasa sumergida y la síntesis de metabolitos extracelulares.

1.3. Extracción de ADN y amplificación por PCR

La extracción de ADN genómico se realizó tanto del cuerpo fructífero (100mg) como del micelio aislado (100mg) siguiendo la metodología de CTAB (Doyle & Doyle 1990). Para la amplificación de la región correspondiente al espaciador interno transcrito (ITS), se utilizaron los partidores (ITS1F-ITS4), descritos por White et al. 1990. La amplificación del ITS se realizó por medio de Reacción en cadena de Polimerasa. El producto de PCR fue enviada directamente a la empresa Australomics para su secuenciación. Posteriormente, se evaluó la identidad y cobertura con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank BLAST (Altschul et al. 1997).

2. *Preparación de los extractos fúngicos*

Para la extracción de los metabolitos del cuerpo fructífero, se utilizó el extracto pulverizado anteriormente del hongo seco y deshidratado, los cuales fueron transferidos a una matraz de vidrio. Se añadieron 200 mL de etanol. La mezcla fue mantenida en agitación suave y en oscuridad a temperatura ambiente por 24 horas.

Una vez completa la maceración, la mezcla fue filtrada utilizando papel filtro Whatman N°1 para separar los residuos sólidos del extracto líquido. El filtrado, que contenía los metabolitos secundarios disueltos, fue transferido a frascos de vidrio y colocado en una estufa a 38 °C para favorecer la evaporación del etanol y la recuperación de los metabolitos en forma concentrada. Este extracto seco fue posteriormente utilizado para la síntesis de nanopartículas de oro.

Para la extracción de los metabolitos desde el medio líquido, se procedió a filtrar el micelio sobre papel Whatman N°1 y el filtrado se vertió en una placa petri que luego fue secada en estufa a 38°C. Una vez seco, en la cámara de flujo laminar en condiciones estériles se raspó el contenido de la placa, y fue depositado en un frasco hermético.

3. *Síntesis y optimización de nanopartículas de oro (AuNPs)*

La síntesis de nanopartículas de oro se llevó a cabo siguiendo la metodología, adaptada del protocolo descrito por Iranmanesh et al. (2020) para la reducción biológica de iones de oro mediante metabolitos fúngicos.

3.1. Preparación de Soluciones Stock

Se preparó una solución madre de ácido cloro áurico ($\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 1mM, disolviendo la sal metálica en agua destilada. Esta concentración fue seleccionada basándose en los resultados óptimos reportados en la literatura para hongos. La solución fue almacenada en frascos de color ámbar para prevenir la fotoreducción.

3.2. Solución del Extracto Fúngico

Se pesaron 50 mg de los extractos secos obtenidos anteriormente, los cuales fueron disueltos en 10mL de agua destilada estableciendo una concentración final de 5mg/mL.

Para el caso del extracto del medio líquido, se pesaron 500 mg de extracto seco, los cuales fueron disueltos en 10mL de agua destilada estableciendo una concentración final de 50 mg/mL. Previo a la síntesis, estas soluciones fueron sometidas a un proceso de filtrado pasivo para eliminar turbidez y residuos. Finalmente, el pH de ambos extractos fue ajustado a 8.0 utilizando NaOH (2M) para favorecer la deprotonación de grupos reductores y estabilidad coloidal.

3.3. Procedimiento de Síntesis y Diseño Experimental

Con el fin de determinar la condición óptima de síntesis, se evaluó un rango de concentraciones finales de la solución de oro [0,1; 0,3; 0,5; 0,8 y 0,9 mM]. Las reacciones se llevaron a cabo en un tubo de 2ml, ajustando los volúmenes de la solución madre de HAuCl_4 (1mM) y agua destilada según cada concentración.

3.4. Condiciones de Reacción y Controles

Después de la mezcla, los viales fueron agitados y almacenados en oscuridad total a temperatura ambiente para evitar la interferencia de la luz en la reacción y preservar los metabolitos. El tiempo de reacción se monitoreó desde la hora 0 hasta las 24 horas.

Se incluyeron dos tipos de controles negativos para validar los resultados

1. Control Biológico: Extracto fúngico en agua destilada (sin oro), para descartar cambios propios de la oxidación del extracto.
2. Control Químico: Solución de HAuCl_4 en agua destilada (Sin extracto), para verificar la estabilidad de la sal metálica.

3.5. Monitoreo

La formación de nanopartículas se confirmó inicialmente mediante inspección visual, observando el cambio de coloración de amarillo pálido a rojo rubí o violeta, característico de la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) del oro nanoestructurado. Posteriormente, las muestras fueron analizadas por espectrofotometría UV-Vis utilizando un espectrofotómetro Shimadzu en un barrido de 250 a 700 nm.

4. *Caracterización de nanopartículas*

La forma, tamaños y superficies de las nanopartículas sintetizadas se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un equipo JEOLJSM 1200EX-II, equipado con patrón de difracción de electrones. Las nanopartículas fueron sometidas a sonicación durante 10 minutos y posteriormente cargadas sobre un soporte de cinta de cobre.

El soporte se colocó bajo una lámpara infrarroja durante 15 minutos hasta secar completamente las nanopartículas. Las imágenes y datos obtenidos fueron registrados y almacenados para su análisis posterior. Para la caracterización morfométrica, se midió el diámetro de 100 nanopartículas ($n=100$) a partir de micrografías electrónicas utilizando el

Software ImageJ. Los datos obtenidos se tabularon en el software GraphPad Prism 8, donde se realizó un análisis de distribución de frecuencias con un ancho de intervalo de 2nm. La distribución de tamaño se ajustó mediante una regresión no lineal gaussiana para determinar el diámetro promedio y la desviación estándar de la muestra.

Para conocer los grupos funcionales de los metabolitos y su rol en la formación de nanopartículas, tanto el extracto como las nanopartículas fueron sometidos a un análisis de FTIR, ambos fueron preparados y analizados con un equipo PerkinElmer, con rango de escaneo de 400-4000 cm^{-1} según metodologías establecidas en manual.

La estabilidad coloidal y el diámetro hidrodinámico de las AuNPs biosintetizadas se determinaron mediante espectroscopía de correlación de fotones (DLS) y microelectroforesis láser utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, RU). Las mediciones se realizaron a 25°C en agua desionizada (RI: 1.330; Viscosidad: 0.8872 cP) con un ángulo de detección de 173° (backscatter). Los datos se procesaron mediante el software Zetasizer Ver. 6.34, obteniéndose el promedio Z (Z- average), el índice de polidispersidad (PdI) y el potencial zeta promedio a partir de tres réplicas independientes.

5. *Evaluación del efecto neuroregenerativo de AuNPs*

5.1. Cultivo celular: Se emplearon las células Neuro2a de neuroblastoma de ratón (ATCC CCL- 131). Los procedimientos de mantenimiento y expansión celular se realizaron en un gabinete de bioseguridad biológica nivel II. Las células fueron sembradas en placas de cultivo Petri de 100 mm de diámetro y cultivadas en 10 mL de medio completo. Se empleó DMEM/F12 suplemento con Suero Fetal Bovino (SBF) al 5% (v/v), Glutamina 2 mM, Penicilina 100 U/mL, Estreptomina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Anfotericina B 2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; con cambios de medio cada 3 días y subcultivo cada 7 días. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a 37°C, con 5% de CO_2 y 95% de humedad.

5.2. Análisis de crecimiento celular: Para realizar estos análisis, las células Neuro2a fueron sembradas en placas de fondo plano de 9 pocillos. Las imágenes de crecimiento fueron adquiridas en la plataforma automatizada IncuCyte®S3, que permite realizar análisis en

célula viva por un período de tiempo determinado por el usuario. El equipo fue configurado para tomar 2 fotos por cada pocillo, (se consideraron 2 campos por pocillo, tomándose 1 foto por cada uno de ellos) con un aumento de 10X por un período de tiempo de 48 horas. Posterior a esto, las imágenes fueron procesadas utilizando el software Incucyte®S3 y el módulo de Análisis de Células Adherentes, que permite analizar la morfología y dinámica celular en tiempo real, utilizando solo el contraste de fases y fluorescencia para el Sybergreen. Los análisis realizados incluyeron la medición de confluencia (área de ocupación), proliferación relativa a número de células, porcentaje de muerte celular (fluorescencia verde), excentricidad celular y proliferación relativa a la confluencia. Los ensayos en el IncuCyte®S3 se realizaron en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA Bío-Bío) de la Universidad de Concepción. <http://cmabiobio.cl/>

5.3. Holotomografía: Con el objetivo de complementar el análisis cuantitativo de proliferación y viabilidad celular con una evaluación morfológica de alta resolución en células vivas, se realizó un análisis mediante microscopía holotomográfica utilizando el equipo Monocube. Las células N2a fueron sembradas y tratadas a una densidad de 2500 células/pozo con las concentraciones de 45,81 $\mu\text{g/mL}$ y 91,63 $\mu\text{g/mL}$ de AuNPs biosintetizadas con *P. cubensis*, y comparadas con el grupo control sin tratamiento (0 $\mu\text{g/mL}$), siguiendo las mismas condiciones descritas en los ensayos de Incucyte. Las células fueron analizadas a las 42 horas de iniciado el tratamiento mediante adquisición de imágenes en modo de proyección 2D de máxima intensidad y reconstrucción 3D del índice de refracción. Debido a que el procesamiento cuantitativo de los parámetros holotomográficos excedió el alcance del presente estudio, las imágenes obtenidas se sometieron a un análisis cualitativo descriptivo utilizando el software TomoAnalysis Viewer, permitiendo caracterizar la dinámica morfológica de las neuronas N2a en respuesta al tratamiento.

6. Análisis estadístico

Los datos cuantitativos obtenidos mediante el sistema de imagen en tiempo real IncuCyte (Sartorius) fueron procesados y analizados utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0. Se evaluaron cinco métricas de respuesta celular de forma independiente para cada

densidad de siembra (1250, 2500 y 5000 células/pozo): (1) proliferación relativa al número de células, (2) porcentaje de área total de confluencia, (3) proliferación relativa a la confluencia, (4) porcentaje de muerte celular y (5) excentricidad celular.

Para el análisis de la dinámica temporal completa (0-48 horas), se aplicó un análisis de varianza de medidas repetidas de dos vías (two-way RM ANOVA, *Matching: Across row*) considerando la concentración de AuNPs como factor entre grupos (factor columna) y el tiempo de incubación como factor intragrupo (factor fila). Se aplicó la corrección de Greenhouse-Geisser a los grados de libertad antes de la inferencia estadística. Las comparaciones múltiples post-hoc se realizaron mediante el test de Dunnett, tomando como referencia el grupo control (0 $\mu\text{g/mL}$). El análisis incluyó $n = 192$ mediciones por grupo para todas las métricas.

Para el análisis de punto final a las 48 horas, se realizó un análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett, comparando cada concentración de AuNPs respecto al control ($n = 4$ réplicas biológicas por grupo). Este análisis se aplicó de forma independiente a las mismas cinco métricas y tres densidades celulares, con el objetivo de identificar diferencias estadísticamente significativas al término del período de evaluación.

En todos los análisis el nivel de significancia fue establecido en $\alpha = 0,05$. Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Los niveles de significancia estadística se indican en las figuras mediante asteriscos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns: no significativo.

RESULTADOS

Identificación molecular

El análisis de similitud de la secuencia nucleotídica obtenida de la región ITS mediante la herramienta BLASTn, reveló un 100% de identidad con secuencias reportadas para la especie *Psilocybe cubensis* en la base de datos del GenBank (NCBI). Se obtuvieron valores E (E-value) de 0.0, confirmando la identidad taxonómica del material biológico utilizando para la síntesis de nanopartículas. En la tabla 1 se resumen las principales alineaciones significativas encontradas. Se confirmó la similitud de secuencias del cuerpo fructífero y el aislamiento esporal en placa.

Descripción (Especie / Cepa)	Número de Acceso	Cobertura (Query Cover)	Identidad (Per. Ident)	Valor E (E-value)
<i>Psilocybe cubensis</i> voucher RHP5203	KC669284.1	100%	100.00%	0.0
<i>Psilocybe cubensis</i> genomic DNA (ITS1, 5.8S, ITS2)	HF912352.1	100%	100.00%	0.0
<i>Psilocybe cubensis</i> isolate 6S	KU640170.1	100%	100.00%	0.0
<i>Psilocybe cubensis</i> strain DNA2052	KF830094.1	100%	100.00%	0.0

Tabla 1. NCBI: National Center for Biotechnology Information. ITS: Espaciador Transcrito Interno (región secuenciada). Los números de acceso corresponden a las secuencias depositadas en la base de datos GenBank. El valor E (E-value) de 0.0 denota la máxima significancia estadística en el alineamiento, confirmando la identidad de la especie.

Concentración óptima AuNPs

Los espectros de absorción UV-Vis revelaron que la concentración óptima de precursor metálico (HAuCl_4) para la biosíntesis de nanopartículas de oro empleando el extracto del cuerpo fructífero de *Psilocybe cubensis* fue de 0,3 mM. Como se observa en la figura 1, esta concentración permitió la formación de un pico de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) claramente definido en una longitud de onda cercana a los 550 nm que es típico de las nanopartículas de oro, alcanzando una absorbancia de 0,303 u.a. La presencia de esta banda de absorción en la región del visible es la evidencia física de la reducción de los iones Au^{3+} a Au^0 y la posterior estabilización de las partículas esféricas de tamaño nanométrico, lo cual es consistente con el diámetro promedio de $18,94 \pm 5,28$ nm determinado posteriormente mediante el análisis de distribución de tamaño.

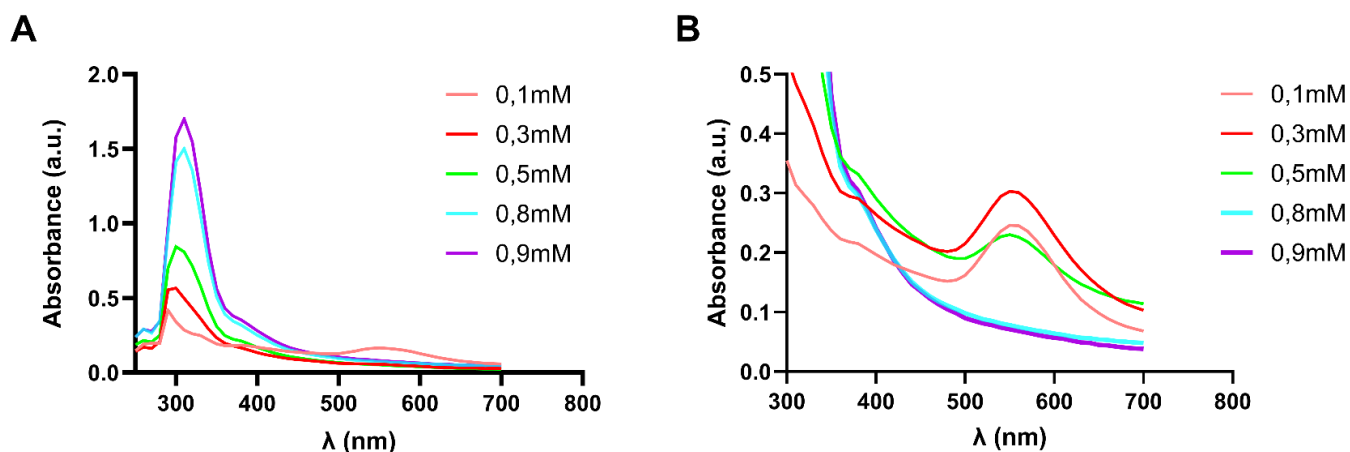


Figura 1. Espectros de absorción UV-Vis de AuNP biosintetizadas por el cuerpo fructífero de *Psilocybe cubensis*. Comparativa de la cinética de formación a las (A) 4 horas y (B) 24 horas de reacción, utilizando diferentes concentraciones de HAuCl_4 . Se observa la estabilización de la banda de resonancia plasmónica superficial (SPR) en la región de 540-560 nm a 0,3mM, confirmando la presencia de nanopartículas de oro monodispersas.

El análisis espectrofotométrico mediado por el extracto del cultivo líquido mostró una banda de absorción a las 4 horas de reacción, ver figura 2A, con una intensidad de 0,8 u.a. A las 24 horas de reacción, ver figura 2B, se registró un incremento en la absorbancia a 0,9 u.a. Sin embargo, este aumento no se asoció con una estabilización del sistema, sino que precedió a

una pérdida de la definición del pico y a una eventual sedimentación del material. A diferencia de las síntesis obtenida con el cuerpo fructífero, el extracto del medio líquido no logró mantener las propiedades ópticas del plasmón superficial más allá de este periodo, evidenciando una inestabilidad coloidal persistente.

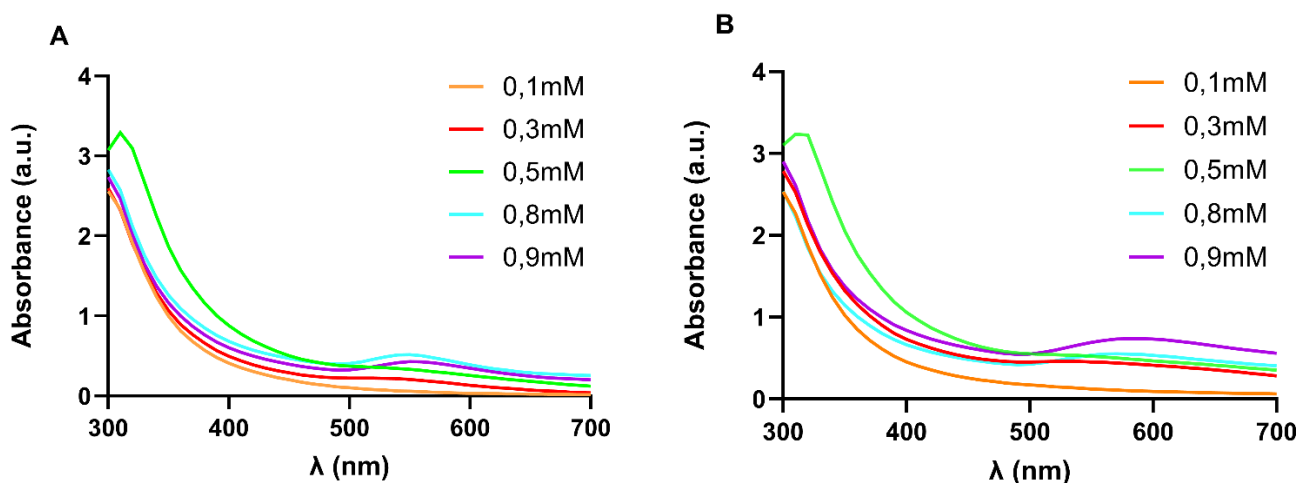


Figura 2. Espectros de absorción UV-Vis de AuNPs del medio líquido micelio. Comparativa de la cinética de formación a las (A) 4 horas y (B) 24 horas de reacción, utilizando diferentes concentraciones de HAuCl₄.

Caracterización de Nanopartículas

Una vez que mediante espectroscopía Uv-Vis se confirmó la formación de AuNPs, las muestras sintetizadas con el extracto del cuerpo fructífero fueron entregadas al servicio de microscopía de Universidad de Concepción. El análisis morfológico de las nanopartículas sintetizadas a partir del extracto de cuerpo fructífero se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las micrografías (Fig. 3) revelaron que las AuNPs presentan una forma predominante esférica o cuasi-esférica. Además, no se observaron procesos de agregación o aglomeración en las muestras analizadas. El análisis morfométrico de distribución de tamaño (n=100) indicó que la población de nanopartículas es monodispersa, con un diámetro promedio de $18,94 \pm 5,28$ nm (Fig. 4). Debido a la pérdida en la señal de síntesis de NPs, la muestra del extracto del medio líquido no fue enviada a caracterizar.

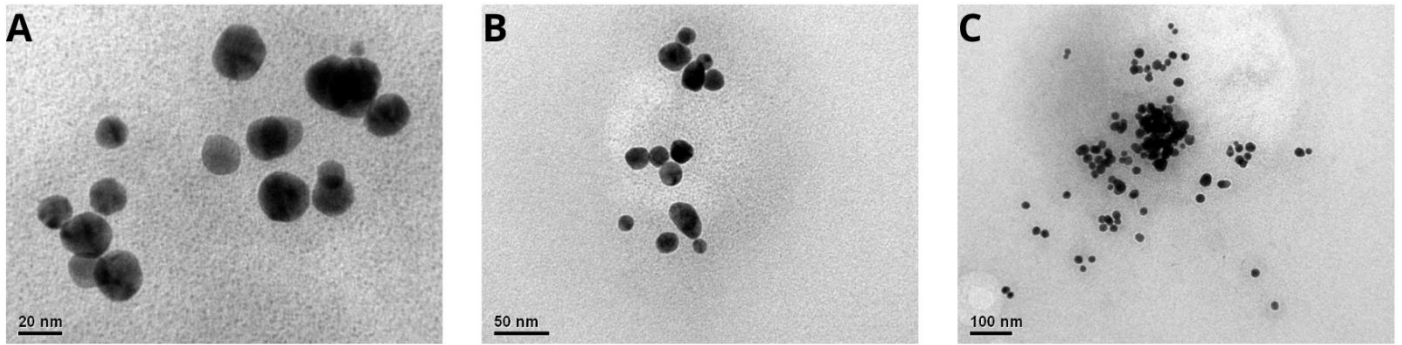


Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión (TEM) de AuNPs sintetizadas con los metabolitos del cuerpo fructífero de *Psilocybe cubensis*. Barras de escala de 20 (A), 50 (B) y 100 (C) nanómetros.

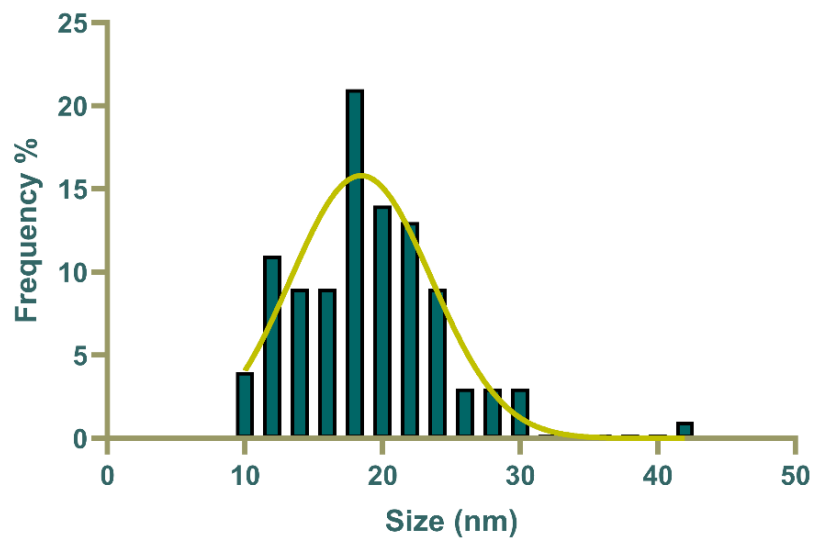


Figura 4. Histograma de distribución Gaussiana del tamaño de las AuNPs. El análisis morfométrico de nanopartículas reveló un diámetro promedio de $18,94 \pm 5,28$ nm. La curva de distribución muestra una población mono-dispersa, consistente con los datos obtenidos mediante espectroscopía UV-Vis.

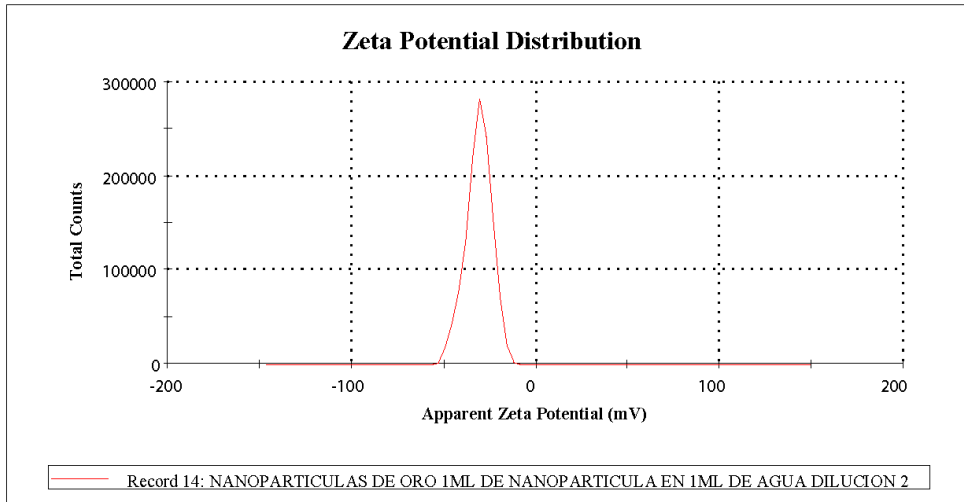
Estabilidad y tamaño hidrodinámico de las AuNPs

El análisis de Potencial Zeta reveló que las AuNPs poseen una carga superficial neta negativa de -31.0 mV (Fig. 5A), lo cual es indicativo de una alta estabilidad coloidal según el criterio de la repulsión electrostática. Esta carga negativa se atribuye a los grupos funcionales del extracto de *P.cubensis* que actúan como agentes de recubrimiento.

De manera complementaria, el análisis por DLS permitió obtener la distribución de tamaños en función de la intensidad (Fig. 5B), revelando un diámetro hidrodinámico promedio (Z-average) de 19,41 nm. Este resultado muestra una estrecha correlación con el diámetro del núcleo metálico observado mediante TEM (18,94 nm), validando la consistencia del tamaño de las nanopartículas tanto en estado sólido como en dispersión acuosa. Si bien el índice de polidispersidad PdI: 1.00 refleja la complejidad del extracto biológico y la presencia de biomoléculas libres, la población principal de nanopartículas se mantiene estable y dentro del rango nanométrico funcional.

A

Results		Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-31,0	Peak 1: -31,0	100,0	7,06
Zeta Deviation (mV):	7,06	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm):	1,24	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

**B**

Results		Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm):	19,41	Peak 1: 92,06	71,3	53,86
Pdl:	1,000	Peak 2: 4,794	24,3	2,432
Intercept:	0,811	Peak 3: 3773	4,4	1160

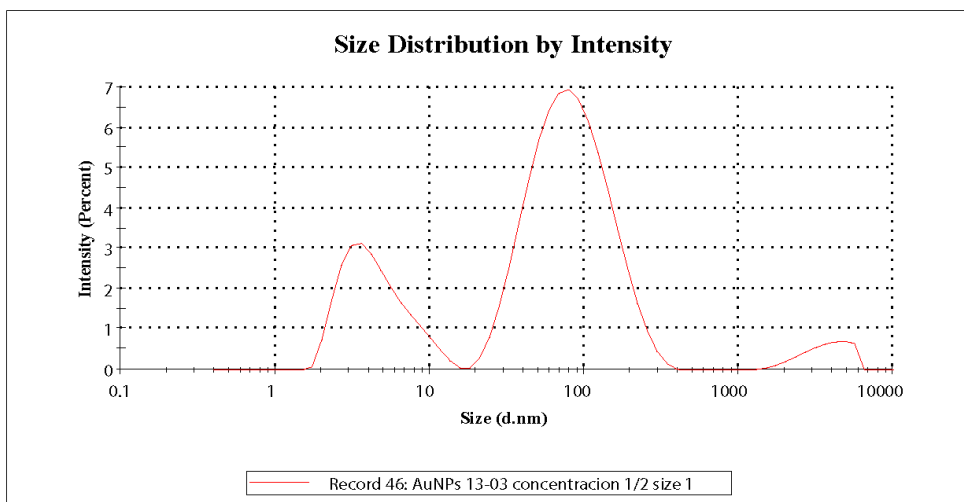


Figura 5. Caracterización Físicoquímica de las Nanopartículas de oro (AuNPs) biosintetizadas. (A) Distribución del Potencial Zeta, mostrando un valor promedio de -31,0 mV, lo

que confirma una alta estabilidad coloidal y repulsión electrostática. (B) Distribución de tamaño por intensidad obtenida mediante DLS, con un diámetro hidrodinámico promedio de 18,55 nm.

Análisis FTIR

Se realizó un análisis mediante FTIR para identificar los grupos funcionales presentes en las nanopartículas de oro y el extracto de *P. cubensis*, los cuales desempeñaron un papel crucial en la reducción y estabilización de las nanopartículas de oro. Para analizar las bandas de absorción se utilizó como guía el estudio de Galdino et al. 2025.

En la Figura 6 se presenta el espectro FTIR de los componentes del sistema, donde se identifican las bandas vibracionales que corroboran la complejidad bioquímica del extracto y la funcionalización de las nanopartículas. Se observan bandas intensas a 3265.54 y 3329.38 cm^{-1} , asignadas al estiramiento de grupos N-H (aminas y amidas) y grupos O-H (alcoholes). Se identificaron bandas de estiramientos en 2926.36 y 2918.75 cm^{-1} correspondientes a vibraciones C-H de alcanos, y una señal en 1727.74 cm^{-1} que representa la tensión C=O de grupos carbonilo. Adicionalmente, se detectó una banda en 1598.16 cm^{-1} asociada a la flexión N-H y tensiones C=C, junto con un doblete entre 1027.58 y 990.18 cm^{-1} asignado a las vibraciones de grupos fosfato.

Al evaluar la superposición de los espectros FTIR (Fig. 7), se observó un desplazamiento en la región de estiramiento de los grupos —OH/ —NH de 326.54 a 3329.38 cm^{-1} en las nanopartículas en comparación con el extracto libre. Asimismo, se constató que la profundidad de los picos en el espectro de las nanopartículas de oro es en términos generales, menor que la del espectro del extracto original, aunque se mantiene la presencia de las señales en 1598.16 y 990.18 cm^{-1} .

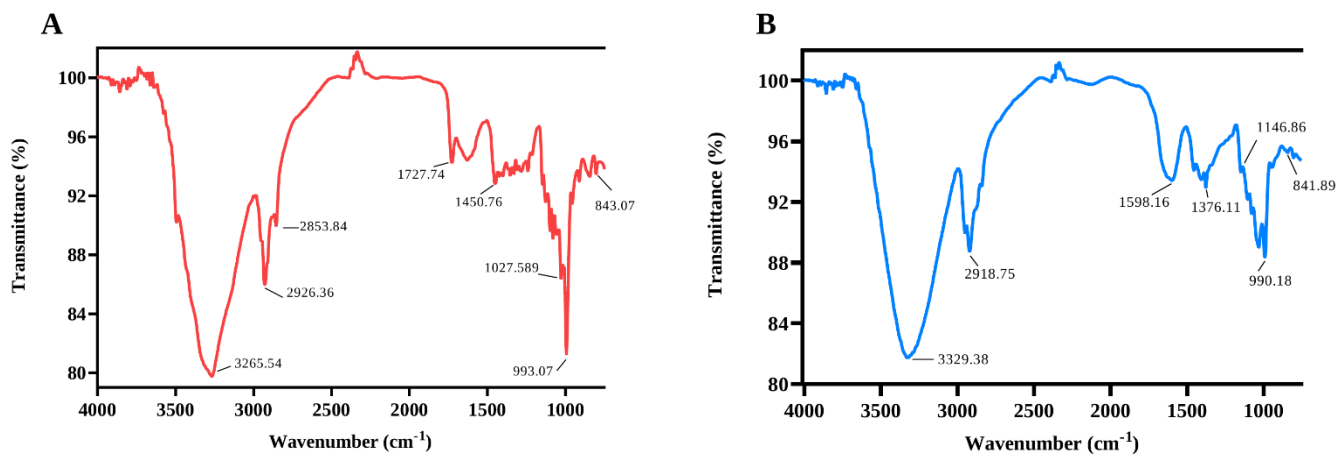


Figura 6. Espectros FTIR de los componentes del sistema. (A) Extracto acuoso de *Psilocybe cubensis* utilizado como agente reductor y estabilizante. (B) Nanopartículas de oro (NpS Oro) funcionalizadas con los metabolitos del hongo.

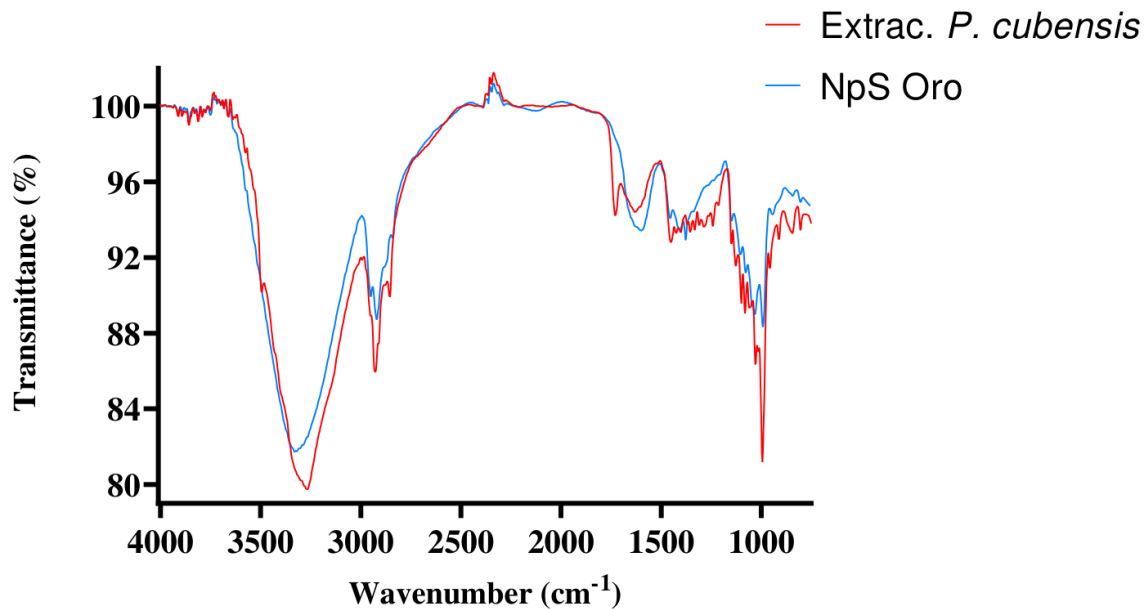


Figura 7. Espectros FTIR superpuestos del extracto acuoso de *Psilocybe cubensis* (línea roja) y las nanopartículas de oro biosintetizadas (línea azul).

Frecuencia Exp. (cm ⁻¹)	Rango Ref. (cm ⁻¹)	Tipo de Vibración / Grupo Funcional	Origen Bioquímico Probable (<i>P. cubensis</i>)
3329 - 3265	3500 - 3100	Tensión N-H (Aminas/Amidas) / Tensión O-H (Alcoholes/ Fenoles)	Proteínas, Psilocibina y Polisacáridos
2926 - 2853	3000 - 2850	Tensión C-H (Alcanos)	Cadenas alifáticas de lípidos y proteínas
1727	1740 - 1705	Tensión C=O (Aldehídos / Cetonas / Ésteres)	Lípidos y metabolitos secundarios
1630	1670 - 1640	Tensión C=O (Amida)	Amida I: Enlaces peptídicos de proteínas (agente estabilizante)
1598	1640 - 1550	Flexión N-H (Amidas/Aminas) / C=C Aromático	Amida II / Anillo indol de la Psilocibina
1450	1465 - 1450	Flexión -CH ₂ - / -CH ₃	Estructuras orgánicas del hongo
1079 - 1027	1300 - 1000	Tensión C-C / C-O (Alcoholes, Éteres, Ésteres)	Carbohidratos y enlace P-O-C
1027 - 990	1050 - 1000	Grupo Inorgánico (PO ₄) ⁻² (Fosfato)/ P-O-C	Enlaces éster de fosfatos (psilocibina)
993 - 990	980 - 930	Grupo (HPO ₄) ⁻²	Estructuras de fosfato hidrogenado

Tabla 2 Asignación de bandas de absorción IR según estándares UPV/EHU.

*Efectos de las nanopartículas de oro biosintetizadas con *Psilocybe cubensis* sobre células N2a*

El efecto de las AuNPs biosintetizadas con *P. cubensis* sobre las células N2a fue evaluado mediante dos aproximaciones estadísticas complementarias aplicadas a las cinco métricas cuantificadas. Para la proliferación relativa al número de células, el porcentaje de área total de confluencia, el porcentaje de muerte celular, la excentricidad y la proliferación relativa a la confluencia se realizó un ANOVA de dos vías con corrección de Greenhouse-Geisser y test de comparaciones múltiples de Dunnett, considerando la concentración de AuNPs y el tiempo de incubación como factores independientes a lo largo de las 48 horas completas de ensayo (n=192). Adicionalmente, para las mismas cinco métricas se realizó un ANOVA de una vía con test de Dunnett sobre los datos del punto final a las 48 horas (n=4 réplicas por grupo), como análisis complementario al término del experimento.

A la densidad de 1250 células/pozo (Fig. 8), la cinética de proliferación relativa al número de células (Fig. 8A) evidenció una marcada divergencia dependiente de la concentración a lo largo de las 48 horas de seguimiento. Las concentraciones entre 22,91 y 91,63 µg/mL mantuvieron niveles de proliferación comparables o superiores al control. En contraste, las dosis de 366,5, 733,0 y 1466,0 µg/mL indujeron una supresión del crecimiento celular progresiva y sostenida. El análisis de ANOVA de dos vías ratificó que las dosis de 22,91 y 45,81 µg/mL incrementaron de forma significativa la tasa proliferativa a lo largo del tiempo ($p < 0,0001$). El análisis ANOVA de una vía al punto final (Fig. 8F), reveló diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$); mientras que el grupo control alcanzó una media de 4,444, las concentraciones inhibitorias registraron valores menores (1,604; 1,147 y 0,419). Finalmente, se confirmó un incremento bioestimulante estadísticamente significativo en la dosis de 45,81 µg/mL en comparación con el control ($p = 0,0173$; *).

La cinética del área total de confluencia (Fig. 8B) mostró que las concentraciones bajas generaron mayor porcentaje de área ocupada que el control. El ANOVA de dos vías confirmó incrementos significativos para 22,91; 45,81; 91,63 y 183,25 µg/mL ($p < 0,0001$), mientras que 366,5 y 733,0 µg/mL la redujeron significativamente ($p < 0,0001$ y $p = 0,004$). El ANOVA de una vía al punto final (Fig. 8 I) confirmó valores de ~14,1%, ~13,7% y ~12,9%

para 22,91; 45,81 y 91,63 $\mu\text{g/mL}$ frente a $\sim 8,3\%$ del control ($p \leq 0,015$), y reducción significativa a 366,5; 733,0 y 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ ($p \leq 0,0136$).

La cinética de proliferación relativa a la confluencia (Fig. 8C) mostró el mismo patrón bifásico consistente a las métricas previas. El análisis ANOVA de dos vías confirmó que las concentraciones de 22,91 y 45,81 $\mu\text{g/mL}$ presentaron el efecto bioestimulante más significativo a lo largo del tiempo con medias de 2,380 y 2,343, respectivamente, frente al valor medio de 2,153 del grupo control ($p < 0,0001$). Por el contrario, la concentración de 91,63 $\mu\text{g/mL}$ no presentó diferencias significativas, en comparación con las dosis inhibitorias de 183,25; 366,5; 733,0 y 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ las cuales evidenciaron una reducción sostenida en la eficiencia de proliferación. El ANOVA de una vía para el punto final (Fig. 8G) confirmó una supresión significativa en las dosis de 366,5, 733,0 y 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ (medias de 1,012; 0,576 y 0,219 frente a 3,674 del control; $p < 0,0001$), e incremento significativo únicamente a 45,81 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0262$, *). Las concentraciones de 22,91; 91,63 y 183,25 $\mu\text{g/mL}$ no difirieron significativamente del control (ns).

El porcentaje de muerte celular (Fig. 8D) mostró un aumento progresivo a lo largo de 48 horas, alcanzando niveles críticos de entre el 60% y 80% hacia el término del ensayo en las dosis de 733,0 y 1466,0 $\mu\text{g/mL}$. El ANOVA de dos vías confirmó incrementos altamente significativos para 366,5; 733,0 y 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,0001$). En contraste las dosis de 22,91; 91,63 y 183,25 $\mu\text{g/mL}$ no mostraron variaciones significativas (ns), mientras que la concentración de 45,81 $\mu\text{g/mL}$ presentó una ligera pero significativa reducción en la mortalidad basal ($p < 0,0001$). El análisis de muerte celular a las 48 horas mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (Fig. 8H) reveló un cambio drástico en el perfil de toxicidad a partir de concentraciones intermedias. Mientras que las dosis de 22,91 a 183,25 $\mu\text{g/mL}$, no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control, manteniendo los niveles de mortalidad basales, se observó un incremento en la letalidad en las dosis de 366,5 $\mu\text{g/mL}$, quien indujo un aumento significativo de la mortalidad celular (media de 44,51% vs. 15,03%; $p < 0,0001$). Por otro lado, la citotoxicidad máxima se alcanzó con la concentración de 733,0 $\mu\text{g/mL}$, representando el punto de mayor toxicidad en el ensayo, con una mortalidad del 69,89%, con una diferencia altamente significativa de -54,86

frente al grupo control ($p < 0,0001$). A diferencia de las dosis anteriores, la concentración de 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ no presentó un valor significativo al punto final ($p = 0,9953$).

La excentricidad celular (Fig. 8E) mostró valores entre $\sim 0,65$ y $\sim 0,80$ durante el ensayo, lo que indica que la morfología celular se mantuvo conservada en la mayoría de las concentraciones evaluadas. El ANOVA de dos vías evidenció diferencias significativas en todas las concentraciones ($p < 0,0001$), siendo 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ la que produjo el mayor incremento sostenido ($p < 0,0001$). El ANOVA de una vía al punto final (Fig. 8J) confirmó que únicamente 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ presentó excentricidad significativamente mayor al control a las 48 h (media de $\sim 0,794$ frente a $\sim 0,707$ del control; $p < 0,0001$), mientras que todas las demás concentraciones no difirieron significativamente del control en este punto (ns), lo que indica que el aumento de excentricidad es un efecto morfológico selectivo de la concentración más alta.

Las imágenes representativas del Incucyte a 0, 24 y 48 h para el control (Fig. 8K), 91,63 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 8L) y 733,0 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 8M) corroboraron visualmente el patrón descrito.

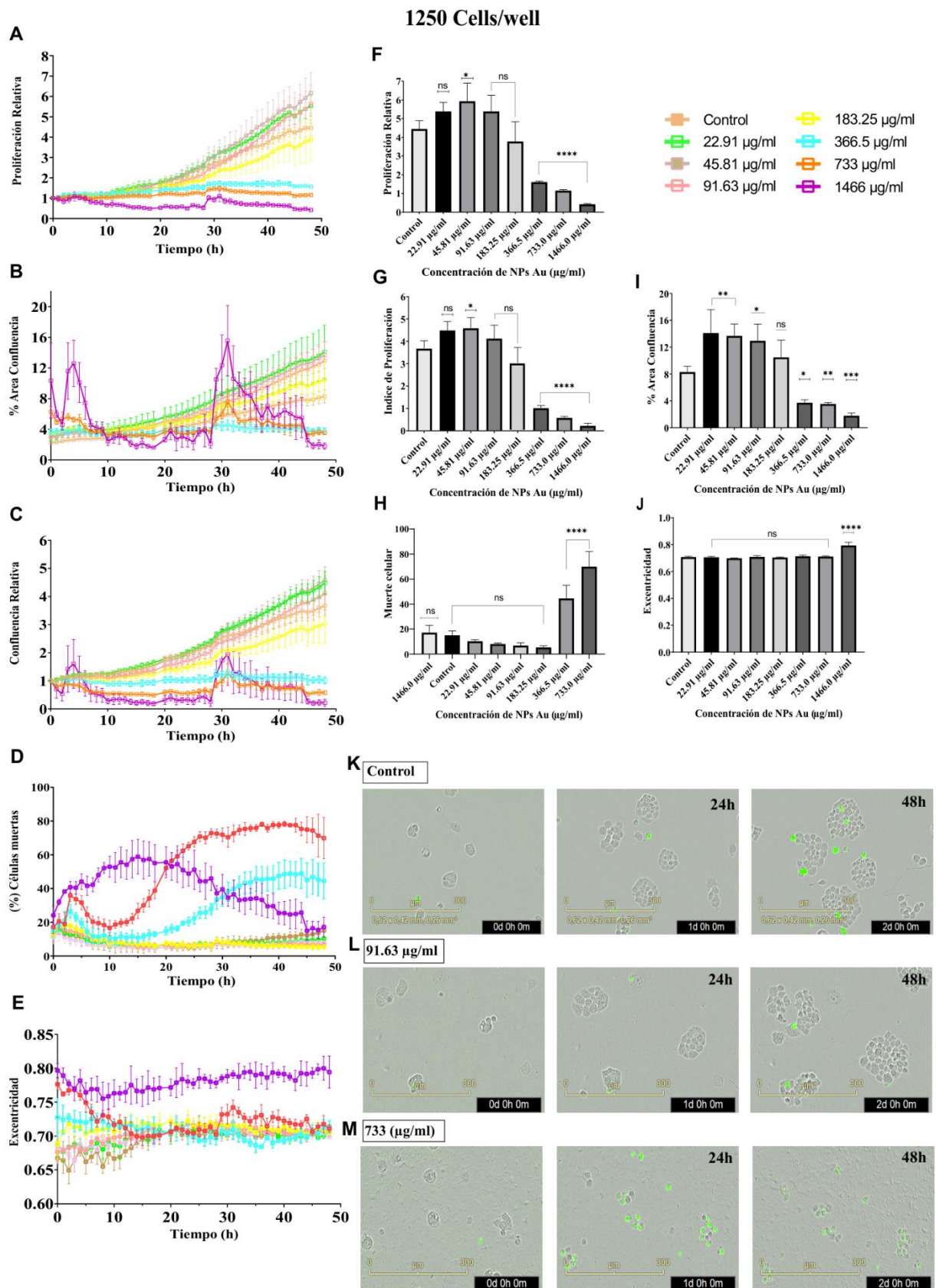


Figura 8. Efecto de la suplementación con AuNPs biosintetizadas a partir de *Psilocybe cubensis* sobre la proliferación de células N2a. Los ensayos se realizaron con una densidad inicial de 1250 células/pozo durante un periodo de 0 a 48 h bajo diferentes concentraciones de AuNPs. **(A)** Cinética de proliferación relativa al número de células. **(B)** Área total de confluencia (%). **(C)** Proliferación relativa a la confluencia. **(D)** Porcentaje de muerte celular. **(E)** Excentricidad total. **(F-**

J) Análisis estadístico al punto final (48 h): Comparación de medias mediante ANOVA de una vía y post-hoc de Dunnett para las métricas de proliferación (F, G), muerte celular (H), ocupación de área (I) y morfología (J). Las barras representan media \pm SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns: no significativo). (K-M) Micrografías representativas: Registro visual a las 0, 24 y 48 horas del Control (K), la dosis bioestimulante de 91,63 $\mu\text{g/mL}$ (L) y la dosis de toxicidad aguda de 733 $\mu\text{g/mL}$ (M). La fluorescencia verde indica eventos de muerte celular.

A 2500 células/ pozo (Fig. 9). La cinética de proliferación relativa al número de células (Fig. 9A) mostró el patrón bifásico de forma más marcada. El análisis estadístico ANOVA de dos vías confirmó incrementos significativos en la proliferación para las concentraciones de 22,91; 45,81 y 91,63 $\mu\text{g/mL}$ (diferencias media de -0,194, -0,238 y -0,329; $p < 0,0001$), mientras que la dosis de 183,25 $\mu\text{g/mL}$ no mostró un efecto estadísticamente significativo (ns). Por el contrario, se registró una supresión altamente significativa en las dosis de 366,5; 733,0 y 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,0001$) en comparación al grupo control. El ANOVA de una vía al punto final (Fig. 9F) corroboró estos resultados donde las dosis estimulatorias alcanzaron medias de entre 5,505 y 6,019, superando notablemente el valor de 4,670 del control. En contraste, las dosis inhibitorias presentaron medias significativamente menores, situándose en 2,879, 1,660 y 0,777, respectivamente ($p < 0,0001$).

La cinética del área de confluencia (Fig. 9B) evidenció incrementos altamente significativos para el rango de dosis de 22,91- 183,25 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,0001$). Siendo la concentración de 91,63 $\mu\text{g/mL}$, la cual exhibió el efecto bioestimulante más significativo y pronunciado del estudio, alcanzando una media de ocupación superficial del 19,00% frente al 12,17% registrado en el grupo control. En contraposición, se observó una reducción significativa en la confluencia para las dosis superiores a 366,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,0001$). El ANOVA de una vía al punto final (Fig. 9I) confirmó valores medias de 30-35% para las dosis estimulatorias frente a la media 18,3% del control ($p < 0,0001$). Por el contrario, las dosis inhibitorias de 366,5, 733,0 y 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ mostraron una cobertura significativamente menor, con medias de aproximadamente 16,8%, 6,2% y 5,3%, respectivamente.

La cinética de proliferación relativa a la confluencia (Fig. 9C) reflejó el mismo patrón bifásico. El ANOVA de dos vías confirmó que los factores concentración, tiempo y su interacción ejercieron efectos significativos sobre el crecimiento celular. Las dosis de 22,91, 45,81; 91,63 y 183,25 $\mu\text{g/mL}$ destacaron como los tratamientos con mayor significancia

estadística frente al grupo control (media de $\sim 2,186$), alcanzando valores promedio de $\sim 2,507$, $\sim 2,548$, $\sim 2,5$ y $\sim 2,323$ ($p < 0,0001$). Las dosis superiores a $366,5 \mu\text{g/mL}$ presentaron una tasa de proliferación drásticamente inferior a la basal. Al evaluar el punto final del experimento (48 h, Fig. 9G), el ANOVA de una vía ratificó un incremento proliferativo altamente significativo en el rango de $22,91$ a $183,25 \mu\text{g/mL}$ (medias entre $4,371$ y $4,650$, frente a $3,297$ del control; $p < 0,0001$). En contraposición, se validó una supresión de la proliferación en las dosis de $366,5$; $733,0$ y $1466,0 \mu\text{g/mL}$ (medias de $2,247$; $0,695$ y $0,446$, respectivamente; $p < 0,0001$).

Respecto a la citotoxicidad, el porcentaje de muerte celular (Fig. 9D) fue especialmente pronunciado a esta densidad inicial; las concentraciones de $733,0$ y $1466,0 \mu\text{g/mL}$ superaron el 80% de mortalidad entre las 20 y 30 horas de tratamiento. El análisis de ANOVA de dos vías validó diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$), evidenciando además una reducción significativa en la tasa de mortalidad para el rango de $45,81$ a $183,25 \mu\text{g/mL}$ en comparación con el grupo control. Por el contrario, el tratamiento con la dosis de $366,5 \mu\text{g/mL}$ no arrojó diferencias estadísticamente significativas respecto a la basal. El análisis de ANOVA de una vía reveló un comportamiento caracterizado por una ventana de neuroprotección basal, a esta densidad los tratamientos con $91,63$; $183,25$ y $366,5 \mu\text{g/mL}$ mostraron tasas de mortalidad significativamente inferiores al control ($5,50\%$; $3,03\%$ y $5,95\%$ vs. $11,81\%$ control). Mientras que la citotoxicidad aguda se restringió a la dosis de $733,0 \mu\text{g/mL}$, con un $83,67\%$ de muerte celular ($p < 0,0001$), mientras que la dosis máxima $1466,0 \mu\text{g/mL}$ presentó una mortalidad del $17,83\%$ ($p = 0,0316$).

La excentricidad (Fig. 9E) evidenció que $1466,0 \mu\text{g/mL}$ produjo el mayor incremento sostenido (diferencia de medias de $-0,065$; $p < 0,0001$). El ANOVA de una vía al punto final (Fig. 9J) confirmó que únicamente $1466,0 \mu\text{g/mL}$ presentó excentricidad significativamente mayor al control a las 48 h (media de $\sim 0,768$ frente a $\sim 0,697$ del control; $p < 0,0001$), mientras que todas las demás concentraciones no difirieron significativamente (ns).

Las imágenes representativas para el control (Fig. 9K), $91,63 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 9L) y $733,0 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 9M) confirmaron visualmente el patrón descrito.

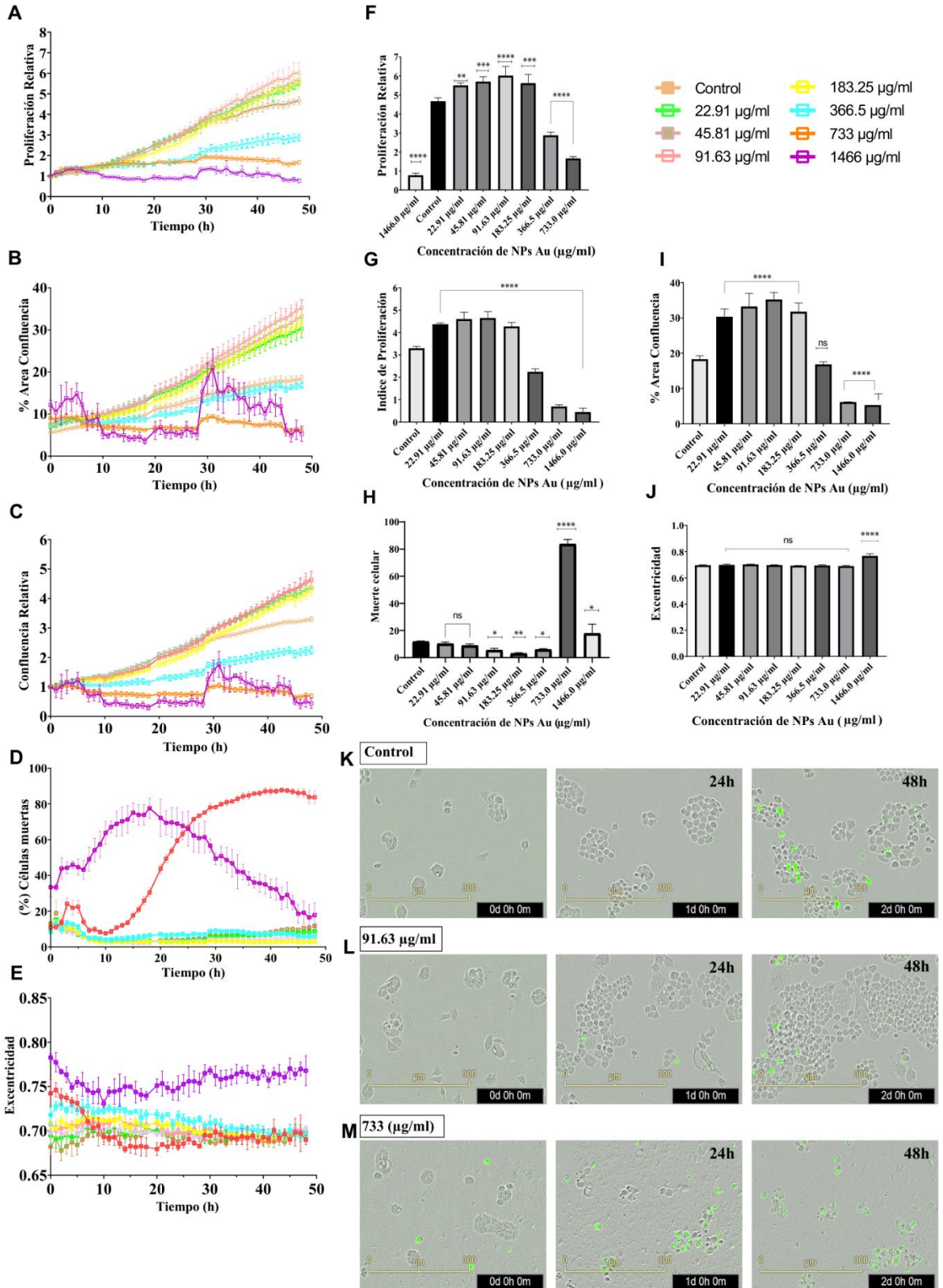


Figura 9. Efecto de la suplementación con AuNPs biosintetizadas a partir de *Psilocybe cubensis* sobre la proliferación de células N2a. Los ensayos se realizaron con una densidad inicial de 2500 células/pozo durante un periodo de 0 a 48 h bajo diferentes concentraciones de AuNPs. (A) Cinética de proliferación relativa al número de células. (B) Área total de confluencia (%). (C)

Proliferación relativa a la confluencia. **(D)** Porcentaje de muerte celular. **(E)** Excentricidad total. **(F-J)** Análisis estadístico al punto final (48 h): Evaluación mediante ANOVA de una vía y post-hoc de Dunnett. Se observa un incremento significativo en la proliferación relativa **(F, G)** y área de confluencia **(I)** para el rango 22,91-183,25 $\mu\text{g/mL}$. La excentricidad **(J)** permanece estable excepto en la dosis máxima (1466 $\mu\text{g/mL}$), indicando preservación de la arquitectura celular en dosis bajas e intermedias. **(K-M)** Micrografías representativas: Comparativa visual entre el Control (K), la dosis de máximo estímulo de 91,63 $\mu\text{g/mL}$ (L) y la dosis citotóxica de 733 $\mu\text{g/mL}$ (M), evidenciando una red neuronal más densa en el tratamiento bioestimulante.

A la densidad de 5000 células/pozo (Fig. 10), la cinética de proliferación relativa al número de células (Fig. 10A) ratificó el patrón bifásico observado anteriormente, con la mayor potencia estadística de las tres densidades evaluadas. El análisis de ANOVA de dos vías reveló diferencias altamente significativas para todas las concentraciones ($p < 0,0001$); específicamente, el rango de 22,91–183,25 $\mu\text{g/mL}$ indujo un incremento sostenido en la proliferación (diferencias de medias entre -0,300 y -0,398), mientras que las dosis de 366,5–1466,0 $\mu\text{g/mL}$ suprimieron el crecimiento celular (diferencias de medias de +0,570, +0,857 y +1,445, respectivamente). Estos hallazgos fueron corroborados por el ANOVA de una vía al punto final de 48 h (Fig. 10F) con un $p < 0,0001$, donde las dosis estimulatorias alcanzaron medias de 4,662–5,191 frente a 3,671 del grupo control, contrastando con los valores significativamente menores (2,653; 1,684 y 0,832) registrados en las dosis inhibitorias.

La cinética del área de confluencia (Fig. 10B) evidenció el efecto bioestimulante más pronunciado de todo el estudio. Las concentraciones entre 22,91 y 183,25 $\mu\text{g/mL}$ alcanzaron niveles de ocupación superficial de entre ~37% y 40%, superando ampliamente el ~17% registrado en el control. El ANOVA de dos vías confirmó incrementos altamente significativos para este rango (diferencias de medias de -5,840 a -8,396; $p < 0,0001$), así como reducciones drásticas en las dosis superiores a 366,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,0001$). Finalmente, el análisis de una vía al punto final (Fig. 10I) validó estadísticamente tanto el aumento de la confluencia en el intervalo de 22,91–183,25 $\mu\text{g/mL}$ ($p \leq 0,040$) como su disminución significativa en las concentraciones más elevadas ($p \leq 0,050$).

La proliferación relativa a la confluencia (Fig. 10C) exhibió un comportamiento consistente con las métricas anteriores. El análisis de ANOVA de dos vías reveló que tanto la concentración, el tiempo, como la interacción entre ambos factores, ejercieron un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,0001$). Particularmente, la dosis de 91,63 $\mu\text{g/mL}$ destacó

como el principal inductor del crecimiento, alcanzando una media de 2,38 frente al 1,971 del grupo control ($p < 0,0001$). Este perfil bioestimulante fue compartido por el rango de dosis entre 22,91 y 183,25 $\mu\text{g/mL}$, todas con una significancia de $p < 0,0001$. Complementariamente, el análisis de ANOVA de una vía al punto final (Fig. 10G) ratificó este fenómeno de hormesis, se observó un incremento significativo en la biomasa en el intervalo de 22,91 – 183,25 $\mu\text{g/mL}$ (medias entre 3,689–4,264 vs. 2,751 del control; $p < 0,0001$), mientras que las concentraciones de 366,5, 733,0 y 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ provocaron una supresión drástica de la proliferación (medias de 2,129; 0,774 y 0,478, respectivamente; $p \leq 0,004$).

Respecto a la citotoxicidad, el porcentaje de muerte celular (Fig. 10D) alcanzó niveles críticos de entre el 70% y 80% para las concentraciones de 733,0 y 1466,0 $\mu\text{g/mL}$, con un pico de incidencia entre las 20 y 30 horas de tratamiento. El análisis de ANOVA de dos vías ratificó diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$), evidenciando un incremento masivo de la mortalidad en las dosis altas (diferencias de medias de 33,77 y 38,43 respecto al control). En contraste, las dosis comprendidas entre 22,91 y 366,5 $\mu\text{g/mL}$ mostraron niveles de mortalidad significativamente reducidos ($p < 0,0001$). Al punto final del experimento (48 h, Fig. 10H), el ANOVA de una vía reveló que la densidad de 5.000 células/pozo ratificó el comportamiento hormético con la mayor potencia estadística. Se observó una reducción altamente significativa de la mortalidad basal del control (22,12%) en todo el rango de 22,91 a 366,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,0001$). Por el contrario, la dosis de 733,0 $\mu\text{g/mL}$ indujo un colapso del 72,18% ($p < 0,0001$). Mientras que la dosis de 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ mostró una mortalidad significativa de solo 12,40% ($p = 0,0051$).

El análisis de excentricidad (Fig. 10E) identificó a la dosis de 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ como el único tratamiento capaz de inducir un incremento sostenido y significativo en la esfericidad celular (diferencia de medias de 0,056; $p < 0,0001$). El ANOVA de una vía al punto final (Fig. 10J) confirmó que solo la concentración de 1466,0 $\mu\text{g/mL}$ presentó una excentricidad significativamente mayor al control a las 48 h en las tres densidades evaluadas (media de $\sim 0,769$ vs. $\sim 0,699$; $p < 0,0001$). Las demás concentraciones no mostraron variaciones morfológicas significativas (ns) respecto a la basal. Este patrón, reproducible en densidades

de 1250, 2500 y 5000 células/pozo, establece que el aumento de la excentricidad es un efecto morfológico selectivo y específico de la dosis máxima evaluada.

Finalmente, las micrografías representativas del grupo control (Fig. 10K), la dosis de 91,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 10L) y la dosis de 733,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 10M) corroboraron visualmente el patrón descrito, evidenciando una red neuronal sana y extendida en el tratamiento bioestimulante frente al colapso estructural observado en la dosis máxima.

5000 Cells/well

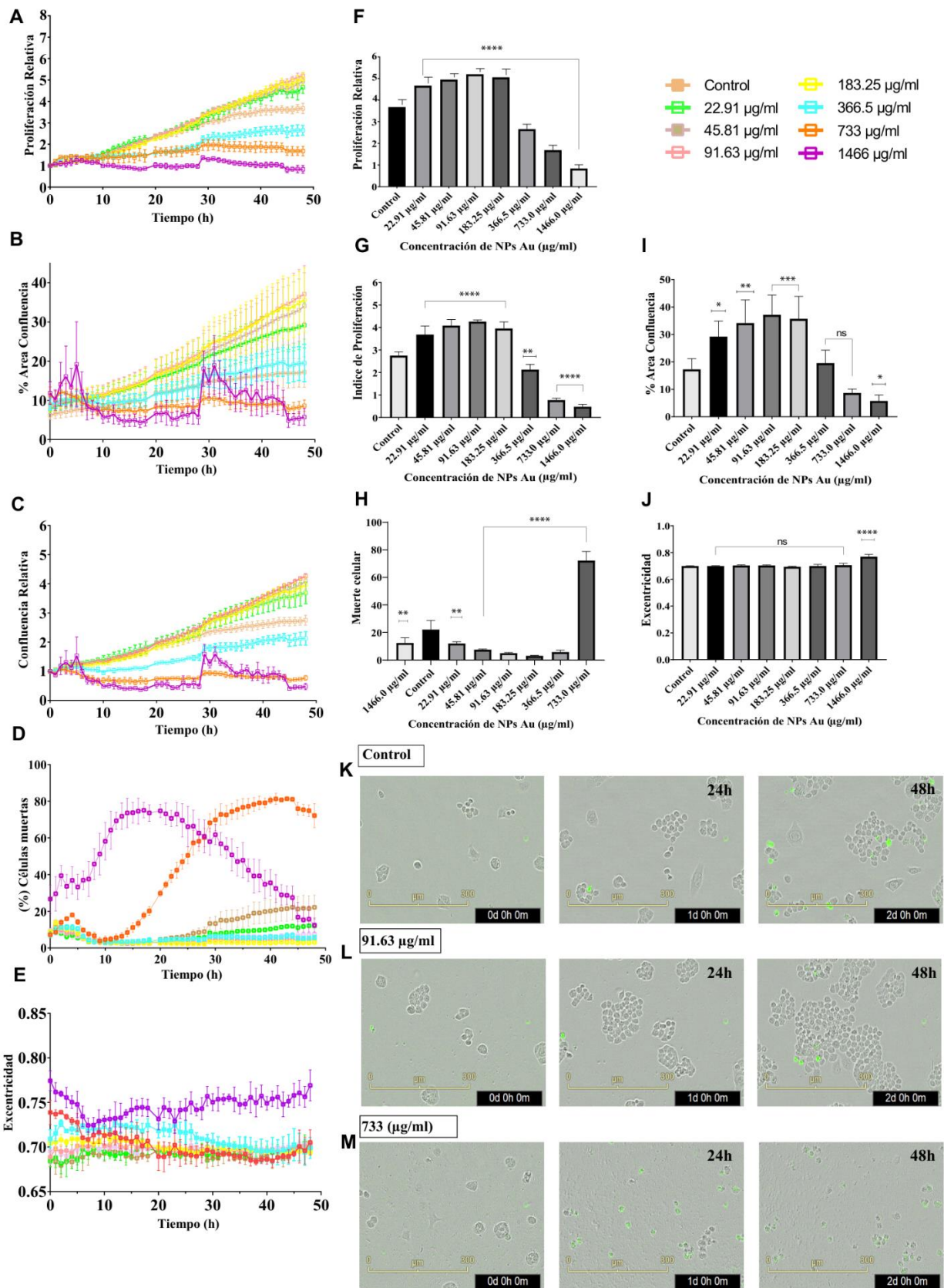


Figura 10. Efecto de la suplementación con AuNPs biosintetizadas a partir de *Psilocybe cubensis* sobre la proliferación de células N2a. Los ensayos se realizaron con una densidad inicial de 5000 células/pozo durante un periodo de 0 a 48 h bajo diferentes concentraciones de AuNPs. (A)

Cinética de proliferación relativa al número de células. **(B)** Área total de confluencia (%). **(C)** Proliferación relativa a la confluencia. **(D)** Porcentaje de muerte celular. **(E)** Excentricidad total. El efecto cooperativo celular permite una respuesta pro-proliferativa robusta incluso a dosis de 183,25 $\mu\text{g/mL}$, desplazando el umbral de toxicidad observado en densidades menores. **(F-J)** Análisis estadístico al punto final (48 h): Cuantificación mediante ANOVA de una vía y post-hoc de Dunnett. Se ratifica un aumento superior al 20% en la proliferación (F, G) y una duplicación del área de confluencia (I) respecto al control en el rango óptimo. La muerte celular (H) se mantiene en niveles basales o inferiores al control en dosis bajas. **(K-M)** Micrografías representativas: Evidencia visual del Control (K), la dosis de 91,63 $\mu\text{g/mL}$ (L) y 733 $\mu\text{g/mL}$ (M).

Análisis morfológico tridimensional de células N2a mediante holotomografía

El análisis holotomográfico de las células N2a se realizó entre las 42 y 48 horas de tratamiento, empleado una densidad inicial de 2500 células/pozo. Se adquirieron imágenes de corte óptico (XY slice view) y reconstrucciones tridimensionales del índice de refracción (RI) a cuatro tiempo: T0 (42h); T2 (44h), T4 (46h) y T6 (48h). Las imágenes presentadas corresponden a proyecciones del mapa tridimensional de RI medido de forma no invasiva y libre de marcadores, donde el brillo de cada estructura refleja su valor IR los organelos de alta densidad óptica como gotas lipídicas y vesículas aparecen como puntos brillantes, mientras que el citoplasma y el medio extracelular se presentan más oscuros (Sbrana et al. 2024).

Grupo control (Fig. 11A-F). Los cortes XY a T0, T2, T4 y T6 (Fig. 11A – D) revelaron agregados celulares de gran densidad que aumentaron progresivamente a lo largo del período de observación, evidenciado un crecimiento activo consistente con los datos cuantitativos del Incucyte. Las células presentaron una morfología predominantemente redondeada con membranas plasmáticas bien delimitadas y regiones de contacto célula-célula. El contenido intracelular mostró una distribución homogénea de vesículas y organelas de tamaño moderado. Las reconstrucciones 3D (Fig. 11E-F) confirmaron la arquitectura compacta y tridimensional densa del agregado celular, con escasas proyecciones periféricas individuales.

45,81 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 11G-L). Los cortes XY a T0, T2, T4 y T6 (Fig. 11G–J) mostraron agregados celulares de tamaño intermedio con morfología celular redondeada a levemente elongada, bien organizada y sin evidencia de alteraciones estructurales visibles durante las 6 horas de registro. El contenido intracelular fue comparable al del control, con vesículas bien

definidas distribuidas de forma uniforme. Las proyecciones citoplasmáticas periféricas fueron moderadas y de extensión similar a las observadas en el grupo control. Las reconstrucciones 3D (Fig. 11K–L) confirmaron la arquitectura cohesiva del agregado, con morfología celular globular y proyecciones periféricas discretas. En conjunto, lo observado a esta concentración es consistente con el perfil de biocompatibilidad evidenciado en los análisis cuantitativos de Incucyte, donde 45,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no produjo alteraciones morfológicas significativas ni aumento de muerte celular.

91,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 11M–R). Los cortes XY a T0, T2, T4 y T6 (Fig. 11M–P) revelaron el fenotipo morfológico más diferenciado de los tres grupos evaluados. Las células presentaron una morfología notablemente más elongada y fusiforme, con extensiones citoplasmáticas largas y bien definidas que se proyectan activamente desde el cuerpo celular en múltiples direcciones. Varias células exhibieron una forma característica en pera, con un polo celular adelgazado hacia la periferia del agregado. El contenido intracelular mostró vesículas de mayor tamaño y distribución más heterogénea en comparación con las otras condiciones. Las reconstrucciones 3D (Fig. 11Q–R) confirmaron la naturaleza tridimensional de las extensiones citoplasmáticas, distinguibles claramente del cuerpo celular globular central. Este fenotipo elongado con extensiones citoplasmáticas activas es morfológicamente compatible con procesos de reorganización del citoesqueleto asociados a extensión celular activa, y podría corresponder a los estadios iniciales de neuritogénesis, proceso ampliamente documentado en células N2a en respuesta a estímulos neurotróficos y compuestos bioactivos de origen fúngico (Yeo et al. 2019; Metz et al. 2018).

La selección de las concentraciones de 45,81 y 91,63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el análisis holotomográfico respondió a criterios cuantitativos derivados de los ensayos IncuCyte, ambas dosis se posicionaron consistentemente como las de mayor efecto bioestimulante sobre la proliferación y confluencia en las tres densidades celulares evaluadas, con diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0,0001$), y sin inducción de muerte celular adicional. Su inclusión permite, por tanto, correlacionar directamente el fenotipo morfológico tridimensional con el perfil funcional de mayor potencial neuroestimulante identificado en el estudio.

Coherentemente con los datos cuantitativos de excentricidad del análisis IncuCyte, la ausencia de distorsiones morfológicas severas en los grupos de 45,81 y 91,63 $\mu\text{g/mL}$ observada en las reconstrucciones holotomográficas no constituye un resultado negativo, sino una confirmación estructural de la biocompatibilidad del sistema. El análisis de punto final a 48h reveló que la excentricidad de ambas concentraciones no difirió significativamente del control (ns), lo que indica que, si bien el ANOVA de dos vías detectó trayectorias temporales distintas durante el ensayo, estas diferencias no se tradujeron en una deformación celular acumulada ni en una alteración estructural sostenida. En términos morfológicos, las células tratadas con estas concentraciones mantienen su integridad citoesquelética, lo cual es condición necesaria para que los procesos de reorganización activa observados como las extensiones citoplasmáticas a 91,63 $\mu\text{g/mL}$ sean interpretados como fenómenos dinámicos asociados a neuritogénesis incipiente y no como artefactos de estrés o daño celular.

Dado que el análisis cuantitativo de parámetros holotomográficos no pudo realizarse en el marco de este estudio, las observaciones descritas corresponden a un análisis morfológico cualitativo basado en la inspección visual de los cortes ópticos XY y las reconstrucciones 3D del índice de refracción. La cuantificación formal de estos parámetros mediante segmentación automatizada constituye una línea de investigación futura prioritaria que permitiría caracterizar con mayor rigor los cambios morfológicos observados (Sbrana et al. 2024; Chvalova et al. 2024).

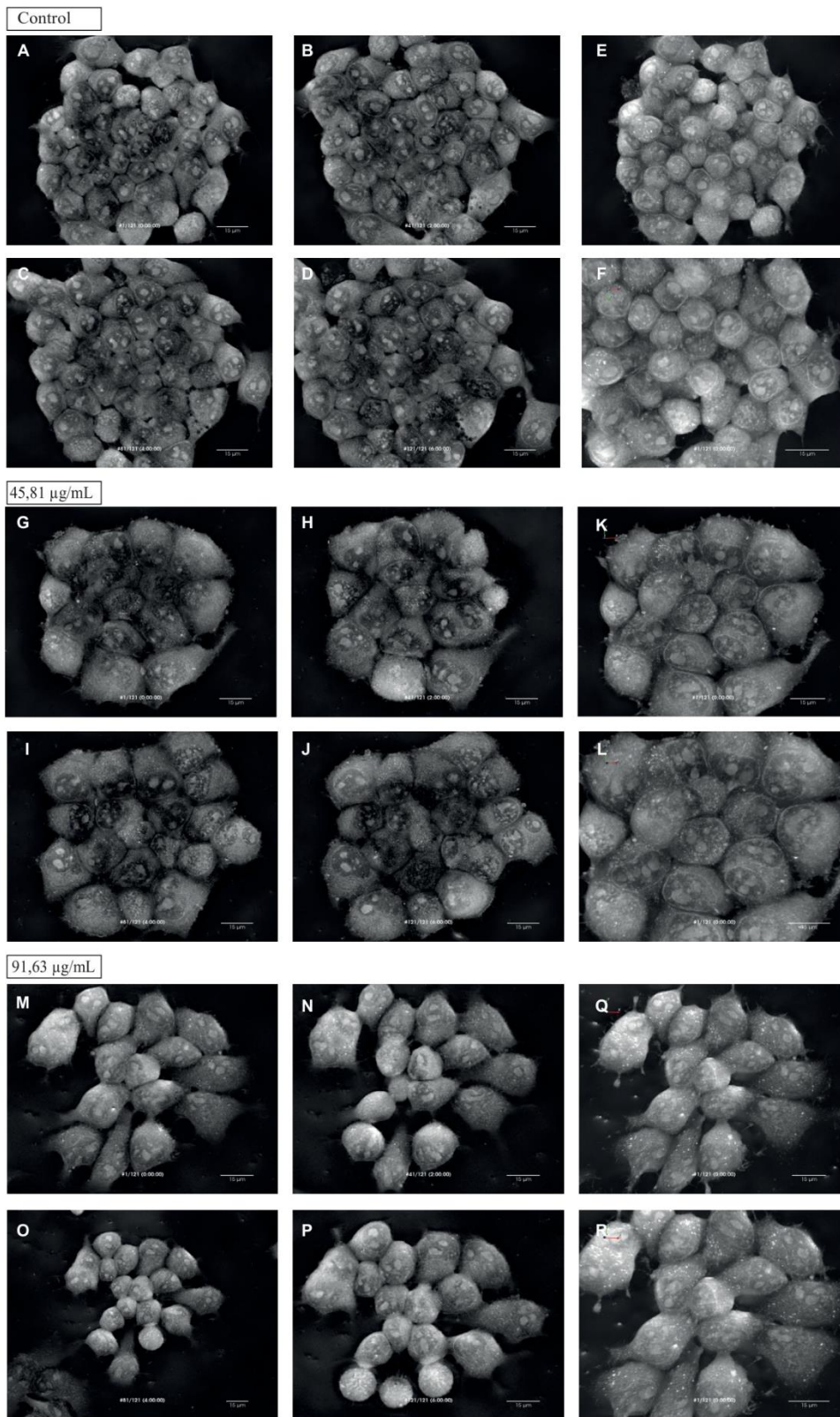


Figura 11. Caracterización estructural de neuronas N2a mediante microscopía holotomográfica 3D. El registro de imágenes se inició tras 42 horas pre-cultivo celular definido como Tiempo 0 del equipo, realizándose un seguimiento de 6 horas hasta completar las 48 horas de incubación total. Grupo control (A-D). Las micrografías en vista de corte (XY slice view). (E-F) Las reconstrucciones 3D. A dosis 45,81 µg/mL (G-J): Las secciones XY, (K-L) Representan las imágenes en 3D. Para la dosis 91,63 µg/mL (M-R) Los cortes ópticos XY slice view y (Q-R)

reconstrucción 3D. La escala temporal del ensayo correlaciona el tiempo de registro del software (T) con el tiempo total de crecimiento biológico (h) de la siguiente manera: T0 = 42 h; T2 = 44h; T4 = 46h y T6 = 48h. Todas las imágenes fueron capturadas mediante la medición del índice de refracción (RI) sin el uso de marcadores fluorescentes.

DISCUSIÓN

Identificación molecular

El primer paso para garantizar la reproducibilidad y validez de la síntesis de nanopartículas fue la confirmación taxonómica del modelo de estudio. Aunque *Psilocybe cubensis* posee características macroscópicas documentadas, la literatura advierte que la identificación basada únicamente en la morfología puede ser poco confiable debido a la alta plasticidad fenotípica del género y a la existencia de especies simpátricas visualmente similares, algunas de las cuales presentan alta toxicidad, como el género *Galerina* (Strauss D et al. 2022; Cohen J et al. 2025). Para superar esta limitación, se empleó la amplificación de la región ITS, el cual es el marcador de código de barras de ADN universal para la identificación de hongos. El análisis arrojó un 100% de identidad y un valor E de 0.0, confirmando que tanto el cuerpo fructífero como el aislado en placa corresponde a *P. cubensis*.

Esta validación molecular es de suma relevancia para el presente estudio biotecnológico, ya que la literatura reciente ha demostrado que existe una significativa variabilidad inter e intra-cepa en la expresión de metabolitos secundarios y alcaloides indólicos dentro del género *Psilocybe* (Kurzbaum et al. 2025). Al confirmar genéticamente la especie, se asegura que el perfil bioquímico del extracto rico en compuestos psicoactivos, antioxidantes y otros agentes esenciales para la reducción y estabilización de las AuNPs corresponde fielmente a las propiedades descritas para *P. cubensis*, validando así la eficacia del hongo como biofábrica nanotecnológica.

Biosíntesis de Nanopartículas de Oro.

La síntesis verde de nanopartículas de oro evidenció una marcada diferencia en la estabilidad coloidal dependiendo la matriz fúngica empleada. Mientras que el extracto del cuerpo fructífero logró estabilizar las AuNPs, reflejado en un pico SPR definido a 550 nm, el extracto derivado del cultivo líquido resultó en la pérdida de definición del pico y una eventual sedimentación a las 24 horas. Esta inestabilidad coloidal puede atribuirse directamente a la naturaleza de la fracción utilizada y a las condiciones de cultivo de la fase líquida, ya que se encuentra descrito la baja proporción de compuestos del tipo ergotioneína, psilocibina, triptófano, en los cultivos puros (Waldbillig et al. 2023).

En este estudio, no se utilizó la biomasa fúngica generada, sino el medio de cultivo líquido, el cual contiene exclusivamente los metabolitos extracelulares excretados durante el crecimiento sumergido. Investigaciones metabolómicas han demostrado que existen diferencias profundas entre la composición química de los cuerpos fructíferos, el micelio sólido y los caldos de fermentación líquida (Waldbillig et al. 2023). En los cultivos sumergidos, el micelio se mantiene en un estado predominantemente vegetativo, donde la maquinaria celular prioriza el metabolismo primario para la proliferación de biomasa, limitando la síntesis y excreción de metabolitos secundarios (Kurzbaum et al. 2025).

A diferencia del cuerpo fructífero maduro, que concentra de forma natural una alta densidad de alcaloides indólicos y potentes compuestos antioxidantes con capacidad quelante, la excreción de metabolitos secundarios estabilizadores hacia el medio líquido requiere de estímulos ambientales específicos. La literatura señala que la inducción de rutas biosintéticas secundarias en fermentaciones sumergidas es altamente dependiente de factores de estrés, tales como variaciones en la disponibilidad de oxígeno, estrés por cizallamiento, cambios de temperatura o limitación de nutrientes (Kurzbaum et al. 2025). Dado que, en este ensayo, el hongo no fue sometido al estrés fisiológico necesario para activar la síntesis y secreción de metabolitos secundarios antioxidantes hacia el medio líquido. En consecuencia, el extracto careció de una concentración suficiente de agentes de recubrimiento, lo que impidió la estabilización a largo plazo de las nanopartículas de oro y condujo a su eventual aglomeración.

En este ensayo se utilizó exclusivamente el filtrado extracelular del micelio cultivado en medio rico (YMG) durante 15 días, manteniendo al hongo en un estado predominantemente vegetativo. Investigaciones recientes señalan que el micelio en cultivos sumergidos experimenta condiciones ambientales que no logran activar los genes reproductivos ni los clusters de genes biosintéticos (BGC) responsables de la síntesis masiva de metabolitos secundarios (Kurzbaum et al. 2025).

Como resultado, el perfil extracelular difiere drásticamente del cuerpo fructífero. Estudios recientes demuestran que, mientras los cuerpos fructíferos acumulan preferencialmente potentes agentes reductores y estabilizantes como la ergotioneína, el triptófano y diversos alcaloides indólicos, el micelio concentra metabolitos primarios como la N-acetilglucosamina, α -GPC y trimetilglicina (Waldbillig et al. 2023). Estos compuestos primarios presentes en el medio líquido carecen del potencial redox y la capacidad quelante necesarios para reducir eficazmente los iones Au^{3+} y proporcionar un recubrimiento robusto, lo que impidió la estabilización termodinámica de las nanopartículas.

La literatura indica que la síntesis de derivados triptamínicos ocurre principalmente durante la fase estacionaria del crecimiento y se ve fuertemente inhibida por el exceso de fósforo en el medio (Kurzbaum et al. 2025). Dado que el cultivo se mantuvo en un medio óptimo y sin estresores ambientales como variaciones bruscas de temperatura, luz o agotamiento nutricional, no se indujo la ruta biosintética secundaria. Esto corrobora que, para el éxito de la biosíntesis verde mediada por cultivo líquido en futuras investigaciones, será necesario someter los cultivos a condiciones de estrés abiótico que fuercen la excreción de los agentes reductores necesarios.

Caracterización AuNPs

Por otro lado, la caracterización mediante TEM de las AuNPs sintetizadas por el cuerpo fructífero confirmó la obtención de un sistema monodisperso de morfología esférica con un diámetro promedio de ~ 18.9 nm. Estas características dimensionales son altamente favorables y críticas para su futura aplicación neurobiológica. La literatura señala que las nanopartículas de oro con tamaños de entre 10 y 120 nm son capaces de cruzar la barrera

hematoencefálica con éxito. Además, se ha reportado que las nanopartículas con morfología esférica son absorbidas celularmente de manera más eficiente y presentan perfiles de toxicidad significativamente menores en comparación con otras estructuras, como los nanobastones (Ibarra R et al. 2025). Así la morfología cuasi-esférica y la alta relación superficie volumen obtenida en este estudio no solo sugiere un perfil de alta bioseguridad para los ensayos en células N2a, sino que maximizan el área disponible para la biofuncionalización con los metabolitos neuroactivos del hongo, facilitando su interacción directa con las membranas y receptores neuronales (Báez D et al. 2021).

El análisis FTIR confirmó que la compleja matriz bioquímica del hongo *Psilocybe cubensis* juega un rol fundamental en la síntesis verde de las AuNPs. Las intensas bandas O-H y N-H (3265.54 y 3329.38 cm^{-1}), junto con la banda de la Amida I a 1630 cm^{-1} , son fuertemente consistentes con la presencia de proteínas y polisacáridos del extracto. Estudios recientes de caracterización fisicoquímica en extractos de *P. cubensis* han confirmado que estas frecuencias de vibración son indicativas de una matriz fúngica estructuralmente compleja y rica en enlaces peptídicos y estructuras de carbohidratos (Galdino et al. 2025), las cuales en este sistema actúan como los principales agentes reductores y estabilizantes.

La interacción directa entre estos metabolitos y el oro quedó en evidencia al comparar el espectro del extracto y las AuNPs (Figura 7). La disminución en la intensidad general de los picos sugiere que parte de los grupos funcionales del extracto se consumieron o reorganizaron estructuralmente para donar electrones durante la reducción Au^{3+} a Au^0 . Por otro lado, el desplazamiento observado en la región de estiramiento de los grupos -OH y -NH es un claro indicativo de la formación de nuevos enlaces de coordinación que recubren y estabilizan la superficie metálica de la nanopartícula.

Un hallazgo de gran relevancia biomédica es la retención de los metabolitos secundarios en el nanomaterial final. La persistencia en el espectro de las AuNPs de la banda en 1598.16 cm^{-1} (anillo indol de los derivados triptamínicos) y del doblete entre 1027.58 y 990.18 cm^{-1} (marcador de los grupos fosfato), confirma que la psilocibina permanece asociado o funcionalizada en la superficie del sistema. Esta interpretación es respaldada por análisis espectroscópicos modernos en ingredientes farmacéuticos activos (API) derivados de *P. cubensis*, los cuales demuestran que una alta definición en las bandas de absorción

vibracional P-O-C en esta región del infrarrojo está directamente correlacionada con una alta concentración de compuestos que contienen enlaces éster, fosfato, siendo la psilocibina el principal constituyente de esta naturaleza en el extracto (Galdino et al. 2025).

La caracterización mediante DLS y Potencial Zeta consolida los hallazgos obtenidos por FTIR y TEM, demostrando que el extracto del cuerpo fructífero no solo reduce el oro, sino que genera un nanomaterial con propiedades físicoquímicas óptimas para su interacción con sistemas biológicos. El potencial zeta de -31.0 mV confirma una excelente estabilidad coloidal del sistema impulsada por repulsión electrostática. Esta fuerte carga superficial negativa se atribuye directamente a la funcionalización con los metabolitos ricos en electrones detectados en el análisis FTIR, tales como los grupos fosfatos de la psilocibina y los grupos hidroxilo y el carboxilo de las proteínas y polisacáridos. Desde una perspectiva de nanomedicina, esta carga neta negativa resulta ser una ventaja crítica para los ensayos de neuroregeneración; la literatura reciente señala que la carga superficial juega un rol fundamental en la bioseguridad, donde las nanopartículas metálicas con carga neutra o negativa presentan una citotoxicidad significativamente menor en comparación con sus contrapartes catiónicas, las cuales tienden a interactuar de manera demasiado agresiva con las membranas celulares induciendo estrés oxidativo y daño neuronal (Ibarra-Ramírez et al. 2025).

Adicionalmente, el diámetro hidrodinámico de $19,41$ nm obtenido mediante DLS muestra una estrecha y notable correlación con el tamaño del núcleo metálico observado previamente en TEM (~ 18.94 nm). Esta coherencia dimensional confirma que las nanopartículas no sufren procesos de aglomeración al encontrarse en suspensión acuosa. Si bien el análisis reportó un alto índice de polidispersidad ($PdI = 1.00$), este valor es un fenómeno recurrente y esperable en la síntesis verde cuando se emplean extractos crudos complejos. Dicho índice no refleja necesariamente una aglomeración del nanomaterial (lo cual fue descartado por TEM), sino la respuesta del equipo frente a la densa matriz bio-orgánica libre que incluye proteínas, polisacáridos y una amplia gama de metabolitos secundarios no reaccionados que envuelve y coexiste con el núcleo metálico de las AuNPs en la dispersión coloidal (Srinath & Ravishankar et al 2015; Ibarra-Ramírez et al. 2025). En su conjunto, esta estabilidad termodinámica y el mantenimiento del tamaño a escala nanométrica en solución acuosa

garantizan que las AuNPs funcionalizadas preservan su integridad estructural y área superficial al interactuar con las células de neuroblastos N2a.

Respuesta bifásica dosis-dependiente

El hallazgo central de este estudio es que las AuNPs biosintetizadas con extracto de *Psilocybe cubensis* ejercen un efecto bifásico sobre las células de neuroblastoma N2a, caracterizado por la estimulación de la proliferación, la confluencia y el índice de proliferación relativa a confluencia a concentraciones de 22,91 – 183,25 $\mu\text{g/mL}$, y citotoxicidad progresiva a concentraciones $\geq 366,5 \mu\text{g/mL}$, patrón consistente a las tres densidades celulares evaluadas y confirmado tanto por el análisis temporal completo como por el análisis de punto final a 48 horas para las cinco métricas cuantificadas. Este comportamiento es plenamente consistente con el fenómeno de hormesis, definido como una respuesta bifásica dosis-respuesta en la que dosis bajas producen estimulación y dosis altas producen inhibición (Calabrese et al. 2022). Si bien la hormesis ha sido documentada para diversidad nanopartículas en células de mamíferos (Calabrese et al. 2022; Delgado-Rivera et al. 2026), su descripción en células neuronales tratadas con AuNPs de síntesis verde fúngica no había sido reportada previamente en la literatura, lo que constituye uno de los aportes más relevante de este trabajo.

La estimulación significativa de la proliferación y la confluencia a dosis bajas, sin aumento de muerte celular y sin alteraciones morfológicas detectables al punto final, sugiere una interacción biocompatible entre las AuNPs y las células N2a en ese rango de concentraciones. Estudios previos han demostrado que AuNPs esféricas de tamaño similar (~18–20 nm) con carga superficial negativa promueven la adhesión, proliferación y diferenciación de células neuronales al interactuar de forma no destructiva en los receptores de membrana (Hung et al. 2021; Kim et al. 2022). El potencial zeta de -31,0 mV de las AuNPs de este estudio, atribuible a la funcionalización con metabolitos del extracto de *P. cubensis*, refuerza esta interpretación.

El incremento selectivo de la excentricidad a 1466,0 $\mu\text{g/mL}$, reproducible en las tres densidades evaluadas, constituye un indicador morfológico de la reorganización patológica del citoesqueleto de actina inducida por estrés crónico (Liu et al. 2023). La ausencia de este cambio a 733,0 $\mu\text{g/mL}$ en el análisis de punto final es consistente con el agotamiento temprano del pool celular ya descrito: las células que sobrevivieron al evento citotóxico agudo no exhiben la acumulación de daño morfológico sostenido que caracteriza a la

toxicidad gradual de la dosis máxima. En contraste, la preservación de la excentricidad dentro del rango basal en todas las concentraciones bioestimulantes confirma que las AuNPs no generan distorsión estructural detectable a nivel poblacional en las dosis funcionales. Este hallazgo valida la integridad morfológica celular dentro de la ventana terapéutica propuesta, sugiriendo que la interacción entre la biocorona fúngica y la membrana neuronal ocurre sin comprometer la estabilidad del citoesqueleto.

La notable reducción en la tasa de mortalidad celular observada en el rango de dosis bajas e intermedias (22,91–183,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respecto al control, estadísticamente significativa en las densidades de 2500 y 5000 células/pozo, sugiere un marcado efecto neuroprotector mediado por la funcionalización fúngica. Adicionalmente, a 2500 y 5000 células/pozo, la concentración de 366,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ también exhibió muerte celular significativamente menor al control, lo que indica que el umbral neuroprotector se extiende más allá del rango puramente bioestimulante. Este resultado es coherente con el rol propuesto de la ergotioneína (ERT) como principal agente antioxidante de la corona orgánica: mientras la neurotoxicidad de las nanopartículas metálicas se asocia habitualmente a la sobreproducción de ROS, la ERT neutralizaría activamente ese estrés oxidativo, reduciendo la mortalidad basal incluso por debajo del nivel del control (Torres-Ortiz et al. 2026).

El efecto citotóxico severo observado a 733,0 y 1466,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue evidenciado de forma consistente por ambos análisis estadísticos, aunque con perfiles temporales distintos. Ambas concentraciones produjeron una supresión drástica de la proliferación y el colapso de la confluencia en las tres densidades evaluadas ($p < 0,0001$ en todos los casos). Sin embargo, el análisis de la muerte celular al punto final de 48 h revela un patrón diferencial: mientras que la dosis de 1466,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostró una mortalidad significativamente superior al control en la densidad de 1250 células/pozo (media de ~17,15% frente a ~3,67%; $p < 0,0001$), la dosis 733,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no mostró diferencia significativa en ese mismo punto (ns).

Este hallazgo se explica por la naturaleza cinética del proceso citotóxico. El análisis ANOVA de dos vías asigna a 733,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la mayor muerte celular acumulada a lo largo del tiempo en esa densidad (diferencia de medias de -44,21), debido a que el evento ocurrió de forma aguda entre las 10 y 30 horas de exposición. Este fenómeno agotó el pool celular detectable

antes del término del ensayo, de modo que al punto final ya no quedan células vivas ni muertas en cantidad suficiente para ser cuantificadas por el sistema de imagen.

Además, se suma un factor técnico, la aglomeración y decantación masiva de AuNPs observada a concentraciones altas. Este fenómeno no solo pudo interferir con la cuantificación del IncuCyte, sino que sugiere un mecanismo de toxicidad mediado por el contacto físico directo y la posible asfixia mecánica del cultivo. Como señala Leite et al. (2019), el agotamiento del sustrato celular en plataformas de monitoreo en tiempo real puede subestimar la señal de muerte al final del experimento si el evento citotóxico es masivo y temprano, tal como se observó en este estudio con la dosis de 733,0 µg/mL.

Los mecanismos moleculares subyacentes a esta citotoxicidad a dosis altas probablemente incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el compromiso de la integridad de la membrana plasmática y la perturbación del citoesqueleto de actina, mecanismos bien documentados para AuNPs a concentraciones elevadas (Torres-Ortiz et al. 2026; Liu et al. 2023). La notable preservación de la viabilidad celular y la baja tasa de mortalidad observada en el rango de dosis bajas e intermedias (22,91 a 183,25 µg/mL) sugieren un marcado efecto neuroprotector mediado por la funcionalización fúngica, donde la ergotioneína (ERT) desempeñaría un rol farmacológico protagónico. Mientras que la neurotoxicidad de las nanopartículas metálicas se asocia habitualmente a la sobreproducción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y al consecuente estrés oxidativo (Torres-Ortiz et al. 2026; Liu et al. 2023). La retención de ERT en la superficie de las AuNPs sintetizadas conferiría un escudo antioxidante al microambiente celular. Este aminoácido posee una capacidad excepcional para neutralizar radicales libres y proteger el tejido neuronal del daño oxidativo (Ishimoto & Kato, 2022).

Aunque la complejidad del extracto biológico dificulta la detección de moléculas individuales mediante FTIR, la presencia de ERT en la corona orgánica de las AuNPs puede inferirse mediante la triangulación de datos fisicoquímicos y biológicos. Químicamente, el grupo tiol de la ERT exhibe una altísima afinidad por el oro mediante enlaces Au-S, lo que explica la robusta estabilización electrostática y el potencial Zeta negativo (-31,0 mV) obtenido. Esta inferencia se ve respaldada por los perfiles cinéticos del sistema IncuCyte®; la ausencia de citotoxicidad inducida por ROS sugiere que la superficie metálica está

funcionalizada por un potente agente antioxidante, característica intrínseca de la ERT. Además, la incapacidad documentada del extracto de micelio el cual carece de ERT según estudios metabolómicos (Waldbillig et al. 2023) para estabilizar exitosamente las AuNPs, ratifica que este metabolito presente en el cuerpo fructífero es un factor indispensable para la síntesis verde reportada.

Este mecanismo de protección dual coincide con hallazgos en otros basidiomicetos neuroactivos, como *Lignosus rhinocerus*, cuyos extractos ricos en antioxidantes han demostrado actividad antiapoptótica en linajes neuronales, atenuando la fragmentación nuclear mediante la activación de vías de supervivencia como la quinasa Akt (Yeo et al. 2019). Bajo esta perspectiva, las AuNPs de *P. cubensis* actúan como un sistema nanoterápico integral, se estima que la ergotioneína proporciona el estado de neuroprotección necesario para amortiguar el estrés inicial de la internalización metálica, asegurando la supervivencia del neuroblastoma N2a, mientras permite que el consorcio de metabolitos fúngicos actúe sinérgicamente sobre la dinámica de proliferación celular.

El rol de los metabolitos de Psilocybe cubensis

Una pregunta central para la interpretación de estos resultados es si el efecto biológico observado sobre las células N2a puede atribuirse a las propiedades fisicoquímicas del núcleo de oro, a los metabolitos del extracto de *P. cubensis* o a la sinergia entre ambos componentes. El análisis FTIR demostró que los metabolitos del hongo, incluyendo la psilocibina (identificada por las bandas a $1598,16\text{ cm}^{-1}$ y el doblete $1027,58\text{--}990,18\text{ cm}^{-1}$), permanecen asociados a la superficie de las AuNPs tras la síntesis, lo que hace plausible una contribución bioactiva de los metabolitos fúngicos sobre las células N2a.

En este sentido, un hallazgo de alta relevancia molecular reciente es que la psilocina se une directamente al receptor tirosina quinasa TrkB, el receptor de alta afinidad del factor neurotrófico BDNF, según lo reportado por Moliner et al. (2023) los psicodélicos como la psilocina se unen a TrkB con afinidades aproximadamente 1000 veces superiores a las de otros antidepresivos clásicos, actuando como moduladores alostéricos positivos que potencian la señalización del BDNF endógeno de forma independiente de la activación del receptor 5-HT_{2A}. Esta acción sobre la vía BDNF/TrkB activa las cascadas de señalización

mTORC1 y MAPK/ERK, reconocidas como los principales mediadores moleculares de la neuritogénesis, la sinaptogénesis y la plasticidad estructural neuronal (Shao et al. 2021).

En este contexto, la hipótesis más plausible es que las AuNPs biosintetizadas actúan como una nano plataforma que estabiliza y potencia la biodisponibilidad de los componentes psicoactivos de *P. cubensis* en el microambiente celular, mientras que el núcleo de oro aporta las propiedades de escala nanométrica que facilitan la interacción con los receptores neuronales. La coherencia dimensional entre el diámetro del núcleo metálico (TEM: ~18,94 nm) y el diámetro hidrodinámico en solución (DLS: 19,41 nm) confirma que el sistema mantiene su integridad en medio acuoso, condición necesaria para preservar estas propiedades al interactuar con las células N2a.

Es importante reconocer, sin embargo, que el diseño experimental de este estudio no permite dissociar los efectos del núcleo de oro, de los metabolitos solos, o de la sinergia entre ambos, dado que no se incluyeron controles con AuNPs de síntesis química convencional ni con extracto de *P. cubensis* sin oro. Esta constituye la principal limitación del estudio y una prioridad para investigaciones futuras.

Observaciones morfológicas por holotomografía

El análisis morfológico mediante reconstrucción holotomográfica tridimensional (Monocube) a las 42 horas de tratamiento aporta una perspectiva cualitativa de alta resolución que complementa e integra los datos cuantitativos del Incucyte. La capacidad de la holotomografía para capturar la arquitectura celular en tres dimensiones sin marcadores ni tinciones, evitando los artefactos de fototoxicidad y las alteraciones estructurales asociadas a los métodos de tinción clásicos hace que las observaciones obtenidas reflejen el estado morfológico de las células en condiciones cercanas a las fisiológicas (Medina-Ramírez et al. 2024).

El hallazgo morfológico más destacado fue la morfología elongada con extensiones citoplasmáticas activas y prominentes observada exclusivamente en las células tratadas con 91,63 µg/mL, una concentración que en los análisis cuantitativos del Incucyte mostró el mayor efecto pro-proliferativo y pro-viabilidad entre todas las evaluadas. Esta morfología caracterizada por células fusiformes con proyecciones en múltiples direcciones contrasta

claramente con la morfología redondeada y compacta del control y de las células tratadas con 45,81 $\mu\text{g/mL}$.

La interpretación de estas extensiones citoplasmáticas como indicadores de neuritogénesis incipiente se ve reforzada por la convergencia hacia valores basales de excentricidad al punto final (ns). Esta ausencia de significancia estadística a las 48 horas permite descartar que el fenotipo elongado observado en la holotomografía sea una respuesta a estrés citoesquelético patológico; por el contrario, confirma que la reorganización morfológica ocurre en células estructuralmente íntegras. Este comportamiento es morfológicamente consistente con los estadios tempranos de extensión de neuritas descritos en células N2a estimuladas con factores neurotróficos o nanomateriales bioactivos (Kim & Lee, 2022; Paviolo & Stoddart, 2017), donde la diferenciación inicial no compromete la estabilidad homeostática de la población celular.

En el contexto de células N2a, que son precursores de neuroblasto ampliamente utilizados como modelo de diferenciación neuronal *in vitro*, este tipo de extensiones citoplasmáticas activas es morfológicamente compatible con los estadios tempranos de la neuritogénesis (Paviolo & Stoddart, 2017). La neuritogénesis en células N2a puede ser inducida por factores neurotróficos como el NGF, así como por nanopartículas metálicas con propiedades neuroactivas (Kim et al. 2022; Rahimzadegan et al. 2022), y se caracteriza precisamente por la extensión de proyecciones citoplasmáticas que preceden a la formación de neuritas maduras.

La cuantificación formal de estos parámetros mediante segmentación automatizada constituye una línea de investigación futura prioritaria. Las técnicas avanzadas de holotomografía permiten extraer parámetros biofísicos directos a partir del mapeo del Índice de Refracción (RI), tales como la masa seca y el índice de esfericidad celular (Sbrana et al. 2024).

Direcciones futuras

En conjunto, el presente estudio constituye el primer reporte de síntesis verde de nanopartículas de oro utilizando extractos de un hongo productor de psilocibina, así como la primera evaluación de su bioactividad neuronal mediante seguimiento cinético en tiempo real (IncuCyte®) y análisis holotomográfico. Los resultados revelaron una ventana de biocompatibilidad robusta entre 22,91 y 183,25 µg/mL, caracterizada por efectos pro-proliferativos y pro-viabilidad estadísticamente significativos. Considerando la funcionalización con metabolitos neuroactivos que poseen afinidad nano molar por receptores TrkB (Moliner et al. 2023), este nanomaterial se posiciona como un candidato de alto interés para futuras investigaciones en neurorehabilitación y medicina regenerativa.

Una revisión sistemática de la literatura confirma la ausencia de investigaciones que integren la síntesis verde de AuNPs mediada por hongos psicoactivos con la evaluación de su potencial neurogénico. Los antecedentes más cercanos se limitan a síntesis con hongos medicinales no psicoactivos (*Pleurotus florida*, *Ganoderma lucidum* o *Inonotus obliquus*), cuyos trabajos se han enfocado predominantemente en líneas cancerígenas con objetivos antitumorales, omitiendo el potencial neurorregenerativo (Iranmanesh et al.2020).

Si bien existen precedentes de AuNPs funcionalizadas que promueven la diferenciación de células madre neurales o ejercen neuroprotección (Kim et al. 2022; Papastefanaki et al. 2015), ninguna de estas aproximaciones incorpora metabolitos con la bioactividad específica de *Psilocybe cubensis*. Este enfoque innovador permite proponer un sistema nanobiotecnológico donde el núcleo metálico actúa como un transportador estable para un consorcio de moléculas fúngicas con alta afinidad por dianas terapéuticas cerebrales.

La relevancia de este hallazgo se fortalece al contrastarla con las directrices más recientes de la nanomedicina. Según la revisión de Haro-Martínez et al. (2025), las AuNPs son de las estrategias más prometedoras para tratar enfermedades neurodegenerativas debido a su inercia química y su capacidad para cruzar la Barrera Hematoencefálica (BHE) cuando su tamaño se sitúa en el rango de 10 a 120 nm. Bajo esta perspectiva, las AuNPs aquí reportadas constituyen un nanosistema híbrido que combina un núcleo inorgánico estructural (~18,9 nm) con una matriz orgánica bioactiva proveniente del cuerpo fructífero.

Esta hibridación natural resuelve un desafío crítico en la traslación clínica, la formación incontrolada de la biocorona. Generalmente, la adsorción inespecífica de proteínas y lípidos altera la farmacocinética del nanomaterial y enmascara sus ligandos terapéuticos (Haro-Martínez et al. 2025). Sin embargo, el proceso de biosíntesis dota a las AuNPs de una biocorona fúngica preensamblada y estable, conformada por alcaloides triptamínicos y antioxidantes. Los datos de FTIR y Potencial Zeta ($-31,0$ mV) confirman que estas biomoléculas recubren la superficie, previniendo la opsonización inespecífica y presentando directamente los ligandos neuroactivos a los receptores neuronales (como TrkB). En consecuencia, la respuesta celular transita de un evento de estrés por internalización metálica a un proceso robusto de bioestimulación.

Por consiguiente, esta investigación llena un vacío crítico y responde a la necesidad urgente de explorar 'transportadores alternativos' más eficientes (Haro-Martínez et al. 2025). Al dotar al núcleo de oro con una biocorona que posee propiedades farmacológicas intrínsecas como la neuroprotección y la bioestimulación, se trasciende la visión tradicional de las partículas como vehículos inertes. No obstante, el estudio presenta limitaciones, como la ausencia de controles con síntesis química convencional de AuNPs o extracto aislado de *P. Cubensis*, y la falta de marcadores de diferenciación molecular (TUJ-1 o activación de TrkB).

Como perspectivas futuras para robustecer este modelo, resulta imperativo transitar hacia un análisis cuantitativo holotomográfico (masa seca y volumen) e implementar técnicas de HPLC para caracterizar con exactitud el perfil de metabolitos retenidos en la corona orgánica. En conclusión, y en respuesta a la hipótesis planteada, las AuNPs derivadas del cuerpo fructífero demostraron una superioridad funcional frente al extracto de medio líquido, logrando una respuesta bifásica dosis-dependiente con evidencia morfológica de neuritogénesis incipiente a $91,63$ $\mu\text{g/mL}$, respaldando así el potencial neuroregenerativo de este innovador sistema nanoterápico.

CONCLUSIÓN

El presente estudio demuestra el éxito de la síntesis verde de nanopartículas de oro (AuNPs) utilizando extractos del hongo *Psilocybe cubensis*, estableciendo un precedente en la funcionalización de nanomateriales con fines neuroestimulantes. Mediante la caracterización fisicoquímica, se validó la formación de AuNPs estables y esféricas con un potencial Zeta de $-31,0$ mV, cuya biocorona orgánica preensamblada rica en metabolitos como la ergotioneína y derivados triptamínicos no solo asegura la estabilidad del sistema, sino que le confiere propiedades antioxidantes críticas para la interacción celular. Los ensayos cinéticos en tiempo real con la plataforma IncuCyte® revelaron una ventana de biocompatibilidad robusta entre $22,91$ y $183,25$ $\mu\text{g/mL}$, donde el nanomaterial ejerce un efecto pro-proliferativo y pro-viabilidad significativo en el modelo neuronal N2a, superando la tasa de crecimiento basal del control. Esta respuesta biológica positiva se complementó con el análisis por holotomografía 3D, el cual confirmó que el estímulo de las AuNPs preserva la arquitectura, turgencia y dinámica exploratoria de las neuronas, descartando efectos neurotóxicos estructurales en las dosis funcionales. En contraste, se identificó un umbral de citotoxicidad aguda a partir de los $733,0$ $\mu\text{g/mL}$, asociado al colapso temprano de la confluencia y a interferencias físicas por aglomeración del material. En conjunto, estos hallazgos posicionan a las AuNPs de *P. cubensis* como un sistema nanoterápico con un notable potencial neuroestimulante, sentando las bases para futuras investigaciones en neurorehabilitación orientadas a evaluar su capacidad para inducir neuroplasticidad y diferenciación funcional en el Sistema Nervioso Central.

BIBLIOGRAFÍA

- BÁEZ, D.F., GALLARDO-TOLEDO, E., OYARZÚN, M.P., ARAYA, E. & KOGAN, M.J. 2021. The Influence of Size and Chemical Composition of Silver and Gold Nanoparticles on in vivo Toxicity with Potential Applications to Central Nervous System Diseases. *International Journal of Nanomedicine* 16:2187–2201.
- BHAT, R., SHARANABASAVA, V.G., DESHPANDE, R., SHETTI, U., SANJEEV, G. & VENKATARAMAN, A. 2013. Photo-bio-synthesis of irregular shaped functionalized gold nanoparticles using edible mushroom *Pleurotus florida* and its anticancer evaluation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 125:63–69.
- BOGENSCHUTZ, M.P., ROSS, S., BHATT, S., et al. 2022. Porcentaje de días de consumo excesivo de alcohol después de la psicoterapia asistida con psilocibina frente a placebo en el tratamiento de pacientes adultos con trastorno por consumo de alcohol: Un ensayo clínico aleatorizado. *JAMA Psiquiatría* 79(10):953–962.
- CALABRESE, E.J., DHAWAN, G., KAPOOR, R., AGATHOKLEOUS, E. & CALABRESE, V. 2022. Hormesis: Wound healing and keratinocytes. *Pharmacological Research* 183:106393.
- CANTANTE, R. & SMITH, A.H. 2018 Investigaciones micológicas sobre el teonanácatl, el hongo alucinógeno mexicano. Parte II. Una monografía taxonómica de *Psilocybe*, Sección *Caerulescentes*. *Micología* 50(2):262–303.
- CASTRO-LONGORIA, E., GARIBO-RUIZ, D. & MARTÍNEZ-CASTRO, S. 2017. Myconanotechnology to treat infectious diseases: a perspective. En: *Fungal Nanotechnology* (Eds. Prasad, R.), pp. 235-261. Springer, Cham.
- CASTRO-LONGORIA, E., VILCHIS-NESTOR, A.R. & AVALOS-BORJA, M. 2011. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 83(1):42-48.

- CHVALOVA, V., VOMASTEK, T. & GROUSL, T. 2024. Comparación de microscopía holotomográfica y microscopía holográfica controlada por coherencia. *Revista de Microscopía* 294(1):5–13.
- COHEN, J., SULIMANI, L., PROCACCIA, S., et al. 2025. Comprehensive analysis of 42 psilocybin-producing fungal strains reveals metabolite diversity and species-specific clusters. *Scientific Reports* 15(1):13822.
- DELGADO-RIVERA, V.A., SERRANO-FUENTES, M.K., RIVERA-VILLANUEVA, J.M., PÉREZ-SATO, J.A. & BELLO-BELLO, J.J. 2026. Chitosan Nanoparticles as a Biostimulant During In Vitro Multiplication of Vanilla Using Temporary Immersion Bioreactors. *Molecules* 31(2):328.
- DINIS-OLIVEIRA, R.J. 2017. Metabolism of psilocybin and psilocin: clinical and forensic toxicological relevance. *Drug Metabolism Reviews* 49(1):84–91.
- DORCHEH, S.K. & VAHABI, K. 2016. Biosynthesis of Nanoparticles by Fungi: Large-Scale Production. En: *Fungal Metabolites* (Eds. Mérillon, J.M. & K.G. Ramawat), pp. 1-20. Springer International Publishing, Switzerland.
- FRICKE, J., BLEI, F. & HOFFMEISTER, D. 2017. Enzymatic synthesis of psilocybin. *Angewandte Chemie International Edition* 56(40):12352–12355.
- GALDINO, T.P., OLIVEIRA, L.C., LUZ, M.A., et al. 2025. Physico-chemical characterization and antioxidant potential of *Psilocybe cubensis* extracts. *ACS Omega* 10(28):30695-30707.
- GARCÍA-MARÍN, L.E. & CASTRO-LONGORIA, E. 2023. Nanopartículas metálicas: una alternativa para combatir la resistencia de especies causantes de la candidiasis. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología* 16(31):69780.
- GÓMEZ, G.L. 2013. Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación en Discapacidad* 2(1):18-22.

- GURUNATHAN, S., PARK, J.H., HAN, J.W. & KIM, J.H. 2015. Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 human breast cancer cells: targeting p53 for anticancer therapy. *International Journal of Nanomedicine* 10:4203-4222.
- GUSNARD, D.A., AKBUDAK, E., SHULMAN, G.L., et al. 2001. Corteza prefrontal medial y autorreferencial actividad mental: Relación con un modo predeterminado de cerebro función. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias* 98(7):4259-4264.
- HARO-MARTÍNEZ, E., MUSCOLINO, E., MORAL, N., DURAN, J. & FORNAGUERA, C. 2025. Crossing the blood-brain barrier: nanoparticle-based strategies for neurodegenerative disease therapy. *Drug Delivery and Translational Research* 16(3):797-824.
- HASLER, F., GRIMBERG, U., BENZ, M.A., HUBER, T. & VOLLENWEIDER, F.X. 2004. Acute psychological and physiological effects of psilocybin in healthy humans: a double-blind, placebo-controlled dose-effect study. *Psychopharmacology* 172(2):145-156.
- HUNG, H.S., KAO, W.C., SHEN, C.C., et al. 2021. Inflammatory Modulation of Polyethylene Glycol-AuNP for Regulation of the Neural Differentiation Capacity of Mesenchymal Stem Cells. *Cells* 10(11):2854.
- IBARRA-RAMÍREZ, E., MONTES, M., URRUTIA, R.A., et al. 2025. Metallic Nanoparticles Applications in Neurological Disorders: A Review. *International Journal of Biomaterials* 2025:4557622.
- IRANMANESH, S., SHAHIDI BONJAR, G.H. & BAGHIZADEH, A. 2020. Estudio de la biosíntesis de nanopartículas de oro utilizando varios hongos saprofiticos. *Applied Nanoscience* 10(2):1851.
- ISHIMOTO, T. & KATO, Y. 2022. Ergothioneine in the brain. *FEBS Letters* 596(10):1290-1298.
- JIANG, Q., SHAO, L.X., YAO, S., et al. 2026. Psilocybin triggers an activity-dependent rewiring of large-scale cortical networks. *Cell* 189(2):659-675.

- KIM, G.J., LEE, K.J., CHOI, J.W. & AN, J.H. 2022. Modified Industrial Three-Dimensional Polylactic Acid Scaffold Cell Chip Promotes the Proliferation and Differentiation of Human Neural Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 23(4):2204.
- KURZBAUM, E., PÁLENÍČEK, T., SHRCHATON, A., AZERRAD, S. & DEKEL, Y. 2025. Exploring *Psilocybe cubensis* Strains: Cultivation Techniques, Psychoactive Compounds, Genetics and Research Gaps. *Journal of Fungi* 11(2):99.
- LEITE, P.E.C., PEREIRA, M.R., HARRIS, G., et al. 2019. Suitability of 3D human brain spheroid models to distinguish toxic effects of gold and poly-lactic acid nanoparticles to assess biocompatibility for brain drug delivery. *Particle and Fibre Toxicology* 16(22):1-15.
- LEWIS, L.N. 1993. Chemical catalysis by colloids and clusters. *Chemical Reviews* 93(8):2693–2730.
- LIN, M.C.Q., LEE, H., TSANG, V.W.L., et al. 2023. Revisión sistemática sobre los mecanismos de acción de la psilocibina en el tratamiento de la depresión. *European Psychiatry* 66(S1): S416–S417.
- LING, S., CEBAN, F., LUI, L.M., et al. 2022. Mecanismos moleculares de la psilocibina e implicaciones para el tratamiento de la depresión. *CNS Drugs* 36(1):17–30.
- LIU, J., RICKEL, A., SMITH, S., HONG, Z. & WANG, C. 2023. “Non-cytotoxic” doses of metal-organic framework nanoparticles increase endothelial permeability by inducing actin reorganization. *Journal of Colloid and Interface Science* 634:323-335.
- LÓPEZ-GIMÉNEZ, J.F. & GONZÁLEZ-MAESO, J. 2017. Hallucinogens and serotonin 5-HT_{2A} receptor-mediated signaling pathways. *Behavioral Neurobiology of Psychedelic Drugs* pp. 45–73.
- LOWE, H., TOYANG, N., STEELE, B., et al. 2021. El potencial terapéutico de la psilocibina. *Moléculas* 26(10):2948.

- LU, F., GONG, Z., ZENG, F., et al. 2025. El hidrogel cargado con nanopartículas de cerio-manganeso y factor de crecimiento nervioso mejora la reparación de lesiones de la médula espinal al modular el microambiente inmune y promover la regeneración neuronal. *Journal of Nanobiotechnology* 23(1):1-15.
- MAHMOOD, Z.A. 2013. Bioactive alkaloids from fungi: psilocybin. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 23(3):349–357.
- MANDRAKE, K. & HAZE, V. 2016. *La Biblia del Hongo de Psilocibina: La Guía Definitiva para Crecer y Usar Hongos Mágicos*. Green Candy Press, San Francisco. 380 pp.
- MASON, N.L., KUYPERS, K.P.C., MÜLLER, F., et al. 2020. Yo mismo, adiós: Alteraciones regionales en el glutamato y la experiencia de la disolución del ego con psilocibina. *Neuropsicofarmacología* 45(12):2003–2011.
- MEDINA-RAMIREZ, I.E., MACÍAS-DÍAZ, J.E., MASUOKA-ITO, D. & ZAPIEN, J.A. 2024. Holotomography and atomic force microscopy: a powerful combination to enhance cancer, microbiology and nanotoxicology research. *Discover Nano* 19(1):64.
- METZ, K.A., TENG, X., COPPENS, I., et al. 2018. KCTD7 deficiency defines a distinct neurodegenerative disorder with a conserved autophagy-lysosome defect. *Annals of Neurology* 84(5):766-780.
- MOLINER, R., GIRYCH, M., BRUNELLO, C.A., et al. 2023. Psychedelics promote plasticity by directly binding to BDNF receptor TrkB. *Nature Neuroscience* 26(6):1032–1041.
- MONOSOV, I.E., TRAGESER, J.C. & THOMPSON, K.G. 2008. Medidas de actividad de spiking registrada simultáneamente y campo local los potenciales sugieren que la selección espacial emerge en el frontal campo de ojos. *Neuron* 57(4):614–625.
- PAPASTEFANAKI, F., JAKOVCEVSKI, I., POULIA, N., et al. 2015. La administración intraespinal de nanopartículas de oro recubiertas de polietilenglicol promueve la recuperación funcional después de una lesión de la médula espinal. *Molecular Therapy* 23(6):993–1002.

- PATTNAIK, S., THALLURI, C. & SWAIN, K. 2023. Rise of gold nanoparticles as carriers of therapeutic agents. *Acta Chimica Slovenica* 70(4):467–478.
- PAVIOLO, C. & STODDART, P.R. 2017. Gold Nanoparticles for Modulating Neuronal Behavior. *Nanomaterials* 7(4):92.
- PAVIOLO, C., HAYCOCK, J.W., CADUSCH, P.J., MCARTHUR, S.L. & STODDART, P.R. 2014. La exposición a nanobarras de oro mediante láser puede inducir transitorios de calcio intracelular. *Journal of Biophotonics* 7(9):761–765.
- QUESTER, K., AVALOS-BORJA, M. & CASTROLONGORIA, E. 2013. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron* 54-55:1-27.
- RAHIMZADEGAN, M., MOHAMMADI, Q., SHAFIEIAN, M., SABZEVARI, O. & HASSANNEJAD, Z. 2022. Influence of reducing agents on in situ synthesis of gold nanoparticles and scaffold conductivity with emphasis on neural differentiation. *Biomaterials Advances* 134:112634.
- RAI, M., BONDE, S., GOLINSKA, P., et al. 2021. Fusarium as a novel fungus for the synthesis of nanoparticles mechanism and applications. *Journal of Fungi* 7(2):139.
- REN, Y., ZHU, X., QI, X., et al. 2021. Immunomodulatory Layered Double Hydroxide Nanoparticles Enable Neurogenesis by Targeting Transforming Growth Factor- β Receptor 2. *ACS Nano* 15(3):1-15.
- RICKLI, A., MONING, O.D., HOENER, M.C. & LIECHTI, M.E. 2016. Receptor interaction profiles of novel psychoactive tryptamines compared with classic hallucinogens. *European Neuropsychopharmacology* 26(8):1327–1337.
- SBRANA, F., CHELLINI, F., TANI, A., et al. 2024. Label-free three-dimensional imaging and quantitative analysis of living fibroblasts and myofibroblasts by holotomographic microscopy. *Microscopy Research and Technique* 87(11):2757–2773.

- SHAO, L.X., LIAO, C., GREGG, I., et al. 2021. Psilocybin induces rapid and persistent growth of dendritic spines in frontal cortex in vivo. *Neuron* 109(16):2535-2544.
- SIMÕES, F.R. & TAKEDA, H.H. 2017. Basic Concepts and Principles. En: *Nanostructures* (Eds. Da Róz, A.L., M. Ferreira, F. De Lima Leite & O.N. Oliveira), pp. 1-32. William Andrew Publishing, New York.
- SMAUSZ, R., NEILL, J. & GIGG, J. 2022. Neural mechanisms underlying psilocybin's therapeutic potential - the need for preclinical in vivo electrophysiology. *Journal of Psychopharmacology* 36(7):781–793.
- SRINATH, B.S. & RAVISHANKAR RAI, V. 2015. Biosynthesis of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of size 4–10 nm from spent cultures of *Klebsiella pneumoniae*. *3 Biotech* 5(5):671–676.
- STRAUSS, D., GHOSH, S., MURRAY, Z. & GRYZENHOUT, M. 2022. An Overview on the Taxonomy, Phylogenetics and Ecology of the Psychedelic Genera *Psilocybe*, *Panaeolus*, *Pluteus* and *Gymnopilus*. *Frontiers in Forests and Global Change* 5(813998):1-15.
- TORRENS-SPENCE, M.P., LIU, C.T., PLUSKAL, T., CHUNG, Y.K. & WENG, J.K. 2018. Monoamine biosynthesis via a noncanonical calcium-activatable aromatic amino acid decarboxylase in psilocybin mushroom. *ACS Chemical Biology* 13(12):3343–3353.
- TORRES-ORTIZ, D.G., KARLA, J., ALICIA, D.R., MARLEN, G. & MIRIAM, E. 2026. Selective cytotoxicity properties of *Kalanchoe daigremontiana*-mediated gold nanoparticles against Jurkat leukemia cells. *Biomedical Materials* 21(2):025007.
- VAN COURT, R.C., WISEMAN, M.S., MEYER, K.W., et al. 2022. Diversidad, biología e historia de los hongos que contienen psilocibina: Sugerencias para la investigación y el desarrollo tecnológico. *Fungal Biology* 126(4):308–319.
- VOLLENWEIDER, F.X., LEENDERS, K.L., SCHARFETTER, C., et al. 1997. Tomografía por emisión de positrones y estudios de fluorodesoxiglucosa de hiperfrontalidad metabólica y

psicopatología en el modelo de psilocibina de psicosis. *Neuropsicofarmacología* 16(5):357–372.

VOLLENWEIDER, F.X., VOLLENWEIDER-SCHERPENHUYZEN, M.F., BÄBLER, A., et al. 1998. La psilocibina induce psicosis similar a la esquizofrenia en humanos a través de una acción agonista de la serotonina-2. *Neuroreporte* 9(17):3897–3902.

WALDBILLIG, A., BARANOVA, M., NEUMANN, S., ANDRADE, J. & SIDHU, S. 2023. Exploring *Psilocybe* spp. mycelium and fruiting body chemistry for potential therapeutic compounds. *Frontiers in Fungal Biology* 4:1295223.

WIECZOREK, P.P., WITKOWSKA, D., JASICKA-MISIAK, I., POLIWODA, A., OTERMAN, M. & ZIELIŃSKA, K. 2015. Capítulo 5 - alcaloides bioactivos de hongos alucinógenos. En: *Estudios en Química de Productos Naturales* (Ed. Atta-ur-Rahman), pp. 133–168. Elsevier, Polonia.

YEO, Y., TAN, J.B.L., LIM, L.W., et al. 2019. Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Lineages as In Vitro Models for Screening the Neuroprotective Properties of *Lignosus rhinocerus* (Cooke) Ryvarden. *BioMed Research International* 2019:3126376.

