



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

**AgNPs como potenciales agentes antitumorales,
específicamente contra cáncer de pulmón**

TESIS

**que presenta para obtener el grado de:
INGENIERA EN NANOTECNOLOGÍA**

Salma Lizbeth Tzompaxtle Bravo

**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Yanis Toledano Magaña**

**CODIRECTOR DE TESIS:
Dr. Guillermo Amaya Parra**

Ensenada Baja California, junio de 2024.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



**"AgNPs como potenciales agentes antitumorales,
específicamente contra cáncer de pulmón"**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA

Salma Lizbeth Tzompaxtle Bravo
matrícula 350086

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una
revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los
señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

Dra. Yanis Toledano
Magaña
DIRECTOR

Dr. Guillermo Amaya Parra
CODIRECTOR

Dr. Jorge Octavio Mata
Ramírez
SINODAL

Dra. Haydee López
Rodríguez
SINODAL

Dr. Prisco Alfredo Luque
Morales
SINODAL

"Por la Realización Plena del Ser"

RESUMEN de la Tesis de Salma Lizbeth Tzompaxtle Bravo, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de INGENIERA EN NANOTECNOLOGÍA. ENSENADA, Baja California, México. Marzo del 2023.

AGNPS COMO POTENCIALES AGENTES ANTITUMORALES, ESPECÍFICAMENTE CONTRA CÁNCER DE PULMÓN.

Resumen aprobado por:
Dra. Yanis Toledano Magaña Director de tesis



El uso de nanopartículas de plata (AgNPs) en el tratamiento del cáncer, específicamente el de pulmón, ha sido objeto de estudios debido a sus propiedades únicas, como su tamaño nanométrico y capacidad para liberar iones de plata. Se ha demostrado que las AgNPs exhiben actividad antitumoral al interactuar con células tumorales y tejidos circundantes, pero su aplicación se ve condicionada por propiedades fisicoquímicas que también pueden influir en la toxicidad hacia tejidos sanos. Estudios han investigado los efectos de las AgNPs en la inducción de apoptosis, la inhibición de la proliferación celular y la interferencia con la angiogénesis en células tumorales, mientras que en tejidos sanos se ha observado efectos tóxicos dependientes de concentración, tamaño y tiempo de exposición. Las AgNPs Argovit™ son nanopartículas comerciales con baja toxicidad y genotoxicidad, lo que las posiciona como alternativas para combatir enfermedades sin afectar células normales. Sus propiedades fisicoquímicas han sido caracterizadas, destacando su diámetro hidrodinámico y potencial-Z. Estudios han evaluado su efecto en diversas líneas celulares cancerígenas, mostrando potencial antiproliferativo. Se ha observado que las AgNPs Argovit™ inducen apoptosis en células cancerosas, sin afectar significativamente la viabilidad celular en modelos de cultivos primarios, sugiriendo un potencial como agente antineoplásico selectivo.

En comparación con tratamientos convencionales como la quimioterapia, las AgNPs Argovit™ han mostrado un porcentaje de inhibición de crecimiento más elevado en líneas celulares cancerígenas. Además, se destaca que, a diferencia de la quimioterapia, las AgNPs Argovit™ no disminuyen significativamente la viabilidad celular en modelos de cultivos primarios de varios órganos. Se propone evaluar la capacidad antiproliferativa de las AgNPs Argovit en una línea celular de cáncer de pulmón, así como su potencial efecto citotóxico en una línea celular sana, como un primer paso hacia su posible uso en el tratamiento del cáncer de pulmón.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, efecto antiproliferativo, líneas celulares, selectividad citotóxica y propiedades fisicoquímicas.

(Silver Nanoparticles (AgNPs) as Potential Antitumoral Agents, Specifically Against Lung Cancer)

Abstract approved by:
Dr. Yanis Toledano Magaña, Thesis Advisor



The use of silver nanoparticles (AgNPs) in cancer treatment, particularly in lung cancer, has been the focus of research due to their unique properties, such as nanoscale size and the ability to release silver ions. It has been demonstrated that AgNPs exhibit antitumoral activity by interacting with tumor cells and surrounding tissues. However, their application is contingent upon physicochemical properties that may also influence toxicity towards healthy tissues. Studies have investigated the effects of AgNPs on inducing apoptosis, inhibiting cell proliferation, and interfering with angiogenesis in tumor cells. Conversely, in healthy tissues, toxic effects have been observed, dependent on concentration, size, and exposure time. Argovit™ AgNPs are commercial nanoparticles with low toxicity and genotoxicity, positioning them as alternatives to combat diseases without affecting normal cells. Their physicochemical properties, including hydrodynamic diameter and potential-Z, have been characterized. Studies have assessed their effects on various cancer cell lines, revealing potential antiproliferative properties. It has been observed that Argovit™ AgNPs induce apoptosis in cancer cells without significantly impacting cell viability in primary culture models, suggesting potential as a selective antineoplastic agent. In comparison to conventional treatments like chemotherapy, Argovit™ AgNPs have demonstrated a higher growth inhibition percentage in cancer cell lines. Additionally, unlike chemotherapy, Argovit™ AgNPs do not significantly decrease cell viability in primary culture models of various organs. The proposal is to evaluate the antiproliferative capacity of Argovit™ AgNPs in a lung cancer cell line and their potential cytotoxic effect on a healthy cell line, representing an initial step towards their potential use in lung cancer treatment.

Keywords: Silver nanoparticles, antiproliferative effect, cell lines, cytotoxic selectivity and physicochemical properties.

DEDICATORIA

Le dedico mi tesis de licenciatura a mi mamá Ma. Luisa Bravo López por todo su apoyo, por siempre estar ahí durante el tiempo que me tomó realizarla, sin su apoyo no habría podido culminar este proyecto de gran relevancia para mí. No tengo palabras para expresar lo agradecida que estoy, por la fe y confianza que depositó en mí durante los años de la carrera universitaria, fue una de las personas que creyó en mí totalmente para lograr todo esto.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yanis Toledano Magaña por aceptar ser mi directora de tesis, por su paciencia y por brindarme su apoyo en todo momento durante la realización de este proyecto, logró influir de manera positiva y considerable en mi formación como profesional tanto en el presente como para el futuro ya que me brindó herramientas vitales y fundamentales clave para mi desarrollo profesional, por lo cual agradezco el haberme abierto desde un principio las puertas del laboratorio de nanomedicina y nanotoxicología de la UABC y durante todo el tiempo que fue necesario.

Al Dr. Juan Carlos García Ramos, por todo su apoyo, aprendizaje y consejos que me ayudaron y me aportaron en diversos aspectos puntos fundamentales para desarrollar este proyecto.

Al Dr. Guillermo Amaya Parra por aceptar ser mi codirector de tesis y por ayudarme de manera fundamental durante todo el proceso para lograr culminar este proyecto, de antemano agradezco el apoyo, la paciencia y herramientas brindadas que me servirán para ser mejor profesionalista.

A mis compañeros de laboratorio, sobre todo a Jesús Gabriel González por ayudarme desde un inicio y en las partes clave y fundamentales para llevar a cabo la parte práctica de este proyecto y a Rodrigo Antonio Rojas Labastida, así como a Cristina Márquez Ketchul por ayudarme con parte de la fase práctica de este proyecto, por su dedicación y constancia para lograr los resultados esperados.

Al laboratorio de química medicinal y nanomedicina y nanotoxicología de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California campus Valle Dorado por dejarme usar las instalaciones para la realización de mi tesis.

ÍNDICE

Contenido

1. Introducción	10
2. Antecedentes	13
2.1 Nanopartículas de plata (AgNPs) Argovit™	14
2.2 Líneas celulares	16
2.3. Línea celular H1299 y Beas-2B.....	17
3. Marcoteórico:	22
3.1 Caracterización de las AgNPs por Microscopía de transmisión electrónica (TEM). ...	22
3.2 Caracterización de las AgNPs por la técnica de DLS	23
3.3 Caracterización de las AgNPs por TGA	24
4. Alcances de la investigación	26
4.1 Planteamiento del problema.....	26
4.2 Justificación	26
4.3 Hipótesis.....	28
4.4 Objetivos	28
5. METODOLOGÍA	29
5.1. Preparación de diluciones de AgNPs	29
5.2 Mantenimiento y proliferación de las líneas celulares	29
5.3 Montaje de ensayo	31
5.4 Ensayo de viabilidad	32
5.5 Análisis estadístico	33
6. Resultados	33
6.1 Registro del conteo celular	33
6.2 Análisis estadístico	38
6.3 Discusión	43
7. CONCLUSIÓN	51
8. Referencias bibliográficas	53

Índice de tablas:

Tabla 1 Propiedades fisicoquímicas de las formulaciones 1 y 4 de las AgNPs Argovit™	16
Tabla 2. Conteo celular línea celular H1299	34
Tabla 3. Conteo celular de la línea celular Beas-2B caja 1	35
Tabla 4. Conteo celular de la línea celular Beas-2B caja 2	35
Tabla 5. Conteo celular de la línea celular Beas-2B caja 3	36
Tabla 6. Comparativa de resultados de diferentes líneas celulares de diversas publicaciones	49

Índice de figuras y gráficas:

Figura 1. Esquema representativo de la TEM.	23
Figura 2. Esquema de funcionamiento del DLS.	24
Figura 3. Esquema de funcionamiento del análisis termogravimétrico. O.	25
Figura 4. Representación de la placa con 96 pocillos.	36
Gráfica 1. Efecto de la AgNP 4 en la línea celular Beas-2B.	37
Gráfica 2. Promedio de viabilidad en función de la concentración de AgNPs administrada.	37
Gráfica 3 y 4. Viabilidad celular de la línea H-1299 tratada con diferentes concentraciones de AgNPs.	43

1.Introducción

El cáncer es un proceso descontrolado de proliferación y diseminación celular que puede impactar a individuos de cualquier edad y estrato social, afectando no solo a los pacientes, sino también a sus familias y a la sociedad en su conjunto. En particular, el cáncer de pulmón plantea un desafío significativo para la salud pública, ya que se reconoce como una de las principales causas de muerte por cáncer tanto en México como en todo el mundo. “Este tipo de cáncer se inicia cuando las células empiezan a reproducirse de manera incontrolada, formando un tumor que se propaga a otras partes del cuerpo, donde desarrolla nuevos tumores que reemplazan el tejido normal. Por lo general, este proceso se origina en las células que revisten los bronquios, los bronquiolos y los alvéolos.” (Arrieta et al., 2019).

De acuerdo con la Secretaría de Salud, Baja California es uno de los estados en el país con mayor sobrevida en cáncer. Esto se atribuye al personal calificado y la tecnología de punta que otorgan los tratamientos oncológicos dentro de los más altos estándares de calidad. Dentro de los servicios que se ofrecen se encuentran la quimioterapia y radioterapia para pacientes con neoplasias malignas como; cáncer de pulmón, entre otros, así como, tratamientos de braquiterapia, consulta oncológica, clínica de displasias, clínica del dolor, consulta psico-oncológica (Vance et al., 2015).

En México en el 2020 se registraron 7 mil 811 casos nuevos y 6 mil 733 muertes por cáncer de pulmón. De manera temprana, este tipo de tumor solo se diagnostica en 0.6 por ciento de los casos; en etapa localmente avanzada, 24 puntos porcentuales y cerca del 65 por ciento en estadio cuatro o periodo crítico. Desde 1990 hasta 2016, la tasa de mortalidad bajó en promedio 1.9% cada año a nivel nacional; esta disminución varió entre hombres y mujeres 2.1% y 1.4% anual, respectivamente (Arrieta et al., 2019). La mayoría de los casos de cáncer de pulmón (alrededor del 71%) están relacionados con el tabaquismo. La exposición al humo de tabaco de segunda mano, al gas radón

y al humo de leña y combustibles sólidos son otros factores importantes que aumentan el riesgo de desarrollar esta enfermedad (Arrieta et al., 2019).

Para el año 2023, los cálculos de la Sociedad Americana contra el Cáncer en los Estados Unidos de América indican que se diagnosticarán alrededor de 238,340 nuevos casos de cáncer de pulmón (117,550 hombres y 120,790 mujeres) donde alrededor de 127,070 personas morirán a causa de cáncer de pulmón (67,160 hombres y 59,910 mujeres). Este cáncer es más frecuente en personas de edad avanzada, la mayoría de las personas diagnosticadas con cáncer de pulmón tiene 65 años o más; un número muy pequeño de personas diagnosticadas tienen menos de 45 años. La edad media de las personas en el momento del diagnóstico es aproximadamente 70 años (Arrieta et al., 2019).

A nivel mundial se estimó una incidencia de más de 2 millones de casos de cáncer de pulmón y alrededor de 1.8 millones de muertes por esta causa, en el 2020. Son las cifras tan alarmantes, los gastos en salud pública y la calidad de vida de los pacientes los que han llevado a diferentes grupos de investigación a trabajar en la búsqueda de nuevos y mejores tratamientos para el cáncer de pulmón (Arrieta et al., 2019). En este sentido, el uso de nanopartículas de plata (AgNPs) para el tratamiento del cáncer de pulmón es un tema de investigación en desarrollo y aún no se ha establecido como una terapia convencional o estándar (Strick et al., (2017).

Las AgNPs poseen un tamaño entre 1 y 100 nm y se están estudiando en diversos campos, incluido la medicina. Se ha demostrado que tienen propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias, y se están investigando para su uso como quimioterapéuticos. Algunos estudios preclínicos han sugerido que las nanopartículas de plata podrían tener efectos antitumorales al inducir la muerte de células cancerosas o al inhibir su crecimiento. Sin embargo, es importante destacar que estos estudios se han llevado a cabo en entornos de laboratorio y en modelos animales, y aún se necesita más investigación para evaluar su seguridad y eficacia en humanos (Mitchell et al., 2021).

En particular las AgNPs Argovit™ han sido ampliamente reportadas por sus aplicaciones en diferentes campos del conocimiento, entre ellos, la biomedicina. Es por esto por lo que en los antecedentes se detallarán de manera específica lo analizado en trabajos tomados de la literatura que lograron incentivar la realización de este proyecto de tesis. AgNPs como agentes antitumorales, específicamente contra cáncer de pulmón.

2. Antecedentes

Se sabe que las nanopartículas de plata tienen propiedades únicas, como su tamaño nanométrico y su capacidad para liberar iones de plata. Estas propiedades les permiten interactuar con las células tumorales y los tejidos circundantes. Además, estudios previos han demostrado que las nanopartículas de plata pueden exhibir actividad antitumoral en diferentes tipos de cáncer, lo que sugiere su potencial aplicación contra el cáncer de pulmón.

En cuanto al mecanismo de acción de las AgNPs, se postula que las nanopartículas de plata podrían generar especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células cancerosas, lo que conduce a un aumento del estrés oxidativo. Este estrés oxidativo puede dañar los componentes celulares y activar vías de señalización que conducen a la apoptosis, un proceso de muerte celular programada. Esto plantea un área de oportunidad debido a la baja toxicidad que se asocia con un mecanismo de muerte celular por apoptosis (Ramírez et al., 2022).

Además, se ha observado que las nanopartículas de plata pueden interferir con vías de señalización celulares clave, involucradas en la proliferación celular lo que podría suprimir la capacidad de las células cancerosas de crecer y dividirse.

Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de plata (AgNPs) pueden influir en su interacción con células tumorales y tejidos sanos. Algunas de estas propiedades son; el tamaño de las partículas donde las AgNPs tienen un tamaño muy pequeño, en la escala nanométrica. Este tamaño les permite penetrar en las células y tejidos con facilidad, lo que puede influir en su capacidad para interactuar con las células tumorales y los tejidos sanos. (Ramírez et al., 2022).

Además, la superficie y carga superficial son propiedades que conllevan características específicas en estas nanopartículas, provocando diferentes

características de superficie y carga, lo que puede afectar su interacción con las células. También, estas propiedades pueden influir en la adsorción de moléculas en la superficie de las nanopartículas y en su capacidad para interactuar con los componentes celulares. (Ramírez et al., 2022).

Por otro lado, la liberación de iones de plata por parte de AgNPs se han asociado con sus propiedades antimicrobianas y citotóxicas. En este sentido, la liberación de iones de plata puede afectar directamente a las células tumorales y también a los tejidos sanos circundantes. Es por esto por lo que los ensayos de citotoxicidad cobran relevancia, ya que se debe asegurar que las AgNPs sean seguras para futuras aplicaciones en humanos. (Ramírez et al., 2022).

Es importante tener en cuenta que las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs pueden influir tanto en su actividad antitumoral como en su toxicidad hacia los tejidos sanos. En el caso de las células tumorales, se ha investigado el efecto de las AgNPs en la inducción de apoptosis, la inhibición de la proliferación celular y la interferencia con la angiogénesis, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, también se ha observado que las AgNPs pueden tener efectos tóxicos en tejidos sanos, dependiendo de su concentración, tamaño y tiempo de exposición. Estos efectos pueden incluir daño oxidativo, inflamación y estrés celular (Han et al., 2020).

2.1 Nanopartículas de plata (AgNPs) Argovit™.

Las AgNPs Argovit™ tienen propiedades fisicoquímicas que han sido previamente caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión dinámica de luz (DLS) y análisis termogravimétrico (TGA), siendo la primera de ellas una técnica que proporciona el tamaño de nanopartícula y permite calcular el diámetro hidrodinámico gracias a la medición de la luz dispersada en suspensión coloidal.

Por su parte, el método de TGA se refiere al estudio del cambio en el peso de una muestra al ser sometida a una fuente de calor constante y es utilizada para

determinar los componentes volátiles en la muestra y si es o no estable térmicamente. Con este es posible medir transiciones de fase de segundo orden, descomposición, desorción, vaporización y la deshidratación de una muestra en particular.

Entre las propiedades fisicoquímicas reportadas podemos encontrar el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas entre los 440 nm y 480 nm indicando diferencias en su solvatación. Otro parámetro importante medido por esta técnica fue el potencial-Z de 2 formulaciones de nanopartículas Argovit™ con valores que se ubicaron entre -0.40 y -0.80. Por último, el índice de polidispersión es de entre 0.5 y 0.850 el cual dicta que las formulaciones se encuentran mayormente polidispersas.

<i>Propiedades fisicoquímicas</i>	<i>AgNP 1</i>	<i>AgNP4</i>
Tamaño promedio de los núcleos metálicos de plata ØAg (nm)	16.4 ± 8.0	16.4 ± 8.1
Distribución de tamaños por TEM (nm)	5-40	5-40
PVP	K-15: 8000–12,000 kDa	K30: 45,000–58,000 kDa
Diámetro hidrodinámico ØHidro (nm)	448.7	483.2
Índice de polidispersidad (IPD)	0.813	0.555

Potencial Z (mV)	-0.872	-0.464
Resonancia de plasmón superficial (λ)	415	406.549
Plata metálica (%w/w)	Análisis TGA 1.14 \pm 0.02	Análisis TGA 1.19 \pm 0.0
PVP (%w/w)	19.62 \pm 0.30	20.92 \pm 0.42
H ₂ O (%w/w)	79.24 \pm 0.45	20.92 \pm 0.42
Morfología	Esférica	Esférica

Tabla 1 **Propiedades fisicoquímicas de las formulaciones 1 y 4 de las AgNPs Argovit™.**

En la tabla se resumen las propiedades de las AgNPs utilizadas en este trabajo. Específicamente, las AgNPs Argovit™ son nanopartículas comerciales que han reportado una baja toxicidad y genotoxicidad en modelos celulares y animales, por eso se ha propuesto su uso como alternativa para combatir diferentes enfermedades sin presentar efectos adversos sobre las células normales.

De acuerdo con la literatura, las AgNP Argovit™ han reportado una baja toxicidad en diversos modelos, tanto celulares como animales. Estos resultados las han planteado como alternativas idóneas alternativas para combatir diferentes enfermedades sin presentar efectos adversos a las células o los animales sanos. Respecto a los estudios *in vitro* en diferentes líneas celulares, se han obtenido muy buenos resultados, atacando a células diana sin tener un efecto secundario o adverso a otros tipos celulares presentes.

2.2 Líneas celulares

Históricamente, las líneas celulares han sido utilizadas como herramientas para estudios en biología celular y molecular. Permiten estudiar la morfología, citotoxicidad y genotoxicidad de diferentes sustancias, entre otros estudios más. Existen distintas aplicaciones experimentales, así como diversas líneas

celulares que pueden ser estudiadas *in vitro*. Se utilizan principalmente porque son el punto de partida para muchas aplicaciones tecnocientíficas en el área de la salud.

Dentro de las ventajas que tienen es que son accesibles, menos costosas y son fáciles de trabajar en comparación con un organismo más complejo. La línea celular se genera a partir de un cultivo primario realizando una modificación genética para que el número de células aumente, la población sea homogénea y por ello, las características de las células se conservarán por generaciones con las condiciones adecuadas, pueden ser congeladas en nitrógeno líquido o a temperaturas de -80°C y ser almacenadas por periodos largos sin perder sus características.

Las líneas celulares ofrecen un modelo valioso para experimentos preliminares. Sin embargo, después de cierto número de divisiones, las células perderán su capacidad de proliferar llegando a una etapa conocida como senescencia y morirán, perdiendo así la línea celular. Las líneas celulares se utilizan en investigación y desarrollo de fármacos como modelo de tejido sano o tejido enfermo para conocer ciertos procesos biológicos, analizar el metabolismo, pruebas de detección y citotoxicidad de fármacos.

2.3. Línea celular H1299 y Beas-2B.

Cabe recalcar que en estudios anteriores se trabajó con H1299 siendo una línea celular de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humanas derivada del ganglio linfático, presenta características biológicas particulares.

Estas células tienen una delección parcial homocigótica del gen TP53 y, como resultado, no expresan la proteína p53 supresora de tumores, lo que explica en parte su propensión proliferativa. Es también esta característica lo que permite determinar el efecto de potenciales fármacos con una mayor precisión, siendo que las células no cuentan con mecanismos propios para inhibir el proceso tumoral (Han et al., 2020).

También se ha informado que estas células secretan la hormona peptídica neuromedina B (NMB), pero no el péptido liberador de gastrina (GRP). Esta línea celular se utiliza ampliamente en la investigación del cáncer y la inmunooncología. Este modelo ha permitido la evaluación farmacocinética, del metabolismo y la fabricación de nuevos fármacos antineoplásicos. En este orden, diversos estudios muestran un posible efecto antitumoral de diferentes formulaciones de AgNPs en la línea celular H1299 (Ferdous et al., 2019).

Obtener perfiles citotóxicos por la exposición directa o indirecta de células a AgNPs a partir de modelos pulmonares *in vitro* toma relevancia debido a que es posible extrapolar estos resultados al posible impacto en la salud humana o la aplicación farmacológica de las formulaciones de AgNPs. Si bien la plata promete ser una excelente alternativa a los quimioterapéuticos pulmonares convencionales, existen estudios que comprueban que es necesario contemplar las posibles consecuencias de su uso médico antes de proponerlas como una solución al cáncer de pulmón (Han et al., 2020).

Para evaluar el potencial antiproliferativo de las AgNPs es necesario tener en cuenta el estudio de sus propiedades fisicoquímicas y los factores biológicos directamente relacionados con los modelos *in vitro*. Estos modelos a pesar de ser simples se caracterizan por brindar una vista panorámica de los posibles riesgos para la salud humana. Se integran factores asociados con la toxicidad pulmonar por exposición a AgNPs (Ferdous et al., 2019).

Existen estudios donde se reporta que las AgNPs Argovit™ se han administrado a cultivos de diferentes líneas celulares cancerígenas entre ellas células de cáncer de cuello uterino (HeLa), pulmón (H1299, Beas-2B), próstata (DU-145), colon (HT-29 y DLD-1) y mama (MDA-MB-231 y MCF-7). El motivo de usar distintas líneas es para probar si las AgNPs inhiben eficazmente la viabilidad celular de líneas celulares de cáncer dependientes y no dependientes de hormonas (Han et al., 2020).

En estudios basados en la literatura de modelos pulmonares *in vitro* se evaluaron los efectos citotóxicos producidos a nivel celular y la dependencia de estos con respecto a variables como el tamaño, la concentración, el tiempo de exposición, el tipo de célula, y el modelo. Para ello los autores evalúan las distintas propiedades fisicoquímicas de las AgNPs y las contrastan con los factores extrínsecos como el tiempo de exposición y la concentración (Ramírez et al., 2022).

En estos trabajos se analizaron AgNPs con tamaños oscilando entre los 10 y 100 nm que es el límite máximo para ser considerado un NM. Estas AgNPs presentaron recubrimientos de PVP, citrato, fitogénicos y sin recubrimiento. Las líneas evaluadas abarcaron los modelos A549, Beas-2B, Calu-1, NCI-H358, MRC-5, NIH3T3, entre otros. (Han et al. 2020).

En un estudio se evaluó el efecto citotóxico de AgNPs Argovit® en HCT-15 y cultivos primarios donde se emplearon cinco formulaciones que mostraron tener potencial anti proliferativo contra la línea celular HCT-15 y cultivos primarios. Para las formulaciones de AgNP 1, 2 y 3 se observó un efecto concentración dependiente, no así para la AgNP4 y AgNP 5. Sin embargo, incluso con la concentración más alta se observó una viabilidad mayor al 50%, teniendo una actividad similar a la del fármaco de primera elección carboplatino a la IC50 reportada de 190 μ M en diversos artículos de investigación.

Los resultados mostraron que la apoptosis fue la vía principal de muerte celular. Por otro lado, las AgNPs no disminuyeron la viabilidad celular de manera significativa en modelos de cultivos primarios de aorta, médula, riñón, hígado y corazón. La disminución significativa solo se presentó en monocitos y linfocitos de bazo. Los resultados obtenidos en este artículo de investigación mostraron que las AgNPs son un potencial agente antineoplásico selectivo.

En el estudio a mencionar se analizaron las células MCF-7 expuestas a un tratamiento de AgNPs a distintas concentraciones. Los resultados obtenidos

del ensayo de viabilidad nos demuestran que la respuesta citotóxica en la línea celular de adenocarcinoma mamario humano expuestos a AgNPs Argovit™ inducen un efecto citotóxico independiente de la concentración, pues el intervalo de concentraciones crecientes evaluadas 1µM-1mM producen entre 6 y 65% de disminución en la viabilidad celular.

De la misma manera, se puede identificar una cantidad de restos celulares en ciertos tratamientos, principalmente en las concentraciones más altas (100 µM y 1mM de AgNPs). Es importante señalar que esta evidencia experimental se obtuvo gracias a que el conteo se realizó forma manual con ayuda del microscopio óptico, lo que permitió identificar efectos inducidos por las nanopartículas de plata en las células cancerosas como la lisis celular. A partir del estudio, podemos determinar claramente que las células no tratadas con AgNPs muestran una mayor confluencia de células en monocapa y adheridas con una membrana celular intacta.

Al comparar las Argovit™ con otro tipo de AgNPs el porcentaje de inhibición de crecimiento que nos brindan las Argovit™ es más elevado a las AgNPs comparadas. En base en la literatura se reporta unas AgNPs sintetizadas con extracto de *Fagonia indica*, se evaluaron en la misma línea tumoral de cáncer de mama MCF-7 a una concentración de 12.35µg/mL durante 24h teniendo como resultado una citotoxicidad del 50%. Además, en otro estudio se evaluaron la citotoxicidad de AgNP-floroglucinol por síntesis verde a una concentración de 12.35µM, obteniendo una citotoxicidad del 50% en ambas formulaciones de AgNPs Argovit™.(Han et al., 2020).

Es bastante claro que las AgNPs exhiben excelentes propiedades biomédicas, sin embargo, también es necesario estudiar los efectos toxicológicos que puedan llegar a tener estas NPs previo a su utilización en organismos vivos. Se sabe que las nanopartículas de plata pueden interactuar con diferentes líneas celulares y tener un impacto en su proliferación y supervivencia celular. En el caso del cáncer de pulmón, se ha investigado la capacidad de las

nanopartículas de plata para inhibir la proliferación celular y promover la muerte celular en líneas celulares como H1299.

Las nanopartículas de plata podrían tener un efecto antitumoral contraen la línea celular H1299 mediante la inducción de apoptosis y la interferencia con vías de señalización celular clave involucradas en la proliferación celular. Además, se espera que las nanopartículas de plata tengan un efecto mínimo en la línea celular de células bronquiales normales Beas-2B, lo que sugiere una selectividad hacia las células cancerosas.

En el presente trabajo, se buscó evaluar el efecto citotóxico de las AgNPs sobre una línea de células pulmonares sanas (Beas-2B) para evaluar la viabilidad de continuar estudiándolas para su uso potencial en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades.

La línea celular Beas-2B se definió originalmente como una línea celular epitelial de pulmón no tumorigénica humana derivada de un tejido pulmonar humano y se ha utilizado ampliamente como modelo epitelial de pulmón no tumorigénico in vitro en una gran variedad de estudios en asociación con la carcinogénesis pulmonar durante más de 30 años (Han, et al. 2019).

Es por todo lo anterior que en el presente trabajo se pretende evaluar la capacidad antiproliferativa de AgNPs Argovit en una línea celular de cáncer de pulmón y su potencial efecto citotóxico en una línea celular sana, ambas representativas del sistema respiratorio. Como una primera aproximación al potencial uso de estas nanopartículas para el tratamiento de cáncer de pulmón.

3. Marcoteórico:

3.1 Caracterización de las AgNPs por Microscopía de transmisión electrónica (TEM).

El principio fundamental del TEM se basa en la interacción entre una muestra delgada y un haz de electrones de alta energía. En esencia, el TEM opera como un microscopio óptico, pero con mayor amplificación. En lugar de un ocular, las imágenes se visualizan en una pantalla. En la formación de la imagen, los electrones convencionales se sustituyen por fotones y las lentes ópticas por lentes electromagnética (Rosarin, et al 2012)

Como se muestra en la figura 1, el principio del análisis mediante TEM es sencillo. Un cañón de electrones emite continuamente a través de una columna de vacío. Los electrones que atraviesan la muestra son captados por un detector (pantalla fluorescente). La intensidad de los electrones no dispersados produce una imagen de sombra de la muestra (Ferdous et al., 2019). Esto permite visualizar la muestra a nivel nanométrico en una pantalla de alta resolución, lo que posibilita determinar el tamaño y la morfología del nanomaterial.

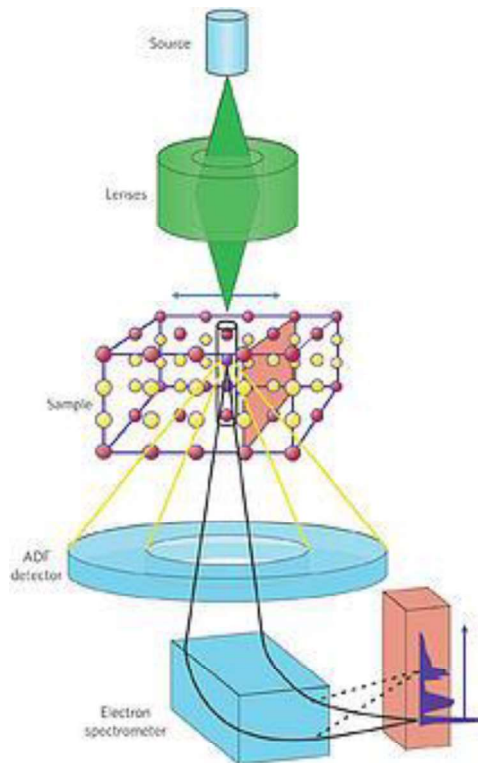


Figura 1. Esquema representativo de la TEM. Principio básico del TEM (microscopía electrónica de transmisión): Figura obtenida de: (Vance et al., 2015).

3.2 Caracterización de las AgNPs por la técnica de DLS

La caracterización mediante dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica que determina el tamaño de las nanopartículas midiendo la luz dispersada en una suspensión coloidal. Este método se basa en comparar la intensidad de la luz dispersada al atravesar una suspensión coloidal, lo que permite calcular el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas presentes. (Rosarin., et al 2012)

Este procedimiento también se usa ampliamente para medir el tamaño de las nanopartículas antes y después de la funcionalización de su superficie, y puede incluso medir el grosor del recubrimiento si es necesario. Se ha documentado que las partículas se mueven por difusión a través del movimiento browniano, lo que causa una difusión más rápida en partículas más pequeñas. Este movimiento se mide mediante una función matemática dependiente del tiempo de la luz dispersada, que es leída por el DLS (Ferdous et al., 2019).

Además, este equipo permite la medición del potencial Z mediante una técnica

novedosa. El potencial Z mide el campo eléctrico entre la nanopartícula y su microambiente acuoso, y se usa para determinar el grado de repulsión entre nanopartículas cargadas en un medio disperso. Altos valores de potencial Z, ya sean positivos o negativos, indican nanopartículas altamente cargadas y más estables en solución. Por el contrario, bajos valores de potencial Z sugieren que las nanopartículas tenderán a formar agregados en solución, indicando que las fuerzas repulsivas han disminuido.

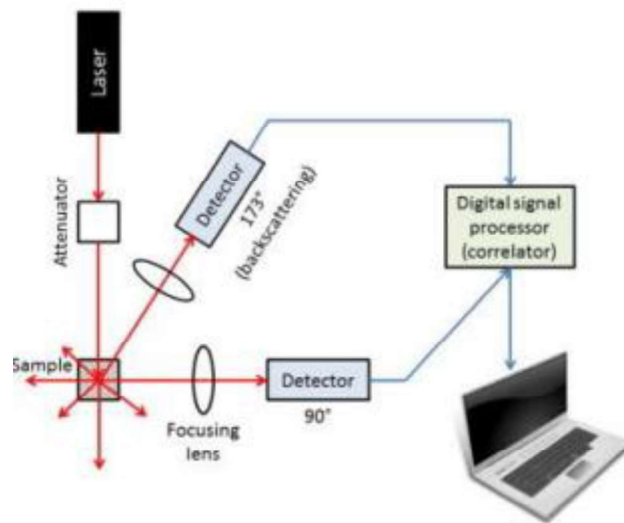


Figura 2. Esquema de funcionamiento del DLS. Principio básico del DLS (dispersión de luz dinámica): Figura obtenida de: (Vance et al., 2015). En el esquema se esquematiza el funcionamiento general de la dispersión dinámica de luz.

3.3 Caracterización de las AgNPs por TGA

El análisis termogravimétrico (TGA) se refiere al estudio del cambio de peso de una muestra cuando se somete a una fuente de calor constante, y se utiliza para determinar los componentes volátiles y la estabilidad térmica de la muestra. Esta técnica permite medir transiciones de fase de segundo orden, descomposición, desorción, vaporización y deshidratación de una muestra específica. El sistema se compone de un horno altamente calibrado para mantener una temperatura constante y una balanza muy sensible que puede registrar hasta los cambios más mínimos en el peso del analito.

El principio de esta técnica se basa en un cable colgante de alta precisión que está conectado en la parte superior a la balanza térmicamente aislada y en la parte inferior a un plato de muestra que se encuentra expuesto al horno de precisión. Estos equipos pueden ser aún más complejos si se les añade un lector de infrarrojos para la detección de gases (Ferdous et al., 2019).

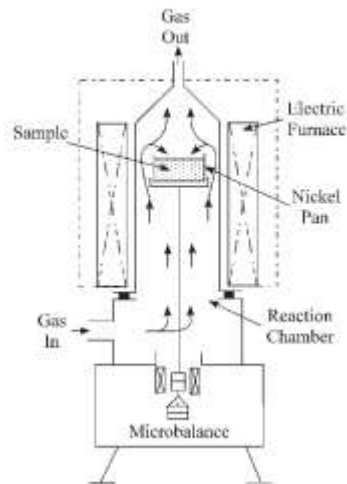


Figura 3. Esquema de funcionamiento del análisis termogravimétrico. Operación de la técnica de TGA (análisis termogravimétrico): Figura obtenida de: (Mitchell et al., 2021). En el esquema se ilustra el funcionamiento del análisis termogravimétrico.

4. Alcances de la investigación

4.1 Planteamiento del problema

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, y a pesar de los avances en tratamientos convencionales como la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía, las tasas de supervivencia a largo plazo siguen siendo bajas. Estos tratamientos a menudo están asociados con efectos secundarios graves y falta de selectividad, lo que puede dañar tejidos sanos y reducir la calidad de vida de los pacientes. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos enfoques terapéuticos más eficaces y menos tóxicos. (Rosarin., et al 2012)

En este contexto, las nanopartículas de plata (AgNPs) han emergido como prometedores agentes antitumorales debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, como alta reactividad superficial y capacidad para generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas propiedades permiten que las AgNPs interactúen de manera específica con las células tumorales, induciendo apoptosis e inhibiendo la proliferación celular. (Rosarin., et al 2012)

Sin embargo, aunque los estudios preclínicos han demostrado el potencial de las AgNPs en varios tipos de cáncer, su eficacia y seguridad específica en el tratamiento del cáncer de pulmón aún no se han investigado exhaustivamente. Además, existe una controversia sobre los posibles efectos tóxicos y la biocompatibilidad de las AgNPs, lo que subraya la necesidad de más investigaciones para optimizar su uso terapéutico. (Rosarin., et al 2012)

4.2 Justificación

Las AgNPs presentan una serie de características que las convierten en candidatas atractivas para el desarrollo de terapias contra el cáncer de pulmón. Primero, su pequeño tamaño y alta superficie específica les permiten penetrar eficazmente en las células tumorales y liberar agentes terapéuticos de manera controlada. Segundo, las AgNPs pueden ser fácilmente funcionalizadas con diversas biomoléculas para mejorar su selectividad y reducir su toxicidad en

células sanas. Además, las propiedades intrínsecas de las AgNPs para generar ROS pueden ser aprovechadas para inducir apoptosis en células cancerosas de manera más efectiva que los tratamientos convencionales.

Estudios recientes han mostrado que las AgNPs pueden interactuar con las proteínas presentes en el organismo, formando biocoronas que facilitan su internalización celular a través de procesos como la endocitosis. Este mecanismo puede ser especialmente beneficioso en el tratamiento del cáncer de pulmón, donde la entrega dirigida de nanopartículas a las células tumorales podría mejorar significativamente la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios.

Dado el potencial demostrado de las AgNPs en estudios preclínicos y su capacidad para ser modificadas para mejorar su seguridad y eficacia, investigar su aplicación específica en el tratamiento del cáncer de pulmón es una vía prometedora. Este estudio podría proporcionar una base sólida para el desarrollo de nuevas terapias antitumorales más efectivas y con menos efectos secundarios, contribuyendo significativamente a mejorar las opciones de tratamiento y la calidad de vida de los pacientes con cáncer de pulmón.

4.3 Hipótesis

Las nanopartículas de plata inhibirán la proliferación y promoverán la muerte celular en la línea celular de cáncer de pulmón H1299, mientras que no presentarán efectos citotóxicos en la línea celular de células bronquiales normales Beas-2B.

4.4 Objetivos

Objetivo general

4.4.1 Determinar el potencial antiproliferativo de nanopartículas de plata Argovit™ en células cancerosas y sanas de pulmón.

Objetivos específicos

4.4.2 Determinar el efecto de las nanopartículas de plata Argovit™ en la línea celular sana BEAS-2B derivada de tejido bronquial.

4.4.3 Evaluar la capacidad antiproliferativa de las AgNPs en el modelo de células de cáncer de pulmón H1299.

4.4.4 Determinar la selectividad citotóxica de las AgNPs Argovit™.

4.4.5 Relacionar las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs con su potencial efecto citotóxico y antiproliferativo en modelos celulares pulmonares.

5. METODOLOGÍA

5.1. Preparación de diluciones de AgNPs

Las AgNPs Argovit™ que se utilizaron en este trabajo fueron donadas por la Dra. Nina Bogdanchikova del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM. Se utilizaron las formulaciones identificadas como AgNP1 y AgNP4 (Tabla 1) caracterizadas previamente. Se prepararon diluciones de AgNPs variando la concentración en función del contenido de plata metálica en un orden de magnitud entre cada una.

Para este proceso se agitaron manualmente para homogeneizar las nanopartículas. Se prepararon 4 disoluciones en escala logarítmica considerando el contenido de plata metálica de cada formulación de AgNPs. Las concentraciones de trabajo fueron 5.5 μ M, 55.6 μ M, 556 μ M y 5.5 mM.

La forma en la que se llevaron a cabo los estudios fue a través de ensayos celulares, primero se plantaron los cultivos celulares en cajas petri para reproducir las Beas-2B y una vez que la proliferación alcanzaba el 100% era momento de comenzar a preparar las células para los ensayos de citotoxicidad. Trabajamos en colaboración con 2 muestras de nanopartículas etiquetadas como 1 y 4, la NP 1 se prepararon a una concentración menor en comparación con la NP 4 (5mM), esto con la finalidad de comparar los resultados toxicológicos variando las concentraciones de las NPs.

5.2 Mantenimiento y proliferación de las líneas celulares

H1299 carcinoma de pulmón de células no pequeñas humanas derivada del gangliolinfático y Beas-2B línea celular bronquial epitelial.

El mantenimiento y la proliferación de líneas celulares de pulmón precisa un cuidado diferente según el tipo de célula con el que se esté tratando. En este sentido se decidió utilizar los modelos más representativos del sistema respiratorio como lo son las células bronquiales y alveolares epiteliales. Para el modelo de evaluación de pulmón sano, se estableció el uso de la línea celular

bronquial epitelial (Beas-2B), mientras que para los modelos tumorales se efectuó la de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humanas derivada del gangliolinfático (H1299).

Las líneas celulares utilizadas poseen tasas de crecimiento distintas entre sí, esto se toma en cuenta para el recambio de medio celular y la realización del pase. Fue necesario monitorear diariamente el cultivo para asegurarse de que no existe contaminación y observar la correcta proliferación de las células.

Siendo las células H1299, la línea trabajada con anterioridad que se utilizó como punto de comparación con la línea celular Beas-2B que se trabajó, cabe destacar que estas células fueron conservadas a -86°C utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como criopreservante, posteriormente estas se descongelaron a temperatura ambiente, para después verterlas en una caja petri con 10 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 0.1% de antibiótico/antimicótico, además es necesario mencionar que la utilización de medio de cultivo celular RPMI 1640 logra aportar vitaminas, aminoácidos y sales inorgánicas encargados de una correcta homeostasis y fundamento celular, además el SBF favorece el crecimiento y adhesión celular, por otro lado la adición de antibiótico-antimicótico en una concentración total del 0.1% ayuda a mantener los cultivos axénicos.

Para finalizar, las cajas se incubaron a una temperatura de 37°C en un ambiente con 5% de CO_2 . Es necesario recalcar que todo procedimiento realizado se llevó a cabo bajo los estándares indicados y condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar para mantener las condiciones axénicas de los cultivos celulares.

Se prosiguió con un pase celular efectivo donde una vez alcanzada la confluencia celular para cada cultivo celular cercano al 90% se realizó su división y traspaso a una nueva caja Petri suplementada. Para esto se tomó un volumen total del 10% de la caja original el cual fue vertido en una nueva caja

Petri la cual se suplementó con medio frasco suplementado. Este ensayo fue hecho por triplicado.

5.3 Montaje de ensayo

En primera instancia es necesario despegar las células de las cajas petri en las que se proliferan, para esto se realiza un proceso de tripsinización. Para tal efecto, primero es necesario pasar por un método de esterilización previo para tener limpias nuestras manos y brazos para poder trabajar con el material adecuado en una campana de flujo laminar.

Primero, se retiró el sobrenadante de una caja petri, una vez removido el sobrenadante se colocaron 3 ml de tripsina para despegar las células adheridas en la caja, para posteriormente incubar por 5 minutos a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂, esto con el fin de reactivar las enzimas que estaban inertes hasta el momento, transcurrido este tiempo se detuvo la actividad (desactivó) de la tripsina añadiendo 10 ml de medio suplementado e RPMI-1640, el cual gracias a sus características proporcionan nutrientes a las células e inhibe la actividad enzimática.

Para poder recuperar las células se empleó un tubo falcón de 15 ml, el cual se centrifugó junto con las células a 2400 rpm por 10 minutos, esto para poder separar las fases, una vez ya teniendo un conglomerado de células en la parte inferior del tubo, nuevamente se removió el sobrenadante hasta dejar solamente el pellet. Una vez teniendo el pellet por separado, fue resuspendido con 3 ml de medio y 7 ml de solución salina. Teniendo listo lo mencionado anteriormente, se procedió a tomar 1ml de la suspensión celular dividida en un Eppendorf sin graduación, del cual se extrajeron 10 µL para el conteo de células. Este último se realiza en una cámara de Neubauer utilizando azul de tripano como colorante de exclusión vital para determinar el número de células viables en cada una de las cajas.

5.4 Ensayo de viabilidad

Para realizar el análisis de la viabilidad celular de los distintos modelos se procedió al correspondiente diseño experimental. Para ello se determinó el número de células que se incluirían por pozo en placas de 96 pocillos. Estas fueron calculadas para ser 20,000 células/pozo para cada modelo celular y homogeneizar así posibles variables. Por otro lado, se calculó la cantidad de medio RPMI 1640, SFB y antibiótico necesario por pozo.

Habiendo diseñado experimentalmente cada placa, se procedió a cargar una canaleta con la cantidad necesaria de células, medio RPMI 1640, SFB y antibiótico. En esta canaleta se resuspendieron las células y con una micropipeta multicanal se montaron 190 μ L de esta suspensión celular por pozo.

Finalmente se añadieron 10 μ L de los correspondientes estímulos Argovit™ y los controles positivos y negativos. Por último, los experimentos se incubaron a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂ por 24h. Transcurridas las 24h las células fueron fijadas añadiendo 10 μ L de Azul tripano y 40 μ L de formaldehído. Otro procedimiento realizado corresponde al conteo celular por línea (cada pozo) en la cámara de Neubauer donde mediante el microscopio se procedió a contar las células correspondientes por cuadrante, abarcando los 4 que contiene la misma, esto nos brindó la cantidad de células por mililitro presentes en cada caja de cultivo, así mismo es necesario recalcar que las nanopartículas de plata fueron elegidas primordialmente por sus propiedades fisicoquímicas.

5.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico multivariable para determinar si existen o no diferencias significativas en el efecto que induzcan las AgNPs en los diferentes cultivos celulares. En todos los casos se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado.

6. Resultados

6.1 Registro del conteo celular

Es necesario recalcar que un estudio previo que involucró a la línea celular H1299 nos ayudará como punto de comparación. Con base en la distribución de la placa de 96 pozos, los primeros 36 son correspondientes a las filas A, B y C donde se trabajó con la nanopartícula de plata número 4, además como punto de comparación, las filas E, F y G fueron seleccionadas de igual manera por las propiedades fisicoquímicas, las cuales corresponden a la nanopartícula de plata número 1, ambas corresponden a la línea celular H1299.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	71500 0	35000	12600 0	56000	30000	35500	12500	10000	7500	5000	7500	13500
B	12500 0	95000	24450 0	10500 0	55000	45000	20000	20000	16000	12500	1300 0	8000
C	15800 0	11200 0	62500	17000	12500	16000	14000	11000	8000	8500	6000	5000
D				V	A	C	I	O				
E	17400 0	12350 0	19300 0	45500	30000	35000	20000	8500	15000	6500	5500	7000
F	19000	12250 0	16150 0	21000	45000	85000	15500	16500	17000	15500	1450 0	11000
G	30150 0	29150 0	39150 0	29500	27500	21000	18500	18000	15000	10500	1350 0	13000
H	19850 0	10900 0	16350 0	15500	C	O	N	T	R	O	L	

Tabla 2. Conteo celular línea celular H1299. En la tabla se muestra la distribución de células contadas como viables en una caja de 96 pozos.

En esta ocasión se trabajó con la línea celular Beas-2B, en todos los casos se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado. En la caja número 1 los primeros 12 pozos fueron correspondientes a la fila A donde se trabajó con la nanopartícula de plata número 4, la fila B en los primeros seis pozos se colocó el control negativo.

Respecto a la segunda placa con 96 pozos, los primeros 24 pozos correspondientes a las filas A y B donde se trabajó en este caso con la nanopartícula 1 y 4, la fila C en los primeros seis pozos se colocó el control. Para finalizar la tercera placa con 96 pozos, los primeros 24 pozos correspondientes a las filas A y B donde se trabajó en este caso con la nanopartícula 1 y 4, la fila C en los primeros seis pozos se manejó el control.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	34000	67500	19850 0	20150 0	19000 0	18000 0	18650 0	16000 0	10200 0	91000 0	8900 0	61000
B	48000 0	28750 00	18875 00	52250 0	15125 00	14875 00	C O	N	T	R	O	L
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tabla 3. Conteo celular de la línea celular Beas-2B caja 1. En la tabla se muestra la distribución de células contadas como viables en una caja de 96 pozos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	32000	32000	36000	34000	46000	28000	26000	20000	22000	8000	1200 0	16000
B	34000	32000	40000	38000	34000	24000	32000	26000	22000	14000	1400 0	18000
C	67500 0	69750 0	56845 6	46650 0	85900 0	76245 9	C O	N	T	R	O	L
D												
E												
F												
G												
H												

Tabla 4. Conteo celular de la línea celular Beas-2B caja 2. En la tabla se muestra la distribución de células contadas como viables en una caja de 96 pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	15500	10500	9000	11500	13000	7000	9000	21000	12500	8500	6000	6500
B	16000	28000	14000	30000	14000	50000	40000	14000	48000	32000	5000 0	46000
C	76500 0	69750 0	56845 6	47750 0	86000 0	87250 0	CO	N	T	R	O	L
D												
E												
F												
G												
H												

Tabla 5. Conteo celular de la línea celular Beas-2B caja 3. En la tabla se muestra la distribución de células contadas como viables en una caja de 96 pozos.

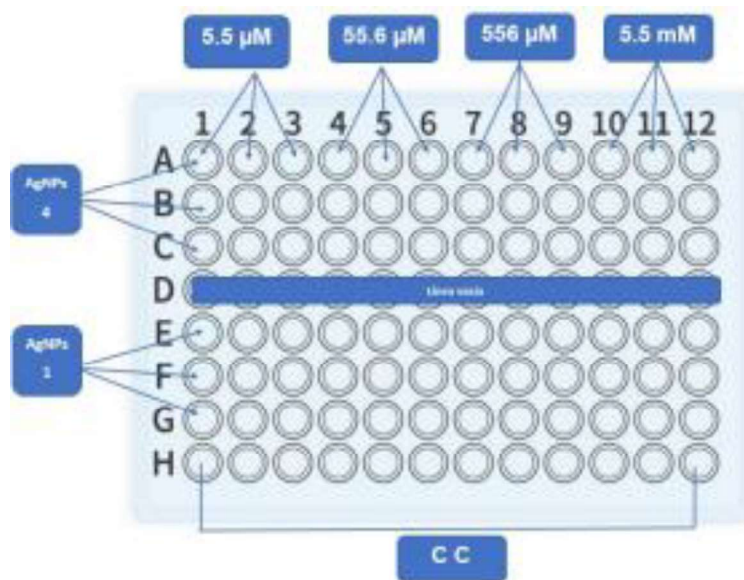
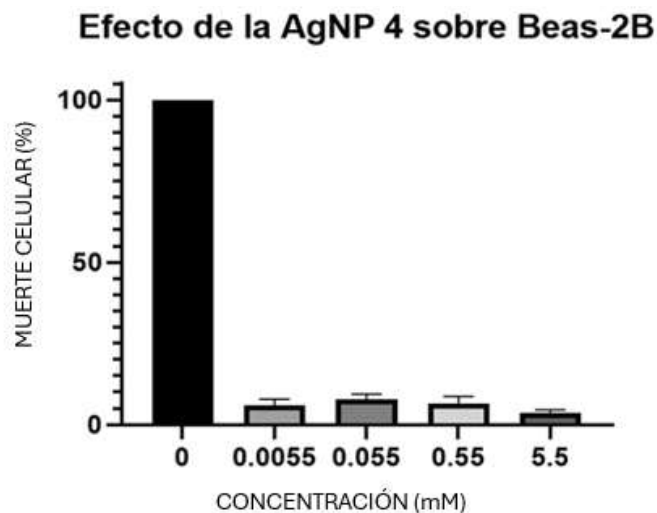


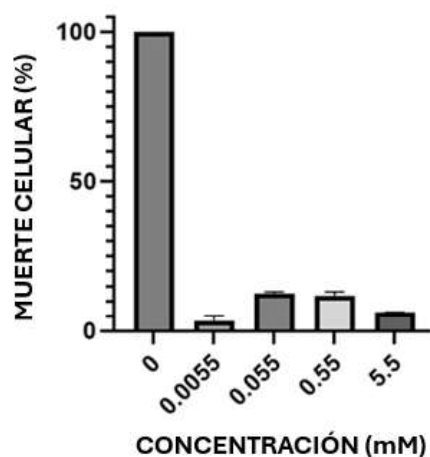
Figura 4. Representación de la placa con 96 pocillos. En el esquema se muestra la distribución de pozos en una placa de 96 pozos.

En la tabla superior, así como en la representación de una placa de 96 pozos se plasma la distribución de las diferentes concentraciones de AgNPs para el modelo celular tomado, así mismo se aprecia como el número de células va disminuyendo de acuerdo con cambio en el gradiente de concentración de AgNPs. Se muestran las concentraciones utilizadas yendo de menor a mayor

de izquierda a derecha, así como los controles de viabilidad (C.C). A continuación, se muestra lo obtenido con la línea celular Beas-2B.



Gráfica 1. Efecto de la AgNP 4 en la línea celular Beas-2B. Se visualiza la viabilidad celular de la línea Beas-3B en función de la concentración de las nanopartículas de plata con las que se incubaron durante 24 horas.



Gráfica 2. Promedio de viabilidad en función de la concentración de AgNPs administrada. Se muestra la comparativa respecto al promedio de las cajas 1,2 y 3 de la línea celular Beas-2B donde se visualiza la viabilidad celular de la línea trabajada en función de la concentración de nanopartículas de plata utilizadas (AgNPs 1 y 4).

6.2 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico multivariable para determinar si existen o no diferencias significativas en el efecto que induzcan las AgNPs en los diferentes cultivos celulares. En todos los casos se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado.

Primero se organizó y analizó la información básica, y luego se realizó el cálculo del ANOVA.

Corresponde a la línea Beas-2B:

Paso 1: Organización de los Datos

Se organizaron los datos por grupo, ensayo y concentración.

Ensayo 1, Caja 1 (AgNP4):

Concentraciones (mM): 5.5, 0.55, 0.055, 0.0055

Datos:

5.5	mM:	61000,	89000,	91000
0.55	mM:	102000,	160000,	186500
0.055	mM:	180000,	190000,	201500
0.0055	mM:	198500,	67500,	34000

Ensayo 2, Caja 2:

Concentraciones (mM): 5.5, 0.55, 0.055, 0.0055

Datos para AgNP 1:

5.5	mM:	15500,	10500,	9000
0.55	mM:	11500,	13000,	7000
0.055	mM:	9000,	21000,	12500
0.0055	mM:	8500, 6000, 6500		

Datos para AgNP4:

5.5	mM:	16000,	28000,	14000
0.55	mM:	30000,	14000,	50000
0.055	mM:	40000,	14000,	48000
0.0055	mM:	32000, 50000, 46000		

Ensayo 3, Caja 3:

Concentraciones (μ M): 5500, 550, 55, 5.5 (conversión necesaria para mM: 5.5, 0.55, 0.055, 0.0055)

Datos para AgNPs 1:

5.5	mM:	8000,	12000,	16000
0.55	mM:	26000,	20000,	22000
0.055	mM:	34000,	46000,	28000
0.0055	mM:	32000, 32000, 36000		

Datos para AgNPs 4:

5.5	mM:	14000,	14000,	18000
0.55	mM:	32000,	26000,	22000
0.055	mM:	38000,	34000,	24000
0.0055	mM:	34000, 32000,	40000	

Paso 2: Cálculo de Medias y Varianzas

Se calcularon las medias y varianzas de cada grupo (por concentración y tipo de AgNP). Se realizó este cálculo para cada grupo y cada ensayo.

Paso 3: Suma de Cuadrados

Suma de cuadrados total (SST): Variabilidad total en los datos.

Suma de cuadrados entre grupos (SSB): Variabilidad debida a las diferencias entre las medias de los grupos.

Suma de cuadrados dentro de los grupos (SSW): Variabilidad debida a la variabilidad dentro de los grupos.

Paso 4: Grados de Libertad

Grados de libertad total (DFT): Número total de observaciones menos uno.

Grados de libertad entre grupos (DFB): Número de grupos menos uno.

Grados de libertad dentro de los grupos (DFW): Número total de observaciones menos el número de grupos.

Paso 5: Promedios de los Cuadrados

Promedio de los cuadrados entre grupos (MSB): SSB dividido por DFB.

Promedio de los cuadrados dentro de los grupos (MSW): SSW dividido por DFW.

Paso 6: Cálculo del Estadístico F

El estadístico F se obtuvo dividiendo el promedio de los cuadrados entre grupos por el promedio de los cuadrados dentro de grupos.

Paso 7: Comparación con el Valor Crítico

Se comparó el valor de F obtenido con el valor crítico de F para los grados de libertad correspondientes y un nivel de significancia dado (usualmente 0.05).

Interpretación de Resultados:

En el análisis proporcionado:

Valor	de	F	calculado:	65535
Valor	crítico	de	F:	1.992

Probabilidad (p-valor): 0.2367

Conclusión:

Comparación del Estadístico F y el Valor Crítico: El valor de F calculado es significativamente mayor que el valor crítico de F, lo que sugiere inicialmente que podría haber diferencias significativas entre los grupos.

P-valor: Un p-valor de 0.2367 indica que no se rechaza la hipótesis al nivel de significancia del 5%.

Resultado del ANOVA:

No hay diferencias significativas: El análisis ANOVA muestra que no hay diferencias significativas en el efecto inducido por las AgNPs en la línea Beas-2B, dado que el p-valor es mayor que 0.05. Esto significa que las diferencias observadas entre los grupos podrían no deberse totalmente a un efecto real de las concentraciones de AgNPs en los cultivos de esta línea celular.

Este análisis concluye que, con los datos disponibles y el método de ANOVA aplicado, se puede afirmar que las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata no tienen un efecto citotóxico en la línea celular de células bronquiales normales Beas-2B.

Resultados del análisis ANOVA:

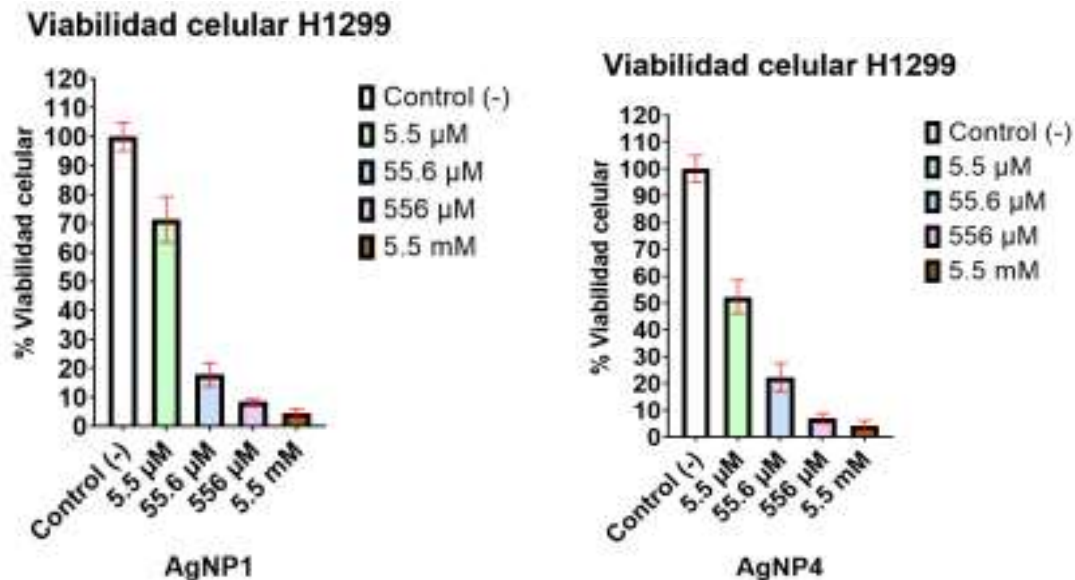
	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Agua y CC	1675833.3	1321333.3	692916.7
Medio	1174166.7	1321333.3	736666.7
	378280.8618	Desviación estandar	

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1675833.333	1	1174166.667	1174166.667	1.2583E+11
1321333.333	1	1321333.333	1321333.333	0
692916.6667	1	736666.6667	736666.6667	957031250

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.84966E+11	2	92483231481	65535	0,2367	1,992
Dentro de los grupos	0	0	65535			
Total	1.84966E+11	2				

6.3 Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó que el efecto de las AgNPs en los cultivos celulares de H1299 se observa un efecto dependiente de la concentración, siendo las concentraciones más elevadas (5.5mM) las que inhiben más del 60% la proliferación de las células tumorales.



Gráfica 3 y 4. Viabilidad celular de la línea H-1299 tratada con diferentes concentraciones de AgNPs. Se muestra la viabilidad celular de la línea H-1299 en función de la concentración de las nanopartículas de plata 1 y 2 con las que se incubaron durante 24 horas. Se graficó el promedio y la desviación estándar.

Se realizó el análisis estadístico, en este caso se utilizó un análisis ANOVA. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en el efecto inducido por las AgNPs en la línea Beas-2B, dado que el p-valor es mayor que 0.05. Esto significa que las diferencias observadas entre los grupos podrían no deberse totalmente a un efecto de las concentraciones de AgNPs en los cultivos de esta línea celular. Este análisis concluye que, con los datos disponibles y el método de ANOVA aplicado, se puede afirmar que las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata no tienen un efecto citotóxico en la línea celular de células bronquiales normales Beas-2B.

Tomando en consideración que esta última corresponde con las células sanas,

y comparando con la línea tumoral donde la viabilidad celular se vio afectada al aumentar la concentración de las nanopartículas, puede notarse una disminución un poco mayor en la formulación cuatro (de color verde) en comparación de la uno (de color café) que posee un porcentaje de viabilidad por debajo del 10%, tanto para la nanopartícula uno como para la número cuatro. Esto podemos atribuirlo a las diferentes propiedades fisicoquímicas entre formulaciones que influyen en la selectividad del cultivo.

El efecto de la viabilidad se puede asociar directamente con sus propiedades fisicoquímicas. Entre las principales diferencias podemos encontrar la longitud de las cadenas de PVP que recubren las NPs lo que nos lleva a asumir que mientras mayor sea su longitud, se tiene una menor estabilidad en el medio de dispersión. Caso contrario a las AgNP 1 y AgNP4 las cuales poseían una menor cantidad de PVP, esto se mira relacionado directamente con que exista una pequeña diferencia en la carga superficial y diámetro hidrodinámico, en este último se ve influido el tamaño de las nanopartículas, las cuales se notó que al tener un diámetro hidrodinámico grande también poseen una menor carga superficial.

Dados estos factores y estas propiedades fisicoquímicas se hace pensar que las formulaciones de AgNP1 y AgNP4 pueden llegar a ser más estables en un medio disperso, lo que afectará directamente al efecto citotóxico que presenten frente a la línea celular de cáncer de pulmón H1299 (Mitchell et al., 2021). La estabilidad de la nanopartícula influye, entre otras cosas, en la cantidad de iones de plata que pueden liberarse, así como en la internalización de las mismas.

En las gráficas que se muestran en la parte superior (1 y 2), se reportaron los datos obtenidos al evaluar la línea celular Beas-2B, de este análisis se puede decir que la viabilidad celular no se vio afectada en gran medida al aumentar la concentración de las nanopartículas, esto si solo fuese comparado entre las

diferentes concentraciones de nanopartículas, ocurriendo cambios mínimamente notorios, teniendo diferencias entre 5% y 10% de viabilidad entre cada una de las concentraciones.

Existen diferentes efectos que influyen en el efecto que tienen las AgNPs en la viabilidad de las células, diversas investigaciones muestran que dentro de lo más relevante son las propiedades fisicoquímicas. Una de las características que se ha reportado como de mayor influencia es la morfología, esta se ha asociado con la capacidad de las AgNPs de interactuar con las membranas celulares. Además, dada la posible agregación de las AgNPs se pueden encontrar resultados variables en los cultivos celulares (Mitchell et al., 2021).

Entre las principales diferencias que nos pueden explicar los resultados entre las diferentes formulaciones, podemos encontrar la longitud de las cadenas de PVP que recubren las NPs las cuales se hace pensar que mientras mayor sea su cantidad tiene una menor estabilidad en el medio de dispersión. Caso contrario a las AgNP 1 y AgNP4 las cuales poseían una menor cantidad de PVP, esto se mira relacionado directamente con que exista una pequeña diferencia en la carga superficial y diámetro hidrodinámico, en este último se ve influido el tamaño de las nanopartículas, las cuales se notó que al tener un diámetro hidrodinámico grande también poseen una menor carga superficial. Dados estos factores y estas propiedades fisicoquímicas es posible que las formulaciones de AgNP1 y AgNP4 pueden llegar a ser más estables en un medio disperso, lo que afectará directamente al efecto citotóxico que presenten frente a la línea celular de cáncer de pulmón H1299.

Destacando los aspectos fisicoquímicos de la nanopartícula de plata 1 podemos decir que la misma cuenta con un tamaño promedio de los núcleos metálicos de plata \emptyset Ag (nm) de 16.4 \pm 8.0, en lo que respecta a su distribución de tamaños por TEM (nm) es de 5-40, en el PVP (polivinilpirrolidona), K-15, en

cuestión de su diámetro hidrodinámico \varnothing Hidro (nm), es de 448.7, siendo el índice de polidispersidad (IPD) la misma tiene de 0.813, en lo que respecta a su potencial Z (mV) de -0.872 y su resonancia de plasmón superficial (λ) de 415, considerando en este aspecto al análisis TGA donde la plata metálica es de 1.14 \pm 0.02 con un PVP (% w/w) de 19.26 \pm 0.30, H₂O (% w/w) y para finalizar pero no menos importante respecto a la morfología es esférica (Antaki, Et al 2011).

Por otro lado, la nanopartícula 4 tiene un tamaño promedio de los núcleos metálicos de plata \varnothing Ag (nm) de 16.4 \pm 8.1, en lo que respecta a su distribución de tamaños por TEM (nm) es de 5-40, en el PVP (polivinilpirrolidona), K-30, su diámetro hidrodinámico \varnothing Hidro (nm), es de 483.2, siendo el índice de polidispersidad (IPD) la misma tiene de 0.555, y respecto a su potencial Z (mV) un valor de -0.464 y una resonancia de plasmón superficial (λ) de 406.549, con base con al análisis TGA, la plata metálica es de 1.19 \pm 0.01 con un PVP (% w/w) de 20.92 \pm 0.42, H₂O DE 77.89 \pm 0.80, así mismo cuenta con una morfología esférica, contemplando todo lo analizado, ambas nanopartículas tienen ciertas similitudes debido a sus propiedades mencionadas lo que las hace viables entre sí para poder realizar una comparativa analítica, estructural y gráfica debido a los resultados obtenidos mediante s 1 Y 4 (Mitchell et al., 2021).

Morfología (TEM, SEM)	Tamaño (TEM, DLS)	Nanopartículas	Diámetro hidrodinámico (DLS)	Concentración evaluada	Línea celular	IC50, Viabilidad %
Microscopía Electrónica de Transmisión, mostrando una forma esférica y un tamaño uniforme.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y se encontró un tamaño promedio de 20 nm.	Nanopartículas de platino recubiertas de polietilenglicol.	Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y se obtuvo un valor de 30 nm.	Las nanopartículas de platino recubiertas fueron evaluadas a una concentración de 50 µg/mL.	A549 (cáncer de pulmón)	La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de exclusión de azul de tripano, y se encontró una viabilidad del 80% después del tratamiento con las nanopartículas de platino recubiertas. El IC50 de las nanopartículas de platino recubiertas en la línea celular A549 fue de 25 µg/mL. Se observó una disminución significativa en la viabilidad celular en comparación con el grupo de control, y se encontró que las nanopartículas de platino recubiertas mostraron una mayor eficacia en la inhibición del crecimiento celular en el cáncer de pulmón.
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), mostrando una forma esférica y una distribución uniforme.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y se encontró un tamaño promedio de 50 nm.	Nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido fólico	Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y se obtuvo un valor de 60 nm.	Las nanopartículas de oro funcionalizadas fueron evaluadas a una concentración de 100 µg/mL.	H1975 (cáncer de pulmón)	La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de viabilidad MTT, y se encontró una viabilidad del 90% después del tratamiento con las nanopartículas de oro funcionalizadas. El IC50 de las nanopartículas de oro funcionalizadas en la línea celular H1975 fue de 50 µg/mL. Se observó una disminución en la viabilidad celular en comparación con el grupo de control, y se encontró que las nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido fólico mostraron una mayor capacidad de

						inhibición del crecimiento tumoral en las células de cáncer de pulmón.
Microscopía Electrónica de Transmisión, mostrando una estructura porosa y una distribución uniforme.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y se encontró un tamaño promedio de 100 nm.	Nanopartículas de sílice mesoporosa cargadas con paclitaxel.	Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y se obtuvo un valor de 120 nm.	Se manejó una concentración de 50 µg/mL.	H460 (cáncer de pulmón)	La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de viabilidad MTT, y se encontró una viabilidad del 70% después del tratamiento con las nanopartículas de sílice mesoporosa cargadas con paclitaxel. El IC50 de las nanopartículas de sílice mesoporosa cargadas con paclitaxel en la línea celular H460 fue de 30 µg/mL.
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), mostraron una forma esférica y distribución uniforme.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y se encontró un tamaño promedio de 30 nm.	Nanopartículas de cobalto.	Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y se obtuvo un valor de 40 nm.	Las nanopartículas de cobalto fueron evaluadas a una concentración de 200 µg/mL.	Células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (no especificadas)	La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo MTT, y se encontró una viabilidad del 90% después del tratamiento con las nanopartículas de cobalto. El IC50 de las nanopartículas de cobalto en las células de cáncer de pulmón de células no pequeñas fue de 150 µg/mL. Se observó una disminución en la viabilidad celular en comparación con el grupo de control.
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), mostrando uniformidad y forma esférica.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y un tamaño promedio de 20 nm.	Nanopartículas de plata.	Dispersión Dinámica de Luz (DLS) y el diámetro hidrodinámico fue de 30 nm,	Fueron evaluadas a una concentración de 50 µg/mL.	MCF-7 (cáncer de mama)	La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de viabilidad MTT, y se encontró una viabilidad del 80% después del tratamiento con las nanopartículas de plata. El IC50 de las nanopartículas de plata en la línea celular MCF-7 fue de 25 µg/mL. Se observó una disminución en la viabilidad celular en comparación con el

						grupo de control. Además, se observaron cambios morfológicos y la inducción de apoptosis en las células tratadas con las nanopartículas de plata.
--	--	--	--	--	--	---

Tabla 6. **Comparativa de resultados de diferentes líneas celulares de diversas publicaciones.** Resumen de resultados comparables con los encontrados en este trabajo que permiten establecer diferencias en actividad biológica según sus propiedades fisicoquímicas (Estrada. Cárdenas., et al 2010).

Las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs se han relacionado directamente con su actividad biológica. En este caso se observa que una de las características más importantes es la longitud del polímero utilizado para estabilizar las AgNPs. Es importante señalar que esto puede asociarse también con un mayor efecto de las AgNPs en las líneas tumorales debido a la tasa de proliferación que es mayor en comparación con la línea celular sana. Además, el tener una mayor necesidad de nutrientes y un metabolismo más acelerado, podría haber una mayor internalización de AgNPs.

7. CONCLUSIÓN

Las nanopartículas de plata Argovit™ han sido ampliamente reportadas por sus potenciales aplicaciones en diversas áreas, entre ellas, el tratamiento de cáncer. En este trabajo se evaluó el efecto en líneas celulares relacionadas con tejido pulmonar.

Los resultados en la línea celular sana BEAS-2B derivada de tejido bronquial muestran que las nanopartículas de plata Argovit™ no inducen efectos citotóxicos significativos. Esto sugiere que las AgNPs Argovit™ son biocompatibles con células bronquiales normales, lo que es crucial para su posible uso terapéutico, ya que minimiza el riesgo de daño a las células sanas durante el tratamiento.

Por otro lado, en el modelo de cáncer de pulmón H1299 se determinó una capacidad antiproliferativa notable de las AgNPs Argovit™, con una IC50 de 25 µg/mL. Comparación con los tratamientos de primera elección, esta capacidad antiproliferativa es tres veces más efectiva. Esta comparación demuestra el potencial de las AgNPs como una opción viable y posiblemente más eficiente para el tratamiento del cáncer de pulmón.

Además, se determinó que las nanopartículas de plata Argovit™ tienen una alta selectividad citotóxica contra las células tumorales en comparación con las células sanas. Esta selectividad se cuantificó de manera específica en base en los ensayos realizados ya que esta característica es fundamental, ya que uno de los principales problemas en el tratamiento del cáncer es la alta toxicidad y la falta de especificidad de los tratamientos convencionales. La alta selectividad de las AgNPs Argovit™ reduce el riesgo de efectos secundarios y daña mínimamente a las células sanas.

En relación con las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs Argovit™, se observó que características como el tamaño de partícula, la carga superficial y la estabilidad coloidal juegan un papel crucial en su efecto citotóxico y antiproliferativo. Específicamente, las nanopartículas de plata 1 y 4, las cuales fueron elegidas, mostraron una mayor eficiencia en la inhibición de la proliferación celular y una mayor selectividad hacia las células cancerosas.

Esto sugiere que la modificación y optimización de estas propiedades pueden mejorar significativamente el rendimiento terapéutico de las AgNPs.

Es por todo lo anterior que en el presente trabajo se determinó el potencial antiproliferativo de las AgNPs Argovit™, obteniendo una selectividad contra células cancerosas en comparación con células sanas, lo que se asoció con las propiedades fisicoquímicas específicas de las formulaciones evaluadas. Esto plantea una nueva aproximación al tratamiento del cáncer pulmonar con una opción de vanguardia como son las AgNPs. Las nanopartículas de plata inhibirán la proliferación y promoverán la muerte celular en la línea celular de cáncer de pulmón H1299, mientras que no presentarán efectos citotóxicos en la línea celular de células bronquiales normales BEAS-2B.

Las nanopartículas de plata Argovit™ presentan un alto potencial antiproliferativo contra células de cáncer de pulmón H1299 y muestran una selectividad citotóxica notable, preservando la viabilidad de las células bronquiales normales BEAS-2B. Estos hallazgos subrayan la relevancia de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas en su aplicación terapéutica y sugieren que las AgNPs Argovit podrían ofrecer una alternativa prometedora y menos tóxica para el tratamiento del cáncer de pulmón.

8. Referencias bibliográficas

1. Arrieta, O., Zatarain-Barrón, Z. L., Aldaco, F., Barrón, F., Báez-Saldaña, R., Campos-Gómez, S., Trejo, R., & De la Garza, J. (2019). Lung Cancer in Mexico. In *Journal of Thoracic Oncology* (Vol. 14, Issue 10, pp. 1695–1700). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.05.018>
2. Fahmy, H. M., Mosleh, A. M., Elghany, A. A., Shams-Eldin, E., Abu Serea, E. S., Ali, S. A., & Shalan, A. E. (2019a). Coated silver nanoparticles: synthesis, cytotoxicity, and optical properties. *RSC Advances*, 9(35), 20118–20136. <https://doi.org/10.1039/C9RA02907A>
3. Ferdous, Z., Al-Salam, S., Greish, Y. E., Ali, B. H., & Nemmar, A. (2019). Pulmonary exposure to silver nanoparticles impairs cardiovascular homeostasis: Effects of coating, dose and time. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 367, 36–50. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.006>
4. González-Vega, J. G., García-Ramos, J. C., Chavez-Santoscoy, R. A., Castillo-Quiñones, J. E., Arellano-García, M. E., & Toledano-Magaña, Y. (2022). Lung Models to Evaluate Silver Nanoparticles' Toxicity and Their Impact on Human Health. *Nanomaterials*, 12(13), 2316. <https://doi.org/10.3390/nano12132316>
5. Han, X., Na, T., Wu, T., & Yuan, B. Z. (2020). Human lung epithelial BEAS-2B cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227174>
6. Cruz-Ramírez, O. U., Valenzuela-Salas, L. M., Blanco-Salazar, A. Rodríguez-Arenas, J. AMier-Maldonado, P.A., García-Ramos, J. C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Toledano-Magaña, Y. (2021a). Antitumor Activity against Human Colorectal Adenocarcinoma of Silver Nanoparticles: Influence of [Ag]/[PVP]Ratio. *Pharmaceutics*, 13(7), 1000. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071000>.
7. Martini, N., & Melamed, M. R. (n.d.). *Multiple primary lung cancers*.
8. Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
9. Rosarin, F. S., Arulmozhi, V., Nagarajan, S., & Mirunalini, S. (2012). Antiproliferative effect of silver nanoparticles synthesized using amla on Hep2 cell line Asian Pacific Journal of Tropical Medicine Amla AgNPs Oxidative stress Cytotoxicity Antiproliferation. In the *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. www.elsevier.com/locate/apjtm
10. Sung, J. H., Ji, J. H., Park, J. D., Yoon, J. U., Kim, D. S., Jeon, K. S., Song, M. Y., Jeong, J., Han, B. S., Han, J. H., Chung, Y. H., Chang, H. K., Lee, J. H., Cho, M. H., Kelman, B. J., & Yu, I. J. (2009). Subchronic

- Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 108(2), 452–461. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn246>.
11. Agustí C, Rosell R. Tumores broncopulmonares. En: Farreras P, Roz-man C, editores. *Medicina interna*. 14.aed. Madrid: Harcourt,2000; p. 894-907.
 12. Antakli T, Schaefer RF, Rutherford JE, Read RC. Second primary lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2011;59:863-7.
 13. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA. (n.d.).
 14. Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., & Hull, D. R. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(1), 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
 15. William Strick. Nanotecnología.(z.d.). (2017) Genome.gov. National Human Genome Research Institute, <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Nanotecnologia>
 16. MORITA, K., et al. "Application 8 - A Cancer Treatment Strategy That Combines the Use of Inorganic/Biocomplex Nanoparticles With Conventional Radiation Therapy". En: NAITO, M.; YOKOYAMA, T.; HOSOKAWA, K.; NOGI, K. eds. *Nanoparticle Technology Handbook (Third Edition)*. Amsterdam. Netherlands: Elsevier, 2018, pp. 439-443. ISBN 978-0-444-64110-6
 17. Estrada Jorge-NCI-H1299 - CRL-5803 | ATCC. (z.d.). <https://www.atcc.org/products/crl-5803>
 18. Joseline Cardenas,- 10 Líneas Celulares. Diapositivas de Virología- Línea celular H1299. Docsity. (z.d.-b). <https://www.docsity.com/es/10-lineas-celulares/7520>.
 19. Ferdous, Z., Al-Salam, S., Greish, Y. E., Ali, B. H., & Nemmar, A. (2019). Pulmonary exposure to silver nanoparticles impairs cardiovascular homeostasis: Effects of coating, dose and time. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 367, 36–50. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.006>
 20. Ferdous, Z., & Nemmar, A. (2020). Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2375. <https://doi.org/10.3390/ijms21072375>
 21. Fizeşan, I., Cambier, S., Moschini, E., Chary, A., Nelissen, I., Ziebel, J., Audinot, J.-N., Wirtz, T., Kruszewski, M., Pop, A., Kiss, B., Serchi, T., Loghin, F., & Gutleb, A. C. (2019). In vitro exposure of a 3D-tetraculture representative for the alveolar barrier at the air-liquid

- interface to silver particles and nanowires. *Particle and Fibre Toxicology*, 16(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0297-1>
22. “Cáncer - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.” PAHO, <https://www.paho.org/es/temas/cancer>. Accessed 30 November 2022.