

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería
Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



“Evaluación de la respuesta biológica de nanopartículas de plata en modelos murinos”

TESIS

Que para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias

Presenta:
Lucía Margarita Valenzuela Salas

Bajo la dirección de:
Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez

Co-dirigido por:
Dra. Yanis Toledano Magaña

Tijuana, Baja California, México.

Mayo 2021

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 207

Tijuana, B. C., a 26 de Abril del 2021

C. Lucia Margarita Valenzuela Salas
Pasante de: Doctor en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS


Es propuesto, por los C.C. Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez

Dra. Yanis Toledano Magaña

Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema Evaluación de la respuesta biológica de nanopartículas de
plata en modelos murinos.

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

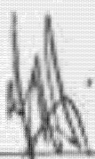
- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- MARCO TEÓRICO
- III.- METODOLOGÍA
- IV.- RESULTADOS
- V.- DISCUSIÓN
- VI.- CONCLUSIONES



Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez
Director de Tesis


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO


Dra. Yanis Toledano Magaña
Co-Directora de Tesis


Dr. Jose Luis González Vázquez
Director


Q. Noemi Hernández Hernández
Sub-Directora

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer al Dr. Luis Villarreal por haberme invitado a cursar mis estudios de doctorado bajo su dirección. Después de haber tocado puertas en varias instituciones, fue él quien me dio la mano y desde entonces me ha guiado y aconsejado durante todo este proceso. Excelente persona y gran amigo.

También quiero agradecer a la Dra. Yanis Toledano, quien hace varios años y como caída del cielo llegó al Bioterio para hacer una investigación con modelos animales y desde entonces ha sido mi mentora en esta área tan importante de las ciencias de la salud. Ambos con una gran calidad humana, sin celo de compartir sus conocimientos, los dos me han brindado su amistad, su confianza, me han abierto las puertas de sus laboratorios e incluso las puertas de sus casas. Me siento profundamente agradecida con ustedes dos. ¡De corazón, muchas gracias Yanis y Luis!

También quiero agradecer a mi gran amigo Román Chávez, quien con sus palabras y consejos supo despertar en mí el interés por estudiar un Doctorado y comenzar a tocar puertas.

Tambien quiero agradecer a la Dra. Nina Bogdanchikova y a la Red Internacional de Nanociencias y Nanotecnología por darme la oportunidad de trabajar con sus nanopartículas de plata y por permitirme ser parte de esta red de científicos reconocida ante CONACYT y que juntos hemos logrado grandes avances en el area de la nanotecnología.

Tambien agradezco enormemente el apoyo con su experiencia a Paris Mier y a Juan Carlos Garcia, quienes fueron parte fundamental para la elaboración de esta tesis y los dos artículos científicos que logramos publicar durante este proceso.

Y sobre todo agradezco el apoyo moral, psicológico y económico, así como el soporte con nuestros hijos cuando yo tuve que estar ausente, además agradezco su acompañamiento, sus palabras y sus consejos durante todo este porceso a quien es mi confidenete y mi mejor amigo y siempre me motiva a seguir adelante y a realizarme en mi carrera y en mi profesión, a mi esposo Moises López.

Contenido

Abreviaturas	6
RESUMEN.....	7
CAPITULO I.....	8
1.1 INTRODUCCIÓN	8
CAPITULO II.....	12
2.1 MARCO TEÓRICO	12
2.1.1 La nanotecnología y las nanopartículas de plata (AgNPs).....	12
2.1.3 Síntesis de nanopartículas de plata.....	12
2.1.4 Caracterización de nanopartículas de plata	14
2.1.5 Las nanopartículas de plata como alternativa a la quimioterapia para el tratamiento del cáncer	15
2.1.6 Efectos citotóxicos y genotóxicos de las AgNPs	17
2.1.7 Mecanismo de toxicidad de las AgNPs.....	19
2.1.8 Efectos tóxicos de la administración de AgNP por vía oral	21
2.1.9 Efectos de la administración de AgNPs por vía respiratoria	21
2.1.10 Efecto de las AgNPs después administración por vía dérmica.....	22
2.1.11 Efectos tóxicos de las AgNPs por otras vías	22
2.1.12 Efecto de las AgNPs en el medio ambiente.....	23
CAPITULO III.....	25
3.1 METODOLOGÍA.....	25
3.1.1 Nanopartículas de plata (AgNPs).....	25
3.1.2 Caracterización de las AgNPs-PVP	26
3.1.3 Ensayo de Melanoma -Fase <i>in vitro</i>	26
3.1.4 Ensayo de Melanoma - Fase <i>in vivo</i>	27
3.1.5 Analisis estadístico para el ensayo de Melanoma.....	29
3.1.6 Estudio de AgNPs con cubierta proteica (BioArgovit)	29
3.1.7 Evaluación del efecto antitumoral de BioArgovit <i>in vivo</i>	30
3.1.8 Actividad amebicida de BioArgovit <i>in vitro</i>	32
3.1.9 Evaluación toxicológica de BioArgovit.....	32
3.1.10 Estudios de toxicidad de BioArgovit <i>in vivo</i>	34
CAPITULO IV.....	36
4.1 Resultados	36
4.1.1 Resultados de ensayos con AgNPs-PVP (Argovit™).....	36
4.1.2 Resultados de la caracterización de nanopartículas de plata BioArgovit	46
CAPITULO V.....	58

5.1 Discusión.....	58
CAPITULO VI.....	67
6.1. Conclusiones.....	67
Referencias	69

Abreviaturas

ACT	Toxicidad Aguda por Clase
ADN	Acido Desoxirribonucleico
AFM	Microscopia de Fuerza Atómica
AgNPs	Nanopartículas de plata
ALT	Alanina Amino Transferasa
AOT	Bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio
AP	Fosfatasa Alcalina
APS	Aminopropiltriethoxisilano
AST	Aspartato Amino Transferasa
CBMN	Ensayo de Micronúcleos de bloqueo de citocinesis
CTAB	Bromuro de cetil trimetil amonio
DDL	Dispersión Dinámica de Luz
DL ₅₀	Dosis Letal Media
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMEA	Agencia Europea para la Evaluación de Productos Médicos
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
FDP	Toxicidad Aguda a dosis fija
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
HDA	Hexadecilamina
HPBL	Linfocitos de Sangre Periférica
ICH	Conferencia Internacional de Armonización
IPCS	Programa Internacional sobre Seguridad Química
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
MIPs	Macrófagos Intravasculares Pulmonares
MIPs	Macrófagos Intravasculares Pulmonares
NO	Óxido Nítrico
NPs	Nanopartículas
OECD	Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo
OLA	Oleilamina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEG	Polietilenglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TEM	Microscopia de Transmisión de Electrón
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UDP	Prueba de Arriba y Abajo
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta Visible
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VLD	Velocimetría de Láser Doppler

RESUMEN

Los nanomateriales evolucionan rápidamente para producir alternativas biomédicas seguras y efectivas, principalmente las nanopartículas de plata (AgNPs). Las propiedades antibacterianas, antivirales y antitumorales de los AgNPs las convierten en un andamio recurrente para producir nuevas opciones de tratamiento. En esta tesina se informa sobre dos nuevas formulaciones de AgNPs (PVP-AgNPs y AgNP-proteica), incluyendo su caracterización completa, la evaluación de la actividad antitumoral de las dos formulaciones *in vitro*, además de la evaluación *in vivo* de la formulación de PVP-AgNPs y de la actividad amebicida de las AgNPs-priteicas. En cuanto a la formulación AgNP-proteica se encontró que la principal vía de muerte en células tumorales HCT-15 es la apoptosis, que probablemente es estimulada por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las mitocondrias. Se sugiere un mecanismo similar para la actividad antiproliferativa observada en los trofozoítos. Todos los resultados de la evaluación toxicológica sugieren una Categoría 5 (prácticamente no tóxica) del Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Sustancias Químicas para las AgNPs recubiertos de proteína después de la administración oral durante un período corto e instan a completar su perfil toxicológico preclínico. Por otro lado, en las pruebas realizadas con las PVP-AgNPs en un modelo murino de melanoma, los ratones supervivientes tratados no muestran daño genotóxico determinado por cuantificación de frecuencia de micronúcleos en células de sangre periférica. Estos resultados exhiben la notable actividad antitumoral de una formulación de PVP-AgNPs no genotóxica y constituyen el primer avance hacia la aplicación de estos AgNPs para el tratamiento del melanoma, que podría reducir considerablemente los efectos adversos provocados por los quimioterapéuticos actualmente aplicados.

Palabras clave: Nanopartículas de plata; modelos murinos; evaluación biológica; ensayos *in vivo*.

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

El programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería (MyDCI) de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC, aprobó el 10 de septiembre del 2008 la alternativa de titulación de su programa de doctorado por publicación de dos artículos JCR en donde el estudiante sea primer autor. Como resultado del trabajo multidisciplinario e interinstitucional se logro publicar dos artículos científicos en revistas de alto impacto. Las instituciones involucradas en este trabajo fueron la Facultad de Ciencias de la Salud (FACISALUD), la Facultad de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología y la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC campus Tijuana. La Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño y la Escuela de Ciencias de la Salud de la UABC campus Ensenada. La Facultad de Química y la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como el Departamento de Físicoquímica de Nanomateriales CONACyT UNAM CNYN en Ensenada. También participaron investigadores adscritos al Programa Internacional de Medicina de la Universidad Autónoma de Guadalajara en el Estado de Jalisco, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Occidente ubicada en el Estado de Sinaloa, además del Department of Technology of Organic Substances and Polymer Materials y la Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences de la Tomsk Polytechnic University, ambas en Tomsk, Russia.

El primero artículo titulado *Antiproliferative and Antitumour Effect of Nongenotoxic Silver Nanoparticles on Melanoma Models* se publicó en la revista *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* en el 2019. Cabe destacar que el modelo murino de melanoma lo llevé a cabo como alumna de doctorado bajo la dirección de la Dra. Yanis Toledano Magaña y del Dr. Luis Jesús Villarreal Gomes en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud. La revista antes mencionada es cuartil 1, tiene un factor de impacto de 5.076. Hasta el momento este artículo se ha citado en 10 publicaciones científicas.

El segundo artículo publicado como primer autor tiene como título *New Protein-Coated Silver Nanoparticles: Characterization, Antitumor and Amoebicidal Activity, Antiproliferative Selectivity, Genotoxicity, and Biocompatibility Evaluation*. Fue publicado en la revista *Pharmaceutics* en enero de 2021. Esta revista también es cuartil 1 con un factor

de impacto de 4.421. En esta ocasión, la parte experimental *in vivo* las lleve a cabo en el Bioterio de FACISALUD igualmente como alumna de doctorado bajo la dirección de la Dra. Yanis Toledano Magaña y del Dr. Luis Jesús Villarreal Gomes, y el resto de los experimentos fueron llevados a cabo en colaboración con investigadores de los centros de investigacionesmencionados anteriormente.

Como se puede observar, en ambos trabajos se probaron formulaciones de nanopartículas de plata, ya que tenemos un gran interés en contribuir con nuevos conocimientos acerca de este metal en el área de la nanotecnología.

En los últimos 10 añosla nanotecnología ha evolucionado para mejorar las propiedades de los materiales para aplicaciones biomédicas como antimicrobianos (Pelgrift et al., 2013), antivirales (Deshmukh et al., 2016), sistemas de administración de fármacos, tratamiento del cáncer (Awasthi et al., 2018) y bioimagen (Rafique et al. 2019), entre otros (Saji et al., 2010; Khan et al., 2018). La nanomedicina y la nanotoxicología se centran en determinar la eficacia y el riesgo de los nanomateriales utilizados para aplicaciones biomédicas y terapéuticas específicas. Sin embargo, la falta de sistematicidad en la evaluación de la toxicidad y los limitados datos fisicoquímicos reportados para la mayoría de los nanomateriales dificultan determinar su uso seguro (Gomes et al. 2018; Akhtar et el., 2018). Concretamente, las nanopartículas de plata (AgNP) se encuentran entre los nanomateriales más estudiados y aplicados en el campo biomédico (Zhang et al. 2019). El beneficio y los efectos tóxicos de las nanopartículas de plata se han relacionado con sus propiedades fisicoquímicas, como su tamaño, forma, recubrimiento y potencial zeta (Wei et al. 2015). Uno de los principales contribuyentes sugeridos a los efectos biológicos provocados por AgNP es la liberación de iones Ag +, que induce especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que lleva a un desequilibrio redox (Xu et al. 2020), sin embargo, aún no se han aclarado todos los mecanismos de acción de los AgNP.

Recientemente, muchos grupos de investigación, determinaron que la nanopartícula completa y no la liberación de iones de plata fueron los principales responsables de la sobreproducción de ROS que lleva a la muerte a las células expuestas a los AgNP (Ivasket al. 2015; Cvjetko et al. 2017; Casillas-Figueroa et al. 2020). La sobreproducción de ROS es una estrategia eficaz empleada para eliminar o disminuir el crecimiento de cultivos de

alta proliferación sensible al desequilibrio redox, como parásitos y tumores (Nowak-Sliwinska et al., 2019; Poillet-Perez et al., 2015; Boros, Dyson y Gasser, 2020; Toledano-Magaña, 2017). En México, ambas enfermedades de alta proliferación son problemas de salud pública. Los tumores son la cuarta causa de muerte; mientras tanto, las enfermedades parasitarias afectan a los niños menores de un año ya las personas con sistemas inmunológicos comprometidos, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2020).

Para el desarrollo de esta tesina doctoral se ha estudiado una formulación de PVP-AgNP disponible comercialmente conocida como Argovit®TM que ha sido muy eficaz como antimicrobiano (Spinoso-Castillo et al. 2019; Vazquez-Muñoz et al. 2019), antifúngico (Vazquez-Muñoz et al. 2019) y antiviral (Bogdanchikova et al. 2016; Borrego et al., 2016; Ochoa-Meza et al. 2019), que también ha sido un factor determinante en la rápida curación de las úlceras del pie diabético (Hernandez et al. 2017). Además, se ha demostrado que esta formulación también inhibe el crecimiento de cultivos de células tumorales humanas de mama, pulmón, próstata, cuello uterino y colon por inducción de apoptosis probablemente desencadenada por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y sin evidencia de daño en el ADN a concentraciones inhibitoras efectivas (Juarez-Moreno et al. 2017).

Considerando la actividad inhibidora del crecimiento de estos PVP-AgNP en líneas celulares tumorales humanas, en este trabajo mostramos un estudio sistemático del efecto *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de plata bien caracterizadas en modelos de melanoma murino, para lo cual se analizó la citotoxicidad *in vitro*, la inducción de la vía de muerte celular, la producción de ROS y el modelo de melanoma subcutáneo en ratones C57BL6 siguiendo el protocolo recomendado por el Instituto Nacional de Salud (NIH) (Overwiji y Restifo, 2001), donde se evaluó el volumen tumoral, la tasa de supervivencia, los parámetros hematológicos y la genotoxicidad de los tratamientos.

Además de este primer estudio, evaluamos la actividad antiproliferativa de una nueva formulación de AgNP recubierta de proteína (BioArgovit) en cultivos de células de adenocarcinoma colorrectal humano (HCT-15), trofozoítos de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS y cultivos primarios de ratones, es decir, hígado, bazo, riñón y cerebro BALB/c. Para mejorar la biocompatibilidad de la formulación de AgNP y determinar si

la relación [agente de recubrimiento] / [metal] juega un papel significativo en la selectividad de la actividad biológica de los AgNP. Asimismo, determinamos el potencial genotóxico de esta formulación a través de la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica humana (HPBL) utilizando el ensayo de micronúcleos de bloqueo de citocinesis (CBMN), determinando su dosis letal media (LD50) en ratones BALB/c y un análisis histopatológico. Nuestros resultados mostraron que BioArgovit tiene una actividad antiproliferativa y antiparasitaria selectiva sin evidencia de efectos adversos citotóxicos, genotóxicos o tóxicos *in vitro* e *in vivo* para sistemas sanos. Estos hallazgos abren nuevas oportunidades en la formulación de nanomateriales selectivos y seguros desarrollados para aplicaciones biomédicas.

CAPITULO II

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 La nanotecnología y las nanopartículas de plata (AgNPs)

La nanotecnología se caracteriza por trabajar con materiales de tamaño entre 1 a 1000 nanómetros, con propiedades fisicoquímicas únicas, útiles en el campo de la Biomedicina y la terapia antitumoral (Butler et al., 2015)(Leyva Gómez, 2013). Las nanopartículas (NPs) poseen una mayor relación de superficie-volumen y por tanto una mayor superficie de contacto con el entorno (Ávalos et al., 2015).

Actualmente las AgNP, son utilizadas en una amplia gama de productos, por ejemplo, dispositivos electrónicos, cosméticos, electrodomésticos, producción textil y de alimentos así como, productos médicos (Zhang et al., 2016)(de Lima et al., 2012)(Brkić Ahmed et al., 2017)(Leyva Gómez, 2013)(Wei et al., 2015). Dentro de los nanomateriales metálicos, las nanopartículas de plata (AgNPs) son las más comercializadas debido a su potencial como antimicrobiano, (Ávalos et al., 2015) y se pueden encontrar en el mercado en apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas. Además, también se está evaluando la utilización de las AgNPs contra el tratamiento de enfermedades que requieren una concentración mantenida de fármaco en sangre o con un direccionamiento específico a células u órganos como ocurre con el virus del VIH-1, ya que se ha demostrado que el tratamiento in vitro con AgNPs interacciona con el virus e inhibe su capacidad para unirse a las células del huésped(Ávalos et al., 2013). Como resultado de estas aplicaciones, la exposición a las AgNPs se ha incrementado, a pesar de que poco se conoce acerca del impacto potencial de las NPAg en el ser humano y a la salud ambiental (Ávalos et al., 2015).

2.1.3 Síntesis de nanopartículas de plata

La nanotecnología y la química sintética moderna han sido utilizadas para establecer una gran cantidad de métodos para la síntesis, cada uno de ellos con ventajas y desventajas bien conocidas (Chaloupka et al., 2010). En general, los métodos de síntesis de AgNP se clasifican en *top-down* y *bottom-up*(Zhang et al., 2016). Los primeros utilizan métodos

físicos y procesos de molienda con el objetivo de reducir el tamaño de agregación del material hasta llegar a un tamaño nanométrico mientras que, los segundos, se refieren a la generación de AgNPs a partir de soluciones coloidales, por lo tanto, la obtención de las AgNPs se hace por medio de la agregación de partículas partiendo de una dispersión molecular (Leyva Gómez, 2013). La síntesis de nanopartículas en solución coloidal requiere del empleo de métodos que permitan obtener un control preciso sobre el tamaño y la forma de las nanopartículas para así obtener un conjunto de partículas monodispersas que presenten una propiedad determinada (Zhang et al., 2016).

Para que la síntesis se lleve a cabo, es necesario el empleo de un precursor metálico, un agente reductor, un agente estabilizante (ver Tabla 1). El mecanismo de reducción de iones plata consta de dos etapas que son, la nucleación y el crecimiento. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades relativas de estos dos procesos que, a su vez influyen en los parámetros de reacción como concentración, temperatura, pH, poder reductor, etc. Los parámetros que están influenciados por el método de síntesis utilizado son el diámetro y tamaño de las NPs, distribución de tamaños, forma de las NP, estabilidad, inclusión de conchas de ligandos y agentes de remate que protegen el núcleo de las NPs, el rendimiento químico de la reacción y la presencia de impurezas (Chaloupka et al., 2010).

Otra clasificación de los métodos para la síntesis de nanopartículas son: métodos químicos, métodos físicos y métodos biológicos (Wei et al., 2015), cada uno de ellos permite obtener AgNP con una gran variedad de características. Algunos de los métodos más utilizados son el método Creighton, el Turkevich, el Lee-Meidel, el Liz-Marzán, el Murphy, por mencionar algunos, además de los llamados métodos “verdes”(Monge, 2009) y la biosíntesis de NPs utilizando varias especies de bacterias y hongos (Chaloupka et al., 2010).

Tabla 1. Métodos para la obtención de AgNPS

Precursor	Reductor	Estabilizante
AgNO ₃	Citrato	
AgNO ₃	NaBH ₄	
AgNO ₃	Ac. Ascórbico	
AgNO ₃	Poliolés	PVP
AgNO ₃	β-D-glucosa	Almidón
[Ag(NH ₃) ₂] ⁺	Azúcares	
AgNO ₃	DMF	APS
AgNO ₃	DMF	PVP
Ag(COOR)	Termólisis	
Ag(COOCH ₃)	Acetaldehido	HDA
Ag(COOCH ₃)	OLA	OLA
[Ag(Mes)] ₄	Termólisis	HDA
AgNO ₃	Ac. Ascórbico	CTAB
AgNO ₃	N ₂ H ₄ ·H ₂ O	AOT
AgNO ₃	Radiación UV	PVP
AgNO ₃	Radiación UV	PEG
[Ag(C ₆ F ₅)]		HDA

APS = aminopropiltriétoxissilano, PVP = polivinilpirrolidona, HDA = hexadecilamina, OLA = oleilamina, CTAB = Bromuro de cetil trimetil amonio, AOT = bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio, PEG = polietilenglicol.

Tomado de: Monge M. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Investig Quim.* 2009;(August):33–41.

2.1.4 Caracterización de nanopartículas de plata

Para evaluar la calidad de las AgNPs se debe de analizar el tamaño de la partícula, la morfología, el potencial zeta, la estabilidad y el perfil de resonancia de plasmones (Leyva Gómez, 2013). La evaluación por medio de Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-vis) permite medir la actividad del plasmón de las AgNPs (Vazquez-Muñoz et al., 2017)(Leyva Gómez, 2013). Un plasmón es el fenómeno vibratorio típico de los plasmas que se produce al interaccionar las cargas libres con la radiación electromagnética de baja frecuencia de las nanopartículas (Alberto et al., 2012).

La evaluación de la distribución del tamaño de la partícula se realiza mediante la técnica de Dispersión Dinámica de la Luz (DDL). Esta permite analizar la distribución el tamaño

de las partículas y consiste en un haz de luz producido por una lámpara de helio-neón que es filtrado a través de un monocromador. La forma de la AgNPs se analiza mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) o también mediante la Microscopia Electrónica de Transmisión (MET). El potencial Z se puede medir por medio de Velocimetría de Láser Doppler (VLD) (Leyva Gómez, 2013). El método de Microscopia de Transmisión de Electrón (TEM) es una importante técnica utilizada para obtener medidas cuantitativas de partículas o tamaño de grano, además de medir la distribución y evaluar la morfología (Zhang et al., 2016).

La Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) es utilizada para evaluar la dispersión y agregación de los nanomateriales, además de evaluar el tamaño, la forma y la estructura. También puede caracterizar la interacción con nanomateriales con las capas bi-lipídicas (membrana celular) en tiempo real (Zhang et al., 2016).

También es posible medir la toxicidad mediante la evaluación de la generación de EROs. Esta se puede realizar por medio del kit de detección de EROS celular DCFDA de Abcam (ab113851). El reactivo permeable a las células DCFDA es un colorante fluogénico utilizado para medir el hidroxilo, peróxilo y cualquier otra actividad de EROs dentro de la célula. Una vez dentro de la célula, el DCFDA es desacetilado por esterasas celulares, lo que produce un compuesto fluorescente, que luego es oxidado por EROs en DCF que es altamente fluorescente, tienen un máximo de excitación de 495 nm y espectro de emisión de 529 nm (Juarez-Moreno et al., 2017).

2.1.5 Las nanopartículas de plata como alternativa a la quimioterapia para el tratamiento del cáncer

En cuanto a los tratamientos disponibles para el cáncer, la quimioterapia tiene grandes ventajas respecto a la radioterapia y la cirugía, ya que asegura que el fármaco alcance el sitio de afección e incluso lo sitios donde hay metástasis. Algunos de los fármacos utilizados en las quimioterapias son la vinblastina, la doxorubicina, el taxol, y el cisplatino (Vazquez-Muñoz et al., 2017).

Todos los tratamientos contra el cáncer como la quimioterapia, radiación, anticuerpos monoclonales y su combinación con radioinmunoterapia, presentan efectos secundarios adversos debido a su alta citotoxicidad y genotoxicidad. Esto ocasiona un daño colateral

en las células sanas e induce inmunosupresión transitoria durante el tratamiento anti-oncogénico, lo que reduce la calidad de vida de los pacientes con cáncer (Chaloupka et al., 2010).

Aunque la quimioterapia es fundamental para el tratamiento de esta enfermedad, sus efectos tóxicos se presentan en las células cancerígenas y a nivel sistémico (Martin et al., 2014)(Ferreiro et al., 2003).La gran mayoría de los fármacos quimioterápicos afectan negativamente el sistema hematopoyéticos. Los fármacos citostáticos pueden aumentar el riesgo de infecciones graves, formación de tromboémbolos, hemorragias, anemia e incluso neoplasias secundarias en la médula ósea a largo plazo. Las infecciones son la mayor causa de muerte y enfermedades alternas en pacientes con cáncer, debidos a que los neutrófilos son las células encargados de la defensa contra infecciones bacterianas y fúngicas (Ferreiro et al., 2003).

Entre los efectos citotóxicos en células normales, los efectos gastrointestinales son los más frecuentes. Las náuseas, los vómitos y los trastornos del ritmo intestinal como son la diarrea o el estreñimiento, son efectos secundarios adversos de casi toda quimioterapia. La alopecia es la toxicidad más frecuente que ocasiona el tratamiento con antraciclinas (adriamicina). La alopecia secundaria a las antraciclinas suele ser universal y se recupera tras finalizar el tratamiento. En las pacientes premenopáusicas la quimioterapia puede producir amenorrea. Los trastornos del ciclo menstrual no son raros. En ocasiones, las menstruaciones son muy abundantes, y se precisa un aporte férrico para evitar la anemia. La anemia se suele presentar como una toxicidad acumulada tras varios ciclos de tratamiento. El aporte de hierro puede ser de ayuda. Es más habitual que la anemia sea secundaria a los desarreglos del ciclo menstrual(Escobedo, n.d.).

Existe un esfuerzo global para desarrollar nuevos métodos que superen las deficiencias de la quimioterapia, disminuyendo el tamaño de los tumores sin dañar a las células sanas aledañas y evitando la aparición de recaídas y la adquisición de resistencia a fármacos. En este sentido, la Nanotecnología ha demostrado ser una de las tecnologías más prometedoras. La nanotecnología es una ciencia de punta del siglo XXI, que permite el uso y aplicación de nanomateriales en la medicina y la biología en un campo con un alto potencial de impacto tecnológico y de innovación en la resolución de enfermedades de importancia mundial(Chaloupka et al., 2010)(Martin et al., 2014)(Franci et al., 2015).

2.1.6 Efectos citotóxicos y genotóxicos de las AgNPs

Se ha descrito ampliamente sobre los efectos citotóxicos y genotóxicos de las AgNPs, dicha generación de efectos toxicológicos en ocasiones genera percepciones negativas sobre su uso como tratamiento para diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer. Sin embargo, la toxicidad por sí sola puede ser muy útil para el tratamiento de cáncer debido a que se busca precisamente esta característica en el diseño de nuevos tratamientos (Wei et al., 2015). Una de las lesiones causadas por las AgNPs que más se conoce es la argiria (McShan et al., 2014), que se define como coloración gris de la piel. Estudios in vivo han demostrado que la exposición por largos periodos a AgNPs se asocia con argiremia (elevada concentración de Ag en la sangre) (Chaloupka et al., 2010). Los factores que están involucrados en la toxicidad de las AgNPs son su pequeño tamaño, su gran superficie de contacto, su composición química, las propiedades de su superficie (Ávalos et al., 2015), el estado de aglomeración, la forma, la solubilidad y la carga superficial (Ávalos et al., 2013). Por un lado, el tamaño y la superficie de las NPs están en estrecha relación debido a que conforme disminuye el tamaño de las AgNPs, aumenta la superficie específica lo cual a su vez deja un mayor número de átomos expuestos en la superficie disponibles para realizar las reacciones redox, reacciones fotoquímicas e interacciones fisicoquímicas con las células. Es decir que, entre más pequeñas sean las AgNPs son más tóxicas (Hou et al., 2017). Por otro lado, pueden ocasionar la disolución de los materiales y en consecuencia, liberar iones plata (Ag^+), los cuales son altamente tóxicos (McShan et al., 2014). Las NPs en general tienden a formar aglomerados o agregados. Los aglomerados se caracterizan por estar unidos por fuerzas relativamente débiles de tipo van der Waals, electrostáticas o de tensión superficial, en cambio, los agregados son grupos de partículas fuertemente asociadas lo que hace difícil su redispersión. Ambos factores influyen en la toxicidad debido a que las NPs agrupadas tienen menor superficie de contacto (Lin et al., 2014).

Se ha comprobado que las formas de triángulo truncado son las más tóxicas y las esféricas las menos tóxicas. En cuanto a la carga de la superficie, las AgNP estabilizadas con citrato con cargas negativas son menos tóxicas que las estabilizadas con polietilamina ramificada con cargas superficiales positivas (Ávalos et al., 2013).

Por su tamaño nanométrico, los nanomateriales pueden penetrar fácilmente a través de los capilares e ingresar a los órganos de interés (Butler et al., 2015). La exposición a las AgNPs puede ser por contacto con la piel, administración oral, inhalación, a través de las membranas mucosas y por vía sanguínea (Wei et al., 2015). Estudios demuestran que tanto la vía de administración como el tipo celular influyen drásticamente en la citotoxicidad de las AgNPs (Butler et al., 2015).

No hay diferencia significativa entre la letalidad en animales microscópicos completos como los nematodos y la letalidad en cultivos celulares de mamíferos, o en líneas de células cancerosas. La concentración letal se encuentra entre 10^0 a 10^2 $\mu\text{g/ml}$ de plata. En cultivos de líneas celulares la mayoría de los trabajos reportan una DL_{100} cerca de 10^1 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ (Vazquez-Muñoz et al., 2017). La mayoría de los estudios reportan una concentración inhibitoria de 10^{-2} a 10^2 $\mu\text{g/ml}$ de plata y más de 90% de inhibición en las concentraciones cercanas a 10^1 de plata, además que no hay diferencias en el nivel de toxicidad respecto a la complejidad de los sistemas biológicos (Kang et al. 2011).

Las consecuencias biológicas de las interacciones entre las células y las NPs también dependen del mecanismo de entrada y la distribución intracelular de la NP. Las vías de internalización de los materiales en las células se clasifican típicamente en aquellos mediados por clatrina y caveolas, endocitosis, fagocitosis, macropinocitosis y pinocitosis (ver Figura 1). Se ha descrito que el mecanismo de entrada y la distribución dependen del tamaño de la AgNPs (Brkić Ahmed et al., 2017).

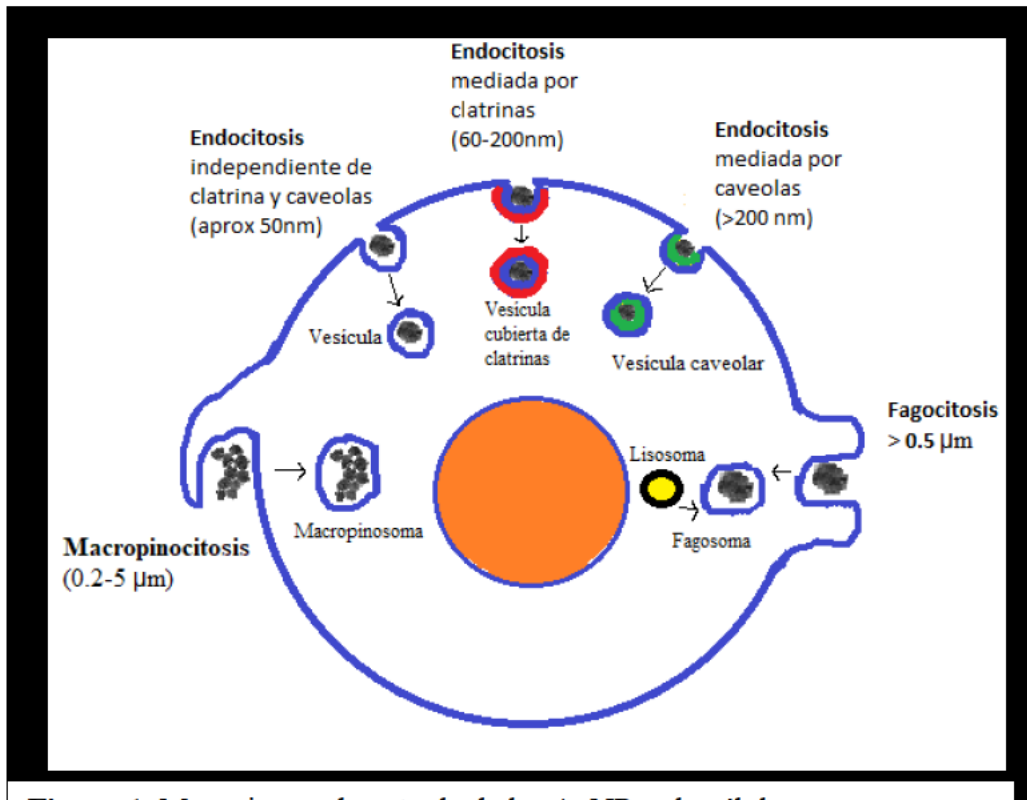


Figura 1. Mecanismos de entrada de las AgNPs a la célula.

Tomado de: Brkić Ahmed L, Milić M, Pongrac IM, Marjanović AM, Mlinarić H, Pavičić I, et al. Impact of surface functionalization on the uptake mechanism and toxicity effects of silver nanoparticles in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol.* 2017;107:349–61.

Las personas pueden exponerse a las AgNPs por contacto con la piel, administración oral, inhalación, inyección intravenosa, etc. Una vez ingresadas al cuerpo humano, las AgNPs pueden someterse a una serie de procesos tales como la unión y la reacción con proteínas, la fagocitosis, la deposición, despeje y la translocación (Ávalos et al., 2015).

2.1.7 Mecanismo de toxicidad de las AgNPs

La generación de Especies reactivas de Oxígeno (EROs) y el estrés oxidativo son los dos mecanismos principales de toxicidad (ver figura 2.) (McShan et al., 2014). Cuando el equilibrio entre las EROs y los sistemas de defensa antioxidantes del organismo se rompen, se produce el denominado estrés oxidativo. Los mecanismos de defensa de las células son las proteínas y enzimas con grupos tioles, por ejemplo, glutatión, tioredoxina, superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa de tioredoxina. Todos ellos neutralizan el estrés oxidativo de las EROs generado en gran medida por el metabolismo energético mitocondrial (Ávalos et al., 2013). Se cree que las AgNPs pueden disminuir los

mecanismos de defensa antioxidante, a través de la reducción de glutatión e inactivación de la SOD, lo cual promueve la peroxidación lipídica y en consecuencia, la acumulación de EROs y el llamado estrés oxidativo, lo cual a su vez provocan una gran cantidad de eventos fisiológicos y celulares incluyendo el estrés, perturbación y destrucción de la mitocondria, apoptosis (Hou et al., 2017), inflamación (Ávalos et al., 2013), aberraciones cromosomales, arresto del ciclo celular en la fase G2/M, activación de enzimas catabólicas, además de la deformación del citoesqueleto (Juarez-Moreno et al., 2017)(Brkić Ahmed et al., 2017)(de Lima et al., 2012).

Citotoxicidad de las AgNPs y producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs).

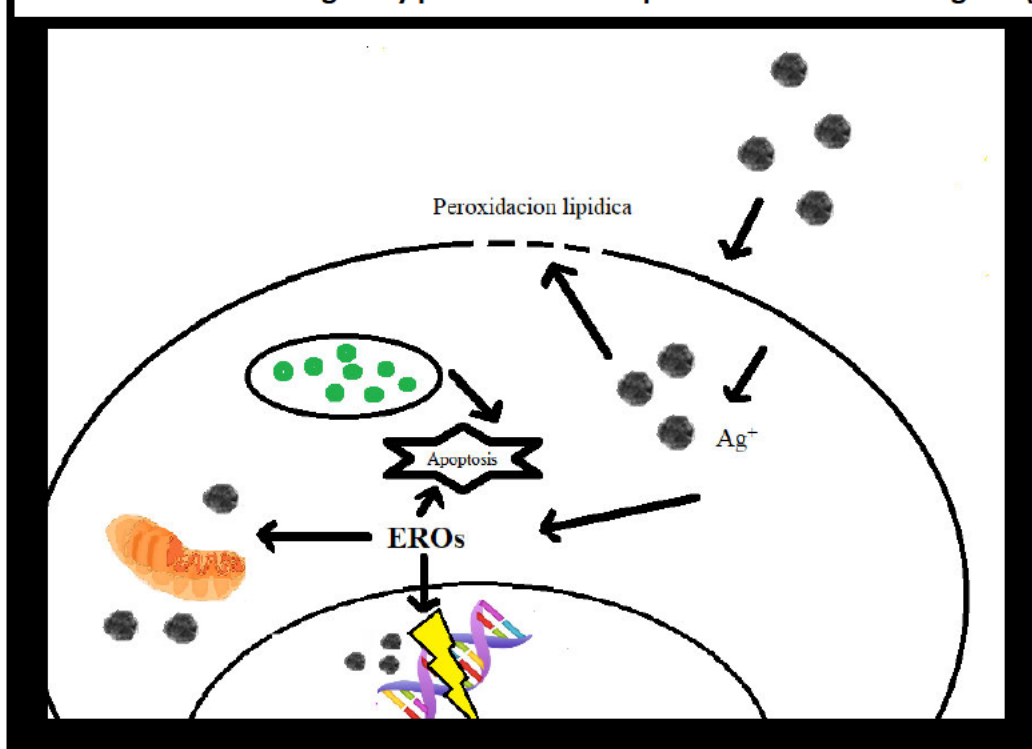


Figura 2. Esquema que representa los mecanismos por los que las AgNP inducen citotoxicidad. Tomado de: Wei L, Lu J, Xu H, Patel A, Chen ZS, Chen G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov Today*. 2015;20(5):595–601.

Las mitocondrias son centros importantes de señalización durante la apoptosis, y la pérdida de la integridad mitocondrial puede ser inducida o inhibida por muchos reguladores apoptóticos (Guo et al., 2013). Las AgNPs actúan activando la vía intrínseca de apoptosis, ya que inducen la liberación mitocondrial de citocromo c al citosol, además, provocan la pérdida del potencial de membrana mitocondrial como resultado de la baja regulación de los niveles proteicos de Bcl-2 además de un incremento de los niveles intracelulares de la proteína Bax. El citocromo c liberado al citosol provoca la activación

de la caspasa 9 y la caspasa 3, lo que activa el proceso de apoptosis (Ávalos et al., 2013).

También se ha observado que las AgNP inducen la liberación de marcadores proinflamatorios, principalmente el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), macrófagos intravasculares pulmonares (MIPs), además del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (Ávalos et al., 2013). Se cree que la toxicidad de las AgNPs se debe a la liberación de iones Ag⁺ en lugar de a las características de las AgNPs *per se* (Vazquez-Muñoz et al., 2017).

Algunos de los daños al DNA consisten en rupturas de las cadenas de ADN, inducción de micronucleos y aberraciones cromosomales (Ávalos et al., 2015). De hecho, el daño al DNA incrementa en la inestabilidad genética, lo que se asocia con el desarrollo de cáncer, es por esta razón que la evaluación genotóxica es vital para asegurar la bioseguridad de los nanomateriales (Ávalos et al., 2015).

2.1.8 Efectos tóxicos de la administración de AgNP por vía oral

La ingestión de partículas de plata en suspensión está asociada con una serie de consecuencias perjudiciales, incluyendo úlceras intestinales y argiria. Los mecanismos cinéticos de translocación de las AgNPs tampoco están claros, pero se ha demostrado que el tejido linfóide del intestino (placas de Peyer) pueden captar las AgNPs intestinales, además, la captación también puede tener lugar transcelularmente a través de los enterocitos o a través de vías paracelulares. Después de la ingestión es probable que las AgNPs o los iones plata se trasladen desde el intestino al torrente sanguíneo, por tanto, pasen a la vía sistémica y a partir de ahí causen síntomas como la argiria y daño hepático. El órgano diana de las AgNPs es el hígado (Wei et al., 2015), dentro del hígado, se sugiere que los macrófagos contenidos dentro del sistema reticuloendotelial son los principales responsables de eliminar las AgNPs de la circulación. Además, también se han observado depósitos de AgNPs en los riñones, cerebro, pulmones y testículos (Ávalos et al., 2013).

2.1.9 Efectos de la administración de AgNPs por vía respiratoria

La principal vía de entrada para las partículas ambientales es el sistema respiratorio. La inhalación de partículas ultrafinas está asociada con efectos pulmonares y cardiovasculares adversos. Después de la inhalación de AgNPs se han observado depósitos en la cavidad nasal, en la región alveolar de los pulmones y en los ganglios

linfáticos pulmonares. Estas NPs depositadas provocan una respuesta inflamatoria, ya que la fagocitosis de las AgNPs puede conducir a la activación de macrófagos alveolares y a la liberación de quimiocinas, citoquinas, especies reactivas de oxígeno (EROs) y otros mediadores que originan como resultado una continua inflamación. Las partículas acumuladas en la región alveolar, se pueden eliminar a través de tres rutas importantes. La primera, a través del sistema mucociliar a lo largo del tracto traqueobronquial, la segunda ruta a través del sistema linfático y la tercera, a partir de la disolución de las NPs que tiene como consecuencia la incorporación de estas NPs al torrente sanguíneo. Esta última pudiera ser la causa de la presencia de NPs en sangre después de una exposición por inhalación de AgNPs, sugiriendo que la eliminación de estas pueda ser también a través de otro órgano o vía de excreción. Los órganos secundarios donde se han encontrado depósitos de AgNPs son principalmente el hígado, y en menor medida en riñones, páncreas, corazón, bulbo olfatorio y cerebro. Es importante la presencia de plata dentro del bulbo olfatorio y el cerebro, ya que esto sugiere que las AgNPs además de distribuirse a través de la sangre, también se pueden distribuir a través del sistema nervioso(Ávalos et al., 2013).

2.1.10 Efecto de las AgNPs después administración por vía dérmica

Después de la exposición de AgNPs en piel dañada se han observado depósitos de plata dentro de la piel, lo que se conoce como argiria. Las NPs pueden ser fagocitadas por los queratinocitos epidérmicos desencadenando una respuesta inflamatoria. Además, también se ha observado un aumento de enzimas hepáticas que sugiere que el hígado ha sido dañado como consecuencia del tratamiento con AgNPs. Este hecho pone en evidencia la disponibilidad de las AgNPs en la vía sistemática después del contacto dermal. Es probable que la exposición de las AgNPs en la piel dañada permita el acceso a las NPs y a través de los capilares dermales a la circulación sanguínea y así ejerza su toxicidad en sitios distales, ya que la estructura y la función del estrato córneo está comprometido. Además, también se reconoce que la permeabilidad de las NPs dentro de la piel normal puede ser influida por su habilidad de acceder a capas más profundas de la piel a través de folículos pilosos o conductos de sudor, donde la función barrera de la piel está alterada y es más débil. Aunque todavía no hay nada evidenciado(Ávalos et al., 2013).

2.1.11 Efectos tóxicos de las AgNPs por otras vías

A bajas concentraciones, las AgNPs actúan como factores anti-proliferativos/ vasoconstrictores que perjudicaron la producción de óxido nítrico (NO). Sin embargo, a altas concentraciones, las AgNPs estimularon la proliferación/ vaso relajación mediada por NO, lo que demuestra que los niveles de exposición de las AgNPs juegan un papel significativo en la toxicidad y puede tener otro impacto fisicoquímico (Lin et al., 2017).

Las AgNPs también pueden tener acceso al sistema reproductivo a través de una variedad de productos comerciales como dispositivos anticonceptivos y productos de higiene femenina. Existen muy pocos estudios sobre los efectos de las AgNPs en el tracto reproductivo. Se cree que las AgNPs pueden acceder a los espermatozoides humanos y podrían causar problemas en la fertilidad, sin embargo, se requiere una amplia investigación en la cinética de absorción y distribución así como la progresión de la toxicidad de las AgNPs expuestas a través de la vía reproductiva (Ávalos et al., 2013).

2.1.12 Efecto de las AgNPs en el medio ambiente

Cuando no son desechados correctamente, las propiedades inhibitorias inespecíficas de las AgNPs representan un riesgo biológico al medioambiente, particularmente para las comunidades microbianas (Vazquez-Muñoz et al., 2017).

Una vez desechados en el medio ambiente, las AgNPs se dispersan de diferentes maneras, lo que modifica sus propiedades y su transporte, destino y toxicidad. Cuando la plata se desecha en la basura, termina en los rellenos sanitarios o bien incinerada. En este caso, existe el riesgo de que la plata se filtre al subsuelo y contamine el agua subterránea. Si se desecha plata en el agua, esta debe ser tratada para evitar que se disperse y contamine el medio ambiente (Wei et al., 2015). Se ha documentado que las AgNPs presentes en el agua de ríos y lagos afectan los organismos acuáticos ya que inducen toxicidad hepática, endocrina y reproductiva en algas, crustáceos planctónicos y peces (Hou et al., 2017).

La transformación de las AgNps en el medio ambiente es fuertemente influenciada por las concentraciones de iones sulfuros, oxígeno disuelto, Cl, macromoléculas biológicas como el ADN y las proteínas, y otros compuestos orgánicos con gran afinidad ya sea con los átomos o con la plata iónica, y condiciones de luz (Wei et al., 2015). Entre los compuestos más efectivos para reducir las AgNPs por medio de la formación de AgxS se encuentran el SO_4^{2-} , S^{2-} , Cl^- , PO_4^{3-} y el EDTA. Además del oxígeno disuelto, las

reacciones cinéticas y mecanismos dependen del pH, las condiciones de iluminación y la concentración de sulfuro. La exposición a la luz puede afectar la toxicidad de las nanopartículas (McShan et al., 2014).

Se ha demostrado que las nanopartículas de plata (AgNP) tienen efectos antitumorales con diversas líneas celulares y modelos murinos tan efectiva como la respuesta producida por los fármacos antineoplásicos utilizados actualmente (Juarez-Moreno et al. 2017; Broutet et al. 2011; Hanahan et al. 2011; Lima et al. 2012). Se ha observado que las AgNPs suprimen la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Juarez-Moreno et al., 2017) y se ha evaluado su mecanismo de acción en líneas celulares de cáncer de pulmón (A549), cáncer de mama (MCF-7), glioblastoma (U2510) y en fibroblastos pulmonares humanos (IMR-90). Además, se han observado resultados positivos cuando se han incorporado AgNPs a los tratamientos existentes contra el cáncer. No únicamente actúan pasivamente con las células, sino que también activamente sirven como mediadores moleculares que regulan las funciones celulares (Wei et al., 2015). Sin embargo, se ha descrito también que las AgNPs tienen efectos citotóxicos y genotóxicos y que este efecto depende tanto de la concentración, como del periodo de exposición. Es necesario realizar más estudios *in vitro* e *in vivo* que permitan determinar a qué concentración este tipo de nanopartículas producen citotoxicidad y genotoxicidad.

Las AgNPs Argovit® sintetizadas por la *Red Internacional de Bionanotecnología con impacto en Biomedicina, Alimentación y Bioseguridad (CONACyT)*, han sido aprobadas por instancias internacionales para su aplicación como suplementos alimenticios, cosméticos, veterinarios y dispositivos médicos de uso humano. Estas AgNPs no han presentado citotoxicidad ni genotoxicidad en diferentes líneas celulares de cáncer, por ejemplo, cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231; cáncer de colon DLD-1 y HT29; cáncer de pulmón, cáncer cervicouterino HeLa y cáncer de próstata (Juarez-Moreno et al., 2017) y son excelentes bactericidas (Franci et al., 2015), fungicidas y antivirales (Vazquez-Muñoz et al., 2017). Estas AgNP tienen certificados internacionales para su uso en veterinaria y cirugía humana (Juarez-Moreno et al., 2017).

Al lograr determinar si las AgNPs tienen un efecto positivo al reducir la proliferación de células tumorales HCT-15, inhibir el crecimiento de melanoma en un modelo murino, así como lisar trofozoitos de *Entamoeba histolytica*, además de determinar el grado de citotoxicidad o genotoxicidad en caso de que este exista, brindarían bases científicas que

justifiquen realizar más experimentos para determinar la farmacocinética y farmacodinámica de estas dos formulaciones en búsqueda de alternativas de tratamiento para el cáncer y/o las enfermedades parasitarias. En México, ambas enfermedades son de alta proliferación y representan un grave problema de salud pública. Los tumores son la cuarta causa de muerte; mientras tanto, las enfermedades parasitarias afectan a los niños menores de un año ya las personas con sistemas inmunológicos comprometidos, además de tener una alta prevalencia en países en vías de desarrollo.

CAPITULO III

3.1 METODOLOGÍA

3.1.1 Nanopartículas de plata (AgNPs)

Ambas formulaciones de nanopartículas de plata utilizadas en este trabajo fueron donadas por el Dr. VasilyBurmistrov del Centro Científico y de Producción Vector-Vita (Rusia). Argovit™ son AgNPs recubiertas de PVP altamente dispersos en agua con una concentración total de 200 mg / ml (20%). El contenido de plata metálica es de 12 mg / mL estabilizado con 188 mg / mL de PVP. Se prepararon diluciones de AgNPs con agua destilada y estéril y se mantuvieron a 4 ° C en la oscuridad.

BioArgovit® es son AgNPs recubierto de proteína hidrolizada sintetizado como se describe en la patente RU2646105C1 “Método para la producción de proteinato de plata”. Esta formulación es una suspensión acuosa altamente dispersa con una concentración total de 200 mg / mL (20%). El contenido de plata metálica informado para esta formulación es 111,2 mM (12 mg / mL) estabilizado con 188 mg / mL de proteína hidrolizada.

3.1.2 Caracterización de las AgNPs-PVP

Se utilizó la dispersión de luz dinámica (DLS) (Malvern Instruments Zetasizer Nano NS modelo DTS 1060, $\lambda = 532\text{nm}$) para determinar el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta. La caracterización de las propiedades ópticas se realizó con un espectrofotómetro UV-vis Cary 60 (Agilent Technologies) en el rango de 200 a 900 nm. La morfología y la distribución del tamaño se determinaron mediante HR-TEM utilizando un microscopio JEOL-JEM-2010. Además, los AgNP liofilizados se caracterizaron por FTIR-ATR en un rango de 400 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} en un accesorio de placa superior ATR de diamante universal (Perkin Elmer). El espectro de la muestra se comparó con el de PVP sólido estándar (MW 100 kD). El contenido de plata de Argovit® se determinó mediante ICP-OES (Varian Vista-MPX CCD simultánea ICP-EOS).

El estudio de melanoma murino consta de una primera fase *in vitro* y una segunda fase *in vivo*. Primeramente, se determinará la IC_{50} y la IC_{100} mediante procedimiento estándar para este fin y se evaluarán los mecanismos moleculares y génicos de los procesos de muerte celular, la interacción de las AgNP con el ciclo celular por medio de la medición con citómetro de flujo, medición de citocinas, etc.

3.1.3 Ensayo de Melanoma -Fase *in vitro*

Cultivo celular

B16-F10, células de melanoma cutáneo murino de ratones C57BL6 / J, se adquirieron de ATCC® (ATCC® CRL-6475™) y se mantuvieron en medio DMEM con alto contenido de glucosa (Sigma-Aldrich 51435C) suplementado con 10% (v / v) de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS, Biowest S1650) y 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich G5792) a 37 ° C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. El subcultivo se realizó cada 2 días.

Actividad antiproliferativa de las AgNPs

Se sembraron células B16-F10 (1X10⁵) en placas de 96 pocillos con 195 µl de medio suplementado con alto contenido de glucosa DMEM (Sigma-Aldrich 51435C). Se realizó un cribado primario para determinar los valores de CI₅₀ utilizando el kit MTTassay (kit de ensayo de proliferación celular Bio-Vision MTT n.º K299-1000) y un análisis Probit después de 24 h de exposición. Después de eso, se empleó IC₅₀ de AgNPs (4,2 µg / ml) y cisplatino (2 µg / ml, CisPt) para determinar el comportamiento de crecimiento celular a las 6, 12, 18 y 24 h. La cinética de proliferación se determinó mediante citometría de flujo en un equipo AttuneNxT. La viabilidad celular se determinó usando el kit de trazador celular Vybrant™ CFDA-SE y yoduro de propidio (PI) (Thermo Fisher Scientific V12883) siguiendo el protocolo del proveedor.

La determinación de la vía de muerte celular por apoptosis y necrosis se determinó con el kit Alexa Fluor® 488 Annexin V / Dead Cell Apoptosis (Thermo Fisher Scientific V13241). La generación de ROS se analizó mediante el kit de ensayo de detección de ROS celular DCFDA (Abcam 139476) y con el indicador de superóxido mitocondrial rojo MitoSOX™ para la obtención de imágenes de células vivas (Invitrogen M36008).

3.1.4 Ensayo de Melanoma - Fase *in vivo*

Modelo de melanoma murino

Compramos setenta ratones machos C57BL / 6JNHsd de 8-10 semanas de edad de Envigo, México. Los ratones se dividieron y asignaron aleatoriamente a jaulas de policarbonato en 6 grupos de 10 ratones cada uno y dos grupos más de 5 ratones cada uno. Los últimos grupos se utilizaron como controles no tratados para ensayos hematológicos y de genotoxicidad. Los ratones se mantuvieron a 25 ° C, 60% de humedad, ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas y se alimentaron a libitum. El protocolo

experimental fue aprobado el 19 de junio de 2018 por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California, México con número de expediente 001/2018.

La inducción del melanoma en ratones C57BL / 6JNHsd se realizó según lo recomendado por los NIH de EE. UU. (Overwijk y Restifo 2001). Primero, se recolectaron células B16-F10 en la fase de crecimiento logarítmico para inyección; Después de garantizar la viabilidad con azul tripán (> 90%), la concentración de células se ajustó a 1×10^6 células / ml en solución salina equilibrada de Hank helada (HBSS, Biowest L0606).

Se inocularon ratones de 20 g de peso mediante la administración subcutánea de 100 μ l de suspensión celular (1×10^5 células / ratón). La aparición de una "ampolla" indica la correcta administración subcutánea. Después de la administración de las células, los ratones se colocaron en la jaula correspondiente. Los tumores se hicieron palpables en 12 días, en este punto se iniciaron los ensayos antitumorales.

A los ratones con tumores palpables (10 por grupo), se les administró subcutáneamente cada tercer día durante 21 días con la dosis correspondiente de cada tratamiento de la siguiente manera: Grupo 1: Control negativo (agua inyectable); Grupo 2: Control positivo (CisPt 2 mg / kg); Grupo 3: control de vehículo (PVP 12 mg / kg); Grupo 4: AgNPs 3 mg / kg; Grupo 5: AgNPs 6 mg / kg y Grupo 6: AgNPs 12 mg / kg. El grupo 7 y el grupo 8 son ratones sanos inyectados con agua o PVP, respectivamente (n = 5 cada uno), utilizados como control negativo para los parámetros hematológicos y genotoxicidad.

Todas las dosis de AgNPs se calcularon según el contenido de plata metálica. Se prepararon diluciones con agua inyectable a partir de una solución stock de Argovit® con 12mg /mL de plata metálica para obtener las soluciones de trabajo en las concentraciones finales 24, 12 y 6 μ g /mL, luego se administraron 100 μ L a cada ratón según esquema de administración. Las dosis se eligieron debido a experiencias previas con modelos murinos (Borrego et al., 2016). Los ratones se examinaron diariamente y los tumores se midieron todos los días de administración con un calibre deslizante. El volumen tumoral se determinó con la fórmula de Attia Weiss. Además, se registraron características generales (actividad, apariencia del cabello y cualquier cambio aparente).

Después de 21 días de la administración, se detuvo el tratamiento y se observó a los animales durante 7 días más. Después de eso, fueron anestesiados con ketamina y sacrificados mediante punción cardíaca para recolectar muestras de sangre.

Determinación de toxicidad

Se tomaron muestras de sangre de los animales antes de que murieran (grupos experimentales 1, 2, 3 y 5) o se sacrificaran (grupos 4, 6 y 7). Se hicieron dos frotis en portaobjetos de microscopio limpios. Los frotis se secaron al aire, se fijaron en etanol absoluto durante 10 minutos y se tiñeron con naranja de acridina (número CAS 10127023; Sigma-Aldrich). Todos los portaobjetos se codificaron antes del análisis microscópico.

Los micronúcleos de cada muestra se puntuaron manualmente utilizando un microscopio binocular (Carl Zeiss, Axiostar Plus) con un filtro fluorescente (IVFL, 450 - 490 nm). Se evaluó el número de eritrocitos micronucleados (MNE) en 10,000 eritrocitos totales y los eritrocitos policromáticos (PCE) en 1000 eritrocitos totales.

3.1.5 Analisis estadístico para el ensayo de Melanoma

Los datos de viabilidad, apoptosis, necrosis, generación de ROS y volumen tumoral se analizaron con un ANOVA bidireccional ($P < 0,05$) seguido de una prueba post hoc de Tuckey ($P < 0,05$) (GraphPadPrism). Para los datos de porcentaje de supervivencia relativa, se utilizó una estadística de chi-cuadrado de Mantel-Haenszel ($P < 0,05$) (GraphPadPrism).

3.1.6 Estudio de AgNPs con cubierta proteica (BioArgovit)

Reactivos

Se utilizarán medios de cultivo celular como RPMI-1640, DMEM y EMEM, y EDTA), 1% L-glutamina, bicarbonato de sodio, insulina recombinante humana y kit de análisis de toxicología *in vitro* (TOX1) el cual se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Suero bovino fetal (FBS) se obtendrá Géminis Bio productos (West Sacramento, California, USA). 2', 7' - Dichlorofluorescindiacetato (DCFDA) kit de detección ROS análisis celular (ab113851) adquirida por la Abcam (Reino Unido). Los componentes para preparar fosfato buffer salino (PBS; 137 mM cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio

2,7 mM, 10 mM fosfato de sodio dibásico y 1,8 mM fosfato monopotásico fosfato pH 7.0) serán adquiridos de J.T. Baker (Centro Valle, Pennsylvania, USA).

Caracterización de AgNPs con cubierta proteica

Para caracterizar el lote utilizado en este trabajo se utilizaron técnicas espectroscópicas convencionales, el diámetro hidrodinámico y la potencial zeta se determinaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) (Malvern Instruments Zetasizer Nano NS modelo DTS 1060, $\lambda = 532\text{nm}$). Las propiedades ópticas se determinaron con un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies) en el rango de 200 a 900 nm. La morfología y la distribución del tamaño se determinaron mediante HR-TEM utilizando un microscopio JEOL-JEM-2010. Se empleó un sistema de análisis térmico SDT Q600 para realizar el análisis termogravimétrico (TGA) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC) bajo atmósfera de argón de 30 a 750 °C a una velocidad de 10 °C min⁻¹.

Todas las diluciones de AgNP preparadas en este trabajo se realizaron con agua destilada y estéril. Se consideró el contenido de plata obtenido del análisis TGA para obtener las soluciones de trabajo. Las soluciones preparadas se mantuvieron a 4 °C en la oscuridad durante no más de 72 h; pasado ese tiempo, se prepararon nuevas diluciones.

3.1.7 Evaluación del efecto antitumoral de BioArgovit in vivo

Los animales se mantendrán en condiciones estériles y con alimentación y agua *at libitum*. Los animales serán sacrificados humanitariamente en cámara de CO₂. Se realizará una curva de supervivencia, evaluación del diámetro, volumen y peso tumoral, análisis histopatológico del tejido tumoral y adyacente. Se evaluará también la regresión tumoral. Se obtendrá una muestra de sangre de los ratones para hacer un análisis de parámetros serológicos y evaluar funcionalidad hepática y renal.

Evaluaciones de seguridad genotóxica e histopatologías

Se realizarán evaluaciones histopatológicas de las masas tumorales, tejido sano, hígado, riñón y bazo. Además, se determinará la acumulación de plata en hígados, riñones y bazos

por absorción atómica. La genotoxicidad en modelos murinos se basará en el análisis de eritrocitos mediante el proceso de eritropoyesis de médula ósea de ratón en mediciones sucesivas de sangre periférica. Se determinarán diferentes biomarcadores de citotoxicidad y genotoxicidad, como micronúcleos en eritrocitos policromatófilos y en eritrocitos maduros. Esto permite determinar el nivel de daño genotóxico inducido por fármacos comerciales y el nuevo agente basado en nanomaterial.

Análisis de los resultados

Se utilizará el programa ImageJ desarrollado por el Instituto Nacional de Ciencia (NIH, por sus siglas en inglés). Este programa se utiliza para clasificar el daño al DNA en leve, moderado, alto y severo. Se realizarán estudios histopatológicos de hígado, bazo, riñón, pulmón y tejido neoplásico en busca de sitios diana en donde se almacenen las AgNPs. Dichas muestras de teñirán con Hematoxilina-eosina utilizando un procedimiento estándar.

Los resultados serán analizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 21. Se realizarán análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey de múltiple comparación mediante el programa GraphPadPrism versión 6.0c. Los resultados se considerarán estadísticamente significativos cuando $P < 0.05$.

Actividad antitumoral *in vitro*

Las células de adenocarcinoma colorrectal humano HCT-15 (tipo C de Duke) se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC® CCL-225™). Las células se mantuvieron en RPMI-1640 con medio L-Glutamina (Biowest L0500) suplementado con 10% (v/v) de Suero Fetal Bovino inactivado por calor (FBS, BiowestS1650, México) y antibiótico-antimicótico al 0.01% (Estreptomina y penicilina G, Biowest L0010) a 37 ° C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. El subcultivo se realizó todos los días.

Las células HCT-15 se sembraron en una placa de cultivo de 96 pocillos; cada pocillo contiene 1×10^4 células, 190 µl de medio RPMI-1640 suplementado fresco y 10 µl de las diferentes concentraciones de AgNP evaluadas, a saber, 0,6, 6, 60 y 600 µg/ml. La viabilidad celular se determinó mediante tinción vital con azul tripán con un contador

celular automático. Una vez que se determinó la concentración semiinhibitoria (CI_{50}), esta concentración, la mitad y el doble se utilizó para evaluar la capacidad de los AgNP para aumentar la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la célula y en las mitocondrias y para identificar la apoptosis o necrosis inducida por la vía de muerte celular. Se utilizó carboplatino ($190 \mu\text{M}$; $70,53 \mu\text{g/ml}$) (Kitada et al., 2008) como control positivo, mientras que se emplearon células HCT-15 sin tratamiento como control negativo.

La cuantificación de ROS dentro de las células se realizó con DCFDA / H2DCFDA - Cellular ROS Assay Kit (Abcam ab113851, MA, EE. UU.). Se utilizó el indicador de superóxido mitocondrial rojo MitoSOX™ para un kit de imágenes de células vivas (Invitrogen M36008, OR, EE. UU.) Para cuantificar la concentración de aniones de radicales superóxidos dentro de las mitocondrias. Se utilizó el kit de apoptosis de células muertas con Annexin V Alexa Fluor 488™ y yoduro de propidio (Invitrogen V13241, OR, EE. UU.) Para identificar los procesos de apoptosis / necrosis. Todas las determinaciones se realizaron siguiendo las instrucciones de los proveedores del kit en un equipo de citometría de flujo AttuneNxT.

3.1.8 Actividad amebicida de BioArgovit *in vitro*

Los trofozoítos de *Entamoebahistolytica* se cultivaron axénicamente en medio TYI-S33 suplementado con 10% (v/v) de suero bovino adulto (ABS) inactivado por calor, 5% (v/v) de vitaminas Diamond y 1% (v/v) de antibiótico. Los trofozoítos se sembraron con una densidad de 6×10^3 trofozoítos por pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos y se trataron con diferentes concentraciones de AgNP, se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 . La concentración final de AgNPs utilizada: 3, 6 y $12 \mu\text{g/mL}$. Los parásitos no tratados y el metronidazol ($\text{Mtz}=7 \mu\text{M}$; $0,82 \mu\text{g/mL}$) fueron control negativo y positivo, respectivamente. La viabilidad se determinó mediante la prueba de exclusión con azul tripán utilizando una cámara de Neubauer bajo un microscopio óptico después de 72 horas de incubación a 37°C y 5% de CO_2 en condiciones anaeróbicas. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

3.1.9 Evaluación toxicológica de BioArgovit

Cultivos celulares primarios y viabilidad

Se aislaron cultivos primarios de hígado, bazo, médula ósea y cerebro de ratones Balb/c sanos. Brevemente, los órganos obtenidos se perfundieron con solución salina fisiológica y posteriormente se lavaron con la misma solución. Los cultivos de células primarias se sembraron en placas Petri con medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor y se incubaron a 37 °C con 70% de humedad relativa y 5% de CO₂.

El efecto citotóxico de los AgNP en cultivos de células primarias de ratones BALB/c sanos se realizó exponiendo las células aisladas a diferentes concentraciones de esta formulación de AgNP. Se expusieron 5 x 10⁴ células sembradas en una placa de cultivo de 96 pocillos a AgNP a una concentración final de 0,012, 0,12, 1,2 y 12 µg/ml de plata metálica. Las células no tratadas se utilizaron como control negativo. Todos los cultivos se incubaron con el estímulo correspondiente a 37 ° C y CO₂ al 5% durante 24 horas. Las células se contaron con un microscopio óptico utilizando una cámara Neubauer y el colorante de exclusión vital azul tripán. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

Frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica

El ensayo de micronúcleos de bloqueo de citocinesis (CBMN) se utilizó como lo describe Fenech (Fenech et al., 2000) para cuantificar la frecuencia de micronúcleos en linfocitos de un donante sano (hombre, 38 años). Las concentraciones finales de AgNP utilizadas en este ensayo fueron 0.012, 0.12, 1.2 y 12 µg / mL. En resumen, se mezclaron 0,5 ml de sangre periférica heparinizada con 6,3 ml de medio modificado HEPES RPMI-1640 (Sigma R5886, MO, EE. UU.). Este último previamente suplementado con 1% de L-glutamina (Sigma G6392, MO, EE. UU.), 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma M7145, MO, EE. UU.) Y 0,2 mL de fitohemaglutinina 1 mg / mL (Sigma L2646, MO, EE. UU.), EE. UU). Después de 44 horas de incubación a 37 ° C, se agregaron 21 µL de 2 mg / mL de citocalasina B (Sigma C6762, MO; EE. UU.) A la mezcla para bloquear la citocinesis celular. Los cultivos se incubaron durante otras 28 horas y luego se recolectaron mediante centrifugación, se fijaron con metanol (Sigma-Aldrich 34860, St. Louis, MO; EE. UU.) -Ácido acético (Sigma-Aldrich ARK2183, MO; EE. UU.) Y se colocaron en una solución portaobjetos para tinción posterior con eosina b (Sigma 2853,

MO; EE. UU.) y azul de metileno (Sigma O3978, MO; EE. UU.). Las células se contaron en un microscopio de campo de luz (Primo Star Zeiss) con una lente de objetivo de 100x. Se calcularon el índice de proliferación por bloqueo de citocinesis (CBPI) y el índice de replicación (RI) contando 1000 células, incluidas células mononucleares (MONON), binucleadas (BN), trinucleadas y tetranucleadas (MULTIN) de acuerdo con 1 y 2, respectivamente.

$$CBPI = \frac{(\#células\ MONON) + (2 * \#células\ BN) + (3 * \#células\ MULTIN)}{Número\ total\ de\ células} \dots (1)$$

$$RI = \frac{[(\#células\ BN) + (2 * \#células\ MULTIN)]_T / (\#Total\ de\ Células)_T}{[(\#células\ BN) + (2 * \#células\ MULTIN)]_C / (\#Total\ de\ células)_C} \dots (2)$$

Donde T = Cultivos con tratamiento de AgNP y C = cultivo control.

El porcentaje de citoestasis se define como lo muestra la fórmula 3:

$$\% Citoestasis = 100 - 100 * \left(\frac{[CBPI]_T - 1}{[CBPI]_C - 1} \right) \dots (3)$$

El índice de división nuclear fue determinada para propósitos comparativos de acuerdo a la fórmula 4:

$$NDI = \frac{(\#células\ MONON) + (2 * \#células\ BN) + (3 * \#células\ TRIN) + (4 * \#cél\ TETRA)}{\# Total\ células} \dots (4)$$

El efecto genotóxico de cada tratamiento se evaluó determinando la frecuencia de micronúcleos (MN), los brotes nucleares (NBUD) y los puentes de cromatina (NPB) en 1000 células binucleadas (BN) con citoplasma bien conservado. Se utilizó el mismo número de células para cuantificar la apoptosis y la necrosis.

3.1.10 Estudios de toxicidad de BioArgovit in vivo

La dosis letal de AgNP se determinó en ratones Balb/c siguiendo la Directriz 420 de la OCDE para el ensayo de toxicidad oral aguda (ODCE, 2002). El Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Baja California aprobó el protocolo experimental (001/2018), México. Se llevó a cabo un estudio de observación para seleccionar la dosis inicial adecuada. A una rata Balb/c se le administró 0,4 ml de la solución concentrada de AgNPs (4,8 mg de plata metálica) y se mantuvo en observación durante 14 días. Se registraron cuidadosamente los cambios en los signos clínicos de los ratones como la apariencia de la piel y el pelaje, los ojos, las membranas, la conducta, el patrón respiratorio, la presencia de náuseas, vómitos, diarrea, temblores, convulsiones, salivación, letargo, sueño, coma y

muerte. Dado que no se observaron signos de toxicidad después de la administración de 0,4 ml de AgNP, se realizó la prueba de límite con seis ratones BALB/c hembra. Se asignaron ratones de ocho semanas y un peso promedio de 22 g a jaulas de policarbonato mantenidas a 25 ° C, 60% de humedad, ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas. A los ratones se les administró 0,4 ml de AgNP cada dos h para un total de 12 administraciones en un período de 24 h. La cantidad final de plata metálica administrada a las 24 h fue de 57,6 mg, correspondiente a 2618 mg de plata metálica/kg de peso corporal. Los ratones administrados se mantuvieron en un período de observación de 14 días. Comida y agua estaban disponibles a voluntad. Además, se controlaron los niveles de glucosa de todos los animales, extrayendo una gota de sangre de la cola durante el experimento de prueba de límite.

Después de completar el período de observación, se utilizó Ketamina (100 mg kg de peso corporal, Ketamin-Pet, Aranda Laboratories, Querétaro, México) y Xylazine (ProcinEquus, Pisa, Hidalgo, México) para anestésiar ratones, que posteriormente fueron desangrados por punción cardíaca. Se recogió sangre y se centrifugó (Heraeus Fresco 21, ThermoScientific) a 2500 rpm durante 10 min para separar el suero. El hígado, riñón, bazo, pulmón, intestino, corazón y cerebro se extrajeron y se colocaron en formaldehído al 10% para evaluación histopatológica.

Estudios histopatológicos

La evaluación histopatológica se realizó según las recomendaciones de la Guía 420 de la OCDE (OCDE, 2002). Los tejidos se procesaron mediante técnicas histológicas de rutina. Se cortaron secciones de 3-5 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluación histopatológica. La lesión tisular se examinó microscópicamente en busca de evidencia de daño celular e inflamación.

Análisis estadístico de BioArgovit

La viabilidad, apoptosis, necrosis y generación de ROS se analizaron con un ANOVA de dos vías ($P < 0,05$) seguido de una prueba post hoc de Tuckey ($P < 0,05$). Los micronúcleos y otras anomalías nucleares encajan bien con el modelo de Poisson. Por tanto, para

garantizar la homocedasticidad entre los grupos experimentales, se realizó una transformación de raíz cuadrada según fórmulas:

$$\hat{X} = \sqrt{(X + 0.5)}$$

\hat{X} =estimador de la variable transformada, X = variable original, número de anomalías contadas. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis con la prueba de comparación múltiple post hoc de Tukey. * indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en comparación con el control negativo. Todos los datos se analizaron utilizando GraphPadPrism 8.

CAPITULO IV

4.1 Resultados

4.1.1 Resultados de ensayos con AgNPs-PVP (Argovit™)

Caracterización de nanopartículas de plata

Se realizó la caracterización completa de la muestra proporcionada por el Prof. Burmistrov. Las AgNPs son principalmente esféricas con un tamaño promedio de 35 ± 15 nm según lo determinado por HR-TEM. El diámetro hidrodinámico (diámetro resumido de nanopartículas de plata metálica y recubrimiento de PVP) determinado por DLS fue de 70 nm y el potencial ζ de -15 mV. El análisis UV-vis mostró un pico de absorción a 420 nm que corresponde a la resonancia de la superficie del plasmón. El contenido de plata de la solución concentrada fue de 12 mg / ml, determinado por ICP-EOS.

El espectro ATR-FTIR muestra picos correspondientes a la vibración de hidroxilo del agua no unida (ν OH) a 3406 cm^{-1} , estiramiento del carbonilo a 1650 cm^{-1} (ν C = O), estiramiento del nitrógeno en el anillo a 1269 cm^{-1} simétrico (ν s CH) y asimétrico (ν asCH)

que se extienden a 2948 y 2915 cm^{-1} , respectivamente. La plata metálica determinada por ICP-OES es 12 mg / ml (% en peso).

Viabilidad celular, apoptosis, necrosis y cuantificación de especies reactivas de oxígeno

En este trabajo se evaluó la viabilidad celular, la inducción de apoptosis o necrosis y los cambios en la generación de ROS en las células de melanoma murino B16-F10 después de la exposición a IC50 de AgNP (4,2 $\mu\text{g} / \text{ml}$) o CisPt (2,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$) a las 6, 12, 18 y 24h. Los principales cambios en la viabilidad celular se observaron en las primeras 6 h posteriores a la administración de los agentes, CisPt o AgNPs. Posteriormente, el efecto se mantuvo hasta el último registro a las 24 h (Figura 3).

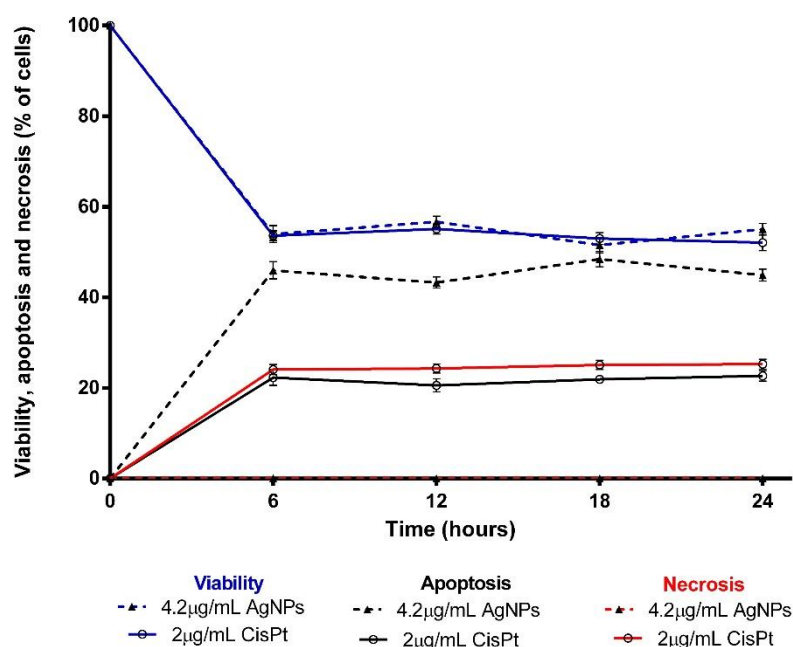


Figura3. Viabilidad, apoptosis y necrosis determinadas en cultivos de células B16-F10 tratados con AgNP o CisPt. Las determinaciones se realizaron a las 6, 12, 18 y 24 h en cultivos de células de melanoma tratadas con las concentraciones de AgNPs o CisPt indicadas en la gráfica. Viabilidad (líneas azules), apoptosis (líneas negras) y necrosis (líneas rojas). * Indica una diferencia estadísticamente significativa $P < 0.05$ para los datos de apoptosis, Φ indica una diferencia estadísticamente significativa $P < 0.05$ para los datos de necrosis.

A partir del registro de viabilidad celular, ambos agentes AgNPs y CisPt presentan el mismo efecto antiproliferativo ($53,95 \pm 1,88$ y $53,62 \pm 1,04$, respectivamente), pero las

vías de muerte celular inducidas son bastante diferentes. Después de 6 h de exposición, se observó $45,97 \pm 1,88\%$ de apoptosis en células tratadas con AgNP, dos veces más que las células apoptóticas encontradas cuando se expusieron a CisPt ($22,31 \pm 1,72\%$, Figura 1). Por otro lado, el tratamiento con AgNPs produce menos del 0,1% de necrosis, mientras que para CisPt fue del $24,06 \pm 1,09\%$. Para CisPt, ambas vías de muerte celular se indujeron prácticamente a la misma velocidad (Figura 3). El comportamiento encontrado después de 6 h de exposición se mantuvo hasta la determinación final hecha a las 24 h de exposición.

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) más significativa se encontró después de la exposición de 6 h a CisPt o AgNPs (Figura 4) y muestra una relación inversa con la viabilidad celular. Las células tratadas con CisPt alcanzaron la producción máxima de ROS después de 6 h de exposición ($20,27 \pm 1,09\%$), mientras que la mayor producción de ROS inducida por AgNPs se observó a las 12 h ($19,50 \pm 0,35\%$).

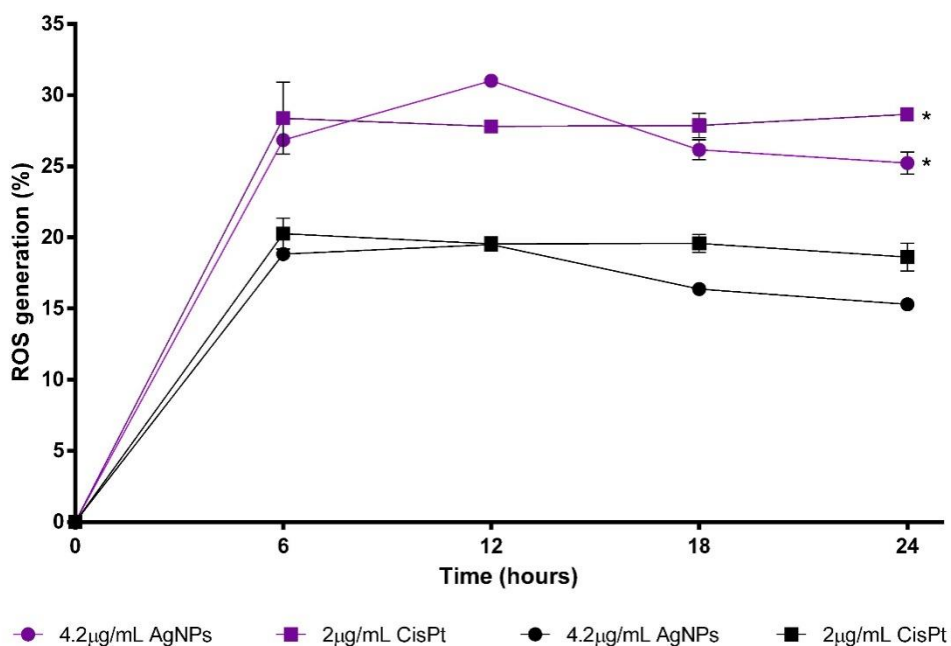


Figura4. Producción de especies reactivas de oxígeno en células de melanoma tratadas con IC50 de AgNP o CisPt. La cuantificación de la producción de ROS en cultivos de células B16-F10 tratados con la IC50 de AgNP o CisPt se realizó mediante citometría de flujo y marcadores fluorescentes. El ROS total se determinó con DCFDA (líneas púrpuras) y superóxido mitocondrial con MitoSOX (líneas negras). * indica una

diferencia estadísticamente significativa $P < 0,05$ comparando los datos de generación de ROS totales con los datos de superóxido mitocondrial

La producción de superóxido mitocondrial tiene el mismo comportamiento en el tiempo que el descrito para ROS total y corresponde a dos tercios de la cantidad total de ROS observada con $31.02 \pm 0.45\%$ para AgNPs y $28.38 \pm 2.52\%$ para CisPt. La diferencia más importante entre los tratamientos es que, CisPt induce una generación de ROS sostenida después de 6 h hasta 24 h, mientras que se observó una disminución en la generación de ROS después de 12 h de exposición cuando las células de melanoma se trataron con AgNP (Figura 4).

Actividad antitumoral

Tanto el volumen tumoral, así como los signos de enfermedad se observaron durante todo el experimento después de la administración del tratamiento descrita en la sección experimental. El volumen del tumor aumentó en todos los ratones con o sin tratamiento. Los ratones con tumores tratados con AgNPs no dejaron de comer o beber durante todo el experimento. Los ratones con el tumor, pero no tratados, así como los tratados con CisPt o PVP, presentaron letargo y pérdida de apetito.

Los ratones inyectados con agua desarrollaron tumores de alrededor de 1500 mm^3 y murieron 7 días después de que el tumor se hizo palpable. El volumen tumoral en animales tratados con PVP o CisPt presentó un volumen tumoral similar (alrededor de 1500 mm^3) a los 9 días del inicio del tratamiento (día 21 en la Figura 5). Por otro lado, los ratones tratados con dosis de AgNPs de 3, 6 y 12 mg/kg presentan un volumen tumoral en el rango de $722\text{-}837 \text{ mm}^3$, lo que representa una inhibición del crecimiento tumoral del 50-60% provocada por los tratamientos con AgNPs en comparación con PVP (mm^3), CisPt (1.704 mm^3) o agua (1.500 mm^3). Es importante recordar que todos los ratones inyectados con agua murieron en el séptimo día de tratamiento (Figura 5).

Para el undécimo día de tratamiento (día 23 en la figura 3), mientras que la tasa de crecimiento tumoral en animales tratados con cualquiera de las tres dosis de AgNPs aumenta de manera bastante similar (volumen tumoral en el rango de $837\text{-}1.142 \text{ mm}^3$), los animales tratados con CisPt o PVP mostraron tumores con un volumen de 3.500 y

9.500 mm³, respectivamente. Estos valores representan una reducción del crecimiento tumoral provocada por la administración de AgNPs del 72% en comparación con CisPt y del 90% en comparación con PVP.

Para el undécimo día de tratamiento (día 23 en la figura 5), mientras que la tasa de crecimiento tumoral en animales tratados con cualquiera de las tres dosis de AgNP aumenta de manera bastante similar (volumen tumoral en el rango de 837-1.142 mm³), los animales tratados con CisPt o PVP mostraron tumores con un volumen de 3.500 y 9.500 mm³, respectivamente. Estos valores representan una reducción del crecimiento tumoral provocada por la administración de AgNP del 72% en comparación con CisPt y del 90% en comparación con PVP.

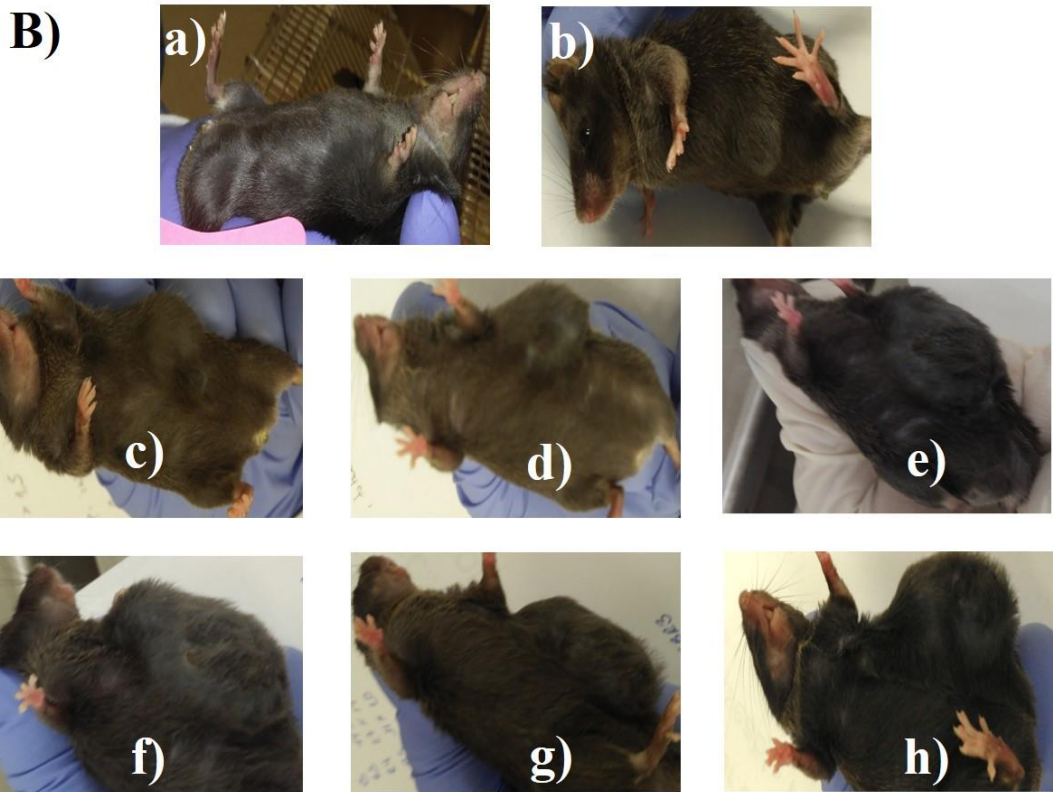
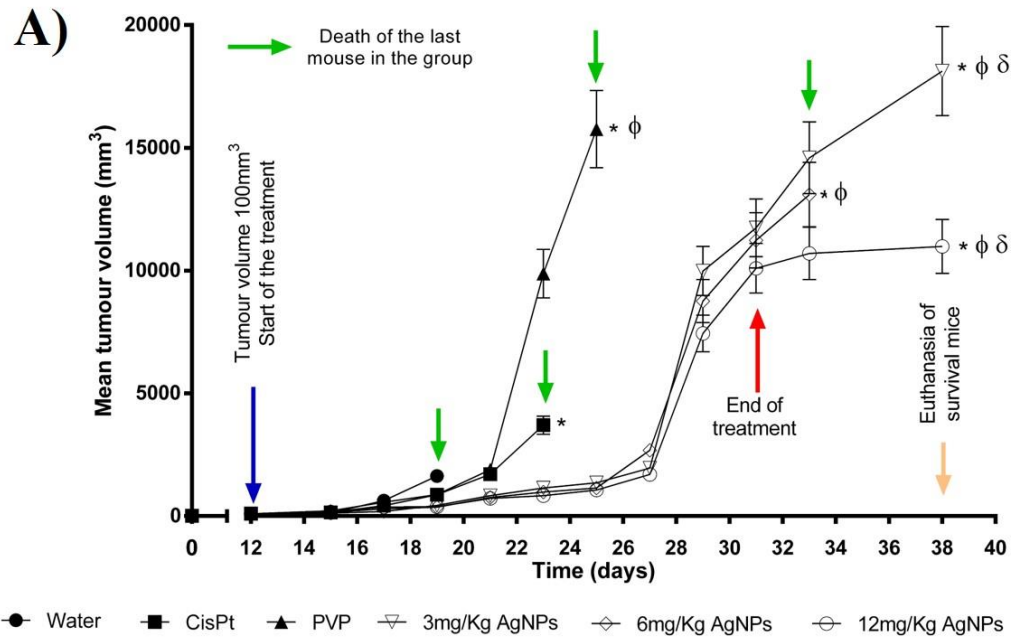


Figura5. A) Volumen medio del tumor de melanoma en función del tiempo (días). Se utilizaron ratones tratados con agua inyectable como controles negativos (agua), 2 mg/kg de cisplatino (CisPt), 12 mg/kg de PVP (PVP) y 3, 6 o 12 mg/kg de AgNP como se indica en la figura. Las células de melanoma se inocularon por vía subcutánea al inicio del experimento (flecha negra), los tratamientos comienzan cuando los tumores eran de 100 mm³ (flecha azul). El tratamiento finaliza a los 21 días (flecha roja). La determinación

del volumen tumoral se detuvo cuando todos los ratones del grupo murieron (flechas verdes). 7 días después del final de los tratamientos (flecha amarilla), los ratones supervivientes fueron sacrificados. * indica una diferencia estadísticamente significativa $P < 0.05$ comparando grupos con el grupo tratado con agua, Φ indica una diferencia estadísticamente significativa $P < 0.05$ comparando grupos con el grupo tratado con CisPt, δ indica una diferencia estadísticamente significativa $P < 0.05$ comparando entre dosis de AgNPs. B) Imágenes que muestran ratón sin melanoma (a), cuando el tumor alcanzó los 100 mm^3 y el volumen del tumor alcanzado en los ratones con el tratamiento correspondiente (c-h). Los últimos ratones que murieron marcados con flechas verdes en la parte A de la figura: c) agua, d) CisPt, e) PVP, g) 6 mg/kg, y los ratones supervivientes sacrificados a los 38 días: f) AgNPs 3 mg/kg, y h) 12 mg/kg.

Las dosis evaluadas de AgNP no mostraron diferencias entre ellas en cuanto al crecimiento tumoral hasta el día 19 de tratamiento, que también fue el último día de tratamiento. Sin embargo, en los últimos siete días del experimento (día 32 a 38 en la Figura 5), se observaron diferencias marcadas. El último ratón superviviente del grupo tratado con 6 mg/kg murió 2 días después del final del tratamiento (día 33 en la Figura 5), mientras que en el grupo de ratones tratados con 3 y 12 mg/kg de AgNPs, sobrevivió un ratón de cada grupo los 7 días del período de observación.

Los ratones supervivientes de los grupos experimentales tratados con 3 y 12 mg/kg de AgNPs muestran volúmenes tumorales al final del período de observación de 18.000 y 11.000 mm^3 , respectivamente (en el día 38 de la Figura 5). Así, parece que una dosis de 12 mg/kg de AgNPs inhibió el crecimiento tumoral en casi un 50% en comparación con el tratamiento de 3 mg/kg (Figura 5), lo que sugiere fuertemente un comportamiento dependiente de la dosis.

La Figura 6 muestra esquemáticamente la tasa de supervivencia relativa de los ratones tratados con los diferentes agentes. El día 11 de tratamiento (día 23 en la Figura 6) se registró la muerte del último ratón del grupo tratado con CisPt, mientras que el 50% de los ratones tratados con 12 mg/kg de AgNPs siguen vivos. Al final del esquema de tratamiento (día 33 en la figura 5), la esperanza de vida de los supervivientes tratados con AgNPs aumentó en 12, 8 y 6 días en comparación con los inyectados con agua, CisPt o PVP, respectivamente (Figura 5). Al final del experimento, los ratones tratados con

3 o 12 mg/kg de AgNP sobrevivieron 19, 15 y 13 días más que los tratados con agua, CisPt o PVP, respectivamente. Esto representa una esperanza de vida en ratones tratados con AgNP casi 4 veces mayor en comparación con los inyectados con agua, y más del doble en comparación con los ratones tratados con 2 mg/fkg de CisPt (Figura 6). Según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se observan esos efectos con un tratamiento con AgNP en un modelo de melanoma in vivo.

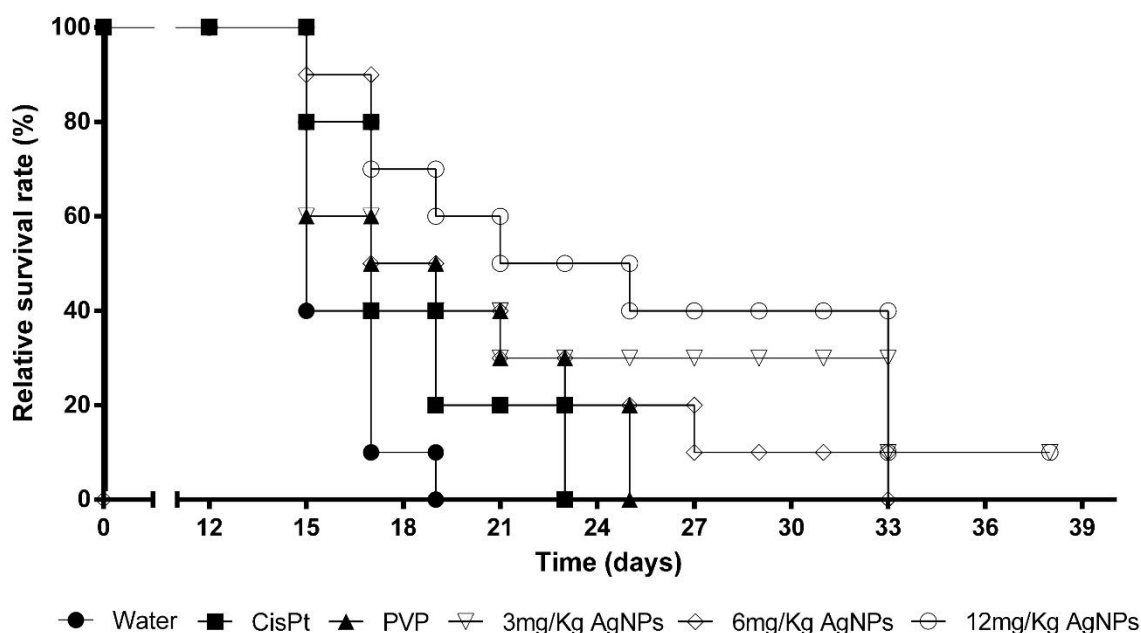


Figura6. Gráfico de Kaplan-Meier que muestra la tasa de supervivencia relativa de los ratones tratados con AgNPs o CisPt. Se utilizaron ratones sin melanoma y sin tratamiento como controles negativos (ratones sanos, tasa de supervivencia del 100%). Ratones con melanoma e inyectados con agua (agua), 2 mg / kg de cisplatino (CisPt), 12 mg/kg de PVP (PVP) y 3, 6 o 12 mg/kg de AgNP se identifican en la parte inferior de la figura. * y Φ indican una diferencia estadísticamente significativa $P < 0.05$ comparando los grupos tratados con AgNPs con los grupos tratados con agua y CisPt, respectivamente.

Parámetros hematológicos

Para completar el perfil de los animales supervivientes al esquema de tratamiento (ratones de los grupos tratados con 3 y 12 mg/Kg), se compararon sus parámetros hematológicos con los observados en ratones sanos inyectados con agua o PVP (grupos control negativo, $n = 5$ para cada grupo).

En términos generales, los parámetros de los individuos tratados con AgNPs se encontraban dentro de los rangos considerados normales para estos ratones (Otto et al.2016), con excepción del hematocrito (HCT) y la hemoglobina (HGT), donde se observó una importante disminución para ambos 3 y 12 mg/kg de AgNP. Además, se observó un aumento de glóbulos blancos y linfocitos, pero solo en el ratón tratado con la dosis de AgNP de 3 mg/kg (Figura 7).

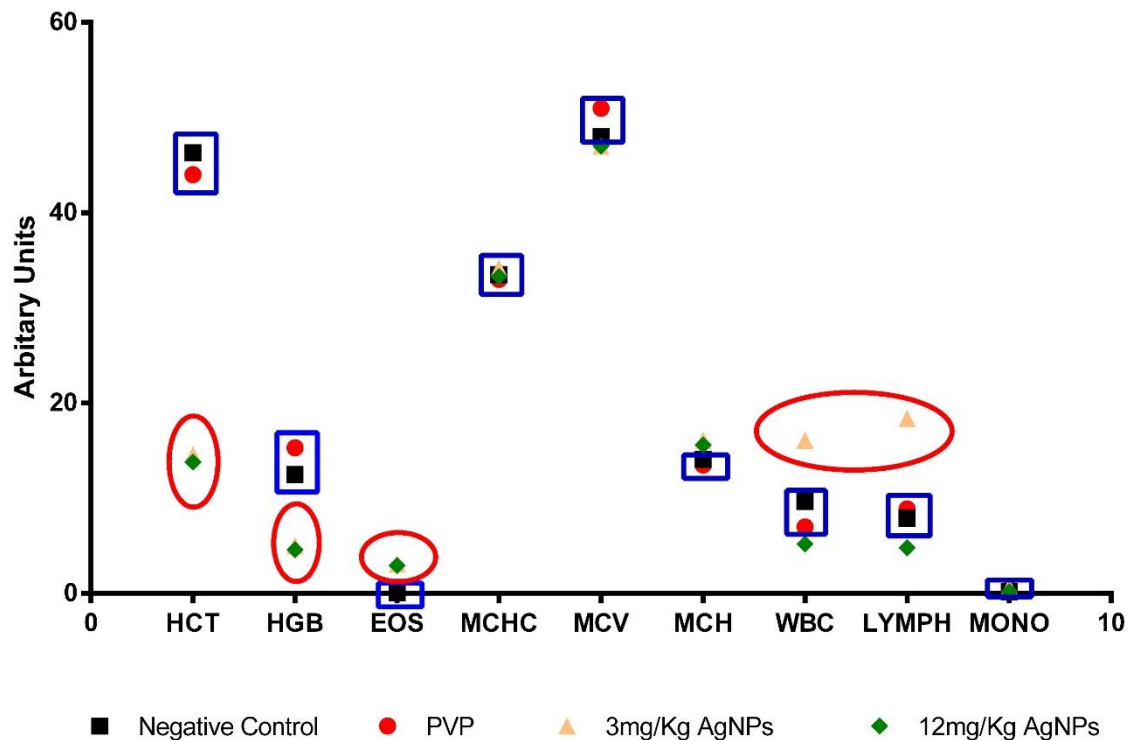
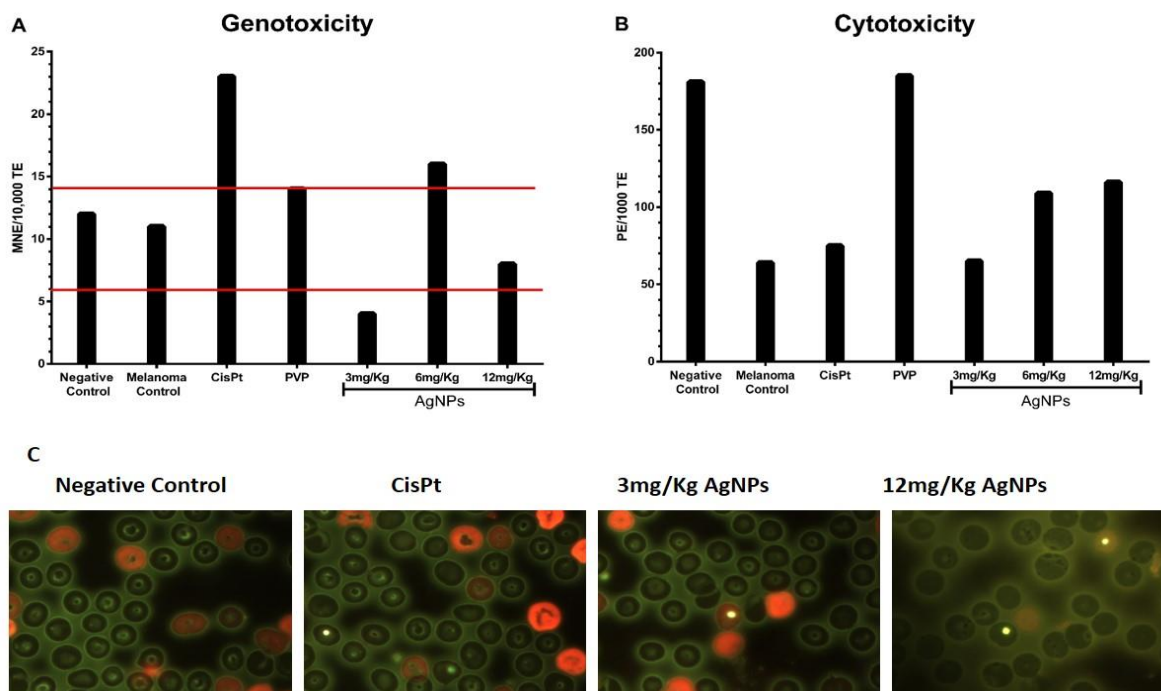


Figura7. Parámetros hematológicos en los animales supervivientes al final del estudio. Se determinaron hematocrito (HCT), hemoglobina (HGB), eosinófilos (EOS), volumen corpuscular medio (MCV), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), glóbulos blancos (WBC), linfocitos (LYMPH), monocitos (MONO) en ratones tratados con AgNP y ratones sin melanoma inyectados con agua o PVP. HCT, HGB, WBC y LYMPH estaban fuera del rango reportado como normal (recuadros azules) y aquellos fuera de los rangos normales en ratones tratados con AgNPs (círculos rojos).

Genotoxicidad



Finalmente, se realizó la cuantificación de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (MNE) en 10,000 del total de eritrocitos, que indican daño genotóxico y el conteo de eritrocitos policromáticos (PCE) en 1000 eritrocitos totales, que indican mielosupresión (efecto citotóxico).

Muestras de sangre de cola de ratones sanos, ratones supervivientes de los tratamientos con AgNPs de 3 y 12 mg/kg y del último superviviente de los otros grupos de tratamiento (controles no tratados con melanoma y ratones con melanoma inyectados con PVP, CisPt y AgNPs 6 mg/kg, respectivamente) se utilizaron para identificar los efectos genotóxicos y citotóxicos de los tratamientos.

Los resultados muestran que los ratones con melanoma presentan prácticamente el mismo recuento de MNE que en ratones sanos, ambos dentro del rango de 6-14 MNE informado para esta cepa, (Aeschbacher 1986) marcado con líneas rojas en la Figura 6. CisPt produce un mayor número de MNE con un recuento de 23 MNE. Curiosamente, la dosis de 6 mg/kg de AgNP genera un recuento de MNE más alto que el límite superior informado. PVP produce 14 MNE, mientras que dosis de AgNP de 3 y 12 mg / kg producen 4 y 8 MNE, respectivamente.

Figura 8. Efectos citotóxicos y genotóxicos cuantificados en eritrocitos policromáticos de muestras de sangre circulante. A) Promedio de eritrocitos policromáticos micronucleados (MNE) puntuados en 10.000 eritrocitos totales, B) Eritrocitos policromáticos (PCE) en 1.000 eritrocitos y C) imágenes representativas de eritrocitos policromáticos puntuados. Ratones sanos (control negativo), ratones no tratados (control de melanoma), ratones con melanoma y tratados con CisPt, PVP y las dosis indicadas de AgNPs. Las líneas rojas indican el rango de micronúcleos normal informado para ratones C57BL6.

Por otro lado, se desprende de la figura 8 que el recuento de PCE en el ratón con melanoma es sustancialmente más bajo que el encontrado en el sano. Para CisPt se encontró un pequeño incremento respecto al control positivo, mientras que se observó un comportamiento dosis-dependiente para las dosis de AgNP, pero ninguno de ellos comparable al efecto observado para PVP, que prácticamente revierte la mielosupresión promovida por el melanoma y alcanza niveles de PCE como los encontrados en los ratones sanos.

4.1.2 Resultados de la caracterización de nanopartículas de plata BioArgovit

Se utilizaron técnicas espectroscópicas para caracterizar completamente el lote de AgNPs utilizado en este trabajo. La Figura 9a muestra que los AgNP son principalmente esféricos, con un tamaño promedio de $33,38 \pm 5,66$ nm según lo determinado por HR-TEM. Los resultados de DSC-TGA (Figura 9b) muestran una pérdida de masa del 80,48% a 116°C correspondiente al agua en la formulación, a 423°C comienza la descomposición de los agentes de recubrimiento terminando a 470°C (18,11%), y la masa restante corresponde a plata metalizada (1,41%). Estos resultados concuerdan con los datos del fabricante, 18,8% del agente de recubrimiento y 1,2% de plata metálica. El análisis UV-vis mostró la resonancia de la superficie del plasmón a 409 nm (Figura 9c). El diámetro hidrodinámico, que resume el diámetro de la nanopartícula de plata metálica y el recubrimiento de proteína hidrolizada, determinado por DLS es de $165,5 \pm 105$ nm (Figura 9d) y el potencial ζ de $2,34 \pm 4,72$ mV (Figura 9e).

Actividad antitumoral *in vitro* en HCT-15

Se evaluó la actividad antiproliferativa *in vitro* en la línea celular de tumor de colon humano HCT-15 exponiendo el cultivo celular a la formulación de AgNPs durante 24 h. El rango de concentración evaluado fue de 0.6 a 600 $\mu\text{g/mL}$, obteniendo una concentración semiinhibitoria (IC_{50}) de 2.13 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 10a). En nuestras condiciones experimentales, el valor de CI_{50} informado para carboplatino (70,53 $\mu\text{g} / \text{ml}$) (Kitada et al., 2008) produce una disminución de la viabilidad celular del 42,2%. Una vez determinada la CI_{50} para los AgNP, se realizaron más experimentos para cuantificar la sobreproducción de ROS, la apoptosis y la necrosis con la CI_{50} , la mitad y el doble de esta concentración (Figuras 10b-10e). Independientemente de la concentración de AgNPs utilizada, la sobreproducción de ROS se acerca al 80% de los eventos positivos en todos los casos (Figura 10b), mostrando una diferencia estadística significativa ($p \leq 0,001$) en comparación con el control negativo. Casi dos tercios de los ROS cuantificados son aniones radicales superóxido dentro de las mitocondrias, como se muestra en la Figura 2c. Parece que la sobreproducción de ROS dentro de las mitocondrias debería desencadenar la vía intrínseca de la apoptosis, generando un 40% de eventos de apoptosis positivos con la mitad de la CI_{50} y un 70% cuando la CI_{50} o el doble de esta concentración se administraron a las células tumorales. No se observó evidencia de necrosis con ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 10c).

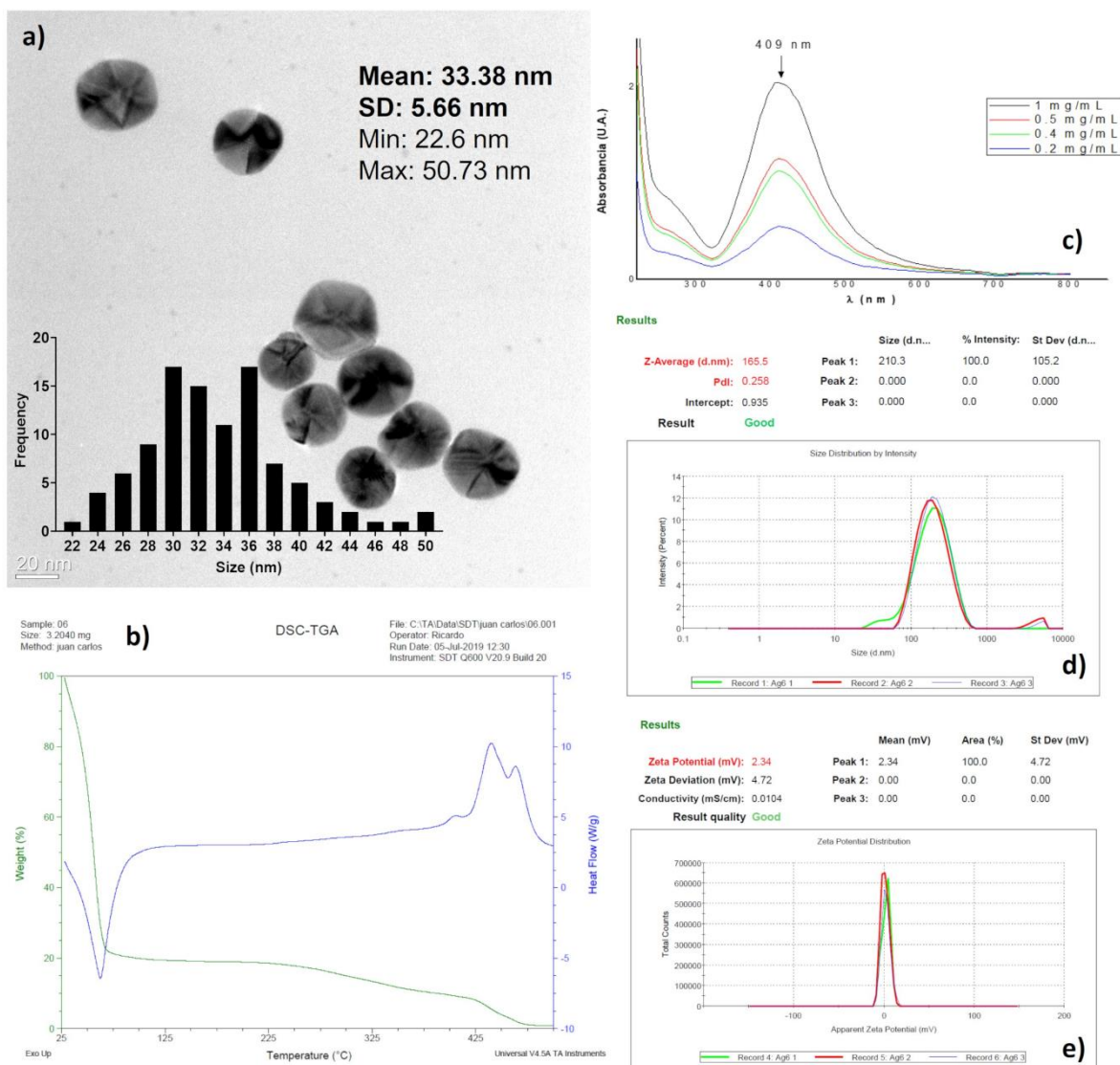


Figure 9. Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de plata BioArgovit. a) Imágenes HR-TEM que muestran la morfología de las nanopartículas de plata (el inserto corresponde al histograma de distribución de tamaño); b) el análisis termogravimétrico de la formulación (TGA / DCS), c) resonancia de plasmón superficial por UV-Vis; d) diámetro hidrodinámico determinado por DLS, ye) potencial zeta.

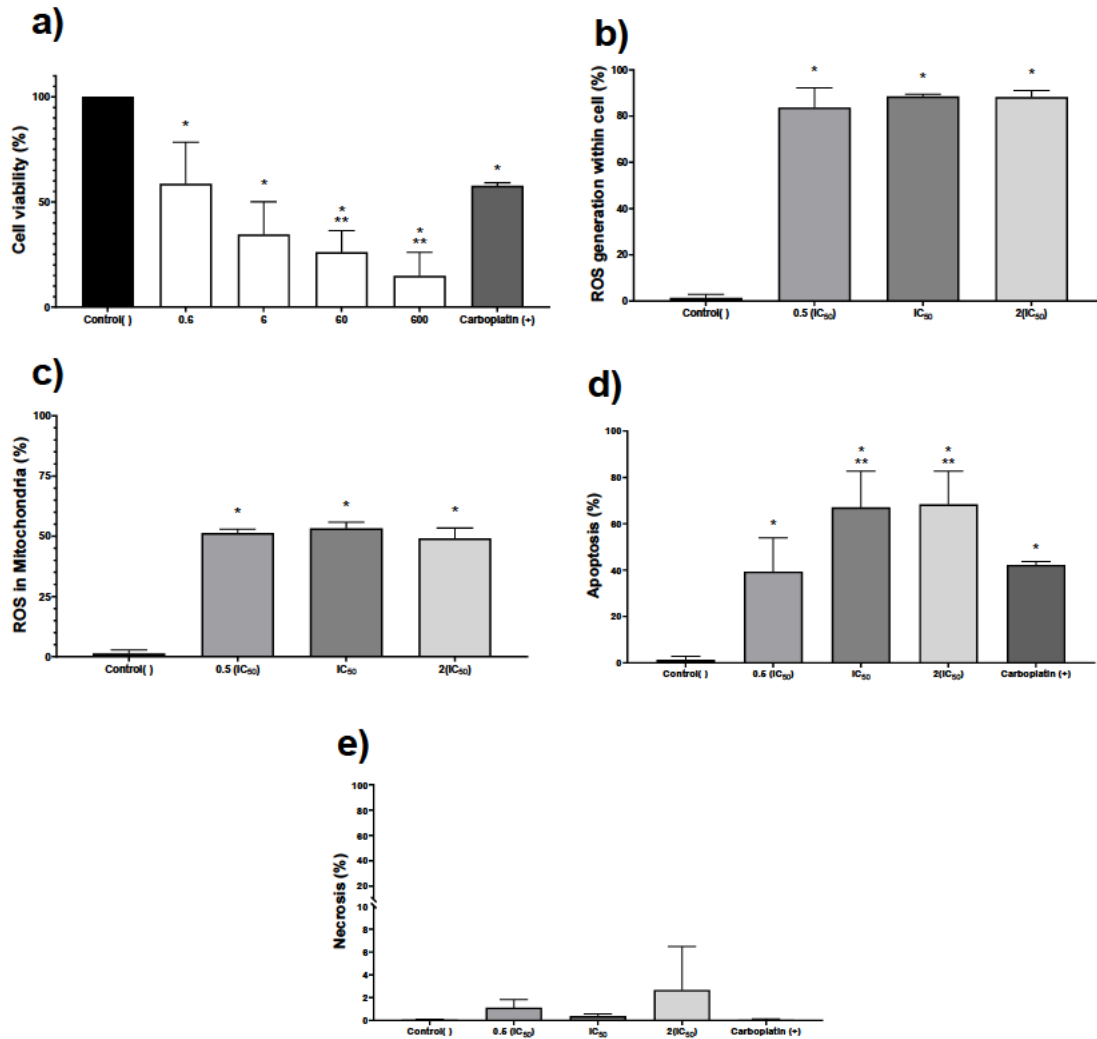


Figure 10. Actividad antiproliferativa de AgNP en el adenocarcinoma humano HCT-15. La viabilidad celular (a) se determinó utilizando 0,6, 6, 60 y 600 µg / ml de AgNP. b) apoptosis, c) necrosis, d) sobreproducción de ROS dentro de la célula, ye) sobreproducción de ROS dentro de las mitocondrias se determinó utilizando la mitad de IC₅₀, IC₅₀ y el doble de IC₅₀. El * representa una diferencia significativa ($p \leq 0,001$) en comparación con el control negativo, ** representa una diferencia significativa ($p \leq 0,001$) en comparación con el carboplatino.

Actividad amebicida

La viabilidad de los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* expuestos a AgNP muestra un comportamiento dependiente de la concentración. Dado que se evaluó la concentración más baja, se observó un efecto de inhibición del crecimiento (viabilidad del 74%). La concentración semiinhibitoria (CI₅₀) para esta formulación de AgNPs en *E. histolytica* es

de 7,47 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La internalización de AgNP en el trofozoíto se pudo observar usando un microscopio de campo brillante. La internalización parece exhibir un comportamiento dependiente de la concentración. Algunas de las nanopartículas se vieron inequívocamente dentro del citoplasma del trofozoíto, lo que confirma la internalización cuando las nanopartículas se movieron como lo hizo el trofozoíto. Los cambios morfológicos en los trofozoítos en comparación con el control negativo, es decir, aumento de redondez y tamaño, fueron evidentes a medida que aumentaba la concentración de AgNP (Figura 11). Los cambios morfológicos son bastante similares a los observados en los trofozoítos expuestos a compuestos que provocan la sobreproducción de ROS (Toledano-Magaña et al. 2017; Toledano-Magaña et al., 2014; Hernández-Ayala et al., 2020).

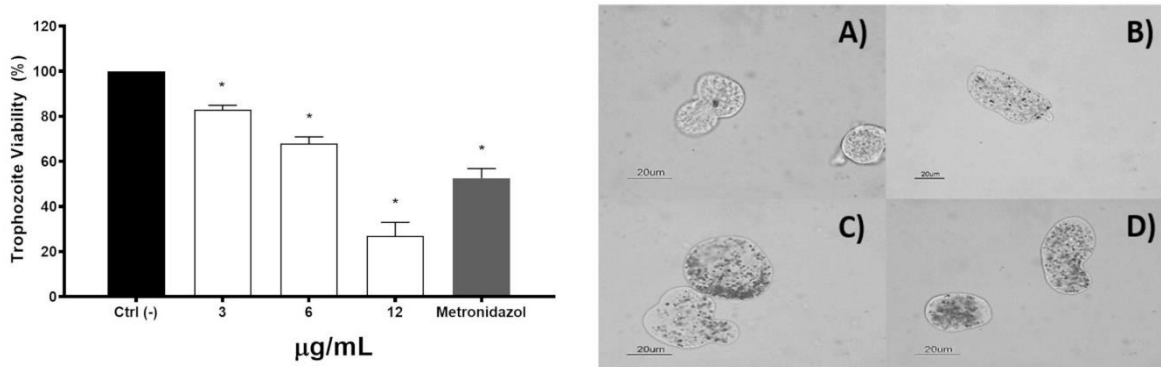


Figura 11. La actividad amebicida de los AgNP contra los trofozoítos de *Entamoebahistolytica*. La viabilidad del trofozoíto de *E. histolytica* expuesta a diferentes concentraciones de AgNP (3, 6 y 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plata metálica) y metronidazol (0,82 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se muestra en el panel de la izquierda. El panel de la derecha muestra las micrografías de los trofozoítos A) sin tratar y expuestos a B) 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C) 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y D) 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de plata metálica contenida en AgNPs. El * representa una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en comparación con el control negativo.

Viabilidad celular en cultivos primarios de ratones

Se han identificado varios órganos como órganos diana después de administrar varias formulaciones de AgNP, como el cerebro, el hígado, el riñón y el bazo (Pang et al., 2016; Recordati et al., 2016). Por lo tanto, evaluamos la viabilidad de cultivos primarios de ratones de los órganos mencionados anteriormente expuestos a diferentes

concentraciones de la formulación de AgNP estudiada en este trabajo. El rango de concentración usado en este ensayo, 0.012 a 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, incluye los valores de CI50 encontrados en los ensayos in vitro de actividad antitumoral y amebicida.

La Figura 12 muestra la viabilidad celular de cultivos primarios expuestos durante 24 horas a diferentes concentraciones de AgNP. No hay evidencia de efecto de inhibición del crecimiento provocado por la exposición a AgNP a ninguna de las concentraciones evaluadas en comparación con el control negativo. Las concentraciones bajas de AgNP (0.012 y 0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) promueven el crecimiento de los cultivos de bazo, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el control negativo.

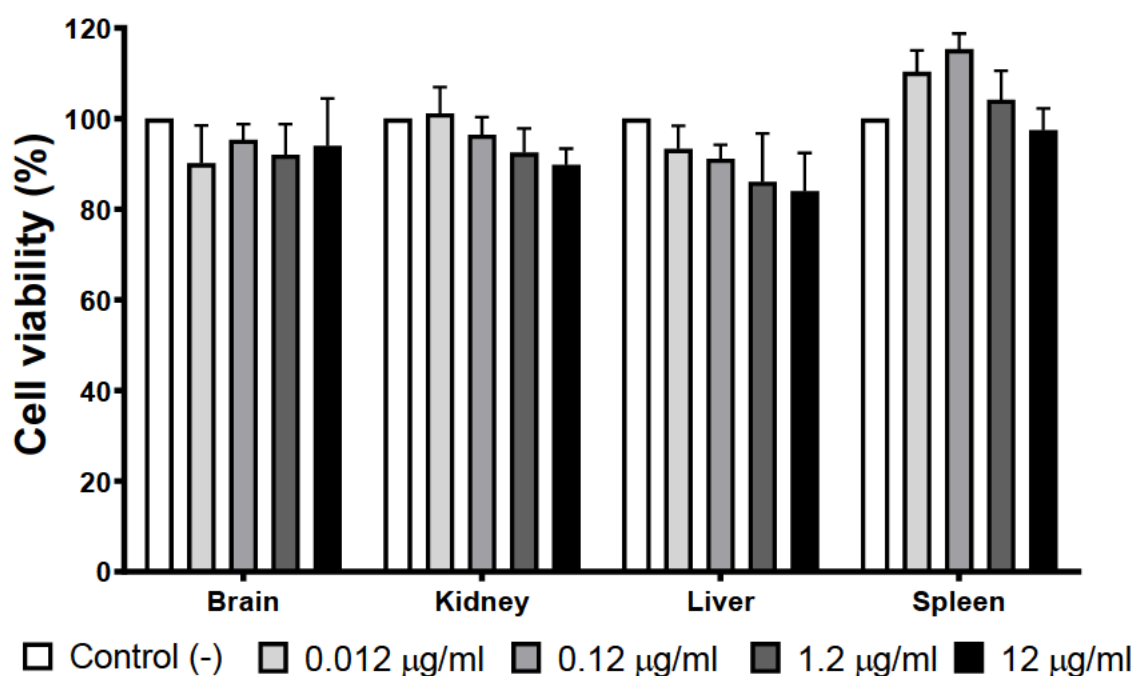


Figura12. Efecto de los AgNP sobre la viabilidad celular de cultivos primarios seleccionados. Los cultivos primarios de cerebro, riñón, hígado y bazo obtenidos de ratones Balb / c se expusieron a 0,012, 0,12, 1,2 y 12 $\mu\text{g} / \text{ml}$ durante 24 horas. Para cada tipo de célula, se utilizó el cultivo primario sin tratamiento como control negativo.

Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citokinesis (CBMN)

Para completar el comportamiento citotóxico in vitro de esta formulación de AgNP, realizamos el ensayo de micronúcleos de bloqueo de citocinesis (CBMN) con linfocitos de sangre periférica humana (HPBL). Este ensayo no solo nos permite determinar el potencial daño genotóxico sino registrar biomarcadores citotóxicos como la capacidad de proliferación de las células, apoptosis y necrosis. Las HPBL se expusieron al mismo intervalo de concentración que el utilizado en cultivos primarios de ratones, 0,012 a 12 $\mu\text{g/ml}$.

La formulación de AgNPs utilizada en este trabajo no resulta ni citotóxica ni genotóxica para HPBL en el rango de concentración evaluado. No se observaron cambios en el índice de división nuclear (NDI), índice de replicación (RI), citostasis y apoptosis por exposición a AgNP en comparación con el control negativo (Figuras 13a-d). Hay un aumento del 10% en la necrosis en comparación con el control, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 13e). Ninguna de las concentraciones evaluadas genera una frecuencia de micronúcleos superior a la observada para el control negativo (Figura 13f). La frecuencia de brotes nucleares (NBUD) y puentes nucleoplasmáticos (NPB) es casi el doble en linfocitos expuestos a 1,2 y 12 $\mu\text{g/ml}$ de AgNP (Figuras 13g-h) en comparación con el control negativo. A pesar de eso, un análisis de Kruskal-Wallis no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de control y las concentraciones de AgNP evaluadas.

Es fundamental mencionar que el rango de concentración de AgNPs utilizado para evaluar el daño citotóxico y genotóxico en linfocitos incluye los valores de IC50 encontrados en los ensayos de actividad antiproliferativa contra líneas celulares tumorales humanas (2,13 $\mu\text{g/ml}$) y trofozoitos de *E. histolytica* (7,47 $\mu\text{g/ml}$). Por tanto, las concentraciones que inhiben eficazmente la proliferación de células tumorales de colon humano y trofozoitos de *E. histolytica* no son ni citotóxicas ni genotóxicas para HPBL in vitro.

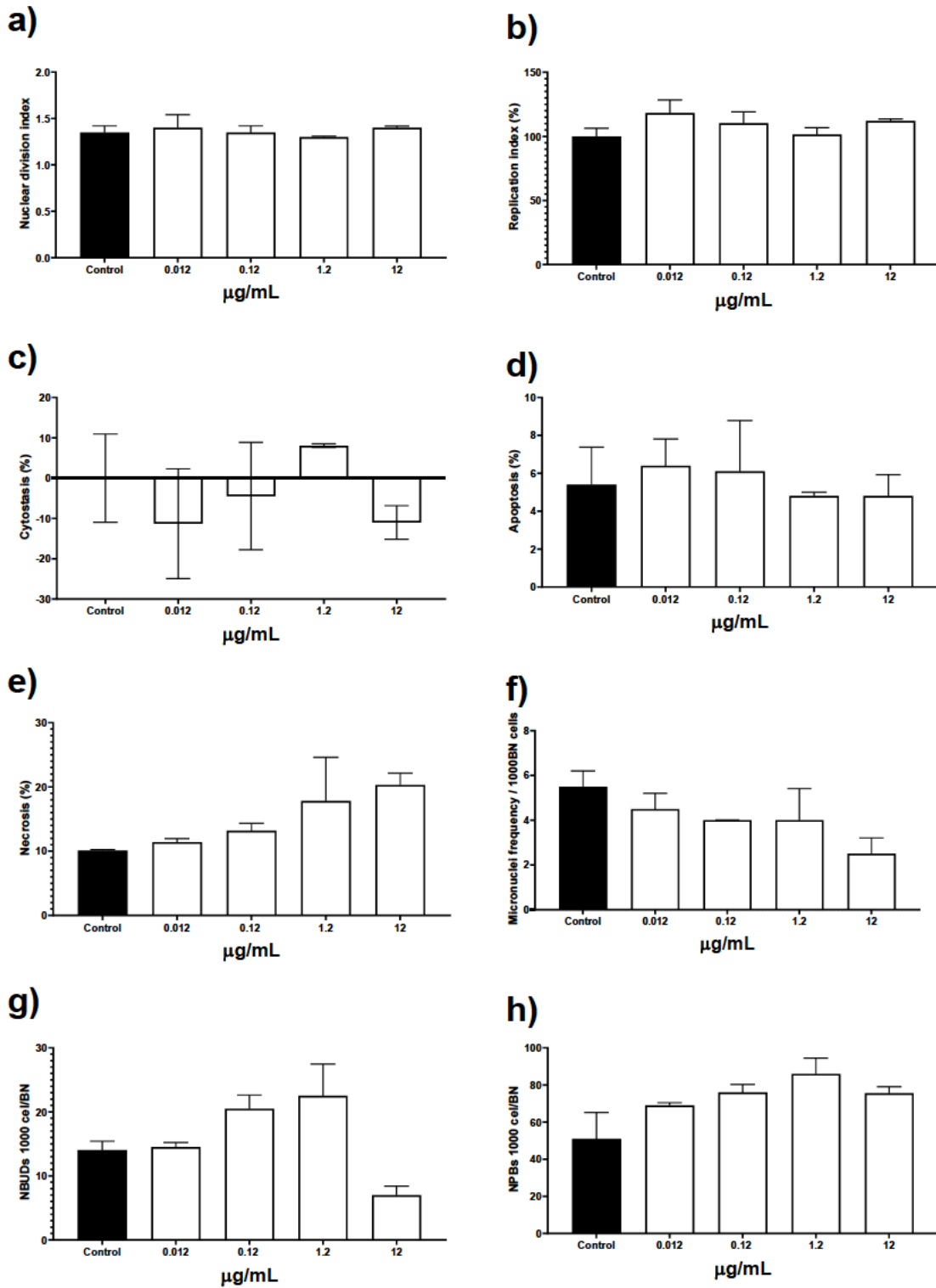


Figura 13. Evaluación de los efectos citotóxicos y genotóxicos de diferentes concentraciones de AgNPs sobre linfocitos de sangre periférica humana (HPBL). Las HPBL se expusieron a 0.012, 0.12, 1.2 y 12 µg/mL siguiendo el ensayo CBMN registrando los biomarcadores a) índice de división nuclear; b) índice de replicación; c) citostasis; d) apoptosis; e) necrosis; f) frecuencia de micronúcleos; g) yemas nucleares

(NBUD) y h) puentes nucleoplasmáticos (NPB). El * representa diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en comparación con el control negativo.

Estudios *in vivo*

La dosis letal de AgNPs determinada en ratones BALB/c según la Directriz 420 de Ensayo de Toxicidad Oral Aguda de la OCDE muestra la baja toxicidad de esta formulación, ya que todos los ratones a los que se les administró 2618 mg de plata metálica por kg de peso corporal en un período de 24 horas sobreviven al período de observación de 14 días. La dosis antes mencionada, 2618 mg de plata metálica/kg, coloca a esta formulación en la Categoría 5 de acuerdo con la Clasificación Globalmente Armonizada (GHS,2019). Después de 14,4 mg de plata metálica (6 h) en los ratones, el letargo y el encorvamiento fueron observado. Un ratón presentó secreción ocular bilateral tras la quinta administración. Se observó diarrea en todos los ratones después de la administración de 24 mg de plata metálica (14 h). Se observó cabello alborotado y deshidratación después de 43,2 mg de plata metálica (18 h). Estas condiciones se mantuvieron hasta el final de la prueba límite, es decir, la administración de 57,6 mg de plata metálica por ratón (24 h). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, todos los ratones sobrevivieron al proceso de administración y al período de observación de 14 días.

Al final del período de observación, se cuantificaron los niveles de glucosa (GLU), fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en la sangre extraída por punción cardíaca. La Tabla 3 recopila los cuatro valores de biomarcadores encontrados en ratones a los que se les administró AgNP. A excepción de AST, que presenta un aumento significativo en su concentración, los otros biomarcadores se encontraban dentro del rango reportado para ratones BALB/c en comparación con el grupo control.

Tabla 3. Marcadores bioquímicos de ratones expuestos a AgNPs durante la prueba límite.

Analito	Unidades	Valores obtenidos durante la prueba límite			Valores de referencia			
		Media	Desv. Estandar	N	Media	Bajo	Alto	N
ALP	U/L	305	229	5	187	108	367	138
ALT	U/L	127	193	5	63	40	170	121
AST	U/L	552	630	5	154	67	381	130
Glucosa	mg/dL	136	18	5	193	85	281	132

Fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST), Alanina aminotransferasa (ALT) y concentraciones de Glucosa (Glu) se cuantificaron y compararon con los valores de referencia de ratones BALB/c.

Resultados histopatológicos

El análisis histológico de órganos de ratones expuestos a AgNP durante la prueba límite confirma la baja toxicidad ejercida por los AgNP. En general, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones del grupo de control y los que recibieron AgNP. Sin embargo, el daño difuso observado en los diferentes tejidos analizados se recopiló en la Tabla 4. Se observaron pequeños parches sangrantes en los pulmones y necrosis tubular difusa en esteatosis renal y hepática (Figura 14a-c). El bazo de estos animales también exhibe signos difusos de congestión y dos tercios de los ratones presentan hematopoyesis; sin embargo, la última condición es típica en esta especie (Figura 14d). Dos tercios del cerebro de este animal presentan signos tempranos de isquemia; sólo un tercio presenta congestión capilar en el intestino y el tejido cardíaco analizado no presenta daño.

Table 4. Análisis histopatológico de riñón, hígado, pulmón, bazo, cerebro, intestino y corazón de ratones BALB/c expuestos a AgNPs.

Tejido	Hallazgos histopatológicos	Incidencia
Riñón	Tubular necrosis data	6/6
Hígado	Microvesicularsteatosis and capillarycongestion	6/6
Pulmón	Small bleedingpatches	6/6
Bazo	Capillarycongestion and hematopoiesis	6/6 y 4/6, respectivamente
Cerebro	Earlysignsorischemia	4/6
Intestino	Capillarycongestion	2/6
Corazón	Near normal	6/6

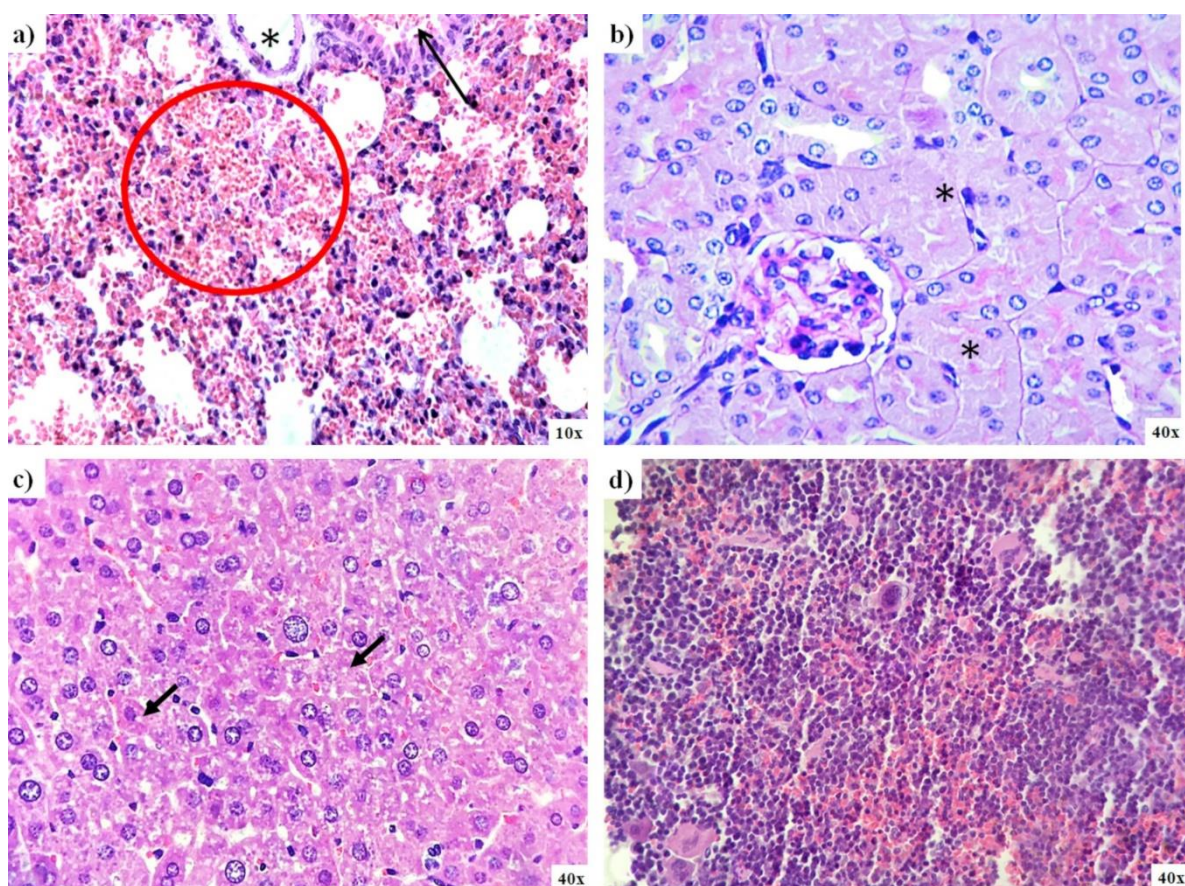


Figure 14. Análisis de patología pulmonar, renal, hepática y esplénica de ratones expuestos a AgNP a partir de la determinación de dosis letales. a) pequeñas manchas sangrantes

(círculo rojo) y luz bronquiolar (flecha negra) que se encuentran en el pulmón; b) células sin núcleo que indiquen necrosis encontradas en los túbulos renales (asterisco); c) evidencia de microvesicularsteatosis en el hígado, y d) tejido del bazo que exhibe leves signos de congestión.

CAPITULO V

5.1 Discusión

La versatilidad de los AgNP en el campo biomédico se ha demostrado y discutido en varias revisiones recientes (Ullah et al., 2018; Sánchez-López et al., 2020; Krishnan et al., 2020; Zielińska et al., 2020). Su actividad antimicrobiana, antiviral, antiparasitaria y antiproliferativa se basa en propiedades fisicoquímicas como el tamaño, la carga superficial y el agente de recubrimiento (Recordati et al., 2016; Yan et al., 2016; Nallanthighal et al., 2017; Wu et al., 2019; Akter et al., 2018). El uso de PVP como agente de recubrimiento de AgNP reduce los efectos citotóxicos y genotóxicos observados en otras formulaciones de tamaño similar, pero sin recubrimiento o estabilizadas con citrato (Ivask et al., 2015; Vecchio et al., 2014; Ahlberg et al., 2014; Foldbjerg et al., 2009; Foldbjerg et al., 2009). Uno de los mecanismos sugeridos para la respuesta biológica provocada por los AgNP es ROS sobreproducción (Yan et al., 2016; Akter et al., 2018; Li et al., 2017; Kim et al., 2013; Mao et al., 2016; Joardan et al., 2020) asociada con la liberación de iones de plata en formulaciones inestables o la nanopartícula completa (Ivask et al., 2015; Ruiz-Ruiz et al., 2020). La sobreproducción de ROS se puede utilizar para eliminar o reducir el crecimiento susceptible a cultivos de desequilibrios redox como tumores y parásitos (Nowak-Sliwinska et al., 2019; Kirtonia et al., 2021; Bogdanchikova et al., 2016).

Durante las últimas décadas, las nanopartículas metálicas (Laprise-Pelletier, Simão y Fortin 2018; Núñez, Estévez y del Pilar Chantada 2018; Sivakumar et al. 2018) y particularmente los AgNP (Y. Li et al. 2018) han mostrado una potencial para inhibir la proliferación de células tumorales. Se ha publicado que la toxicidad de los AgNPs podría estar relacionada con la liberación de iones Ag^+ (Verano-Braga et al. 2014; Piao et al. 2011; Austin et al. 2011) o con las nanopartículas completas (Piao et al. 2011; Austin et al. 2011) que inducen la generación de ROS, modificando el potencial transmembrana de las mitocondrias y, a su vez, desencadenan la activación de varias vías de muerte celular.

Las propiedades fisicoquímicas de los AgNP como tamaño, recubrimiento y contenido metálico se han relacionado con su efecto citotóxico en células de mamíferos (Franchi et al. 2015; Kim y Ryu 2013; Shi, Sun y He 2018). En las líneas celulares humanas, el tamaño de los AgNP desempeña un papel clave en los efectos sobre la viabilidad, la

integridad de la membrana y la generación de ROS (Kim y Ryu 2013; Foldbjerg et al. 2009; Carlson et al. 2008; D. Guo et al. 2013). Específicamente, un tamaño más pequeño de AgNP induce una mayor citotoxicidad (Liu et al. 2010; Avalos et al. 2016; Wang et al. 2010; Joksić et al. 2016). Por otro lado, los agentes de recubrimiento proporcionan diferentes grados de estabilidad que influyen directamente en los efectos citotóxicos y genotóxicos (Bartłomiejczyk et al. 2013; Ivask et al. 2015; Vecchio et al. 2014).

El efecto de la formulación de AgNPs estudiada en este trabajo en células de melanoma murino B16-F10 con una CI50 de 4.2µg/mL después de 24 h de exposición, es bastante similar al encontrado para líneas de células tumorales humanas de cérvix (HeLa), mama (MDA- MB-231 y MCF-7), próstata (DU-145), colorrectal (DLD-1 y HT-29) y pulmón (H-1299 y H-1437). Para todos ellos, los valores de CI50 encontrados estuvieron dentro del rango de concentración de 1,82 a 3,43 µg / mL tras el mismo tiempo de exposición. Como se encontró para B16-F10 en este trabajo, en todo tipo de células tumorales evaluadas, la principal vía de muerte celular inducida es la apoptosis y la viabilidad celular mostró una relación inversa con la sobreproducción de ROS. En el valor de CI50 determinado para cada célula tumoral, no se encontraron daños en el ADN de acuerdo con los ensayos de cometa realizados (Juárez-Moreno et al.2017).

Curiosamente, de acuerdo con la cinética de proliferación, los principales cambios provocados por los AgNP en las células B16-F10 no se produjeron a las 24 h, sino solo después de 6 h de exposición (Figura 1). Después de este tiempo de exposición, la viabilidad celular y la sobreproducción de ROS han mostrado una relación inversa (Figura 2); además, la apoptosis alcanzó sus niveles más altos sin evidencia de necrosis (Figura 1), por lo que los AgNPs necesitan solo 6h para provocar el daño celular que conduce al melanoma. células mueren por apoptosis (Figuras 1 y 2).

A pesar de que tanto los agentes AgNPs como CisPt, producen efectos similares en las células de melanoma con respecto a la viabilidad celular y la sobreproducción de ROS, la consecuencia final es bastante diferente. Mientras que el primero induce solo la apoptosis como la principal vía de muerte celular, el segundo induce prácticamente la misma cantidad de apoptosis y necrosis.

En condiciones *in vitro*, el aducto CisPt-ADN se puede formar después de 1 a 3 h en células sanguíneas y tejido tumoral de pacientes con cáncer (Fichtinger-Schepman et al. 1990). Por lo tanto, la rápida obtención del aducto CisPt-ADN, disminución de glutatión (GSH) (Alemón-Medina et al.2011) y la producción de ROS en la mitocondria que, a su vez, colapsa la producción de energía (Choi et al.2015) podrían ser factores independientes o concomitantes que contribuyan a la presencia de 40 veces más necrosis después de la administración de CisPt en comparación con la exposición a AgNP.

Aunque el mecanismo molecular de citotoxicidad provocado por esta formulación de AgNPs aún no se ha aclarado por completo, estos resultados representan una ventaja importante para los AgNP en comparación con CisPt porque los restos celulares necróticos promueven una respuesta proinflamatoria que se asocia con daño tisular, procesos que no se observan con la inducción de muerte celular programada (X. Guo et al. 2012).

Además, la actividad antitumoral observada en ratones tratados con CisPt es completamente diferente de la observada con tratamientos con AgNPs. Los animales tratados con CisPt murieron el día 11 después del inicio del tratamiento. Durante este tiempo, muestran letargo y pérdida de apetito. Esta sintomatología podría estar relacionada con el daño rápido e incontrolable que se produce a nivel celular, que podría ser promovido por la sobreproducción de ROS en las mitocondrias y la alteración de la estructura del ADN que finalmente desencadena la necrosis como principal vía de muerte celular.

A diferencia del tratamiento con CisPt, los tratamientos con AgNPs lograron un tiempo de supervivencia notable con las tres concentraciones ensayadas. Al menos un ratón de los grupos tratados con 3, 6 o 12 mg/kg de AgNPs alcanzó el día 21 del tratamiento, lo que representa casi una cuadruplicación de la vida útil en comparación con los ratones inyectados con agua y el doble en comparación con los tratados con CisPt.

Hasta donde sabemos, solo hay dos artículos que analizan el efecto de los AgNP en un modelo murino de melanoma *in vivo*. En el primer trabajo (Lin et al. 2014), se realizó un estudio de 17 días utilizando wortmanina, AgNPs o la combinación de ambos. Se utilizó la administración diaria durante 5 días comenzando con un rango de volumen tumoral de

50-100 mm³. Los animales se sacrificaron ocho días después del final del tratamiento (13 días de observación).

Este esquema de tratamiento es bastante diferente al recomendado por los NIH, pero es importante señalar que los autores del trabajo se centraron en la modulación de la autofagia para potenciar el efecto antiproliferativo de los AgNP contra las células cancerosas (Lin et al. 2014). En general, Lin y sus colegas encontraron una inhibición del crecimiento tumoral mucho menor que la que encontramos en la misma ventana de tiempo (trece días después de comenzar el tratamiento).

El mayor volumen tumoral que encuentran en sus controles el día 13 después del inicio del tratamiento es de aproximadamente 1200 mm³, los tratados con sus AgNP tienen un volumen tumoral cercano a 500 mm³ y la combinación de AgNP con wortmanina alrededor de 300 mm³. En este trabajo, encontramos que, el día 13 después de iniciado el tratamiento, los ratones inyectados con agua y CisPt ya murieron, mientras que el ratón superviviente del grupo inyectado con PVP tiene un volumen tumoral de 9500 mm³ y todos los ratones tratados con AgNP presentan volúmenes tumorales entre 800 y 1150 mm³ (Figura 5). Desafortunadamente, estos datos no son concluyentes debido a que las diferencias en el volumen tumoral inicial, frecuencia de dosificación, días de tratamiento, días de seguimiento y un contenido de plata desconocido de los AgNP utilizados por ellos no nos permiten hacer una comparación directa con los resultados encontrados en este trabajo.

El segundo artículo (Kang et al. 2011) es bastante diferente porque se centra en la capacidad angiogénica de los AgNP. Informan que las células de melanoma B16-F10 expuestas a AgNPs y luego inyectadas intradérmicamente en ratones C57BL6, indujeron angiogénesis en el área cercana al tumor y aumentaron la concentración de hemoglobina dentro del tumor. Las nanopartículas más pequeñas (2 nm, Tabla 1) provocaron la vascularización alrededor del tumor tumor en el modelo de melanoma y el efecto angiogénico aumenta si las células se expusieron previamente a los AgNP. El efecto angiogénico provocado por dosis bajas de AgNP podría promover el crecimiento del tumor, pero esto se revierte cuando aumenta la dosis o el tamaño de la nanopartícula (Kang et al. 2011).

Por otro lado, los AgNPs con mayor tamaño (53 nm, Tabla 1) inducen autofagia en células de melanoma con concentraciones altas o inducen la supervivencia celular con concentraciones más bajas. Estos trabajos, incluido el nuestro, son ejemplos del gran impacto que tiene el tamaño de nanopartículas con el mismo agente estabilizador en el melanoma murino, lamentablemente no se puede decir lo mismo de la concentración de plata presente en cada estudio por la falta de información (Tabla 1). Las principales similitudes y diferencias entre la caracterización de las AgNPs publicados anteriormente y los AgNPs utilizados en este trabajo en un modelo de melanoma *in vivo* se muestran en la Tabla 2.

Tabla2: Propiedades fisicoquímicas de AgNPs empleadas *in vivo* en modelos de melanoma murino.

Propiedades	Lin(Lin et al., 2014)	Kang(Kang et al., 2011)	Este trabajo
Tamaño de AgNPs (nm)	58.8±1.7	2.3	35±15
Agente protector	PVP	PVP	PVP
Potential Z (mV)	-12.9±1.1	-0.28	-15
Contenido de plata metálica (%)	ND*	ND*	1.2
Diametro del tumor inicial (mm)	4-6	NA [†]	10
Dosis utilizada plata metálica (mg/Kg)	1.5	1,5 and 10	3, 6 and 12
Días de administración del tratamiento	5	NA [†]	21
Frecuencia de dosis	24h	NA [†]	48h
Días sin tratameinto antes del sacrificio	8	NA [†]	7

* ND: No determinado. [†] NA: No aplica.

Un resultado muy importante de este trabajo es que a la dosis más alta de AgNPs ensayada (12mg/Kg) el crecimiento tumoral parece inhibirse, ya que el volumen tumoral permanece constante durante todo el período observacional (siete días), es decir, desde el Del 31 al 38 del experimento (Figura 5).

Esta respuesta debe estar necesariamente relacionada con el comportamiento dosis-dependiente observado en el recuento de EPC, que podría interpretarse como un menor efecto de mielosupresión a medida que aumentan las dosis de AgNPs. Además, esto es consistente con el comportamiento general de los ratones tratados con AgNPs, que continuaron activos y alimentándose, a pesar del tamaño del tumor. Contrario al

comportamiento observado en ratones tratados con CisPt, y los del grupo de control negativo (Figura 8). Estos resultados sugieren un efecto protector dependiente de la dosis provocado por los tratamientos con AgNPs (Figura 8).

De la figura 8 se desprende claramente que la PVP proporciona una mayor protección contra el efecto mielosupresor. Sin embargo, solo la combinación de PVP y plata metálica para obtener la formulación de AgNPs posee tanto el efecto protector contra la mielosupresión como la actividad antitumoral.

Además, no se observó ningún efecto genotóxico en los tratamientos con AgNP de 3 y 12 mg/kg, ambos con un recuento de MNE por debajo del límite superior del rango informado para este ratón (Aeschbacher 1986), marcado en la Figura 6 con líneas rojas. Los ratones del grupo de control positivo (con melanoma y sin tratamiento) mostraron un recuento de MNE dentro del rango marcado, así como los ratones tratados con PVP. En este sentido, dado que se ha informado que los roedores son más sensibles que los humanos al daño genotóxico inducido por AgNP (de Lima, Seabra y Durán 2012), se esperaría un daño muy bajo causado por la administración de la formulación de AgNPs estudiada aquí en humanos.

Por el contrario, las muestras del último ratón del grupo tratado con CisPt mostraron casi el doble de MNE. Eso podría estar asociado con la inducción de necrosis y el tiempo de supervivencia limitado observado en ratones tratados con este compuesto. Se sabe que los fármacos a base de platino, entre ellos CisPt, son genotóxicos. Este hecho está relacionado con la aparición de nuevos tumores y la farmacorresistencia, lo que significa que, incluso cuando el tratamiento con CisPt es eficaz contra un tumor, existe un riesgo oncogénico por su efecto genotóxico (Sanderson, Ferguson y Denny 1996).

En cuanto al comportamiento observado para los ratones tratados con 6 mg/kg de AgNP, estos experimentos no aportan suficientes argumentos para explicar la muerte del último ratón cinco días antes que los demás animales supervivientes tratados con 3 y 12 mg/kg de AgNP respectivamente (Figura 6). Pero, como en el caso de CisPt, la mayor cantidad de MNE en comparación con los valores basales podría estar asociada con la muerte de ese ratón. Deben realizarse más experimentos para aclarar este punto.

Los ratones de supervivencia presentan parámetros hematológicos bastante similares a los encontrados en ratones sanos (Otto et al.2016), pero el aumento observado en WBC y LYMPH con la dosis más baja de AgNPs (3 mg/kg) es consistente con la activación de células del sistema inmunológico por baja concentración de AgNPs (Castro-Gamboa et al.2019). Por otro lado, los niveles más bajos de hemoglobina (HGB) y hematocrito (HCT) en ratones de supervivencia tratados con 3 y 12 mg/kg de AgNP, se pueden interpretar como anemia.

Se ha informado que la plata coloidal nanométrica estabilizada con PVP puede inducir la disminución de HCT y HGB (Shumakova et al. 2015), y otros AgNP promovieron la formación de trombos venosos por agregación plaquetaria (Jun et al. 2011). Sin embargo, en este caso, la disminución observada en HCT y HGC podría atribuirse al desarrollo del melanoma en sí. Como se muestra en la sección de resultados, los ratones con melanoma, pero sin tratamiento mostraron una disminución importante en el recuento de PCE. Por lo tanto, los bajos niveles de HCT y HGB podrían ser el resultado de un daño acumulativo debido al progreso de la enfermedad y no a un efecto tóxico del AgNP administrado.

Con el fin de evitar al máximo la anemia en estudios posteriores, se propone una suplementación sistémica de hierro. Se ha informado que esto podría ser más eficaz que una dieta doble de hierro (Seril et al. 2005). Además, se sabe que la deficiencia de otros elementos como el cobre o el selenio podría estar involucrada en el proceso de anemia (Matak et al. 2013; Kaushal et al. 2011), pero esto está fuera del alcance de este trabajo, y un análisis posterior debe hacerse para identificar la causa y prevenir la anemia.

Por tanto, este trabajo presenta un estudio sistemático para evaluar el efecto antitumoral de los AgNP en el melanoma en condiciones estandarizadas, siguiendo las recomendaciones del NIH y proporcionando la caracterización completa de los AgNP, específicamente la concentración y dosis del componente activo, plata metálica. En consecuencia, la inducción de la apoptosis, la actividad antitumoral, el aumento de la vida útil, la ausencia de genotoxicidad en las muestras de sangre y el efecto protector observado contra la mielosupresión provocada por el melanoma en ratones que han estado expuestos durante 21 días a AgNP, es una sonda irrefutable de la más alta biocompatibilidad de estos AgNP en comparación con CisPt. Todos estos resultados sugieren que los posibles efectos adversos provocados por estos AgNP en humanos

podrían ser menores que los efectos ya conocidos promovidos por CisPt. Esto enfatiza el potencial de los AgNP como una alternativa para el tratamiento del cáncer e insta a que sus estudios preclínicos sean completos.

En este trabajo, también se ha caracterizado completamente una nueva formulación de AgNPs recubiertos de proteína denominada BioArgovit®. Los AgNP estudiados aquí presentan una forma esférica con un diámetro promedio de $33,38 \pm 5,66$ nm obtenido por TEM y $165,5 \pm 105$ nm determinado por DLS. El contenido de plata y proteína hidrolizada es 1,4% y 18,1% del peso total de la formulación, respectivamente. La resonancia de plasmón se encontró a 409 nm, con una potencial zeta de $2,34 \pm 4,72$ mV. Las propiedades fisicoquímicas de esta nueva formulación son bastante similares a las encontradas para una formulación de PVP-AgNP previamente estudiada por nuestro grupo de investigación (Ruiz-Ruiz et al., 2020; Casillas-Figueroa et al., 2020; Kim et al., 2013; Bogdanchikova et al., 2016; Guerra et al., 2020; D'Arcy et al., 2019; Xu et al., 2020).

Se observó una relación directa entre la viabilidad de las células del adenocarcinoma humano y la sobreproducción de ROS. Las ROS se han sobreproducido principalmente en las mitocondrias de las células HCT-15. La sobreproducción mitocondrial de ROS podría ser responsable de desencadenar la vía intrínseca de muerte celular (Calvert et al., 1982) que finalmente conduce a la gran cantidad de eventos de apoptosis registrados en las células HCT-15 (Figura 10d). El comportamiento mencionado anteriormente ya se describió en células de cuello uterino tumorales humanas (HeLa y SiHa) expuestas a Ginkgo-biloba-AgNP (Chen et al., 2017) y en melanoma murino (B16F10) (Kim y Ryu, 2013) y células tumorales humanas del cuello uterino (HeLa) y mama (MCF. -7 y MDA-MB-231) expuestas a diferentes concentraciones de PVP-AgNPs (Juarez-Moreno et al., 2017).

La sobreproducción de ROS podría ser una de las principales vías que conducen a la muerte de retrozoos de *Entamoeba histolytica* expuestos a la formulación de AgNP recubiertos de proteína. La sobreproducción de ROS ya se informó como un promotor de la muerte de parásitos marinos expuestos a PVP-AgNP (Bravo-Guerra et al., 2020; Pimentel-Acosta et al., 2019). El efecto antihelmíntico del extracto de diente de ajo-AgNPs (Vijayakumar et al., 2019) y la actividad antipalúdica de *Dicoma Anomala* Sond.

Extracto de raíz-AgNPs (Tripathy, Rademan y Matsabisa, 2020) también se asociaron con la sobreproducción de ROS. Es la primera vez que se ha informado de la actividad amebicida contra los trofozoítos de *Entamoebahistolytica*.

La formulación de AgNPs evaluada aquí muestra citotoxicidad selectiva. No se observó daño citotóxico en cultivos primarios murinos (cerebro, riñón, hígado, bazo) con el rango de concentración evaluado (0,012 a 12 $\mu\text{g/ml}$). No se observó daño genotóxico ni genotóxico en HPBL expuestos al mismo rango de concentraciones. No hay diferencia en los micronúcleos, los puentes de nucleoplasma o el movimiento nuclear en comparación con el control negativo según el ensayo CBMN. La concentración de AgNP de 12 $\mu\text{g/ml}$ es casi el doble y más de 5 veces mayor que la concentración necesaria para inhibir la proliferación de trofozoítos de *E. histolytica* (7,47 $\mu\text{g/ml}$) y adenocarcinoma humano (2,13 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente.

No hay ningún cambio en la viabilidad de las células primarias de los ratones en comparación con el control negativo, solo un pequeño aumento no estadísticamente diferente en cultivos de bazo expuestos a 0,012 y 0,12 $\mu\text{g/ml}$ de AgNP. El aumento mencionado podría estar relacionado con la respuesta inmunológica provocada por los AgNP, lo que conduce a la proliferación de linfocitos. El resultado concuerda con la estimulación inmunológica reportada para diferentes formulaciones de AgNP en diversos organismos (Castro-Gamboa et al., 2019; Huang et al., 2016; Joksic et al., 2016; Shaniba et al., 2019; Chakraborty et al., 2016; Liao, Li y Tjong, 2019). La toxicidad selectiva de la formulación de AgNP estudiada en este trabajo también se confirmó con el análisis histopatológico y la dosis letal. Después de la administración de AgNPs 2618 mg Ag/kg de peso corporal, no hay comportamiento muerto o anormal durante o después del período de observación de 14 días, solo daño difuso en órganos seleccionados, a saber, riñón, hígado, pulmón, bazo, cerebro, intestino y corazón (Tabla 4 y Figura 14). Además, los niveles dentro del rango promedio de biomarcadores bioquímicos como ALT, AST, APT y niveles de glucosa también sugieren una alta biocompatibilidad (Tabla 3). Los niveles elevados de AST (Tabla 3) sin evidencia de daño en tejidos como el hígado, el bazo, el intestino y el riñón (Figura 14) se asocian con la manipulación experimental de animales en lugar de la toxicidad del agente evaluado (Everds, 2015).

Asimismo, Kim (2013) y Maneewattanapinyo (2011) informaron sobre formulaciones de AgNP con dosis letales determinadas en modelos murinos de 2000 y 5000 mg/kg de peso corporal, respectivamente. Estas formulaciones también se pueden clasificar en la Categoría 5 del GHS. Desafortunadamente, se reportó escasa información fisicoquímica para comparar directamente con la formulación estudiada en este trabajo. Propiedades de formulación de AgNPs. La respuesta biológica para los AgNP recubiertos de proteína y los PVP-AgNP es bastante similar a pesar de la modificación del agente de recubrimiento; ambos muestran una notable actividad antiproliferativa contra las células tumorales y bajos efectos citotóxicos-genotóxicos contra los cultivos primarios. Por lo tanto, el tamaño, la forma y la relación [agente de recubrimiento]/[metal] son elementos cruciales para diseñar AgNP eficaces y seguros.

CAPITULO VI

6.1. Conclusiones

Este trabajo es un enfoque sistemático para evaluar el efecto antiproliferativo y antitumoral de los AgNP en el melanoma en condiciones estandarizadas siguiendo el protocolo recomendado por los NIH. La formulación de AgNPs estudiada en este trabajo,

Argovit®TM, posee una mayor actividad antitumoral y biocompatibilidad en ratones C57BL / 6JNHsd inoculados con células B16-F10 de melanoma murino que la encontrada para uno de los agentes quimioterapéuticos más empleados en el tratamiento del melanoma, CisPt.

La mayor biocompatibilidad de estos AgNP en comparación con CisPt, se manifiesta in vitro como la inducción de la apoptosis como la principal vía de muerte celular después de 6 h de exposición desencadenada por la sobreproducción de ROS, principalmente en las mitocondrias. Mientras tanto, en los ensayos in vivo se observa su alta capacidad para reducir el crecimiento tumoral, el notable aumento de la vida útil (cuádruple en comparación con los no tratados y el doble con los tratados con CisPt), la ausencia de daño genotóxico y el posible efecto protector contra la mielosupresión, provocada por la progresión natural del melanoma.

Estos hallazgos muestran la importancia de las características fisicoquímicas adecuadas, como el tamaño (35 nm), el contenido óptimo de Ag metálico y la relación Ag/PVP metálica efectiva que proporcionan alta estabilidad a AgNPsa, para provocar la disminución de la tasa de crecimiento tumoral y aumentar la vida. expectativa en personas con uno de los cánceres de piel más agresivos conocidos. Todo ello, sin efectos genotóxicos evidentes e incluso disminuyendo la mielosupresión provocada por la progresión natural de la enfermedad, instando a la completitud de sus estudios preclínicos.

Una nueva formulación de AgNPs recubiertos de proteína se caracterizó por técnicas espectroscópicas en su totalidad, mostrando nanopartículas de AgNPs esferoidales con un promedio de $33,3 \pm 5,6$ nm. Esta formulación de AgNP inhibe el crecimiento de células HCT-15 de manera más eficiente que el desarrollo de trofozoítos de *E. histolytica*, aunque sin causar una disminución en la viabilidad en cultivos primarios de ratón de cerebro, hígado, bazo y riñón. Además, los AgNP no muestran daños citotóxicos o genotóxicos en los linfocitos de sangre periférica humana expuestos a 0,012 a 12 ug/ml de esta formulación de AgNP. La potencia antiproliferativa de los AgNP contra las células HCT-15 es diez veces mayor en comparación con el carboplatino. El análisis histopatológico y la dosis letal determinada para la formulación de AgNP recubiertos de proteína en ratones Balb / c muestran su alta biocompatibilidad. El primero muestra daño difuso a los órganos seleccionados, mientras que el segundo, con un valor de $LD_{50}=2618$ mg de Ag/Kg de

peso corporal, corresponde a la Categoría 5 del SGA. Los resultados obtenidos en este trabajo brindan información adicional para producir nanomateriales seguros y efectivos para aplicaciones biomédicas, específicamente para el diseño de AgNP que pueden inhibir o eliminar células sensibles a la sobreproducción de ROS, como los parásitos de tumores, de manera selectiva.

Referencias

- A. A. Shumakova, V. A. Shipelin, Y. S. Sidorova et al., “Toxicological evaluation of nanosized colloidal silver, stabilized with polyvinylpyrrolidone. I. Characterization of nanomaterial, integral, hematological parameters, level of thiol compounds and liver cell apoptosis,” *Voprosy Pitaniia*, vol. 6, pp. 46–57, 2015.
- A. Avalos, A. I. Haza, D. Mateo, and P. Morales, “Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts,” *International Wound Journal*, vol. 13, no. 1, pp. 101–109, 2016.
- A. Ivask, N. H. Voelcker, S. A. Seabrook et al., “DNA melting and genotoxicity induced by

- silver nanoparticles and graphene,” *Chemical Research in Toxicology*, vol. 28, no. 5, pp. 1023–1035, 2015.
- A. M. J. Fichtinger-Schepman, S. D. van der Velde-Visser, H. C. M. van Dijk-Knijnenburg, A. T. van Oosterom, R. A. Baan, and F. Berends, “Kinetics of the formation and removal of cisplatin-DNA adducts in blood cells and tumor tissue of cancer patients receiving chemotherapy: comparison with *in vitro* adduct formation,” *Cancer Research*, vol. 50, no. 24, pp. 7887–7894, 1990.
- A. R. Ochoa-Meza, A. R. Álvarez-Sánchez, C. R. Romo-Quiñonez et al., “Silver nanoparticles enhance survival of white spot syndrome virus infected *Penaeus vannamei* shrimps by activation of its immunological system,” *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 84, pp. 1083–1089, 2019.
- A. R. Ochoa-Meza, A. R. Álvarez-Sánchez, C. R. Romo-Quiñonez et al., “Silver nanoparticles enhance survival of white spot syndrome virus infected *Penaeus vannamei* shrimps by activation of its immunological system,” *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 84, pp. 1083–1089, 2019.
- Ahlberg, S.; Antonopulos, A.; Diendorf, J.; Dringen, R.; Epple, M.; Flöck, R.; Goedecke, W.; Graf, C.; Haberl, N.; Helmlinger, J.; et al. PVP-Coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-Center study of their physicochemical characteristics, cell culture and *in vivo* experiments. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2014, 5, 1944–1965.
- Akhtar, M.J.; Ahamed, M.; Alhadlaq, H.A. Challenges facing nanotoxicology and nanomedicine due to cellular diversity. *Clin. Chim. Acta* 2018, 487, 186–196. [CrossRef]
- Akhtar, M.J.; Ahamed, M.; Alhadlaq, H.A. Challenges facing nanotoxicology and nanomedicine due to cellular diversity. *Clin. Chim. Acta* 2018, 487, 186–196.
- Akter, M.; Sikder, M.T.; Rahman, M.M.; Ullah, A.K.M.A.; Hossain, K.F.B.; Banik, S.; Hosokawa, T.; Saito, T.; Kurasaki, M. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J. Adv. Res.* 2018, 9, 1–16.
- Alberto, H., Metálicas, N., Superficie, Y. P. D. E., & Relación, U. N. A. (2012). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323627686007>.
- American Cancer Society, *Cancer facts and figures 2018*, American Cancer Society, 2018.
- Ávalos, A., Haza, A. I., & Morales, P. (2015). Manufactured silver nanoparticles of different sizes induced DNA strand breaks and oxidative DNA damage in hepatoma and leukaemia cells and in dermal and pulmonary fibroblasts. *Folia Biologica (Czech Republic)*, 61(1), 33–42.
- Ávalos, A., Haza, A., & Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7(2), 1–23. https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2013.v7.n2.43408
- Awasthi, K. K., Verma, R., Awasthi, A., Awasthi, K., Soni, I., & John, P. J. (2015). *In vivo* genotoxic assessment of silver nanoparticles in liver cells of Swiss albino mice using comet assay. *Advanced Materials Letters*, 6(3), 187–193. <https://doi.org/10.5185/amlett.2015.5640>
- Awasthi, R.; Roseblade, A.; Hansbro, P.M.; Rathbone, M.J.; Dua, K.; Bebawy, M. Nanoparticles in Cancer Treatment: Opportunities and Obstacles. *Curr. Drug Targets* 2018, 19, 1696–1709. [CrossRef] [PubMed]
- Awasthi, R.; Roseblade, A.; Hansbro, P.M.; Rathbone, M.J.; Dua, K.; Bebawy, M. Nanoparticles in Cancer Treatment: Opportunities and Obstacles. *Curr. Drug Targets* 2018, 19, 1696–1709.
- B. Borrego, G. Lorenzo, J. D. Mota-Morales et al., “Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus *in vitro* and *in vivo*,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 12, no. 5, pp. 1185–1192, 2016.
- B. Borrego, G. Lorenzo, J. D. Mota-Morales et al., “Potential application of silver nanoparticles

- to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 12, no. 5, pp. 1185–1192, 2016.
- B. Domingues, J. Lopes, P. Soares, and H. Populo, “Melanoma treatment in review,” *ImmunoTargets and Therapy*, vol. 7, pp. 35–49, 2018.
- B. J. S. Sanderson, L. R. Ferguson, and W. A. Denny, “Mutagenic and carcinogenic properties of platinum-based anticancer drugs,” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 355, no. 1–2, pp. 59–70, 1996.
- Bogdanchikova, N.; Vázquez-Muñoz, R.; Huerta-Saquero, A.; Peña-Jasso, A.; Aguilar-Uzcanga, G.; Picos-Díaz, P.L.; Pestryakov, A.; Burmistrov, V.A.; Martynyuk, O.; Luna-Vázquez-Gómez, R.; et al. Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs. *Int. J. Nanotechnol.* 2016, 13, 227–237.
- Boros E., Dyson P.J., Gasser G. Classification of Metal-Based Drugs according to Their Mechanisms of Action. *Chem.* 2020; 6:41–60.
- Boros, E.; Dyson, P.J.; Gasser, G. Classification of Metal-Based Drugs according to Their Mechanisms of Action. *Chem* 2020, 6, 41–60. [CrossRef]
- Borrego, B.; Lorenzo, G.; Mota-Morales, J.D.; Almanza-Reyes, H.; Mateos, F.; López-Gil, E.; de la Losa, N.; Burmistrov, V.A.; Pestryakov, A.N.; Brun, A.; et al. Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2016, 12, 1185–1192.
- Bravo-Guerra, C.; Cáceres-Martínez, J.; Vázquez-Yeomans, R.; Pestryakov, A.; Bogdanchikova, N. Lethal effects of silver nanoparticles on *Perkinsus marinus*, a protozoan oyster parasite. *J. Invertebr. Pathol.* 2020, 169, 107304. [CrossRef]
- Brkić Ahmed, L., Milić, M., Pongrac, I. M., Marjanović, A. M., Mlinarić, H., Pavičić, I., Gajović, S., & Vinković Vrček, I. (2017). Impact of surface functionalization on the uptake mechanism and toxicity effects of silver nanoparticles in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 349–361. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.016>
- Broutet N y cols. Control Integral del Cáncer Cervicouterino : Publicación Occasional : Guía de Prácticas Esenciales [Internet]. 2014. 292 p. Available from: <http://ezproxy.uis.edu.co:2053/lib/bibliouis/reader.action?docID=10214518>
- Butler, K. S., Peeler, D. J., Casey, B. J., Dair, B. J., & Elespuru, R. K. (2015). Silver nanoparticles: Correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis*, 30(4), 577–591. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev020>
- C. A. A. Hernández, K. Juárez-Moreno, M. E. Castañeda-Juarez, A. P. Horacio Almanza-Reyes, and N. Bogdanchikova, “Silver nanoparticles for the rapid healing of diabetic foot ulcers,” *International Journal of Medical Nano Research*, vol. 4, no. 1, p. 019, 2017.
- C. A. A. Hernández, K. Juárez-Moreno, M. E. Castañeda-Juarez, A. P. Horacio Almanza-Reyes, and N. Bogdanchikova, “Silver nanoparticles for the rapid healing of diabetic foot ulcers,” *International Journal of Medical Nano Research*, vol. 4, no. 1, p. 019, 2017.
- C. Carlson, S. M. Hussain, A. M. Schrand et al., “Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 43, pp. 13608–13619, 2008.
- C. Núñez, S. V. Estévez, and M. del Pilar Chantada, “Inorganic nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer,” *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 23, no. 3, pp. 331–345, 2018.
- Calvert, A.H.; Harland, S.J.; Newell, D.R.; Siddik, Z.H.; Jones, A.C.; Mcelwain, T.J.; Raju, S.; Wiltshaw, E.; Smith, I.E.; Baker, J.M.; et al. Early Clinical Studies with cis-Diammine-1,1-Cyclobutane Dicarboxylate Platinum II. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1982, 9, 140–147.

- Casillas-Figueroa, F.; Arellano-García, M.E.; Leyva-Aguilera, C.; Ruíz-Ruíz, B.; Vázquez-Gómez, R.L.; Radilla-Chávez, P.; ChávezSantoscoy, R.A.; Pestryakov, A.; Toledano-Magaña, Y.; García-Ramos, J.C.; et al. ArgovitTM silver nanoparticles effects on allium cepa: Plant growth promotion without cyto genotoxic damage. *Nanomaterials* 2020, 10, 1386. [CrossRef]
- Casillas-Figueroa, F.; Arellano-García, M.E.; Leyva-Aguilera, C.; Ruíz-Ruíz, B.; Vázquez-Gómez, R.L.; Radilla-Chávez, P.; ChávezSantoscoy, R.A.; Pestryakov, A.; Toledano-Magaña, Y.; García-Ramos, J.C.; et al. ArgovitTM silver nanoparticles effects on allium cepa: Plant growth promotion without cyto genotoxic damage. *Nanomaterials* 2020, 10, 1386.
- Castro-Gamboa, S.; Garcia-Garcia, M.R.; Piñon-Zarate, G.; Rojas-Lemus, M.; Jarquin-Yañez, K.; Angel Herrera-Enriquez, M.; Fortoul, T.I.; Toledano-Magaña, Y.; Garcia-Iglesias, T.; Pestryakov, A.; et al. Toxicity of silver nanoparticles in mouse bone marrow-derived dendritic cells: Implications for phenotype. *J. Immunotoxicol.* 2019, 1–9. [CrossRef] *Pharmaceutics* 2021, 13, 65 16 of 17
- Chakraborty, B.; Pal, R.; Ali, M.; Singh, L.M.; Rahman, D.S.; Ghosh, S.K.; Sengupta, M. Immunomodulatory properties of silver nanoparticles contribute to anticancer strategy for murine fibrosarcoma. *Cell. Mol. Immunol.* 2016, 13, 191–205.
- Chaloupka, K., Malam, Y., & Seifalian, A. M. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 28(11), 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.006>
- Chen, X.; Wang, J.; Fu, Z.; Zhu, B.; Wang, J.; Guan, S.; Hua, Z. Curcumin activates DNA repair pathway in bone marrow to improve carboplatin-Induced myelosuppression. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1–11.
- Cid, M.G.; Mudry, M.; Larripa, I. Chromosome damage induced by carboplatin (CBDCA). *Toxicol. Lett.* 1995, 76, 97–103.
- Cvjetko, P.; Milošić, A.; Domijan, A.M.; Vinković Vrček, I.; Tolić, S.; Peharec Štefanić, P.; Letofsky-Papst, I.; Tkalec, M.; Balen, B. Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2017, 137, 18–28. [CrossRef]
- Cvjetko, P.; Milošić, A.; Domijan, A.M.; Vinković Vrček, I.; Tolić, S.; Peharec Štefanić, P.; Letofsky-Papst, I.; Tkalec, M.; Balen, B. Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2017, 137, 18–28.
- D. Guo, L. Zhu, Z. Huang et al., “Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 32, pp. 7884–7894, 2013.
- D. N. Seril, J. Liao, C. S. Yang, and G. Y. Yang, “Systemic iron supplementation replenishes iron stores without enhancing colon carcinogenesis in murine models of ulcerative colitis: comparison with iron-enriched diet,” *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 50, no. 4, pp. 696–707, 2005.
- D. Schadendorf, A. C. J. van Akkooi, C. Berking et al., “Melanoma,” *The Lancet*, vol. 392, no. 10151, pp. 971–984, 2018.
- D’Arcy, M.S. Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 2019, 43, 582–592.
- de Lima R, Seabra AB, Durán N. Silver nanoparticles: A brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J Appl Toxicol.* 2012;32(11):867–79.
- de Lima, R., Seabra, A. B., & Durán, N. (2012). Silver nanoparticles: A brief review of

- cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, 32(11), 867–879. <https://doi.org/10.1002/jat.2780>
- E.-A. Jun, K.-M. Lim, K. Y. Kim et al., “Silver nanoparticles enhance thrombus formation through increased platelet aggregation and procoagulant activity,” *Nanotoxicology*, vol. 5, no. 2, pp. 157–167, 2011.
- Escobedo, A. (n.d.). Efectos colaterales del tratamiento sistémico del cáncer de mama. 475–477.
- Everds, N.E. Evaluation of Clinical Pathology Data: Correlating Changes with Other Study Data. *Toxicol. Pathol.* 2015, 43, 90–97.
- Fenech, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2000, 455, 81–95.
- Ferreiro, J., Barceló, R., & Rubio, I. (2003). Quimioterapia : efectos secundarios Adverse effects of treatment chemotherapy. *Gac Med Bilbao*, 100, 69–74. [https://doi.org/10.1016/S0304-4858\(03\)74432-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4858(03)74432-1)
- Foldbjerg, R.; Jiang, X.; Miel@u,s, T.; Chen, C.; Autrup, H.; Beer, C. Silver Nanoparticles-Wolves in sheep’s clothing? *Toxicol. Res. (Camb)* 2015, 4, 563–575.
- Foldbjerg, R.; Olesen, P.; Hougaard, M.; Anh, D.; Jürgen, H.; Autrup, H.; Dang, D.A.; Hoffmann, H.J.; Autrup, H. PVP-Coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol. Lett.* 2009, 190, 156–162.
- Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules.* 2015;20(5):8856–74.
- Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5), 8856–8874. <https://doi.org/10.3390/molecules20058856>
- Fuentes-Valencia, M.A.; Fajer-Ávila, E.J.; Chávez-Sánchez, M.C.; Martínez-Palacios, C.A.; Martínez-Chávez, C.C.; JunqueiraMachado, G.; Lara, H.H.; Raggi, L.; Gómez-Gil, B.; Pestryakov, A.A.; et al. Silver nanoparticles are lethal to the ciliate model *Tetrahymena* and safe to the pike silverside *Chirostoma* estor. *Exp. Parasitol.* 2020, 209, 107825. [CrossRef] [PubMed]
- G. Joksić, J. Stašić, J. Filipović, A. V. Šobot, and M. Trtica, “Size of silver nanoparticles determines proliferation ability of human circulating lymphocytes in vitro,” *Toxicology Letters*, vol. 247, pp. 29–34, 2016.
- G. P. Otto, B. Rathkolb, M. A. Oestereicher et al., “Clinical chemistry reference intervals for C57BL/6J, C57BL/6N, and C3HeB/FeJ mice (*Mus musculus*),” *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, vol. 55, no. 4, pp. 375–386, 2016.
- G. Vecchio, M. Fenech, P. P. Pompa, and N. H. Voelcker, “Lab-on-a-Chip-based high-throughput screening of the genotoxicity of engineered nanomaterials,” *Small*, vol. 10, no. 13, pp. 2721–2734, 2014.
- Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS); Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS); United Nations: New York, NY, USA; Geneva, Switzerland, 2019; ISBN 9789210040839.
- Glotov, A.G.; Glotova, T.I.; Sergeev, A.A.; Belkina, T.V.; Sergeev, A.N. [Antiviral activity of different drugs in vitro against viruses of bovine infectious rhinotracheitis and bovine diarrhea]. *Vopr. Virusol.* 2004, 49, 43–46. [PubMed]
- Glotov, A.G.; Glotova, T.I.; Sergeev, A.A.; Sergeev, A.N. Study of antiviral activity of different drugs against bovine herpes and pestivirus. *Antibiot. I Khimioterapiia = Antibiot. Chemoterapy [Sic]* 2004, 49, 6–9.

- Gomes, A.; Sengupta, J.; Datta, P.; Ghosh, S.; Gomes, A. Physiological interactions of nanoparticles in energy metabolism, immune function and their biosafety: A review. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2016, 16, 92–116. [CrossRef]
- Gomes, A.; Sengupta, J.; Datta, P.; Ghosh, S.; Gomes, A. Physiological interactions of nanoparticles in energy metabolism, immune function and their biosafety: A review. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2016, 16, 92–116.
- Guerra, J.D.; Sandoval, G.; Avalos-Borja, M.; Pestryakov, A.; Garibo, D.; Susarrey-Arce, A.; Bogdanchikova, N. Selective antifungal activity of silver nanoparticles: A comparative study between *Candida tropicalis* and *Saccharomyces boulardii*. *Colloid Interface Sci. Commun.* 2020, 37, 100280.
- Guo, D., Zhu, L., Huang, Z., Zhou, H., Ge, Y., Ma, W., Wu, J., Zhang, X., Zhou, X., Zhang, Y., Zhao, Y., & Gu, N. (2013). Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions. *Biomaterials*, 34(32), 7884–7894. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.015>
- H. J. Wang, L. Yang, H. Y. Yang et al., “Antineoplastic activities of protein-conjugated silver sulfide nano-crystals with different shapes,” *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 104, no. 1, pp. 87–91, 2010.
- H. U. Aeschbacher, “Rates of micronuclei induction in different mouse strains,” *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, vol. 164, no. 2, pp. 109–115, 1986.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hernández-Ayala, L.F.; Toledano-Magaña, Y.; Ortiz-Frade, L.; Flores-Alamo, M.; Galindo-Murillo, R.; Reina, M.; García-Ramos, J.C.; Ruiz-Azuara, L. Heteroleptic Ni(II) complexes: Synthesis, structural characterization, computational studies and amoebicidal activity evaluation. *J. Inorg. Biochem.* 2020, 206, 11043.
- Hou, J., Zhou, Y., Wang, C., Li, S., & Wang, X. (2017). Toxic Effects and Molecular Mechanism of Different Types of Silver Nanoparticles to the Aquatic Crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology*, 51(21), 12868–12878. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03918>
- Huang, H.; Lai, W.; Cui, M.; Liang, L.; Lin, Y.; Fang, Q.; Liu, Y.; Xie, L. An Evaluation of Blood Compatibility of Silver Nanoparticles. *Sci. Rep.* 2016, 6, 1–15.
- INEGI Comunicado De Prensa Núm. 480/20. (29/10/2020). Características De Las Defunciones Registradas. [(accessed on 14 November 2020)];2020 Available online: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2020/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2019.pdf>.
- INEGI. Comunicado De Prensa Núm. 480/20. (29/10/2020). Características De Las Defunciones Registradas. 2020. Available online: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2020/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2019.pdf> (accessed on 14 November 2020).
- Ivask, A.; Voelcker, N.H.; Seabrook, S.A.; Hor, M.; Kirby, J.K.; Fenech, M.; Davis, T.P.; Ke, P.C. DNA Melting and Genotoxicity Induced by Silver Nanoparticles and Graphene. *Chem. Res. Toxicol.* 2015, 28, 1023–1035.
- Ivask, A.; Voelcker, N.H.; Seabrook, S.A.; Hor, M.; Kirby, J.K.; Fenech, M.; Davis, T.P.; Ke, P.C. DNA Melting and Genotoxicity Induced by Silver Nanoparticles and Graphene. *Chem. Res. Toxicol.* 2015, 28, 1023–1035.
- J. L. Spinoso-Castillo, R. A. Chavez-Santoscoy, N. Bogdanchikova, J. A. Pérez-Sato, V. Morales-Ramos, and J. J. Bello-Bello, “Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews)

- using a temporary immersion system,” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 129, no. 2, pp. 195–207, 2017.
- J. L. Spinoso-Castillo, R. A. Chavez-Santoscoy, N. Bogdanchikova, J. A. Pérez-Sato, V. Morales-Ramos, and J. J. Bello-Bello, “Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system,” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 129, no. 2, pp. 195–207, 2017.
- J. Li, Y. Wang, R. Liang et al., “Recent advances in targeted nanoparticles drug delivery to melanoma,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 11, no. 3, pp. 769–794, 2015.
- J. Lin, Z. Huang, H. Wu et al., “Inhibition of autophagy enhances the anticancer activity of silver nanoparticles,” *Autophagy*, vol. 10, no. 11, pp. 2006–2020, 2014.
- J. Swanner, J. Mims, D. Carroll et al., “Differential cytotoxic and radiosensitizing effects of silver nanoparticles on triple-negative breast cancer and non-triple-negative breast cells,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 10, no. 1, pp. 3937–3953, 2015.
- Joardar, N.; Guevara-Flores, A.; Martínez-González, J.D.J.; Sinha Babu, S.P. Thiol antioxidant thioredoxin reductase: A prospective biochemical crossroads between anticancer and antiparasitic treatments of the modern era. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 165, 249–267.
- Joksic, G.; Stasic, J.; Filipovic, J.; Sobot, A.V.; Trtica, M.; Joksić, G.; Stašić, J.; Filipović, J.; Šobot, A.V.; Trtica, M. Size of silver nanoparticles determines proliferation ability of human circulating lymphocytes *in vitro*. *Toxicol. Lett.* 2016, 247, 29–34.
- Juarez-Moreno K, Gonzalez E, Girón-Vazquez N, Chávez-Santoscoy R, Mota-Morales J, Perez-Mozqueda L, et al. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Hum Exp Toxicol* [Internet]. 2017;36(9):931–48. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327116675206>
- Juarez-Moreno, K., Gonzalez, E., Girón-Vazquez, N., Chávez-Santoscoy, R., Mota-Morales, J., Perez-Mozqueda, L., Garcia-Garcia, M., Pestryakov, A., & Bogdanchikova, N. (2017). Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Human & Experimental Toxicology*, 36(9), 931–948. <https://doi.org/10.1177/0960327116675206>
- Juarez-Moreno, K.; Gonzalez, E.; Girón-Vazquez, N.; Chávez-Santoscoy, R.; Mota-Morales, J.; Perez-Mozqueda, L.; GarciaGarcia, M.; Pestryakov, A.; Bogdanchikova, N. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Hum. Exp. Toxicol.* 2017, 36, 931–948. [CrossRef]
- K. Juarez-Moreno, E. B. Gonzalez, N. Girón-Vazquez et al., “Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines,” *Human & Experimental Toxicology*, vol. 36, no. 9, pp. 931–948, 2017.
- K. Juarez-Moreno, E. B. Gonzalez, N. Girón-Vazquez et al., “Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines,” *Human & Experimental Toxicology*, vol. 36, no. 9, pp. 931–948, 2017.
- K. Kang, D. H. Lim, I. H. Choi et al., “Vascular tube formation and angiogenesis induced by polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles,” *Toxicology Letters*, vol. 205, no. 3, pp. 227–234, 2011.
- Kang, K., Lim, D. H., Choi, I. H., Kang, T., Lee, K., Moon, E. Y., Yang, Y., Lee, M. S., & Lim, J. S. (2011). Vascular tube formation and angiogenesis induced by
- Kim, J.S.; Song, K.S.; Sung, J.H.; Ryu, H.R.; Choi, B.G.; Cho, H.S.; Lee, J.K.; Yu, I.J. Genotoxicity, acute oral and dermal toxicity, eye and dermal irritation and corrosion and skin sensitisation evaluation of silver nanoparticles. *Nanotoxicology* 2013, 7, 953–960.

- Kim, S.; Ryu, D.Y. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *J. Appl. Toxicol.* 2013, 33, 78–89.
- Kirtonia, A.; Gala, K.; Fernandes, S.G.; Pandya, G.; Pandey, A.K.; Sethi, G.; Khattar, E.; Garg, M. Repurposing of drugs: An attractive pharmacological strategy for cancer therapeutics. *Semin. Cancer Biol.* 2020, 4, 6. *Pharmaceutics* 2021, 13, 65 17 of 17
- Kitada, N.; Takara, K.; Minegaki, T.; Itoh, C.; Tsujimoto, M.; Sakaeda, T.; Yokoyama, T. Factors affecting sensitivity to antitumor platinum derivatives of human colorectal tumor cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2008, 62, 577–584.
- Krishnan, P.D.; Banas, D.; Durai, R.D.; Kabanov, D.; Hosnedlova, B.; Kepinska, M.; Fernandez, C.; Ruttkay-Nedecky, B.; Nguyen, H.V.; Farid, A.; et al. Silver nanomaterials for wound dressing applications. *Pharmaceutics* 2020, 12, 821.
- L. A. Austin, B. Kang, C.-W. Yen, and M. A. El-Sayed, “Plasmonic imaging of human oral cancer cell communities during programmed cell death by nuclear-targeting silver nanoparticles,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, no. 44, pp. 17594–17597, 2011.
- L. Calderón, A. Peniche-Castellanos, L. Fierro-Arias, G. Montes de Oca-Sánchez, and I. Arellano-Mendoza, “Cutaneous melanoma: 12 years of experience,” *Dermatologia Revista Mexicana*, vol. 61, no. 3, pp. 179–189, 2017.
- L. P. Franchi, B. B. Manshian, T. A. J. de Souza et al., “Cyto- and genotoxic effects of metallic nanoparticles in untransformed human fibroblast,” *Toxicology in vitro*, vol. 29, no. 7, pp. 1319–1331, 2015.
- Leyva Gómez, G. (2013). Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación En Discapacidad*, 2, 18–22. <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir131c.pdf>
- Li, Y.; Qin, T.; Ingle, T.; Yan, J.; He, W.; Yin, J.J.; Chen, T. Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Arch. Toxicol.* 2017, 91, 509–519.
- Liao, C.; Li, Y.; Tjong, S.C. Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 449.
- Lin, J., Huang, Z., Wu, H., Zhou, W., Jin, P., Wei, P., Zhang, Y., Zheng, F., Zhang, J., Xu, J., Hu, Y., Wang, Y., Li, Y., Gu, N., & Wen, L. (2014). Inhibition of autophagy enhances the anticancer activity of silver nanoparticles. *Autophagy*, 10(11), 2006–2020. <https://doi.org/10.4161/auto.36293>
- M. C. Foletto and S. E. Haas, “Cutaneous melanoma: new advances in treatment,” *Anais Brasileiros de Dermatologia*, vol. 89, no. 2, pp. 301–310, 2014.
- M. J. Piao, K. A. Kang, I. K. Lee et al., “Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis,” *Toxicology Letters*, vol. 201, no. 1, pp. 92–100, 2011.
- M. Laprise-Pelletier, T. Simão, and M. A. Fortin, “Gold nanoparticles in radiotherapy and recent progress in nanobrachytherapy,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 7, no. 16, article 1701460, 2018.
- Maneewattanapinyo, P.; Banlunara, W.; Thammacharoen, C.; Ekgasit, S.; Kaewamatawong, T. An evaluation of acute toxicity of colloidal silver nanoparticles. *J. Vet. Med. Sci.* 2011, 73, 1417–1423.
- Mao, B.H.; Tsai, J.C.; Chen, C.W.; Yan, S.J.; Wang, Y.J. Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy. *Nanotoxicology* 2016, 10, 1021–1040.
- Martin, H. L., Smith, L., & Tomlinson, D. C. (2014). Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives. *Breast Cancer* (Dove Medical Press), 6, 1–13.

<https://doi.org/10.2147/BCTT.S37638>

- McShan, D., Ray, P. C., & Yu, H. (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>
- Melnik, E.A.; Buzulukov, Y.P.; Demin, V.F.; Demin, V.A.; Gmoshinski, I.V.; Tyshko, N.V.; Tutelyan, V.A. Transfer of silver nanoparticles through the placenta and breast milk during in vivo experiments on rats. *Acta Nat.* 2013, 5, 107–115.
- Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata : métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Investigación Química*, August, 33–41. <https://doi.org/ISSN 1575-3417>
- N. Bogdanchikova, R. V. Muñoz, A. H. Saquero et al., “Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs,” *International Journal of Nanotechnology*, vol. 13, no. 1/2/3, pp. 227–237, 2016.
- N. Bogdanchikova, R. V. Muñoz, A. H. Saquero et al., “Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs,” *International Journal of Nanotechnology*, vol. 13, no. 1/2/3, pp. 227–237, 2016.
- N. Kaushal, S. Hegde, J. Lumadue, R. F. Paulson, and K. S. Prabhu, “The regulation of erythropoiesis by selenium in mice,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 14, no. 8, pp. 1403–1412, 2011.
- Nallanthighal, S.; Chan, C.; Bharali, D.J.; Mousa, S.A.; Vásquez, E.; Reliene, R. Particle coatings but not silver ions mediate genotoxicity of ingested silver nanoparticles in a mouse model. *NanoImpact* 2017, 5, 92–100.
- Nowak-Sliwinska P., Scapozza L., Altaba A.R.I. Drug repurposing in oncology: Compounds, pathways, phenotypes and computational approaches for colorectal cancer. *Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer*. 2019; 1871:434–454.
- Nowak-Sliwinska, P.; Scapozza, L.; Altaba, A.R.I. Drug repurposing in oncology: Compounds, pathways, phenotypes and computational approaches for colorectal cancer. *Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer* 2019, 1871, 434–454. [CrossRef]
- O. Bondarenko, K. Juganson, A. Ivask, K. Kasemets, M. Mortimer, and A. Kahru, “Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review,” *Archives of Toxicology*, vol. 87, no. 7, pp. 1181–1200, 2013.
- Ochoa-Meza, A.R.; Álvarez-Sánchez, A.R.; Romo-Quiñonez, C.R.; Barraza, A.; Magallón-Barajas, F.J.; Chávez-Sánchez, A.; García-Ramos, J.C.; Toledano-Magaña, Y.; Bogdanchikova, N.; Pestryakov, A.; et al. Silver nanoparticles enhance survival of white spot syndrome virus infected *Penaeus vannamei* shrimps by activation of its immunological system. *Fish Shellfish Immunol.* 2019, 84, 1083–1089. [CrossRef]
- P. Matak, S. Zumerle, M. Mastrogiannaki et al., “Copper deficiency leads to anemia, duodenal hypoxia, upregulation of HIF-2 α and altered expression of iron absorption genes in mice,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, article e59538, 2013.
- P. Sivakumar, M. Lee, Y.-S. Kim, and M. S. Shim, “Photo-triggered antibacterial and anticancer activities of zinc oxide nanoparticles,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 6, no. 30, pp. 4852–4871, 2018.
- Pang, C.; Brunelli, A.; Zhu, C.; Hristozov, D.; Liu, Y.; Semenzin, E.; Wang, W.; Tao, W.; Liang, J.; Marcomini, A.; et al. Demonstrating approaches to chemically modify the surface of Ag nanoparticles in order to influence their cytotoxicity and biodistribution after single dose acute intravenous administration. *Nanotoxicology* 2016, 10, 129–139.
- Pelgrift, R.Y.; Friedman, A.J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, 65, 1803–1815. [CrossRef] [PubMed]
- Pelgrift, R.Y.; Friedman, A.J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, 65, 1803–1815.

- Pimentel-Acosta, C.A.; Morales-Serna, F.N.; Chávez-Sánchez, M.C.; Lara, H.H.; Pestryakov, A.; Bogdanchikova, N.; Fajer-Ávila, E.J. Efficacy of silver nanoparticles against the adults and eggs of monogenean parasites of fish. *Parasitol. Res.* 2019, 118, 1741–1749. [CrossRef]
- Poillet-Perez L., Despouy G., Delage-Mourroux R., Boyer-Guittaut M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol.* 2015; 4:184–192.
- Poillet-Perez, L.; Despouy, G.; Delage-Mourroux, R.; Boyer-Guittaut, M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol.* 2015, 4, 184–192. [CrossRef]
- R. Alemón-Medina, M. E. Bravo-Gómez, M. I. Gracia-Mora, and L. Ruiz-Azuara, “Comparison between the Antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeína IIgly and cisplatin in murine melanoma B16 cells,” *Toxicology In Vitro*, vol. 25, no. 4, pp. 868–873, 2011.
- R. Foldbjerg, P. Olesen, M. Hougaard, D. A. Dang, H. J. Hoffmann, and H. Autrup, “PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes,” *Toxicology Letters*, vol. 190, no. 2, pp. 156–162, 2009.
- R. Lima, A. B. Seabra, and N. Durán, “Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles,” *Journal of Applied Toxicology*, vol. 32, no. 11, pp. 867–879, 2012.
- R. Vazquez-Muñoz, B. Borrego, K. Juárez-Moreno et al., “Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: does the complexity of biological systems matter?” *Toxicology Letters*, vol. 276, pp. 11–20, 2017.
- R. Vazquez-Muñoz, B. Borrego, K. Juárez-Moreno et al., “Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: does the complexity of biological systems matter?” *Toxicology Letters*, vol. 276, pp. 11–20, 2017.
- Rafique, R.; Kailasa, S.K.; Park, T.J. Recent advances of upconversion nanoparticles in theranostics and bioimaging applications. *TrAC-Trends Anal. Chem.* 2019, 120, 115646. [CrossRef]
- Rafique, R.; Kailasa, S.K.; Park, T.J. Recent advances of upconversion nanoparticles in theranostics and bioimaging applications. *TrAC-Trends Anal. Chem.* 2019, 120, 115646.
- Rai, M.; Deshmukh, S.D.; Ingle, A.P.; Gupta, I.R.; Galdiero, M.; Galdiero, S. Metal nanoparticles: The protective nanoshield against virus infection. *Crit. Rev. Microbiol.* 2016, 42, 46–56. [CrossRef] [PubMed]
- Rai, M.; Deshmukh, S.D.; Ingle, A.P.; Gupta, I.R.; Galdiero, M.; Galdiero, S. Metal nanoparticles: The protective nanoshield against virus infection. *Crit. Rev. Microbiol.* 2016, 42, 46–56.
- Recordati, C.; De Maglie, M.; Bianchessi, S.; Argenti, S.; Cella, C.; Mattiello, S.; Cubadda, F.; Aureli, F.; D’Amato, M.; Raggi, A.; et al. Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: Nano-Specific and size-Dependent effects. *Part. Fibre Toxicol.* 2016, 13, 1–17.
- Romo-Quiñonez, C.R.; Álvarez-Sánchez, A.R.; Álvarez-Ruiz, P.; Chávez-Sánchez, M.C.; Bogdanchikova, N.; Pestryakov, A.; Mejia-Ruiz, C.H. Evaluation of a new Argovit as an antiviral agent included in feed to protect the shrimp *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus infection. *PeerJ* 2020, 2020, 1–22.
- Ruiz-Ruiz, B.; Arellano-García, M.E.; Radilla-Chávez, P.; Salas-Vargas, D.S.; Toledano-Magaña, Y.; Casillas-Figueroa, F.; Luna Vazquez-Gomez, R.; Pestryakov, A.; García-Ramos, J.C.; Bogdanchikova, N. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes

- as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. *ACS Omega* 2020, 5, 12005–12015.
- Ruiz-Ruiz, B.; Arellano-García, M.E.; Radilla-Chávez, P.; Salas-Vargas, D.S.; Toledano-Magaña, Y.; Casillas-Figueroa, F.; Luna Vazquez-Gomez, R.; Pestryakov, A.; García-Ramos, J.C.; Bogdanchikova, N. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. *ACS Omega* 2020, 5, 12005–12015.
- S. Ahlberg, A. Antonopulos, J. Diendorf et al., “PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments,” *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 5, pp. 1944–1965, 2014.
- S. Bhattacharyya, R. A. Kudgus, R. Bhattacharya, and P. Mukherjee, “Inorganic nanoparticles in cancer therapy,” *Pharmaceutical Research*, vol. 28, no. 2, pp. 237–259, 2011.
- S. Castro-Gamboa, M. R. Garcia-Garcia, G. Piñon-Zarate et al., “Toxicity of silver nanoparticles in mouse bone marrow-derived dendritic cells: implications for phenotype,” *Journal of Immunotoxicology*, vol. 16, no. 1, pp. 1–9, 2019.
- S. J. Cameron, F. Hosseinian, and W. G. Willmore, “A current overview of the biological and cellular effects of nanosilver,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 7, pp. 2030–2040, 2018.
- S. Kim and D. Y. Ryu, “Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues,” *Journal of Applied Toxicology*, vol. 33, no. 2, pp. 78–89, 2013.
- Saji, V.S.; Choe, H.C.; Yeung, K.W.K. Nanotechnology in biomedical applications: A review. *Int. J. Nano Biomater.* 2010, 3, 119–139. [CrossRef]
- Saji, V.S.; Choe, H.C.; Yeung, K.W.K. Nanotechnology in biomedical applications: A review. *Int. J. Nano Biomater.* 2010, 3, 119–139.
- Sánchez-López, E.; Gomes, D.; Esteruelas, G.; Bonilla, L.; Lopez-Machado, A.L.; Galindo, R.; Cano, A.; Espina, M.; Ettcheto, M.; Camins, A.; et al. Metal-Based nanoparticles as antimicrobial agents: An overview. *Nanomaterials* 2020, 10, 292.
- Shaniba, V.S.; Aziz, A.A.; Jayasree, P.R.; Kumar, P.R.M. Manilkara zapota (L.) P. Royen Leaf Extract Derived Silver Nanoparticles Induce Apoptosis in Human Colorectal Carcinoma Cells Without Affecting Human Lymphocytes or Erythrocytes. *Biol. Trace Elem. Res.* 2019, 192, 160–174.
- T. Bartłomiejczyk, A. Lankoff, M. Kruszewski, and I. Szumiel, “Silver nanoparticles—allies or adversaries?” *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol. 20, no. 1, pp. 48–54, 2013.
- T. Shi, X. Sun, and Q. Y. He, “Cytotoxicity of silver nanoparticles against bacteria and tumor cells,” *Current Protein & Peptide Science*, vol. 19, no. 6, pp. 525–536, 2018.
- T. Verano-Braga, R. Miethling-Graff, K. Wojdyla et al., “Insights into the cellular response triggered by silver nanoparticles using quantitative proteomics,” *ACS Nano*, vol. 8, no. 3, pp. 2161–2175, 2014.
- Test No. 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals; OECD Publishing: Paris, France, 2002; Section 4; ISBN 9789264070943.
- Toledano-Magaña Y., García-Ramos J.C., Torres-Gutiérrez C., Vázquez-Gasser C., Esquivel-Sánchez J.M., Flores-Alamo M., Ortiz-Frade L., Galindo-Murillo R., Nequiz M., Gudiño-Zayas M., et al. Water-Soluble Ruthenium (II) Chiral Heteroleptic Complexes with Amoebicidal in Vitro and in Vivo Activity. *J. Med. Chem.* 2017; 60:899–912.
- Toledano-Magaña, Y.; García-Ramos, J.C.; Torres-Gutiérrez, C.; Vázquez-Gasser, C.; Esquivel-Sánchez, J.M.; Flores-Alamo, M.; Ortiz-Frade, L.; Galindo-Murillo, R.; Nequiz, M.;

- Gudiño-Zayas, M.; et al. Water-Soluble Ruthenium (II) Chiral Heteroleptic Complexes with Amoebicidal *in Vitro* and *in Vivo* Activity. *J. Med. Chem.* 2017, 60, 899–912.
- Toledano-Magaña, Y.; Meléndrez-Luévano, R.; Navarro-Olivarria, M.; García-Ramos, J.C.; Flores-Alamo, M.; Ortiz-Frade, L.; Ruiz-Azuara, L.; Cabrera-Vivas, B.M. Synthesis, characterization and evaluation of the substituent effect on the amoebicide activity of new hydrazone derivatives. *Medchemcomm* 2014, 5, 989.
- Tripathy, S.; Rademan, S.; Matsabisa, M.G. Effects of Silver Nanoparticle from *Dicomaanomala Sond.* Root Extract on MCF-7 Cancer Cell Line and NF54 Parasite Strain: An *In Vitro* Study. *Biol. Trace Elem. Res.* 2020, 195, 82–94.
- Ullah Khan, S.; Saleh, T.A.; Wahab, A.; Ullah Khan, M.H.; Khan, D.; Ullah Khan, W.; Rahim, A.; Kamal, S.; Ullah Khan, F.; Fahad, S. Nanosilver: New ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. *Int. J. Nanomed.* 2018, 13, 733–762. [CrossRef]
- Ullah Khan, S.; Saleh, T.A.; Wahab, A.; Ullah Khan, M.H.; Khan, D.; Ullah Khan, W.; Rahim, A.; Kamal, S.; Ullah Khan, F.; Fahad, S. Nanosilver: New ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. *Int. J. Nanomed.* 2018, 13, 733–762.
- Uraskulova, B.B.; Gyusan, A.O. The clinical and bacteriological study of the effectiveness of the application of silver nanoparticle for the treatment of tuberculosis. *Vestn. Otorinolaringol.* 2017, 82, 54–57. [CrossRef] [PubMed]
- Valenzuela-Salas, L.M.; Girón-Vázquez, N.G.; García-Ramos, J.C.; Torres-Bugarín, O.; Gómez, C.; Pestryakov, A.; VillarrealGómez, L.J.; Toledano-Magaña, Y.; Bogdanchikova, N. Antiproliferative and Antitumour Effect of Nongenotoxic Silver Nanoparticles on Melanoma Models. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 2019, 1–12. [CrossRef]
- Vazquez-Muñoz R, Borrego B, Juárez-Moreno K, García-García M, Mota Morales JD, Bogdanchikova N, et al. Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter? *Toxicol Lett* [Internet]. 2017;276(May):11–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.007>
- Vazquez-Muñoz, R., Borrego, B., Juárez-Moreno, K., García-García, M., Mota Morales, J. D., Bogdanchikova, N., & Huerta-Saquero, A. (2017). Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter? *Toxicology Letters*, 276(May), 11–20.
- Vazquez-Muñoz, R.; Bogdanchikova, N.; Huerta-Saquero, A. Beyond the Nanomaterials Approach: Influence of Culture Conditions on the Stability and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles. *ACS Omega* 2020, 5, 28441–28451.
- Vecchio, G.; Fenech, M.; Pompa, P.P.; Voelcker, N.H. Lab-On-A-Chip-Based High-Throughput screening of the genotoxicity of engineered nanomaterials. *Small* 2014, 10, 2721–2734.
- Vijayakumar, S.; Malaikozhundan, B.; Saravanakumar, K.; Durán-Lara, E.F.; Wang, M.H.; Vaseeharan, B. Garlic clove extract assisted silver nanoparticle–Antibacterial, antibiofilm, antihelminthic, anti-inflammatory, anticancer and ecotoxicity assessment. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2019, 198, 111558.
- W. Liu, Y. Wu, C. Wang et al., “Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size,” *Nanotoxicology*, vol. 4, no. 3, pp. 319–330, 2010.
- W. W. Overwijk and N. P. Restifo, “B16 as a mouse model for human melanoma,” *Current Protocols in Immunology*, vol. 39, no. 1, pp. 20.1.1–20.1.29, 2001.
- W. W. Overwijk and N. P. Restifo, “B16 as a mouse model for human melanoma,” *Current Protocols in Immunology*, vol. 39, no. 1, pp. 20.1.1–20.1.29, 2001.
- Wei L, Lu J, Xu H, Patel A, Chen ZS, Chen G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov Today.* 2015;20(5):595–601.

- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., & Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, 20(5), 595–601. <https://doi.org/10.1002/aur.1474>. Replication
- Wei, L.; Lu, J.; Xu, H.; Patel, A.; Chen, Z.S.; Chen, G. Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov. Today* 2015, 20, 595–601. [CrossRef] *Pharmaceutics* 2021, 13, 65 15 of 17
- Wei, L.; Lu, J.; Xu, H.; Patel, A.; Chen, Z.S.; Chen, G. Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov. Today* 2015, 20, 595–601. *Pharmaceutics* 2021, 13, 65 15 of 17
- World Health Organization, “Skin cancers,” 2018, <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>.
- Wu, M.; Guo, H.; Liu, L.; Liu, Y.; Xie, L. Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* 2019, 14, 4247–4259.
- X. Guo, C. Jagannath, M. G. Espitia, and X. Zhou, “Uptake and silica and carbon nanotubes by human macrophages/monocytes induces activation of fibroblasts in vitro — potential implication for pathogenesis of inflammation and fibrotic diseases,” *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, vol. 25, no. 3, pp. 713–719, 2012.
- Xu, L.; Wang, Y.Y.; Huang, J.; Chen, C.Y.; Wang, Z.X.; Xie, H. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics* 2020, 10, 8996–9031. [CrossRef] [PubMed]
- Xu, L.; Wang, Y.Y.; Huang, J.; Chen, C.Y.; Wang, Z.X.; Xie, H. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics* 2020, 10, 8996–9031.
- Xu, Z.; Feng, Q.; Wang, M.; Zhao, H.; Lin, Y.; Zhou, S. Green Biosynthesized Silver Nanoparticles with Aqueous Extracts of Ginkgo Biloba Induce Apoptosis via Mitochondrial Pathway in Cervical Cancer Cells. *Front. Oncol.* 2020, 10, 1–10.
- Y. Li, Y. Chang, X. Lian et al., “Silver nanoparticles for enhanced cancer theranostics: in vitro and in vivo perspectives,” *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 14, no. 9, pp. 1515–1542, 2018.
- Y. M. Choi, H.-K. Kim, W. Shim et al., “Mechanism of cisplatin-induced cytotoxicity is correlated to impaired metabolism due to mitochondrial ROS generation,” *PLoS One*, vol. 10, no. 8, article e0135083, 2015.
- Yan, J.; Zhou, T.; Cunningham, C.K.; Chen, T.; Jones, M.Y.; Abbas, M.; Li, Y.; Mei, N.; Guo, X.; Moore, M.M.; et al. Size- and coating-Dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using *in vitro* standard assays. *Nanotoxicology* 2016, 10, 1373–1384.
- Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>
- Zhang, X.-F.; Liu, Z.-G.; Shen, W.; Gurunathan, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1534. [CrossRef]
- Zhang, X.-F.; Liu, Z.-G.; Shen, W.; Gurunathan, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1534.
- Zielińska, A.; Costa, B.; Ferreira, M.V.; Miguéis, D.; Louros, J.M.S.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Eder, P.; Chaud, M.V.; Morsink, M.; et al. Nanotoxicology and nanosafety: Safety-By-Design and testing at a glance. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2020, 17, 4657.

