

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**Comparación del efecto citotóxico de nanopartículas de plata en modelos
con líneas celulares y cultivos primarios**

T E S I S

**que presenta para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS**

INA. Jesús Gabriel González Vega

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

Comparación del efecto citotóxico de nanopartículas de plata en modelos con líneas celulares y cultivos primarios

T E S I S

que presenta para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS

INA. Jesús Gabriel González Vega

Aprobado por:



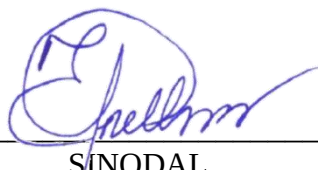
DIRECTORA DE TESIS:
DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA
Presidente del Comité



CODIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN CARLOS GARCÍA RAMOS
Miembro del Comité



SINODAL
DR. Javier EMMANUEL CASTILLO
QUIÑONES
Miembro del Comité



SINODAL
DRA. MARÍA EVARISTA ARELLANO
GARCÍA
Miembro del Comité

RESUMEN de la Tesis de Jesús Gabriel González Vega, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS. ENSENADA, Baja California, México. Junio de 2022.

COMPARACIÓN DEL EFECTO CITOTOXICO DE NANOPARTICULAS DE PLATA EN MODELOS CON LINEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS).

Resumen aprobado por:



Dra. Yanis Toledano Magaña
Director de tesis

Los nanomateriales (NM) resuelven problemas específicos con resultados notables en diversas áreas industriales y científicas; por ello, se han desarrollado diferentes modelos para evaluar su eficacia y toxicidad. Entre estos NM, las nanopartículas (NP) se han empleado ampliamente como portadores de fármacos, para diagnósticos médicos, dispositivos de recolección de energía, sensores, lubricantes, biorremediación, entre otras aplicaciones (Khan et al., 2019). En el campo biomédico, las nanopartículas de plata (AgNPs) han mostrado excelentes propiedades antimicrobianas, anticancerígenas y antivirales, lo que ha aumentado la necesidad de estudiar el riesgo potencial de su uso para la salud pública (Riaz Ahmed et al., 2017a). Por ello, se ha establecido una gran batería de modelos de toxicidad *in vitro*, con la finalidad de predecir los efectos nocivos de la incorporación de AgNPs en estas numerosas áreas o los producidos por exposición involuntaria. Sin embargo, estos modelos suelen reportar resultados contradictorios debido a su falta de estandarización, generando controversia y frenando los avances en la investigación en nanotoxicología. Por lo tanto, se realizó una investigación bibliográfica exhaustiva para contrastarla con nuestro trabajo sobre la citotoxicidad de varias formulaciones de AgNPs en modelos de células pulmonares en los últimos ocho años. Para respaldar estos datos, investigamos la toxicidad de una formulación anterior de AgNPs, Bioargovit®, evaluada por la red colaborativa, la "Red internacional de bionanotecnología con impacto en biomedicina, alimentación y bioseguridad (BIONN)" en varios trabajos. Finalmente, discutimos los resultados obtenidos por nuestros colegas al evaluar las nuevas formulaciones Argovit® en la línea celular HCT-15 y distintos cultivos celulares primarios. El análisis de la literatura y nuestros datos exhiben un efecto citotóxico selectivo en las células cancerosas en comparación con las células sanas. A su vez, se determinó que Argovit® resultó ser aún más selectivo en un panel de tres líneas celulares de pulmón (Beas-2B, A549 y H1299), pero no en cultivos primarios. Los efectos de este aumento del efecto citotóxico sobre las células cancerosas se atribuyeron a un mecanismo de caballo de Troya selectivo. Finalmente, la principal causa de muerte se asoció a la sobreproducción de EROs mitocondrial generada por la interacción celular a las AgNPs lo que podría dañar la ADN y causar una expresión diferencial de genes proapoptóticos que desencadenen esta vía de muerte controlada mediada principalmente por P53.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, líneas celulares, cultivos primarios, pulmón, EROs, iones de plata, expresión diferencial de genes, apoptosis, p53.

ABSTRACT of the thesis, presented by Jesús Gabriel González Vega, to obtain the MASTER of SCIENCE DEGREE. Ensenada, Baja California, México. June, 2022.

(COMPARISON OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES IN MODELS WITH CELL LINES AND PRIMARY CULTURES)

Approved by:



Ph.D. Yanis Toledano Magaña
Thesis Advisor

Nanomaterials (NMs) solve specific problems with remarkable results in several industrial and scientific areas; therefore, different models have been developed to evaluate their effectiveness and toxicity. Among NMs, nanoparticles (NPs) have been extensively employed as drug carriers, medical diagnostics, energy harvesting devices, sensors, lubricants, bioremediation, among other applications (Khan et al., 2019). In the biomedical field, silver nanoparticles (AgNPs) have shown excellent antimicrobial, anticancer, and antiviral properties, which has increased the need to study the potential risk of their use to public health (Riaz Ahmed et al., 2017a). Therefore, a large battery of toxicity models *in vitro*, have been established to predict the harmful effects of incorporating AgNPs in these numerous areas or those produced due to involuntary exposure. However, these models often report contradictory results due to their lack of standardization, generating controversy and slowing the advances in nanotoxicology research. Hence, exhaustive bibliography research to contrast it with our work about the cytotoxicity of several different formulations of AgNPs in lung cell models in the past eight years was conducted. To support these data, we investigate the toxicity concerning a previous AgNPs formulation Bioargovit® evaluated by the collaborative network the "Bionanotechnology international network with impact on biomedicine, food and biosecurity (BIONN)" in several works. Finally, we discuss the results obtained by our colleges evaluating the new formulation Argovit® in HCT-15 cell line and distinct primary cell cultures. The literature analysis and our data exhibit a selective cytotoxic effect on cancer cells compared to healthy cells. In turn, it was determined that Argovit® resulted to be even more selective in a panel of three lung cell lines evaluated in this work (Beas-2B, A549, and H1299), but not in lung primary cultures. The effects of this increased cytotoxic effect on cancer cells were accredited to a selective trojan horse mechanism. Finally, the main cause of death was ascribed to the overproduction of mitochondrial ROS generated by AgNP-cell interactions which propitiate the differential expression of proapoptotic genes and exert apoptosis mainly mediated by P53.

Keywords: Silver nanoparticles, cell lines, primary cultures, lung, ROS, silver ions, differential expression of genes, apoptosis, p53.

“Lo que importa no son las grandes ideas de otros, sino las pequeñas cosas que se te ocurren a ti.” - Haruki Murakami

Dedicatoria

“Me gustaría dedicar esta tesis:

A mis padres Ignacio y Mónica, gracias por estar siempre presentes para mí e inculcarme los valores necesarios para superarme y ser un hombre de bien.

A Mis hermanos menores Jorge y Daniel, por ser una de mis más grandes motivaciones para ser mejor cada día.

A mi familia, por preocuparse por mí durante todo el proceso y darme fuertes palabras de aliento.

A mi segunda familia Héctor, Karolina y Arturo, por ahorrarme muchas malas decisiones y rescatarme incluso de los pozos más profundos.

A mi mentor Shava, por la paciencia y apoyo brindados en mi formación.

Mi Amigo Alberto Blanco, por apoyarme incondicionalmente ante las adversidades de la maestría y de la vida.

A mi psicóloga Laila Jiménez, por enseñarme a ser un hombre más seguro y confiado.

Al amor de mi vida, no tengo idea donde te encuentres, pero ten paciencia, te prometo que voy lo más rápido que puedo.

A Panzi y a todos los Pandas, siempre los Pandas. ”

Agradecimientos

“Un profundo agradecimiento a todas las autoridades y personal que conforman al posgrado MyDCI UABC, por confiar en mí y permitirme desempeñar mi trabajo de investigación dentro de su programa educativo

Me gustaría expresar mi gratitud a mis tutores la Dra. Yanis Toledano Magaña y al Dr. Juan Carlos García Ramos, por todos los conocimientos brindados y su incesante apoyo en mi formación profesional

De igual manera me gustaría agradecer a mis sinodales la Dra. María Evarista Arellano García, a la Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy y al Dr. Javier Emmanuel Castillo Quiñones, por estar al pendiente de mí durante la maestría y mostrarse siempre dispuestos a ofrecerme retroalimentación para mejorar.

A la Red internacional de Bionanotecnología con impacto en biomedicina, alimentación y bioseguridad de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por proporcionar los recursos necesarios para el proyecto de investigación y promover nuestro crecimiento.

Por último, agradezco a el CONACYT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto. ”

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	12
2. Antecedentes	16
2.1 AgNPs en modelos celulares de pulmón.	18
2.2 AgNPs Bioargovit® en distintos modelos biológicos.	23
2.3 AgNPs Argovit® en HCT-15 y cultivos primarios	34
3. Marco teórico	37
3.1 Caracterización de las AgNPs por TEM	37
3.2 Caracterización de las AgNPs por la técnica de DLS	39
3.3 Caracterización de las AgNPs por TGA	42
3.4 Caracterización de las AgNPs por UV-vis	42
3.5 Calculo de viabilidad celular por el método de exclusión vital por azul tripano	43
3.6 Morfología celular de los modelos pulmonares.	45
3.6.1 Células bronquiales epiteliales (CBE)	46
3.6.2 Células alveolares epiteliales (CAE)	46
3.6.3 Macrófagos	47
4. Alcances de la investigación.	48
4.1 Planteamiento del problema	48
4.2 Justificación	49
4.3 Hipótesis	49
4.4 Objetivo General.	50
4.4.1 Objetivos específicos	50
5. Metodología	51
5.1 Formulaciones de AgNPs	51
5.1.1 Preparación de diluciones	51
5.2 Descongelamiento de líneas celulares	52
5.3 Mantenimiento y proliferación de líneas celulares de pulmón	53
5.3.1 Pase celular	53
5.3.2 Tripsinización	54
5.3.3 Conteo de células	54
5.4 Experimento de viabilidad celular	55
5.5 Protocolo de cultivos primarios de pulmón	56
5.5.1 Disección de pulmones de ratones Balb/c	56
5.5.2 Obtención de células primarias totales de pulmón	57
5.5.3 Ensayo de citotoxicidad en cultivos primarios de pulmón	58
6. Resultados	60
6.1 AgNPs	

6.2 Caracterización de las formulaciones de AgNPs	60
6.3 Conteos celulares	60
6.4 Resultados de la viabilidad celular en líneas celulares de pulmón	60
6.4.1 Viabilidad celular en modelos tumorales	62
6.4.2 Viabilidad celular en modelos sanos	63
6.5 Resultados de la viabilidad celular en cultivos primarios de pulmón	63
	69
	72
7. Discusión de resultados	77
7.1 Selectividad citotóxica de AgNPs	77
7.2 Resultados de la selectividad citotóxica en los modelos celulares de pulmón	78
7.2.1 Propiedades fisicoquímicas afectando la selectividad de las AgNPs	82
7.2.1.1 Tamaño de las AgNPs	83
7.2.1.2 Reactividad superficial de las AgNPs	85
7.2.1.3 Funcionalización superficial de las AgNPs	87
7.2.2 Expresión diferencial de genes en modelos pulmonares	91
7.2.3 Factores biológicos afectando la selectividad tumoral de las AgNPs	97
7.2.3.1 Factores biológicos afectando la selectividad tumoral de las AgNPs en células sanas de pulmón	98
7.2.3.2 Factores biológicos afectando la selectividad tumoral de las AgNPs en células cancerígenas de pulmón.	99
7.3 Posible mecanismo citotóxico de las AgNPs en los modelos celulares de pulmón	101
8. Conclusiones	105
8.1 Comparación del efecto citotóxico de AgNPs en modelos con líneas celulares y Cultivos primarios de pulmón	105
9. Referencias	109

Índice de figuras

	Página
1.- Resultados de la viabilidad de las primeras cinco formulaciones Argovit® para la línea HCT-15 en un trabajo previo	34
2.- Resultados de la viabilidad de las primeras cinco formulaciones Argovit® en los distintos modelos primarios	35
3.- Principio básico del funcionamiento del TEM	38
4.- Caracterización de las AgNPs. Microfotografías de las formulaciones de AgNPs obtenidas por TEM e histogramas con las distribuciones de tamaño analizadas por ImageJ.	39
5.- Principio básico de operación del DLS	40
6.- Esquema de operación de la técnica de TGA.	42
7.- Gráficos de plasmón superficial y análisis TGA/DSC para las formulaciones Argovit®.	43
8.- Método de exclusión vital por azul tripano.	45
9.- Preparación de los stocks de AgNPs Argovit®.	52
10.- En esta imagen se muestra la metodología para el mantenimiento y proliferación de líneas celulares de pulmón.	55
11.- Diseño experimental del ensayo de viabilidad por azul tripano.	56
12.- Metodología para la extracción de células primarias totales de pulmón (CPTP).	58
13.- Viabilidad celular A549.	65
14.- Comparación IC50 para las cinco formulaciones de AgNPs en la línea celular A549.	66
15.- Viabilidad celular H1299.	67
16.- Comparación IC50 para las cinco formulaciones de AgNPs en la línea celular H1299.	68
17.- Viabilidad celular Beas-2B.	70
18.- Comparación IC50 para las cinco formulaciones de AgNPs en la línea celular Beas-2B.	71
19.- Viabilidad celular en células primarias totales de pulmón.	73
20.- Comparación IC50 para las cinco formulaciones de AgNPs en células primarias totales de pulmón.	74
21.- Orden de selectividad de las AgNPs Argovit® en la línea celular Beas-2B y las células primarias totales de pulmón contra el modelo tumoral A549.	81
22.- Orden de selectividad de las AgNPs Argovit® en la línea celular Beas-2B y las células primarias totales de pulmón contra el modelo tumoral H1299.	82

Índice de tablas

	Página
1. Citotoxicidad de AgNPs en monocultivos de pulmón.	18
2. Citotoxicidad de AgNPs Bioargovit® en distintos modelos biológicos.	24
3. Caracterización completa de las formulaciones de AgNPs utilizadas Argovit®	41
4. Resumen de condiciones utilizadas para el ensayo de viabilidad celular con cada línea celular.	63
5. IC50 para los modelos tumorales A549 y H1299	68
6. IC50 para la línea celular Beas-2B.	72
7. IC50 para las células primarias totales de pulmón.	75
8. Orden de citotoxicidad por IC50.	76
9. Índices de selectividad.	78
10. Orden de selectividad citotóxica.	80
11. Orden de citotoxicidad contra orden de tamaños.	84
12. Orden de citotoxicidad contra orden de carga superficial.	86
13. Orden de citotoxicidad contra tamaño de PVP.	88
14. Tasa de Ag/PVP.	89
15. Comparación del orden citotóxico contra orden en la tasa de Ag/PVP.	89
16. Orden de selectividad citotóxica vs parámetros fisicoquímicos.	90
17. Genes diferencialmente expresados y su implicación biológica en células pulmonares para distintas formulaciones de AgNPs con diferentes propiedades fisicoquímicas.	92
18. Orden citotoxicidad vs parámetros fisicoquímicos.	106

Capítulo 1

Introducción

La nanotecnología se ocupa de la manipulación de la materia a nanoescala (1-100 nm) y ha tomado un gran lugar en nuestras vidas, convirtiéndose en una tendencia mundial. La podemos encontrar presente en diversos productos médicos, cosméticos y de consumo diario, la mayoría de los cuales carecen de regulación (Farjadian et al., 2019). Los materiales nanoestructurados (MN) potencian aplicaciones más prometedoras que sus contrapartes a gran escala debido a sus propiedades fisicoquímicas (PF) únicas. Las PF más reportadas que influyen en las respuestas de los MN son el tamaño, la forma, la aglomeración, la disolución, la carga superficial y funcionalización de su superficie (Riaz Ahmed et al., 2017a). En este sentido, las nanopartículas (NP) se han perfilado como el nanomaterial más estudiado en las ciencias biomédicas; su pequeño tamaño y su gran relación superficie/volumen los dota de una alta reactividad y la capacidad de superar algunas barreras biológicas, ambas relevantes para la administración de fármacos y aplicaciones en bio-imagen (Mitchell et al., 2021).

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son el nanomaterial más utilizado en la actualidad y su producción aumentará en los próximos años. Dado que la sobreproducción de AgNPs es inevitable, es esencial determinar su riesgo potencial para la salud humana. Las principales rutas de exposición a MN, fibras y vapores de plata se produce mediante la inhalación, ingestión y/o contacto dérmico (Ferdous & Nemmar, 2020). Numerosos estudios informan sobre los peligros inminentes de la inhalación de MN en entornos de trabajo o incluso en la vida cotidiana produciendo efectos nocivos que van desde enfermedades respiratorias hasta una coloración grisácea de la piel en humanos (argiria) e incluso posibles daños en el ADN que podrían expresarse a lo largo de generaciones (“Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review,” 2005; Rim et al., 2013). Independientemente de los esfuerzos para

evaluar la citotoxicidad de las AgNP en los sistemas biológicos, su mecanismo de acción en el tracto respiratorio debido a la inhalación involuntaria sigue sin estar claro para la nanotoxicología. La falta de equipos de bioseguridad para evitar la inhalación involuntaria de nanopartículas ha abierto un campo de debate para dilucidar las posibles consecuencias de la exposición a corto y largo plazo.

Muchas variables están involucradas en la determinación de la citotoxicidad de los nanomateriales en el sistema respiratorio. Las AgNPs pueden interactuar directamente con membrana celular internalizándose o no debido a sus características morfológicas. Además, factores biológicos como la formación de biocorona o la naturaleza de la célula que interactúa con las AgNPs tienen un impacto directo en la viabilidad y proliferación celular (Riaz Ahmed et al., 2017a). Por otra parte, en algunos estudios se ha revelado que características intrínsecas como el tamaño, la carga superficial, la concentración, y el tipo de recubrimiento, y algunos factores extrínsecos como el tiempo de exposición, el tipo de célula, el género del donante y el modelo animal son cruciales en la respuesta celular ejercida por las AgNPs *in vitro* (Ferdous & Nemmar, 2020; Tortella et al., 2020) .

En este sentido las líneas celulares y los modelos primarios presentan diferencias significativas características en su morfología lo cual resulta en una respuesta distinta ante la interacción con las AgNPs. Las líneas celulares cancerígenas y sanas son modelos ampliamente usados desde los 1900. Estos modelos han permitido la evaluación farmacocinética, del metabolismo y la fabricación de nuevas drogas antineoplásicas (Yeasmin et al., 2017). Sin embargo, algunas líneas celulares han mostrado ser irrelevantes en el estudio de poblaciones de pacientes específicos (Yu et al., 2019). En consecuencia, se ha reportado que la falla en estos efectos predictivos en líneas celulares está asociada con el aumento en el número de aberraciones genéticas que sufren los distintos modelos con cada pase celular (cuando alcanzan la confluencia en medio de cultivo) (Richter et al., 2021).

Por otra parte, los modelos primarios de pulmón no fueron desarrollados hasta principios del siglo 20. (Jedrzejczak-Silicka, 2017). Los cultivos primarios son modelos *ex vivo* que provienen directamente del aislamiento del órgano del huésped de interés (Miserocchi et al., 2017)]. Estos modelos mantienen el microambiente sano y/o tumoral según sea el caso de las células aisladas. Estos modelos mantienen una característica muy importante en el desarrollo y progresión de la carcinogénesis que es el “crosstalk” entre poblaciones cancerígenas y sanas

(Leithner et al., 2014). Siendo la variabilidad genética y epigenética de los pacientes con cáncer una de las mayores problemáticas a representar *in vitro*, muchos autores han optado por establecer cultivos primarios en lugar de los modelos de líneas inmortalizados tan limitado que existe en el mercado (Kovács et al., 2016). Estas diferencias en la morfología y mantenimiento de los biomarcadores nativos del tejido de origen dotaran a los modelos primarios de una sensibilidad mayor al interactuar con las AgNPs en comparación con las líneas celulares.

Aunque la plata no tiene ningún papel biológico en el cuerpo y ha mostrado toxicidad en dosis específicas para organismos inferiores, su uso con fines medicinales desde la antigüedad está bien documentado (Medici et al., 2019). Sin embargo, el mecanismo por el cual la plata puede actuar como un agente tóxico contra bacterias patógenas, hongos, moho, parásitos, virus, cáncer e incluso en células humanas sanas sigue sin estar claro hasta el día de hoy (Ferdous & Nemmar, 2020; Medici et al., 2019; Rim et al., 2013; Tortella et al., 2020). Es por ello por lo que los estudios apuntan principalmente a una toxicidad ejercida por la liberación de iones Ag^+ dentro de las células, lo que lleva a la inducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) lo cual afecta a varias vías y mecanismos de señalización a niveles transcripcionales, como la vía apoptótica mediada por p53 (Khan et al., 2019), (Himanen & Sistonen, 2019).

Con esto se pueden obtener perfiles toxicológicos para la exposición directa o indirecta de AgNPs a partir de modelos pulmonares *in vitro* que se pueden extrapolar para determinar el impacto en la salud humana o la aplicación farmacológica de las formulaciones de AgNPs. Si bien la plata promete ser una excelente alternativa a los quimioterapéuticos pulmonares convencionales, existen estudios que comprueban que es necesario contemplar las posibles consecuencias de su uso médico antes de proponerlas como una solución al cáncer de pulmón.

Para evaluar la viabilidad quimioterapéutica de las AgNPs es necesario tener en cuenta el estudio de sus propiedades fisicoquímicas y los factores biológicos directamente relacionados con los modelos *in vitro*. Estos modelos a pesar de ser simples se caracterizan por brindar una vista panorámica de los posibles riesgos para la salud humana. Este trabajo de tesis describe e integra los diferentes factores asociados con la toxicidad pulmonar por exposición a AgNPs en un panel de tres líneas celulares de pulmón y un modelo de células primarias totales de pulmón. En él se destacan factores como el tamaño, el diámetro hidrodinámico, el tamaño de las cadenas de PVP, la relación $[\text{Ag}]/[\text{PVP}]$, la carga superficial, la concentración, el tiempo de exposición, el tipo de célula y la formación de una posible biocorona para explicar la selectividad citotóxica

producida por cinco formulaciones de AgNPs denominadas Argovit® en varios modelos celulares y murinos de pulmón. Derivando así en un total de 20 ensayos de evaluación citotóxica por triplicado. Finalmente, exponemos la importancia de la expresión diferencial de genes como herramienta para mejorar la predicción e interpretación de respuestas citotóxicas específicas y la cuantificación del daño citotóxico para los diversos modelos. Por último, posterior a la discusión de resultados se propone un probable mecanismo de acción selectivo tipo caballo de troya acarreado por la liberación de Ag⁺ incitadores de EROs y activadores de la vía apoptótica mediada por p53.

Capítulo 2

Antecedentes

En esta sección se detallarán los trabajos presentes en la literatura que nos incentivaron a llevar a cabo este proyecto de tesis. Entre ellos se muestra el análisis del efecto citotóxico de AgNPs de distinta procedencia en variados modelos con líneas celulares y cultivos de pulmón. Por otro lado, también se presentan los resultados de la toxicidad de una formulación previa que posee propiedades muy similares llamada Bioargovit® en distintos modelos de plantas, hongos, bacterias, protozoarios, animales, líneas celulares humanas sanas y tumorales, cultivos primarios de Balb/c y cultivos primarios humanos de linfocitos de sangre periférica. Consecuentemente, se exponen los resultados de las cinco primeras formulaciones de AgNPs utilizadas en este trabajo llamadas Argovit® en modelos de cáncer colorrectal (HCT-15) y cultivos primarios de bazo, médula, aorta, corazón, riñón, hígado, y en linfocitos y monocitos de bazo. Por último, se presentan los datos de una exhaustiva búsqueda bibliográfica en la expresión diferencial de genes de pulmón para los divergentes modelos de pulmón reportados en las bases de datos científicas. Esto con la finalidad de poder predecir marcadores específicos de progresión de enfermedad en pulmón y un posible mecanismo de acción citotóxico selectivo en los modelos *in vitro* pulmonares planteados en este estudio (H1299, A549, Beas-2B y CPTP)

2.1 AgNPs en modelos celulares de pulmón

Diversos trabajos reportados en la literatura evalúan la citotoxicidad de AgNPs en modelos pulmonares *in vitro*. En estos estudios se evaluaron los efectos citotóxicos producidos a nivel celular y la dependencia de estos con respecto a variables como el tamaño, la

concentración, el tiempo de exposición, el tipo de célula, y el modelo. Para ello los autores evalúan las distintas propiedades fisicoquímicas de las AgNPs y las contrastan con los factores extrínsecos como el tiempo de exposición y la concentración. En estos trabajos se analizaron AgNPs con tamaños oscilando entre los 10 y 100 nm que es el máximo límite considerado NM. Estas AgNPs presentaron recubrimientos de PVP, citrato, fitogénicos y sin recubrimiento. Las líneas evaluadas abarcaron los modelos A549, Beas-2B, Calu-1, NCI-H358, MRC-5, NIH3T3, Wi38 y distintos modelos primarios de pulmón (**Tabla1**).

Para todos los casos se encontró un cierto grado de citotoxicidad, sin embargo, para los modelos sanos se apreció un efecto significativamente menor en la mayoría de los casos. Los efectos citotóxicos resultaron ser variados. Entre estos se remarcan la disminución de la viabilidad celular, arresto celular, producción de ROS mitocondrial, daño morfológico y daño al ADN, necrosis, senescencia y apoptosis.

Tabla 1. Citotoxicidad de AgNPs en monocultivos de pulmón

Recubrimiento	Tamaño (nm)	Concentración	IC ₅₀	Tiempo de exposición (h)	Línea celular	Efectos citotóxicos	Re cito
PVP	20	0, 10, 25, 50, 100 y 200 µg/mL	100 µg/mL	24, 48 y 72	A549	Disminución de la expresión génica y proteica de p53, p21, MDM2 y caspasa-3. Producción de ROS mitocondriales. Cambios epigenéticos como una disminución en los niveles globales de acetilación de las colas de la proteína histona 3 y un aumento en la metilación global del ADN. Elevación de la apoptosis/necrosis tardía después de 48 h para AgNP20 y aumento de la apoptosis tardía para AgNP10. La alta expresión de HMOX1 en A549 podría hacerlos menos susceptibles a la apoptosis en etapa temprana de muerte celular inducida por ROS Elevación en el número de células en las fases S y sub-G1 (mecanismo de reparación de ADN más efectivo en AgNP de 10 nm)	C Tie dep
PVP	10, 20	5-100 µg/ mL	10 nm: 56.4 µg/ml 20 nm: >100 µg/ml	24 y 48	A549	Daño severo al ADN. Detención del ciclo celular. Una disminución de la viabilidad celular. Aumento de células apoptóticas tardías y necróticas a 100 µg/ml.	C Tie dep
PVP	23	1-10 µg/ mL	*Not specified (ND)	24, 48, y 72	A549 Calu-1 BEAS-2B NCI-H358	Detención del ciclo celular. Una disminución de la viabilidad celular. (Pero no en NCI-H358). Producción de ROS mitocondriales. Oxidación de proteínas mitocondriales.	Co dep Tie dep

						Disminución de los niveles de ATP celular. Acumulación de A549 y Calu-1 en G2 y fase S Acumulación de BEAS-2B en la fase S Las células NCI-H358 no mostraron cambios en el ciclo celular relacionados con la exposición a AgNP ROS mitocondriales y oxidación de proteínas en las líneas celulares sensibles a AgNP	Tip dep
PVP	25	0.4, 1, 4, 10 µg/mL	>100 µg/mL	240	Fibroblastos de pulmón humano (NHLF) MRC-5	Toxicidad aguda moderada para MRC-5 Senescencia celular para la línea MRC-5 al utilizar concentraciones subtóxicas Actividad de β-galactosidasa asociada a la senescencia (SA-β-gal) y focos de heterocromatina asociados a la senescencia (SAHF) en MRC-5 Además, se observó una fuerte actividad (SA-β-gal) para NHLF Expresión de SASP y genes inflamatorios Arresto de fase G2/M Disminución de la fase G0/G1 Disminución moderada de la fase S. 685 transcripciones reguladas al alza y 718 transcripciones reguladas a la baja en los niveles globales de ARNm de RNA-seq Papel potencial de la vía COX2-PGE2 en la senescencia celular pulmonar inducida por AgNPs. La vía COX2-PGE2 está regulada por p65 BCL-2 fue regulado a la baja por AgNP. Expresión de SASP y genes inflamatorios Arresto de fase G2/M Detención completa del crecimiento a los 10 días de exposición para MRC-5 Ciclooxigenasa 2 (COX2/PTGS2) altamente diferenciada.	Co dep Tip dep

						Las células senescentes inducidas por AgNP posteriormente sufren apoptosis.	
Shikonin	20	0.078-10 µg/mL	2.4 ± 0.11 µg/mL	24	A549	Una disminución en la viabilidad y proliferación celular.	Co dep
Acacia nilotica o goma natural (NG) y polvo de semilla de tamarindo (TKP)	10-78	10-100 µg/mL	Wi 38 : 86.15 µg/ml A549: 65.85 µg/ml	12, 24, y 48	A549 Wi38	Disminución de la viabilidad y proliferación celular. Selectivo a las células cancerosas. Inhibición del ciclo celular. Apoptosis mediada por ROS	Co dep Tip dep
Ácido galico	10-30	5, 25, 50, 100, 200 µg/ml	46.5 µg/ml	24	A549	Efectivo en el tratamiento de la toxicidad y resistencia a la radiación desarrollada por las células cancerosas durante el curso del tratamiento del cáncer. Una disminución de la viabilidad celular. Supresión de EMT.	Co dep
<i>Marine algae Caulerpa taxifolia</i>	10-100	10-100 µg/mL	40 mg/mL	24	A549	Formación de necrosis y morfología de condensación de células A549. Daño morfológico. Muerte celular. Apoptosis.	Co dep
<i>Avicennia marina</i>	10-20	10-80 µg/mL	50 mg/mL	24	A549	Inhibición de células cancerosas. Daño a la membrana mitocondrial. ROS.	Co dep
<i>Tinospora cordifolia</i>	25-50	25, 50, 75, 100, 150 ppm	100 µg/ml (ppm)	12, 24, y 48	A549	Disminución de la viabilidad celular relativa. Cambios citomorfológicos. Apoptosis. Daño nuclear. ROS.	Co dep Tie dep

						Pérdida del potencial de membrana mitocondrial (ψ_m).	
<i>Wogonin</i>	5, 40	2–10 μM 1–5 μM	5 nm: 2 μM 40 nm: 6 μM	24 y 48	A549	Disminución de la viabilidad celular relativa. ROS. Activación de la vía apoptótica mitocondrial. Daño en el ADN. Activación de Caspasa 9 y 3. Secreción de marcadores proinflamatorios como $\text{TNF}\alpha$.	Co dep Tie dep
<i>Artemisia oliveriana</i>	10.63	5, 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$	A549: 3.6 $\mu\text{g/mL}$. MRC-5: 10 $\mu\text{g/mL}$	24	A549 MRC-5	Disminución de la viabilidad celular relativa. Aumento de la expresión de genes apoptóticos: Bax, Casp3, Casp9 y miR-192. Disminución de la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 Las células tratadas con AgNP se desplazaron hacia una fase sub-G1 del ciclo celular. Actividad antioxidante. Menos efectos sobre las células normales. Fragmentación del ADN genómico.	Co dep Tip dep
<i>Toxicodendron verniciifluum</i>	2-40	5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{g/mL}$	A549: >320 $\mu\text{g/mL}$ NiH3T3: 160 $\mu\text{g/mL}$	24	A549 NIH3T3	Disminución de la viabilidad celular en A549 pero no en células embrionarias de ratón. Apoptosis mediada por ROS en A549. Muerte celular 95% a máxima concentración para A549.	Co dep Tip dep
Citrato	10, 75	1 $\mu\text{g/mL}$	No especificado	144	BEAS-2B	Daño en el ADN. Detención del ciclo celular G1. 719 genes estaban regulados a la baja y 998 genes estaban regulados al alza. Daño en el ADN. Detención del ciclo celular en G1. Inducción de fibrosis. EMT (transición epitelial mesenquimatosas).	Co dep Tar dep Tie dep

						Transformación celular indicativa de un fenotipo oncogénico.	
Citrato	60	50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$	200 μg Ag/mL	24	A549 HPSAEpiC	Alcalinización del pH lisosomal (disfunción) y formación de autofagosomas. Inhibición del flujo autofágico. Inhibición transcripcional de la expresión de TFEB. Los niveles de proteína de p62 y LC3B-II Aumentó de forma dependiente de la dosis.	Co dep Tip dep
Citrato y quitosano	7-10	6.25×10^{12} , 1.25×10^{12} , 2.5×10^{12} , 5×10^{12} NPs/mL	NHBE: $0.7 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ A549 y BEAS-2B: no está en rango	0.5, 4 y 24 hours	A549. BEAS-2B. NHBE.	A549 y NHBE no respondieron a los cambios de TEER y no se observó citotoxicidad. Las células NHBE demostraron ser la línea celular más resistente y exhibieron solo una citotoxicidad estadísticamente significativa para las AgNP recubiertas con quitosano (0,01 y 01 %) en la concentración más alta. La producción de ROS fue más prominente en A549	Co dep Tip dep Re dep
Citrato	10, 75	2 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	24 y 48	Fibroblastos de pulmón humano (HLF-1)	Disminución de la viabilidad celular Reducción de la actividad metabólica Secreción de procolágeno y citocinas proinflamatorias	Tie dep Co dep Tar dep
Sin recubrir	4.7, 42	0.84–2000 $\mu\text{g/mL}$	4.7 nm: 7.7 mg/mL 42 nm: 1150 mg/mL	24	Cultivos primarios de fibroblastos humanos pulmonares (HPF)	Disminución de la viabilidad de HPF. Reducción de la actividad mitocondrial celular y fuga de LDH. Producción de ROS y estrés oxidativo. Sin cambios estadísticamente significativos en la actividad de SOD. Agotamiento de GSH.	Tar dep

2.2 AgNPs Bioargovit® en distintos modelos biológicos

Similar a la tabla anterior se registró la citotoxicidad de AgNPs en los diferentes modelos utilizados por nuestra red de colaboración. En ella se compilaron los resultados de la toxicidad de una formulación muy similar a la nuestra llamada Bioargovit®. Los modelos utilizados abarcaron una gran familia de hongos, protozoarios, plantas, líneas celulares humanas, líneas celulares animales, modelos primarios, y modelos *in vivo* de distintas especies animales. De manera interesante esta formulación mostró poseer un efecto antimicrobiano, antifúngico, antiparasitario y antitumoral selectivo para los distintos modelos celulares contrastados (**Tabla2**). Adicionalmente se generaron formulaciones más estables denominadas Argovit®. De esta nueva Argovit® se han evaluado las primeras cinco formulaciones en un trabajo previo reportado también por nuestro grupo de investigación (Cruz-Ramírez et al., 2021a). Estas formulaciones fueron probadas en el modelo de cáncer colorrectal HCT-15 y se calculó su selectividad realizando cultivos primarios de distintos órganos del modelo Balb/c (p.ej aorta, médula, riñón, bazo, hígado, corazón, y linfocitos y monocitos de bazo). Los resultados de esta selectividad antitumoral pueden verse reflejados en la **Figura 1 y 2**.

Tabla 2. Citotoxicidad de AgNPs Bioargovit® en distintos modelos biológicos.

Grupo biológico	Modelo	Uso	Hallazgos clave	Referencias
Parasitos	Entamoeba histolytica trophozoites. Cichlidogyrus spp. Perkinsus marinus.	Actividad amebicida in vitro. Determinar el efecto antihelmíntico de las AgNPs en huevos adultos de la especie Cichlidogyrus spp. Observar los efectos de las nanopartículas de plata sobre el parásito Perkinsus marinus.	Viabilidad dependiente de la concentración La concentración inhibidora media (IC50) para esta formulación de AgNP en E. histolytica es de 69,2 µM (7,4 µg/mL). Los trofozoítos expuestos a AgNP aumentan de tamaño y las membranas se adelgazan Efecto antihelmíntico de forma dosis-dependiente. Muerte total de parásitos en Cichlidogyrus spp Inhibición total de la eclosión de huevos monogéneos Formación de vacuolas y rotura de tegumentos El tratamiento con AgNP resulta en una mortalidad del 90 % de P. Marinus. Deformación de las hipnosporas.	(Valenzuela-Salas et al., 2021), (Pimentel-Acosta et al., 2019), (Bravo-Guerra, Cáceres-Martínez, Vásquez-Yeomans, Pestryakov & Bogdanchikova, 2020)
Líneas celulares humanas	Células de adenocarcinoma colorrectal humano HCT-15 (Duke's type C) HeLa MDA-MB-231 MCF7	<i>In Vitro</i> actividad antitumoral Estudios citotóxicos Evaluación de la morfología celular Viabilidad celular	Se encontró una fuerte actividad antiproliferativa de HCT-15, atribuyendo la disminución de la viabilidad celular a la generación de especies reactivas de oxígeno. Siendo su IC50 = 19.7 µM (2.1 µg/mL) indicando una potencia diez veces mayor que el carboplatino y mostrando una actividad emética menor que el cisplatino.	(Valenzuela-Salas et al., 2021), (Juarez-Moreno et al., 2016).

	H1299 H1437 DU-145 HT-29 DLD-1		Los AgNP inhiben eficazmente la viabilidad celular de las líneas celulares de cáncer dependientes y no dependientes de hormonas, en función de la dosis y el tiempo. Producción de ROS Daño considerable en el ADN	
Líneas celulares no humanas	B16-F10, células de melanoma de piel murina de ratones C57BL/6J.	Actividad antiproliferativa. Viabilidad celular. Apoptosis. Necrosis. Especies reactivas de oxígeno.	Apoptosis ROS Producción de superóxido mitocondrial Necrosis Efectos antiproliferativos	(Valenzuela-Salas et al., 2019)
Humano	Dermis humana	Tratamiento de las úlceras del pie diabético de grado II y III de la clasificación de Wagner con AgNPs	Se observaron resultados significativos en la mejora y el cierre de la piel abierta. Disminución de la hiperqueratosis y dermatitis No se observó necrosis ni inflamación Se evidenció proceso de reepitelización y normalización de la pigmentación.	(Hernández et al., 2017)
Roedores	Balb/c. C57BL/6JNHsd ratones machos. C57BL/6.	Aislamiento y viabilidad del cultivo celular primario (cerebro, hígado, riñón y bazo, células dendríticas de la médula ósea). Dosis Letal. Evaluación histopatológica.	Para los modelos in vivo se observó un aumento en la biocompatibilidad de BioArgovit en comparación con los modelos AgNPs reportados en la literatura. Los biomarcadores estaban dentro del rango informado para ratones BALB/c. No se encontraron diferencias histológicas significativas entre los ratones del grupo control y los que recibieron AgNP. Reducción de tumores.	(Valenzuela-Salas et al., 2021), (Valenzuela-Salas et al., 2019), (Castro-Gamboa et al., 2019), (Kalmantaeva et al., 2014)

		Inducción de melanoma. Actividad antitumoral. Genotoxicidad. Investigación histológica de los pulmones, el hígado, los riñones, el bazo y los ganglios linfáticos inguinales.	Los ratones con melanoma presentan prácticamente el mismo recuento de MNE que los ratones sanos. Disminución de la tasa de crecimiento tumoral. Disminución de la viabilidad de BMDC, daño severo en el ADN, apoptosis y cambios fenotípicos. Ningún efecto tóxico sobre las células y los órganos inmunitarios. No hay cambios en la cantidad de linfocitos T y B en el bazo, ni en la producción de citoquinas proinflamatorias después de la exposición a nanopartículas de plata por inhalación o por vía intragástrica. El contenido de linfocitos T productores de IFNγ aumentó 3,6 veces al con la administración subcutánea de nanopartículas de plata.	
Células humanas primarias	Linfocitos de sangre periférica humana	Frecuencia de micronúcleos Brotos nucleares (NBUD). Puentes Nucleoplásmicos (NPB). Índice de proliferación de bloque de citocinesis (CBPI). Apoptosis/necrosis.	En comparación con el cisplatino y el carboplatino, BioArgovit no produjo la formación de micronúcleos en los linfocitos de sangre periférica humana y aumentó el intercambio de cromátidas hermanas, incluso en dosis mucho más altas. Ni citotóxico ni genotóxico. Los AgNP de Argovit no inducen cambios en la apoptosis, la necrosis, la frecuencia de los brotes nucleares o los puentes nucleares.	(Valenzuela-Salas et al., 2021), (Ruiz-Ruiz et al., 2020)

Myrtaceae	Psidium friedrichsthalianum	Como modelo de prueba para la desinfección de puntas de brotes y esterilización del medio y explantes. Multiplicación in vitro de brotes apicales.	Diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para desinfección de puntas de brotes, menor porcentaje de contaminación (40%). La contaminación disminuyó por debajo del 50 % para los explantes y el medio de cultivo. Todos los explantes que no estaban contaminados se mantuvieron en cultivo y sobrevivieron. Se observó un área foliar de 0,409 cm ² y una tasa de multiplicación de 2,286 en puntas de brotes con las condiciones óptimas de desinfección y esterilización (tasa de aumento de 5,6 para la primera y casi el doble para la segunda).	(Andújar et al., 2020)
Amaryllidaceae	Allium cepa	Determinación de la Capacidad Antioxidante. Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). Determinación de Contenido Fenólico Total (TPC). Determinación de Lipoperoxidación (LPO). Índice mitótico. Genotoxicidad.	Aumento de la longitud de las raíces y crecimiento de nuevos brotes a bajas dosis de AgNPs. Se observó aumento en el índice mitótico a dosis bajas, así como un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante. Se observó lipoperoxidación a dosis muy altas. Las nanopartículas de Argovit tienen menor toxicidad en comparación con las nanopartículas de plata comerciales reportadas en la literatura.	(Casillas-Figueroa et al., 2020)

<i>Orchidaceae</i>	<i>Vanilla planifolia</i>	Efectos citotóxicos de Argovit®. Efectos antimicrobianos y horméticos de las nanopartículas de plata Efectos genotóxicos de Argovit®. Efectos de polimorfismo de Argovit®. Índice mitótico.	El crecimiento de las plántulas de <i>Vanilla planifolia</i> se ve favorecido con una pequeña disminución en el índice mitótico. Se encontró dependencia de la dosis en la frecuencia de. células con aberraciones cromosómicas y micronúcleos. Exposición de las plántulas a AgNP aumentan el polimorfismo. La contaminación bacteriana se redujo en dosis altas. Se observó estimulación del crecimiento en dosis bajas. La inhibición estuvo presente en dosis medias ROS. Aumento del contenido fenólico total. Capacidad antioxidante. Peroxidación lipídica. Dependencia de la dosis.	(Bello-Bello et al., 2018), (Spinoso-Castillo et al., 2017)
Yeast	<i>Candida tropicalis</i> <i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Candida albicans</i>	Actividad antifúngica Selectividad Comparación de drogas Actividad antimicrobiana de nanoclusters de plata	Las nanopartículas evaluadas mostraron un 40 % más de selectividad para <i>Candida tropicalis</i> en comparación con <i>Saccharomyces boulardii</i>. Las nanopartículas mostraron una mayor actividad antifúngica en comparación con los medicamentos convencionales, incluso en dosis más bajas La estructura PCL/PVP 85:15 mostró actividad antimicrobiana contra <i>Candida albicans</i>.	(Guerra et al., 2020), (Álvarez-Suárez et al., 2020), (Sedelkin, Potekhina, Lebedeva, & Ulyanova, 2020)

			Las muestras de membranas a base de quitosano que contienen nanoclusters de plata exhiben una actividad antimicrobiana pronunciada contra hongos similares a las levaduras.	
Moho	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium roquefortii</i> <i>Eurotium amstelodame</i>	Actividad antimicrobiana de nanoclusters de plata	Las muestras de membranas a base de quitosano que contienen nanoclusters de plata exhiben una actividad antimicrobiana pronunciada contra los hongos del moho micelial.	(Sedelkin, Potekhina, Lebedeva, & Ulyanova, 2020)
Bacterias Gram negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia coli DH5α</i> <i>Candidatus Liberibacter</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Salmonella</i> <i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Serratia marcescens</i>	Actividad bactericida. Actividad antimicrobiana de nanoclusters de plata. Actividad antimicrobiana de los nanocompuestos de plata. Tratamientos combinados AgNPs-antibióticos	PVP-AgNP mostró actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas. Las muestras de membranas basadas en quitosano que contienen nanoclusters de plata exhiben una actividad antimicrobiana pronunciada contra las bacterias Gram negativas. Exponer el uso potencial de las AgNPs como agente bactericida contra diversas bacterias presentes en cultivos vegetales, específicamente aquellas que producen necrosis bacteriana en papa. Reducción de la adhesividad bacteriana. La combinación AgNPs-Cm provocó una inhibición del crecimiento de alrededor del 50 % en <i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> , mientras que AgNPs-Km provocó una inhibición drástica del crecimiento en el mismo. cepas (alrededor del 95%). Alteración de la membrana.	(Álvarez-Suárez et al., 2020), (Sedelkin, Potekhina, Lebedeva, & Ulyanova, 2020), (Perfileva et al., 2019), (Vazquez-Muñoz et al., 2019)

			Despolarización de la membrana bacteriana. Aumento de la permeabilidad.	
Bacterias Gram positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Bacillus Subtilis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Enterococcus</i> <i>Clavibacter</i> <i>Sependonicus</i> <i>Enterobacter freundii</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Actividad bactericida Actividad antimicrobiana de nanoclusters de plata Actividad antimicrobiana de los nanocompuestos de plata. Tratamientos combinados AgNPs-antibióticos	El armazón PCL/PVP 85:15 mostró actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas. Las muestras de membranas basadas en quitosano que contienen nanoclusters de plata exhiben una actividad antimicrobiana pronunciada contra las bacterias Gram positivas. Exponer el uso potencial de las AgNPs como agente bactericida contra diversas bacterias presentes en cultivos vegetales, específicamente aquellas que producen necrosis bacteriana en papa. Actividad lisosomal reducida Los nanocompuestos de plata produjeron un efecto tóxico en la bacteria Cms La combinación AgNPs-Cm provocó una inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> de alrededor del 50 %, mientras que AgNPs-Km provocó una inhibición drástica del crecimiento en el mismo cepas (alrededor del 95%) No causó daño ultraestructural Despolarización de la membrana bacteriana Aumento de la permeabilidad	(Álvarez-Suárez et al., 2020), (Sedelkin, Potekhina, Lebedeva, & Ulyanova, 2020), (Perfileva et al., 2019), (Vazquez-Muñoz et al., 2019)

<i>Arthropods</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Determinar el efecto protector de Argovit-4 y Argovit® contra WSSV. Determinar si Argovit-4 y Argovit® suplementados con alimentos presentan toxicidad en camarones. Verificar si Argovit-4 y Argovit® como aditivo antiviral en alimentos pueden prevenir o retrasar la mortalidad inducida por WSSV. Comprobar si Argovit-4 y Argovit® alteran la respuesta inmune en etapas tempranas	Se demostró que las nanopartículas de Argovit-4 no son tóxicas para los camarones cuando se administran en los alimentos. Argovit-4 mostró una alta efectividad en el combate del virus de la mancha blanca, reduciendo así el nivel de muerte causado por esta enfermedad. No reportó efectos inmunoestimuladores en las primeras etapas. La mortalidad disminuyó de forma dependiente de la dosis. No se observaron daños en camarones sanos.	(Romo-Quinonez et al., 2020), (Ochoa-Meza et al., 2019)
-------------------	-----------------------------	--	--	--

<i>Rutaceae</i>	<i>Citrus aurantifolia Swingle</i>	Evaluar la capacidad de las nanopartículas de plata para erradicar la bacteria que causa la enfermedad del <i>huanglongbing</i> , <i>Candidatus Liberibacter</i>	El 90% de <i>Candidatus Liberibacter</i> fue erradicado con la primera dosis El método de inyección en tallo produjo una mejor absorción de AgNPS en comparación con el método de rociado.	(Stephano-Hornedo et al., 2020)
Pez	Chirostoma estor	Determinar que las AgNPs son tóxicas para el modelo ciliado <i>Tetrahymena</i> y no para <i>Chirostoma estor</i>	Actividad antiprotozoaria dependiente de la dosis Sin signos de daño histopatológico o cambios microbianos intestinales para <i>Chirostoma estor</i> . Cambios microscópicos y ultraestructurales de AgNPs en <i>Tetrahymena</i>	(Fuentes-Valencia et al., 2020)
Molusco	Oyster	Observar los efectos de las nanopartículas de plata sobre el parásito <i>Perkinsus marinus</i>	El tratamiento con AgNP resulta en una mortalidad del 90 % de <i>P. Marinus</i> Deformación de las hipnosporas. Las AgNP no fueron tóxicas para el huésped.	(Bravo-Guerra, Cáceres-Martínez, Vásquez-Yeomans, Pestryakov & Bogdanchikova, 2020)
Pájaro	<i>Quail</i>	Seguimiento de los resultados de la introducción de nanocompuestos de plata a base	La tasa de supervivencia de las codornices aumentó entre un 3,0% y un 4,0%, La ganancia media diaria de peso vivo aumentó entre un 6,48% y un 7,35%.	(Merzlyakova & Rogachev, 2020)

		de zeolita y como parte del preparado Argovit en la dieta de las aves.	El consumo de pienso por unidad de producto disminuyó entre un 13,14% y un 16,62%. La producción de huevos de codornices ponedoras aumentó entre un 6,00 y un 7,45 %, la producción de masa de huevos entre un 6,02 y un 7,89 % y la producción de huevos para incubar entre un 3,33 y un 11,7 %.	
Ganado	<i>Bos primigenius taurus</i>	Actividad antimicrobiana de los nanocompuestos de plata. Comparación de fármacos en modelos <i>in vivo</i>	Incrementé la sobrevivencia de novillos con enfermedades intestinales causadas por microflora patógena de 91.1 a 100% Se encontró una mayor sensibilidad bacteriana a los medicamentos dirigidos a animales, como la enrofloxacin, la sulfadimidina, la tetraciclina y la neomicina.	(Perfileva et al., 2019)

2.3 Efecto citotóxico de AgNPs Argovit® en HCT-15 y cultivos primarios

Las cinco formulaciones mostraron tener potencial antiproliferativo contra la línea celular HCT-15 y cultivos primarios. Para las formulaciones de AgNP1, 2 y 3 se observó un efecto concentración dependiente, no así para la AgNP4 y AgNP5. Sin embargo, incluso con la concentración más alta se observó una viabilidad mayor al 50%, teniendo una actividad similar a la del fármaco de primera elección carboplatino a la IC₅₀ reportada de 190 μ M en diversos artículos de investigación. Los resultados mostraron que la apoptosis fue la vía principal de muerte celular. Por otro lado, las AgNPs no disminuyeron la viabilidad celular de manera significativa en modelos de cultivos primarios de aorta, médula, riñón, hígado y corazón **figura 2**. La disminución significativa solo se presentó en monocitos y linfocitos de bazo. Los resultados obtenidos en este artículo de investigación aunados a los presentados en la **tabla 1 y 2** nos hacen pensar que las AgNPs son un potencial agente antineoplásico selectivo. Lo cual nos incentivó a realizar la evaluación concerniente en modelos de suma relevancia biológica como lo son, los modelos pulmonares.

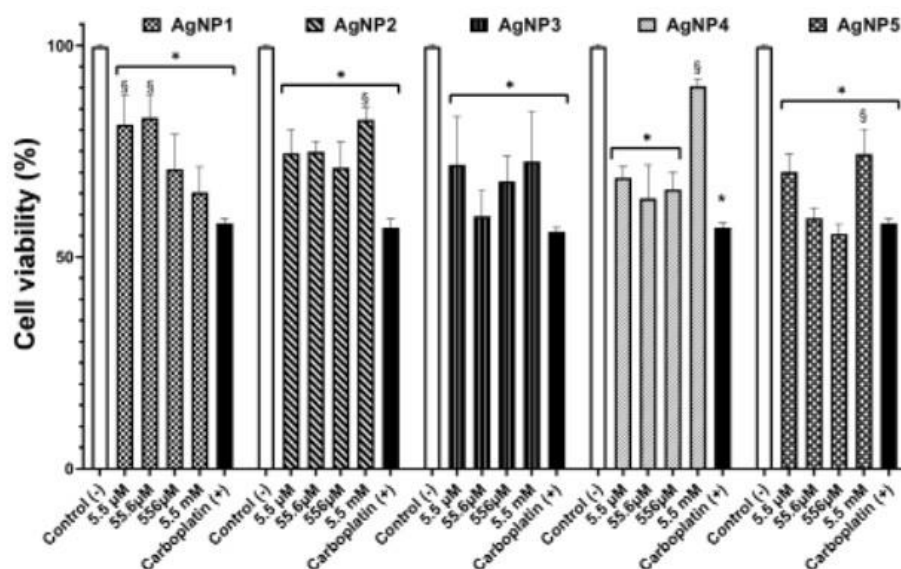
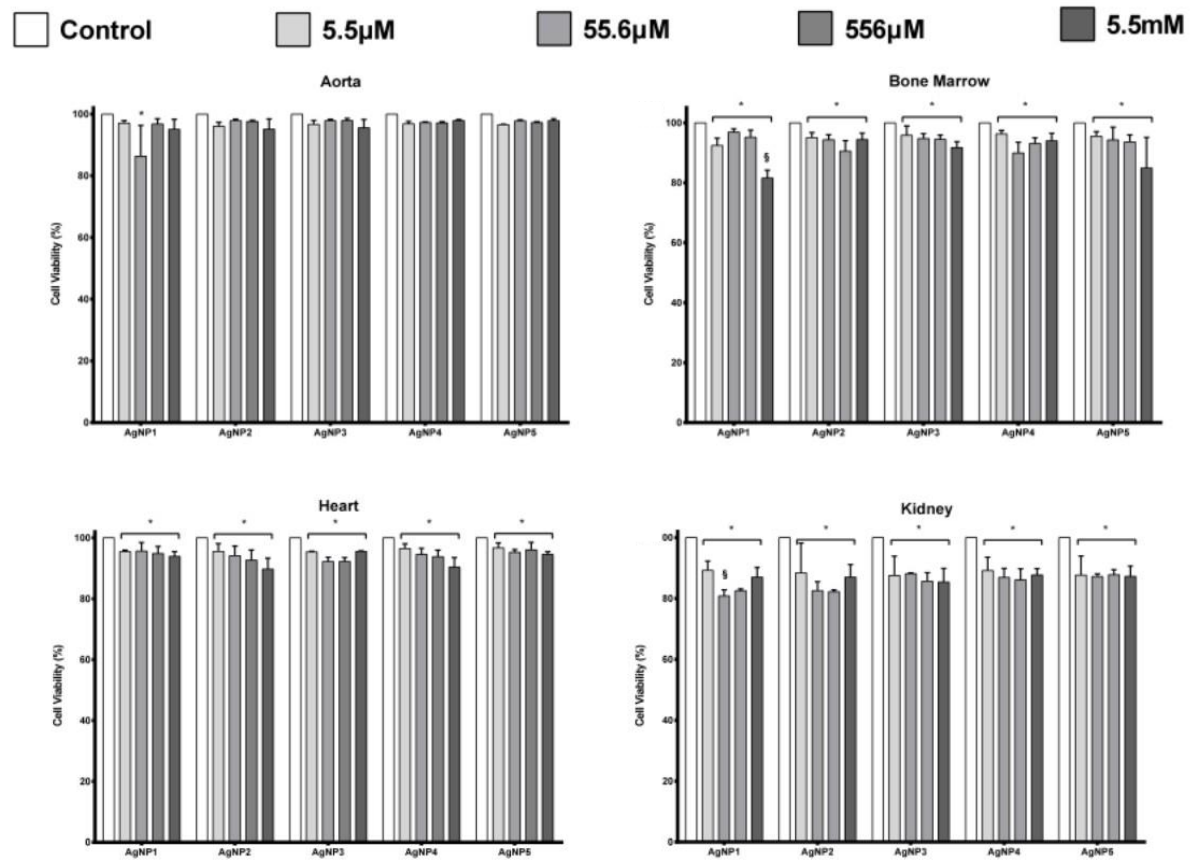


Figura 1. Resultados de la viabilidad de las primeras cinco formulaciones Argovit® para la

línea HCT-15 en un trabajo previo (Cruz-Ramírez et al., 2021a).



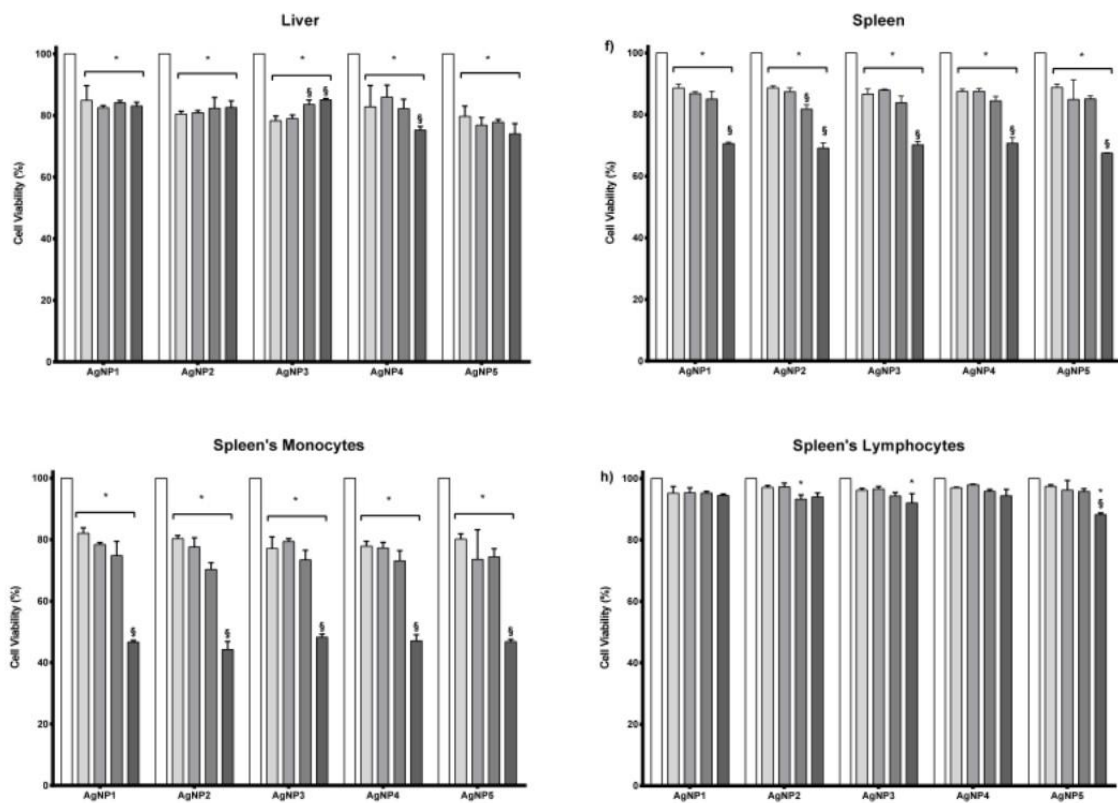


Figura 2. Resultados de la viabilidad de las primeras cinco formulaciones Argovit® en los distintos modelos primarios (Cruz-Ramírez et al., 2021a).

Capítulo 3

Marco teórico

En este capítulo se introducen los principios y fundamentos correspondientes a la caracterización y diseño experimental del concerniente trabajo de tesis. En este se tratarán la caracterización de las formulaciones Argovit® mediante TEM, UV-vis, DLS, TGA, y el método de exclusión vital por Azul tripano.

3.1 Caracterización de las AgNPs por TEM

El principio básico de funcionamiento del TEM está regido por la interacción entre una muestra delgada y haz de electrones de alta energía. De hecho, el TEM funciona como el método de microscopia óptica pero amplificado. En este las imágenes son visualizadas en una pantalla sin necesidad de utilizar un ocular. En la generación de la imagen los electrones convencionales son intercambiados por fotones y los lentes ópticos son remplazados por electromagnéticos (Kumar et al., 2019). Como puede verse en la **figura 3** el fundamento del análisis por TEM es simple. En este, una pistola de electrones genera una emisión continua a través de una columna de vacío. Los electrones que logren atravesar la muestra serán captados por el detector (pantalla fluorescente). Esta intensidad en los electrones que no son dispersados genera una imagen de sombra de la muestra atravesada (Oluwafemi et al., 2021). Esto permitirá la visualización de la muestra en el orden de los nm en una pantalla de alta resolución con la cual será posible determinar el tamaño del nanomaterial y su morfología.

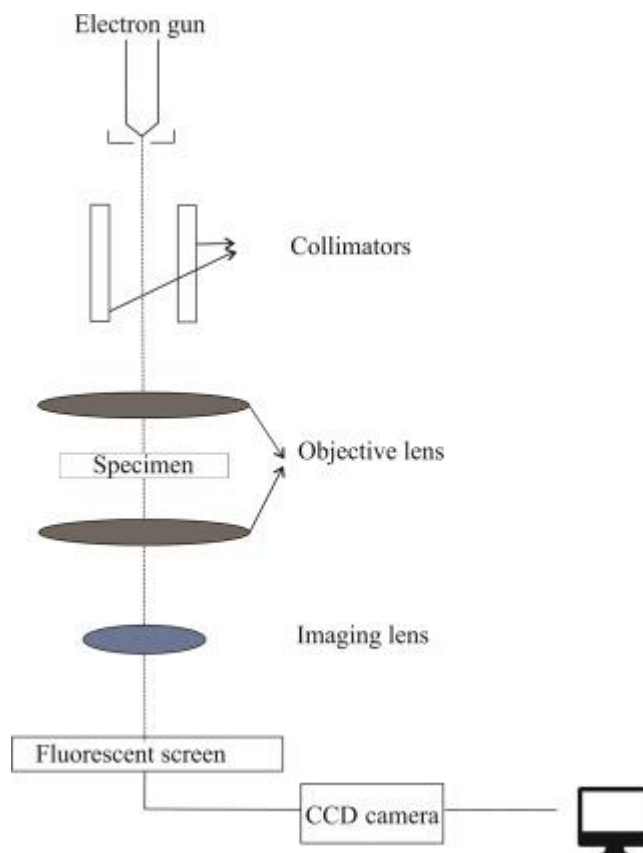


Figura 3. Principio básico del funcionamiento del TEM: Figura propiedad de (Kumar et al., 2019).

Con base en estos principios nuestro grupo de investigación realizó la caracterización fisicoquímica de las formulaciones Argovit® mediante TEM (**Figura 4**). Se identificó el tamaño promedio de las AgNPs con respecto a la frecuencia del número de eventos encontrados para cada formulación y se describen las distintas morfologías. Como se puede apreciar, todos los eventos tienen un tamaño por debajo de los 50 nm. Los resultados de la caracterización fisicoquímica se encuentran compilados en la **tabla3** y son discutidos a profundidad en la **sección 7.2.1**.

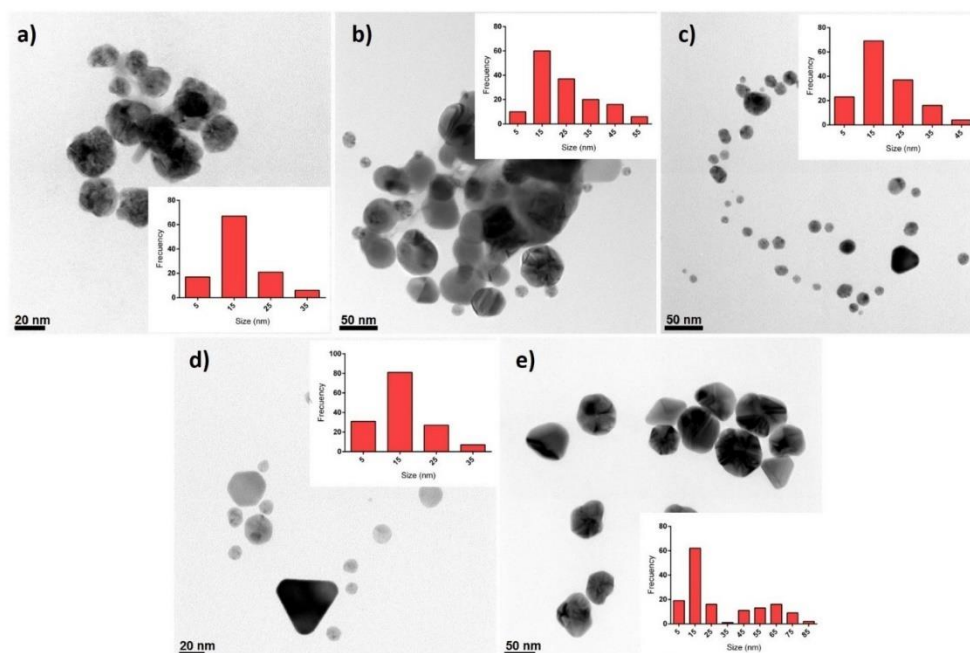


Figura 4. Caracterización de las AgNPs. Microfotografías de las formulaciones de AgNPs obtenidas por TEM e histogramas con las distribuciones de tamaño analizadas por ImageJ.

Tomado de Cruz-Ramírez et al., 2021a.

3.2 Caracterización de las AgNPs por la técnica de DLS

La caracterización por dispersión de luz dinámica (DLS) es la técnica que proporciona el tamaño de nanopartícula gracias a la medición de la luz dispersada en suspensión coloidal. Este principio de operación se basa en la medición de la luz dispersada al atravesar una suspensión coloidal comparando la intensidad de la luz en función del tiempo lo cual permite calcular el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas presentes en el medio (Lim et al., 2013). Este método también es ampliamente utilizado para medir el tamaño de la nanopartícula antes de ser recubierta y posterior a funcionalización de la superficie. Incluso es posible medir el grosor de su recubrimiento de ser necesario (Dhas et al., 2018). Como bien se ha documentado las partículas se rigen por difusión mediante el movimiento browniano, esto hará que ha tamaños

más pequeños se genere una difusión más rápida lo cual a través de una función matemática tiempo dependiente de la luz dispersada será leída por el DLS (Raval et al., 2019).

Por otro lado, este equipo permite la medición del potencial-Z mediante el uso de una nueva técnica. El potencial-Z puede ser referido como la medición del campo eléctrico presente ente la nanopartícula y su microambiente acuoso. Se puede decir que esta técnica determina el grado de repulsión que presentan estas NP cargadas en un medio disperso (Samimi et al., 2019). Los valores altos de potencial-Z ya sean positivos o negativos son atribuidos a nanopartículas altamente cargadas. Estas nanopartículas entre mayor sea su potencial-Z se consideran más estables en solución (Das & Chaudhury, 2011). Si se presenta el caso contrario de poseer potenciales-Z muy bajos, se puede decir que las NP tenderán a formar agregados en solución pues es indicativo de un vencimiento de las fuerzas repulsivas.

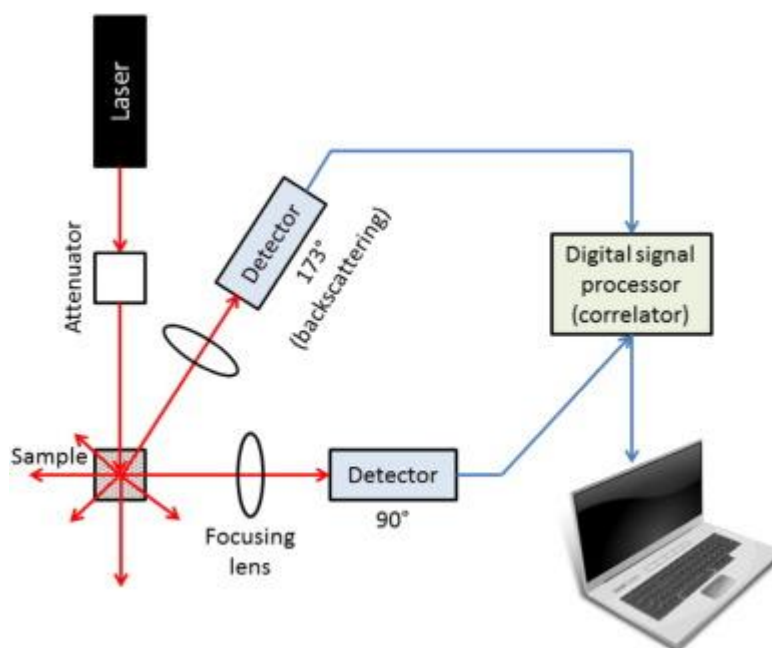


Figura 5. Principio básico de operación del DLS: Figura propiedad de (Bhattacharjee, 2016).

Este equipo permitió la caracterización de algunos parámetros fisicoquímicos importantes en las formulaciones de AgNPs. Entre ellos podemos encontrar el diámetro

hidrodinámico de las nanopartículas que oscilaron entre los 43.8 nm y 4883.2 indicando diferencias en su solvatación. Otro parámetro importante medido por esta técnica fue el potencial-Z de las cinco formulaciones de nanopartículas. Donde sus valores se ubicaron entre -0.464 y -5.13, siendo indicativo de formulaciones estables. Por último, el índice de polidispersión pudo ser registrado en un intervalo e 0.270 y 0.813 el cual dicta que las formulaciones en su mayoría se encuentran polidispersas (**Tabla 3**).

Tabla 3. Caracterización completa de las formulaciones de AgNPs utilizadas Argovit®.

Propiedades fisicoquímicas	AgNP1	AgNP2	AgNP3	AgNP4	AgNP5
Tamaño promedio de los núcleos metálicos de plata ØAg (nm)	16.4 ± 8.0	25.4 ± 13.2	19.0 ± 9.3	16.4 ± 8.1	30.6 ± 23.2
Distribución de tamaños por TEM (nm)	5-40	5-60	5-40	5-40	5-80
PVP	K-15 ^a	K-17 ^b	K-17 ^b	K-30 ^c	12.6 KDa
Diámetro hidrodinámico ØHidro (nm)	448.7	90.4	43.8	483.2	121.1
Índice de polidispersidad (IPD)	0.813	0.270	0.433	0.555	0.280
Potencial Z (mV)	-0.872	-4.56	-5.13	-0.464	-1.46
Resonancia de plasmón superficial (λ)	415	402.444	402	406.549	429
Análisis de TGA					
Plata metálica (%w/w)	1.14 ± 0.02	1.32 ± 0.05	1.26 ± 0.03	1.19 ± 0.01	1.31 ± 0.01
PVP (%w/w)	19.62 ± 0.30	24.49 ± 0.70	24.43 ± 0.20	20.92 ± 0.42	21.67 ± 0.50
H ₂ O (%w/w)	79.24 ± 0.45	74.25 ± 0.60	75.74 ± 0.25	77.89 ± 0.80	77.02 ± 0.40
Morfología	Esférica	Esférica	Esférica	Esférica	Esférica

^aK-15: 8000–12,000; ^bK-17: 10,000–16,000; ^cK-30: 45,000–58,000

Modificado de: (Cruz-Ramírez et al., 2021a)

3.3 Caracterización de las AgNPs por TGA

El análisis termogravimétrico (TGA) se refiere al estudio del cambio en el peso de una muestra al ser sometida a una fuerte de calor constante y es utilizada para determinar los componentes volátiles en la muestra y si es o no estable térmicamente (Rajisha et al., 2011). Con este es posible medir transiciones de fase de segundo orden, descomposición, desorción, vaporización y la deshidratación de una muestra en particular. Este sistema esta básicamente compuesto de un horno altamente calibrado para mantener la temperatura constante y una balanza altamente sensible para registrar hasta el mínimo cambio en el peso de un analito deseado. El principio de esta técnica se basa en un cable colgante de alta precisión ligado en la parte superior la balanza térmicamente aislada y en la parte inferior contiene el plato muestra que se encuentra expuesto al horno de precisión (Ebnesajjad, 2006) (Figura 6). Estos equipos pueden ser incluso más complejos si se propone la adición de un lector de infrarrojo para detección de gases.

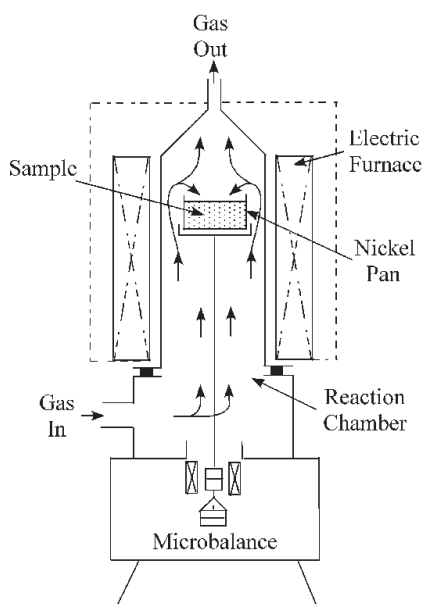


Figura 6. Esquema de operación de la técnica de TGA: Figura propiedad de (OGATA et al., 2004).

Esta técnica resultó muy útil para nuestro grupo de investigación ya que permitió la cuantificación del contenido total de plata metálica (%w/w), PVP (%w/w) y agua (%w/w) para cada formulación de AgNPs Argovit® (Tabla 3).

3.4 Caracterización de las AgNPs por UV-vis

La espectroscopia por ultravioleta visible (UV-vis) es la técnica que se encarga de medir el grado de absorción espectroscópica de los analitos caracterizados en el intervalo del ultravioleta y en el espectro visible (180 a los 750 nm) (Indrayanto et al., 2021). Esta técnica se vuelve muy útil para determinar cambios en el espectro de absorción derivados de la naturaleza del recubrimiento o la corona proteica de las AgNPs. En este sentido es posible determinar la huella digital característica para cada AgNP mediante la medición de su plasmón superficial (PS). El PS se refiere al conjunto de oscilaciones cuantizadas de carga superficial mediadas por un campo eléctrico externo (Loiseau et al., 2019). Estos plasmones superficiales generan picos característicos que pueden ser medidos mediante el UV-vis. Dichos picos provienen de transiciones electrónicas específicas que se caracterizan por ser irrepetibles entre moléculas, compuestos orgánicos y iónicos en solución. De esta manera pudieron observarse los picos característicos del plasmón de resonancia para la plata nanométrica en las cinco formulaciones de Argovit® (**Figura 7**).

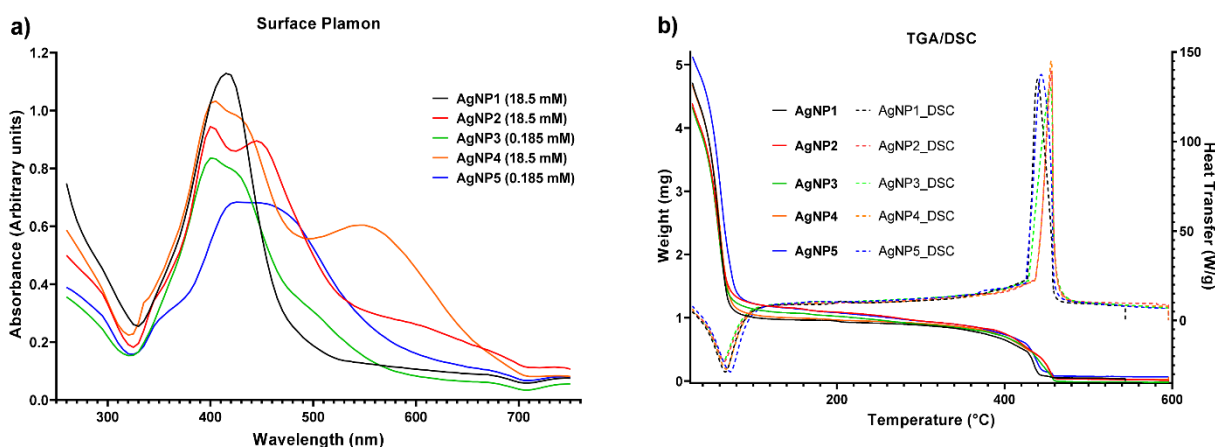


Figura 7. Gráficos de plasmón superficial y análisis TGA/DSC para las formulaciones Argovit®: Figura propiedad de (Cruz-Ramírez et al., 2021a)

3.5 Cálculo de viabilidad celular por el método de exclusión vital por azul tripano

El método de exclusión vital por azul tripano es una de las técnicas convencionales más sencillas y accesibles en la determinación de la viabilidad celular. La viabilidad celular a menudo está catalogada como la cantidad existente de células sanas en una población celular específica expuesta a un estímulo, puede ser determinada por diversos métodos. Sin embargo, el principio de exclusión vital por azul tripano ha mostrado ser una excelente herramienta en la determinación del efecto citotóxico ejercido por AgNPs en distintos modelos celulares. En ese marco, su precepto es sumamente simple, pues las células que se encuentren viables poseerán una membrana celular intacta la cual no dejará pasar el colorante. En contraposición las células que se encuentren con la membrana comprometida perderán la capacidad de impedir el paso de macromoléculas lo cual básicamente las pone en el estatus de célula no viable y puede considerarse muerta (Stoddart, 2011).

Para determinar el número de células viables en una población es necesario el uso de la microscopia óptica. Las muestras celulares teñidas con azul tripano se encontrarán en suspensión, esto basándonos en los principios del mantenimiento celular *in vitro* pues las células para mantenerse vivas requieren de un continuo acceso a nutrientes y un medio rico en factores promotores de la duplicación celular. Estos ensayos de viabilidad regularmente serán visualizados mediante un microscopio óptico en el cual deberemos contar las células vivas y muertas posterior a la exposición por un tiempo determinado al agente a evaluar. En particular estos estudios se realizan al alcanzar el número deseado en la población de células proliferantes, posteriormente son sometidas a un estímulo; en este caso AgNPs a distintas concentraciones. Posterior a la adición del estímulo las células se incuban con el agente a evaluar por un tiempo determinado. Una vez transcurrido el tiempo de exposición deseado las células se tiñen con azul tripano y se fijan con formaldehído para finalmente ser contadas bajo un microscopio óptico.

Técnica de exclusión vital con azul tripano para determinar la viabilidad celular

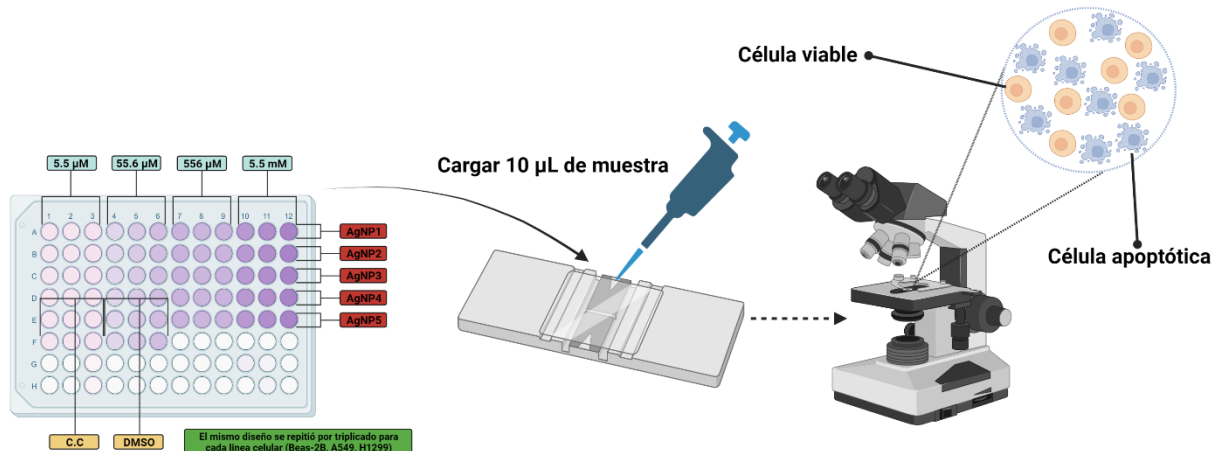


Figura 8. Método de exclusión vital por azul tripano. Los ensayos de viabilidad fueron medidos mediante microscopia óptica cargando una cámara de Neubauer con 10 µL de cada pozo.

3.6 Morfología celular de los modelos pulmonares

La morfología y propiedades biológicas de los diferentes modelos celulares está ampliamente reportada en la literatura. A su vez diversos estudios han mostrado que no solo las propiedades fisicoquímicas de la nanopartícula influirán en su efecto citotóxico. Algunas propiedades biológicas como el tipo de célula pulmonar y la posible formación de biocorona con los diversos componentes celulares han elucidado marcados efectos en la viabilidad celular de numerosas formulaciones de AgNPs (**Tabla 1**). Es por ello por lo que es imperativo tener en cuenta el tipo de célula con el que se está trabajando y poseer un conocimiento adecuado sobre la caracterización de su morfología y parámetros celulares.

3.6.1 Células bronquiales epiteliales (CBE)

Las células epiteliales bronquiales se pueden subdividir en tres categorías principales según sus características bioquímicas y estructurales: células basales, ciliadas y mucosas (Gao et al., 2015). Las células basales se pueden encontrar a lo largo de las vías respiratorias grandes y pequeñas, disminuyendo en cantidad total con la disminución periódica del tamaño de las vías

respiratoria. Solo se expresan en hemidesmosomas (Gao et al., 2015). Por otro lado, las células ciliadas componen la gran mayoría de las células epiteliales bronquiales (alrededor del 50%), las cuales se encargan de la función de la escalera mecánica mucociliar derecha. En última instancia, tenemos células mucosas o caliciformes que actúan como productoras de glicoproteínas de mucina para atrapar agentes extraños en el lumen pulmonar. Las líneas del epitelio de las vías respiratorias, la tráquea y los alvéolos por tejido pseudoestratificado contienen una sola capa de células con diferentes formas y una columna de células columnares de distintos tamaños que forman una unión estrecha alrededor de los vértices laterales del epitelio columnar (Mason, 2006).

3.6.2 Células alveolares epiteliales (CAE)

Uno de los modelos clave y más investigados en toxicología pulmonar por muchas razones es el epitelio alveolar. El epitelio alveolar comprende dos tipos de células Alveolar tipo I (AT1) y células alveolares tipo II (AT2). AT1 cubre más del 95% de la superficie alveolar, que es esencial para la barrera de sangre y aire de los pulmones y el proceso de intercambio de gases (Ward & Nicholas, 1984). Las células AT2 actúan como células progenitoras para los tipos 1 y 2, mediando el daño producido en las células AT1 y protegiendo la superficie de los alvéolos generando surfactante pulmonar (PS) (Radiom et al., 2020). Además, las células AT2 producen glutatión para brindar una defensa antioxidante contra las EROs y proporcionar una defensa inmunitaria a través de la presencia de macrófagos alveolares dentro del epitelio AT2 (Mason, 2006). Por lo tanto, hacer que los modelos de células alveolares sean un modelo de detección primario en las pruebas de toxicología pulmonar.

En este sentido está claro por qué la línea celular de adenocarcinoma alveolar humano (A549) se ha convertido en el modelo estándar de oro para la toxicología pulmonar. La línea celular A549 deriva de AT2, pero mantiene algunas características especiales de AT1 como la presencia de un biomarcador específico de caveolina-1, siendo una de las únicas líneas celulares disponibles comercialmente de este tipo (Bobyk et al., 2021). A549 genera monocapas confluentes con funciones AT2 en condiciones sumergidas, lo que lo hace adecuado como modelo celular para el metabolismo y la liberación de fármacos en el epitelio alveolar.

3.6.3 Macrófagos

Los macrófagos alveolares (MA) y los macrófagos intersticiales (IM) conforman los dos tipos de macrófagos existentes en los pulmones. Los macrófagos alveolares son la primera línea de defensa contra las NP, los contaminantes y los agentes patógenos transportados por el aire. Son responsables de la limpieza de escombros y el reciclaje de PS. Por otra parte, los macrófagos intersticiales se consideran la segunda línea de defensa frente a agentes peligrosos en contacto con los pulmones. Los IM tienen funciones inmunitarias vitales, son responsables del mantenimiento de la homeostasis pulmonar y median en la reacción alérgica de las vías respiratorias (Schyns et al., 2018). Indistintos del tipo de macrófagos presentes en los pulmones, en condiciones fisiológicas ejercen actividad fagocítica, inmunidad adaptativa y controlan la inflamación mediante la producción de citocinas (Hu & Christman, 2019; Hussell & Bell, 2014). Con esto en mente, los macrófagos alveolares se han incorporado a diversos cultivos de células pulmonares, proporcionando una nueva visión de la mecánica de los fármacos.

Capítulo 4

Alcances de la investigación

En este capítulo se detallan los alcances del trabajo de tesis propuesto posterior al análisis de antecedentes en la literatura. En él se abordará plantear la problemática que dio origen a nuestra investigación. Se darán las pautas acerca de porque nuestro proyecto puede ser una excelente manera de resolver dicha problemática. Para esto se propondrá la hipótesis del estudio a manera de expresar los resultados que esperamos encontrar y verificar al final si esta será confirmada o refutada. En última instancia se enmarcarán los objetivos principales y secundarios que necesitan ser alcanzados para poder comprobar nuestra hipótesis.

4.1 Planteamiento del problema

La generación de cultivos organotípicos de pulmón utilizando modelos *in vitro* ha sido ampliamente utilizado para verificar la toxicidad aérea de materiales nanoestructurados, transporte de iones y fluidos, respuesta inmunitaria, morfología, activación de vías de señalización y funciones de reparación de tejido (Pezzulo et al., 2011). Más en específico, estos modelos *in vitro* buscan emular la toxicidad inhalada de nanomateriales que podría ocurrir en los pulmones humanos *in vivo*. Sin embargo, la validez de estos modelos ante las autoridades regulatorias como alternativa a los modelos animales *in vivo* sigue siendo un caso controvertido y el cual necesita más trabajo de investigación. De entre toda la amplia gama de modelos *in vitro* las líneas celulares y cultivos primarios de pulmón son los que más se han destacado a la hora de tratar de predecir estos efectos nocivos en el tracto respiratorio.

En este sentido las líneas celulares y cultivos primarios han mostrado presentar diferencias significativas a la hora de evaluar la toxicidad de AgNPs en modelos pulmonares. Ambos modelos pueden ser tanto de origen sano como tumoral. Esto ha propiciado la posibilidad de evaluar la farmacocinética, el metabolismo y la fabricación de nuevas drogas antineoplásicas selectivas (Pastor et al., 2010). Es por ello que la comparación entre modelos sanos y tumorales ha sido un tópico de suma relevancia en investigación hoy en día. En particular, el contraste entre modelos con líneas celulares y cultivos primarios sanos y tumorales es necesario para evaluar la sensibilidad de fármacos nanoparticulados. Mucho se ha evidenciado que los modelos primarios de pulmón son un modelo más ad hoc a los modelos *in vivo* y por ende más sensibles a los tóxicos inhalados. (BéruBé et al., 2010; Ekstrand-Hammarström et al., 2012). Sin embargo, aún existen muchos resultados contradictorios que desestiman estas aseveraciones poniendo en evidencia la necesidad de estandarizar estos modelos pulmonares *in vitro* como modelos de cernimiento primario en la evaluación de NMs.

4.2 Justificación

Los nanofármacos y más en específico las AgNPs han surgido como una prometedora alternativa a los quimioterapéuticos convencionales. Las AgNPs han mostrado un elevado grado de internalización selectiva atribuido a las propiedades fisicoquímicas que les confieren una incrementada reactividad superficial. Se ha descrito que pueden interactuar con proteínas presentes en el organismo formando una biocorona proteica que favorece su traspaso por la membrana celular mediado principalmente por endocitosis. Aunado a esto, el efecto de retención y permeabilidad aumentada (ERP) presente en las células tumorales debido a su composición morfológica ha mostrado una internalización selectiva de AgNPs en diversos estudios clínicos (Mukherjee et al., 2019). Este promisorio nanomaterial a su vez posee la capacidad de ser funcionalizado, incrementando así su biocompatibilidad y efecto antitumoral selectivo (Fahmy et al., 2019; Ferdous et al., 2019; S. Lee & Jun, 2019). Esto nos brinda motivos suficientes para creer que el estudio de las AgNPs como posible agente antineoplásico en el tratamiento del cáncer de pulmón es algo que vale la pena ser investigado a profundidad.

4.3 Hipótesis

“Las AgNPs presentarán efectos citotóxicos significativamente diferentes en modelos *in vitro* con líneas celulares en comparación con los modelos de cultivos primarios”

4.4 Objetivo principal

- Comparar el efecto citotóxico de AgNPs *in vitro* en modelos con líneas celulares y cultivos primarios.

4.4.1 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto citotóxico de AgNPs en cultivos primarios aislados de órganos de ratones Balb/c.
- Evaluar el efecto citotóxico de AgNPs en cultivos de líneas celulares tumorales y sanas.
- Comparar el efecto citotóxico inducido por AgNPs en líneas tumorales, sanas y cultivos primarios.

Capítulo 5

Metodología

En este capítulo se especificará de manera detallada la metodología establecida para la proliferación y análisis del efecto citotóxico de AgNPs en modelos con líneas celulares y cultivos primarios de pulmón. Esto incluye: la caracterización de las cinco formulaciones de AgNPs utilizadas y la cuantificación de su potencial efecto citotóxico en células sanas y tumorales de pulmón.

5.1 Formulaciones de AgNPs

5.1.1 Preparación de diluciones

Se prepararon los stocks para las cinco formulaciones de AgNPs utilizadas en este estudio nombradas como AgNP1, AgNP2, AgNP3, AgNP4 y AgNP5. Para efectuar esta preparación las AgNPs se mantuvieron en un ambiente oscuro. Posteriormente se tomaron 4 Eppendorf por nanopartícula los cuales fueron preparados como se indica en la **figura 9**. En el primer Eppendorf se agregaron 1000 μL de las AgNPs concentradas de cada Argovit (5.5 mM). Posteriormente se realizaron las diluciones consecutivas 1:10, 1: 100 y 1:100 tomando 100 μL del Eppendorf concentrado al Eppendorf número dos con 900 μL de agua destilada. La misma acción fue repetida del Eppendorf dos al tres y del tres al cuatro logrando concentraciones finales de 5.5 μM , 55.6 μM , 556 μM , 5.5 mM yendo desde la más diluida a la más concentrada.

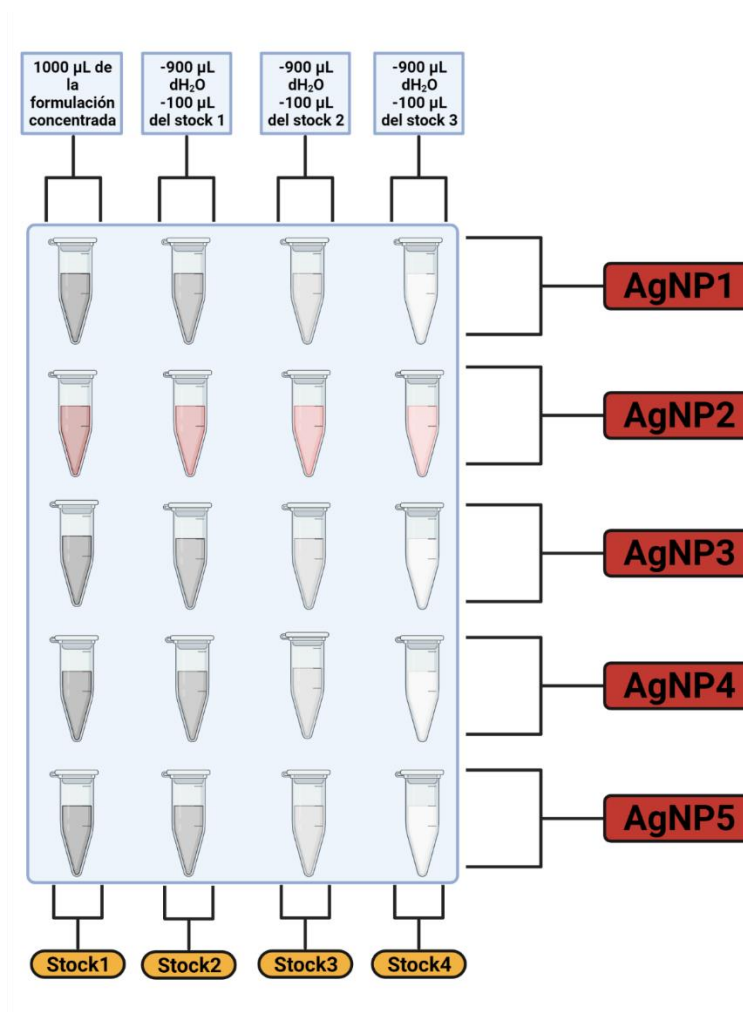


Figura 9. Preparación de los stocks de AgNPs Argovit®. Las diluciones se realizaron siguiendo un orden de izquierda a derecha comenzando con la formulación concentrada. Posterior a la preparación las concentraciones de cada stock quedaron de la siguiente manera: 5.5 mM, 556 µM, 55.6 µM, 5.5 µM.

5.2 Descongelamiento de líneas celulares

Las células conservadas a -86°C utilizando dimetil sulfoxido (DMSO) como criopreservante se descongelan a temperatura ambiente. Posteriormente se siembran en una caja Petri con 10ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 0.1% de antibiótico/antimicótico. La utilización de medio de cultivo celular RPMI 1640 aporta vitaminas, aminoácidos y sales inorgánicas encargados de una correcta homeostasis y funcionamiento celular. Por otra parte, el SBF favorece el crecimiento y adhesión celular. Por último, la adición de antibiotico-antimicotico en una concentración total del 0.1% como se

indica en la **figura 10** sirve para mantener los cultivos axénicos. Finalmente, las cajas se incuban a una temperatura de 37°C en un ambiente con 5% de CO₂. Todos los procedimientos se realizan bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar para mantener las condiciones axénicas de los cultivos celulares.

5.3 Mantenimiento y proliferación de líneas celulares de pulmón

El mantenimiento y la proliferación de líneas celulares de pulmón precisa un cuidado diferente según el tipo de célula con el que se esté tratando. En este sentido se decidió utilizar los modelos más representativos del sistema respiratorio como lo son las células bronquiales y alveolares epiteliales. Para el modelo de evaluación de pulmón sano, se estableció el uso de la línea celular bronquial epitelial (Beas-2B), mientras que para los modelos tumorales se efectuó la proliferación de la línea de adenocarcinoma de células epiteliales basales alveolares humanas (A549) y la de carcinoma de pulmón de células no pequeñas humanas derivada del ganglio linfático (H1299).

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

5.3.1 Pase celular

Una vez alcanzada una confluencia celular para cada cultivo celular cercano al 90% se realizó su división y traspaso a una nueva caja Petri suplementada. Para esto se tomó un volumen total del 10% de la caja original el cual fue vertido en una nueva caja Petri la cual se suplementó con medio fresco suplementado. Finalmente, las placas fueron incubadas a una temperatura de 37°C en un ambiente con 5% de CO₂. El proceso se repitió hasta obtener 3 cajas Petri de cada línea celular los cuales se utilizan para el ensayo de las formulaciones de AgNPs realizando tres ensayos independientes por triplicado.

5.3.2 Tripsinización

La tripsinización fue realizada de la misma forma para las tres líneas celulares. Para esto se retiró el sobrenadante y se adicionaron 3ml de tripsina 1X en cada caja Petri. Posteriormente, las cajas se incubaron 5 minutos a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂. Transcurridos los 5 minutos se detuvo la actividad de la tripsina añadiendo 10ml de medio suplementado. El contenido de cada caja fue vertido en un tubo Falcon de 15 ml los cuales fueron centrifugados a 2200 RPM por 10 minutos. Los pellets celulares fueron alicuotados y contados en el microscopio como se indica en la **sección 5.3.3**.

5.3.3 Conteo de células

Para cuantificar el número de células por mililitro de medio presentes en las cajas de cultivo se toma una muestra. Para tal efecto se realiza la remoción de la adhesión celular a la Poli-D-Lisina (PDL) y Poli-L-Lisina (PLL) presente en el fondo de las cajas de Petri por el método de tripsinización como se explica en la sección 5.3.2. Después, el contenido de las cajas se trasvasa a tubos falcón independientes de 15 ml, se centrifugan por 10 min a 2500 rpm. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 1ml de RPMI 1640 y colocados en tubos Eppendorf. Posteriormente se contó el contenido celular cargando 10 µL de cada Eppendorf en una cámara de Neubauer. Esto nos brindó la cantidad de células por mililitro presentes en cada caja de cultivo. Teniendo el número de células por mililitro se calculó el volumen necesario para sembrar 20,000 células por pozo para la realización del ensayo de viabilidad de cada modelo celular.

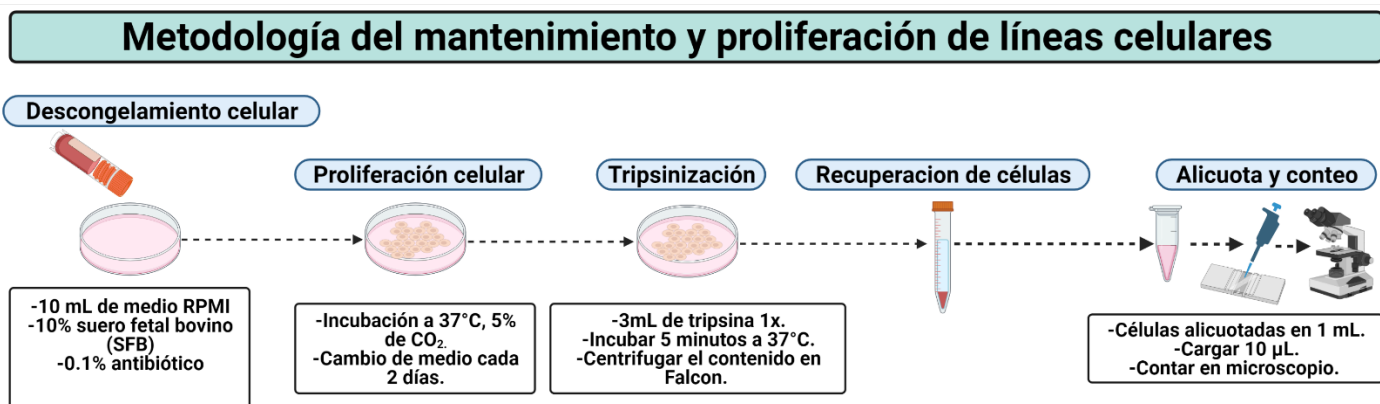


Figura 10. En esta imagen se muestra la metodología para el mantenimiento y proliferación de líneas celulares de pulmón. Para ello se representa el proceso de descongelamiento celular, incluyendo los reactivos utilizados. A su vez se presentan las condiciones óptimas de cultivo para la correcta proliferación. Por último, se muestra como al alcanzar la confluencia celular se recupera el número total de células y se cuentan en un hematocitómetro para realizar los concernientes diseños experimentales.

5.4 Experimento de viabilidad celular

Para realizar el análisis de la viabilidad celular de los distintos modelos se procedió al correspondiente diseño experimental. Para ello se determinó el número de células que se incluirían por pozo en placas de 96 pocillos. Estas fueron calculadas para ser 20,000 células/pozo para cada modelo celular y homogeneizar así posibles variables. Por otro lado, se calculó la cantidad de medio RPMI1640, SFB y antibiótico necesario por pozo **Tabla4**. Habiendo diseñado experimentalmente cada placa, se procedió a cargar una canaleta con la cantidad necesaria de medio celular, RPMI1640, SFB y antibiótico. Esta canaleta se resuspendió y con una micropipeta multicanal se montaron 190 µL de esta suspensión celular por pozo. Finalmente se añadieron 10 µL de los correspondientes estímulos Argovit® y los controles positivos y negativos. Por último los experimentos se incubaron 37°C en un ambiente con 5%

de CO₂ por 24h. Transcurridas las 24 h las células fueron fijadas añadiendo 10 µL de Azul tripano y 40 µL de formaldehído.

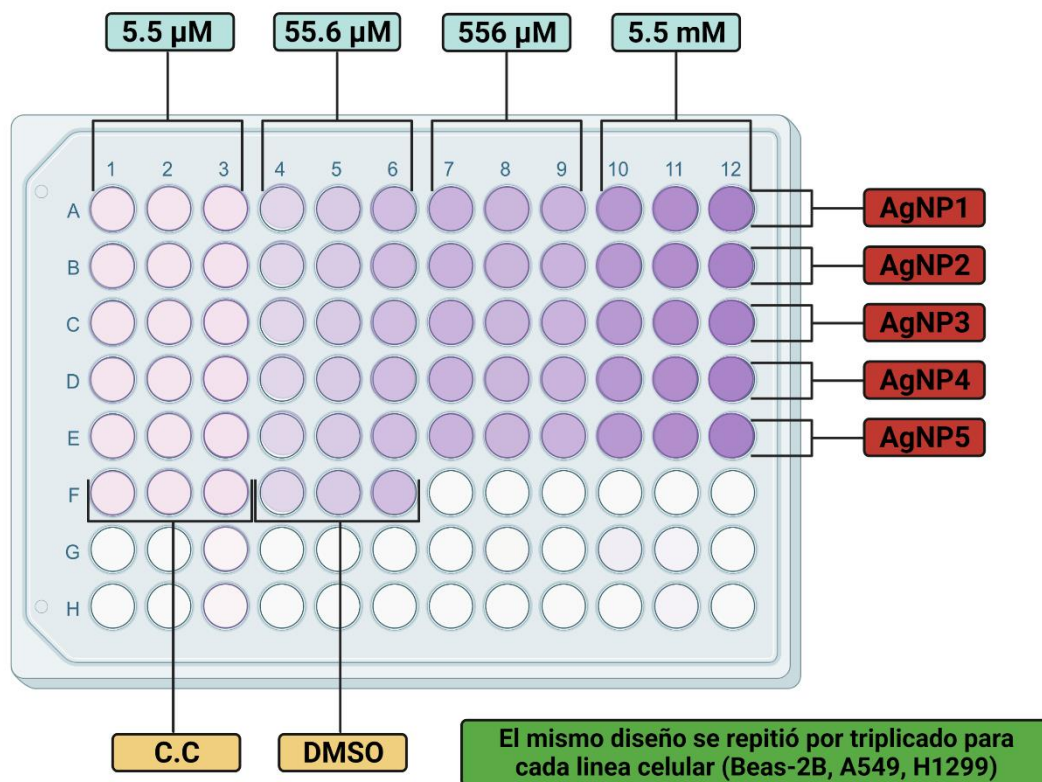


Figura 11. Diseño experimental del ensayo de viabilidad por azul tripano. En esta imagen se muestra la distribución de las diferentes concentraciones de AgNPs Argovit® para los distintos modelos celulares. El cambio de colores en la caja de 96 pozos representa el cambio en el gradiente de concentración de AgNPs. Las etiquetas azules muestran las concentraciones utilizadas yendo de menor a mayor de izquierda a derecha. Las etiquetas amarillas representan los controles de viabilidad (C.C) y de muerte (DMSO) celular.

5.5 Protocolo de cultivos primarios de pulmón

5.5.1 Disección de pulmones de ratones Balb/c

El montaje de células pulmonares primarias de pulmón fue llevado a cabo en modelos murinos de la especie BALB/C mediante el establecimiento de un nuevo protocolo experimental. Para

ello se utilizaron ratones hembra los cuales fueron dislocados cervicalmente siguiendo la NOM-062-ZOO-1999 previa aprobación del protocolo por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud – UABC (0001/2019). Se realizó la disección dentro de la campana de flujo laminar, primero se removió el vello de la zona abdominal sin dañar el peritoneo. Para llegar hasta los pulmones se realizó una incisión y apertura de la membrana posterior. Los pulmones fueron perfundidos mediante la arteria pulmonar con SSF hasta remover la mayor cantidad de eritrocitos. Habiendo sido perfundidos se realizó otra perfusión con 100 μ L de la solución enzimática número I la cual se especifica en la **figura 12**.

5.5.2 Obtención de células primarias totales de pulmón

Los órganos fueron removidos y traspasados a un Petri con SSF sobre una cama de hielo para evitar la reacción enzimática. Al obtener todos los pulmones se incubó el Petri 18 minutos en una mesa agitadora a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂. Habiendo transcurrido los 18 minutos se disgregaron los órganos en medio de cultivo DMEM. El contenido del medio disgregado fue recuperado en dos tubos Falcon de 15 ml a los cuales se les añadieron 200 μ L de la solución enzimática II y se incubaron por 18 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugaron los Falcon a 2200 RPM por 10 minutos. Los pellets fueron lavados con 100 μ L de SSF sobresaturada y 900 μ L de SSF. Se realizó una nueva centrifugación a 2200 RPM por 10 minutos. Por último los pellets fueron suplementados en una caja Petri con 9 ml de medio DMEM, 900 μ L SFB y 10 μ L de antibiótico-antimicótico e incubados a 37°C en un ambiente con 5% de CO₂ por 24 h.

5.5.3 Ensayo de citotoxicidad en cultivos primarios de pulmón.

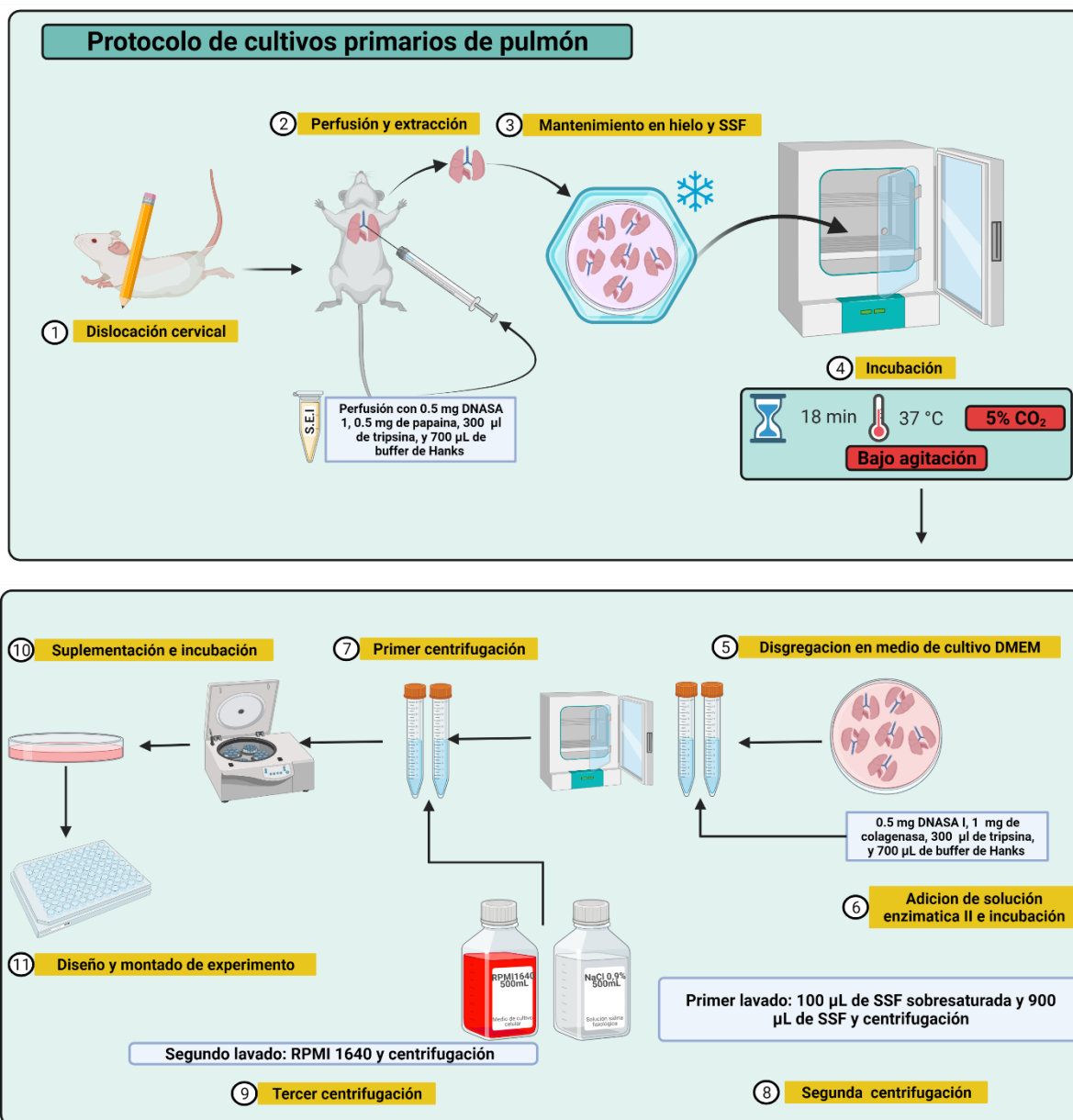


Figura 12. Metodología para la extracción de células primarias totales de pulmón (CPTP). En esta metodología se describen los pasos para su correcta obtención. 1) Dislocación cervical. 2) Disección, perfusión y remoción de los pulmones. 3) Mantenimiento de células en SSF y hielo para inhibir la reacción enzimática. 4) Incubación para reacción enzimática I durante 18

minutos. 5) Disgregación en medio DMEM. 6) Lisis y separación celular con 200 μ L de solución enzimática II. 7) Centrifugación. 8) Lavado con SSF. 9) Lavado con medio RPMI 1640 para detener la segunda reacción enzimática, el contenido se centrifugó nuevamente. 10) El contenido celular obtenido en la última centrifugación se suplementó e incubó a las condiciones habituales (37 °C, 5%CO₂).

Capítulo 6

Resultados

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos concernientes a la evaluación del efecto citotóxico de las cinco formulaciones de AgNPs para un panel de tres modelos de líneas celulares (Beas-2B, A549, H1299) y uno de cultivos primarios de pulmón.

6.1 AgNPs

Las cinco formulaciones de AgNPs utilizadas en este proyecto de tesis fueron proporcionadas por Vector-Vita Ltd.® (Novosibirsk, Russia). Las distintas formulaciones se diferencian entre sí por las características de la polivinil pirrolidona utilizadas como recubrimiento y son nombradas como AgNP1, AgNP2, AgNP3, AgNP4, y AgNP5. Los procedimientos de síntesis para la obtención de estas formulaciones de nanopartículas están sujetos a las leyes de propiedad intelectual y se encuentran descritos en las patentes RU 2,602,534 C2 y RU 2,602,741 C2.

6.2 Caracterización de las formulaciones de AgNPs

La caracterización completa de las cinco formulaciones de AgNPs fue llevada a cabo previamente por Toledano Magaña Yanis y colaboradores (Cruz-Ramírez et al., 2021a). Las técnicas de caracterización incluyeron el análisis mediante ultravioleta visible (Uv-vis), análisis termo gravimétrico (TGA), dispersión dinámica de luz (DLS), y microscopía electrónica de

transmisión (TEM). Los resultados de Uv-vis arrojaron el patrón característico del plasmón superficial para cada nanopartícula. Mientras que la AgNP5 no mostró ningún pico característico, las otras cuatro formulaciones exhibieron valores entre los (400 y 415 nm). Estos valores de absorbancia están ampliamente reportados para la plata a escala nanométrica (Loiseau et al., 2019). Aunado a esto, las formulaciones AgNP2 y AgNP4 muestran otros picos de menor intensidad lo cual se asocia a las diferentes morfologías presentes, lo que se describe más adelante en la caracterización por TEM.

Por otro lado, los estudios de DLS sirvieron para determinar el potencial ζ (ζ) y el diámetro hidrodinámico (ϕ_{hydro}). La AgNP1 y la AgNP4 mostraron poseer los diámetros hidrodinámicos más grandes (448.7 nm y 483.7 nm respectivamente), mientras que la formulación AgNP2, AgNP3 y AgNP5 presentaron los diámetros más pequeños (90.4 nm, 43.8 nm, y 121.1 nm). Estos resultados fueron de la mano con el análisis de la carga superficial para las cinco formulaciones; donde las que presentaron el diámetro hidrodinámico más grande también exhibieron una menor carga superficial. Dichos efectos pueden ser relacionados con una menor cantidad de PVP (%w/w) para estas formulaciones lo cual habla de un menor efecto de apantallamiento producido por el polímero lo cual a su vez produce mayor estabilidad en el medio de dispersión.

De hecho, el efecto en la estabilidad de dichas formulaciones puede verse reflejado directamente en la caracterización mediante TEM. Por medio del estudio del índice de polidispersión (IDP) puede comprobarse que la AgNP1 y la AgNP4 muestran mayores valores en el IDP lo cual es representativo de un tamaño más uniforme de nanopartícula y por ende nos dictan que existe una mayor estabilidad al presentar menos aglomerados. A su vez las micrografías TEM elucidaron una clara morfología esférica para las formulaciones AgNP1, AgNP2, y AgNP5 mientras que para la AgNP3 y AgNP4 se encontraron algunas formas triangulares por lo cual ambas formulaciones fueron marcadas como "Casi esféricas". De manera interesante la AgNP1 y AgNP4 presentaron los menores diámetros en sus núcleos de plata ϕ_{Ag} .

Por último, el análisis de TGA/DSC permitió la obtención del contenido total de agua, PVP, y plata metálica para cada formulación. Se encontró un mayor porcentaje de H_2O (%w/w) cuanto mayor fue el diámetro hidrodinámico debido a la presencia de una mayor capa de dipolo eléctrico por la presencia de agua en la NP. Como se mencionó antes la menor cantidad de PVP (%w/w) fue encontrada en la formulación AgNP1 y AgNP4, de manera similar los menores

porcentajes de plata metálica (%w/w) estuvieron presentes en estas formulaciones. La suma de todos estos factores y propiedades nos hacen creer que la formulación AgNP1 y AgNP4 al ser más estables presentarán un menor efecto citotóxico para las líneas celulares y cultivos primarios de pulmón debido a sus propiedades fisicoquímicas.

6.3 Conteos celulares

Conteo celular Beas-2B Eppendorf 1. 5,900,000 células/mililitro

Conteo celular Beas-2B Eppendorf 2. 4,600,000 células/mililitro

Conteo celular Beas-2B Eppendorf 3. 7,900,500 células/mililitro

Conteo celular A549 Eppendorf 1. 25,000,000 células/mililitro.

Conteo celular A549 Eppendorf 2. 18,750,000 células/mililitro.

Conteo celular A549 Eppendorf 3. 14,170,000 células/mililitro.

Conteo celular H1299 Eppendorf 1. 4,295,000 células/mililitro.

Conteo celular H1299 Eppendorf 2. 6,290,000 células/mililitro.

Conteo celular H1299 Eppendorf 3. 4,002,500 células/mililitro.

Conteo celular células primarias totales de pulmón Eppendorf 1. 8,021 ,250 células/mililitro.

Conteo celular células primarias totales de pulmón Eppendorf 2. 8,021 ,250 células/mililitro.

Conteo celular células primarias totales de pulmón Eppendorf 3. 8,021 ,250 células/mililitro.

Tabla 4. Resumen de condiciones utilizadas para el ensayo de viabilidad celular con cada línea celular.

Línea celular	Células por pozo	Cantidad de pozos requeridos por experimento	Cantidad de medio por experimento (mL)	Cantidad de suero por experimento (mL)	Cantidad de antibiótico (μl)	Cantidad de alícuota de células (mL) [Exp 1,2,3]
Beas-2B	20000	66	13	1.3	50	0.68, 0.86, 0.5
A549	20000	66	13	1.3	50	0.16, 0.21,0.28
H1299	20000	66	13	1.3	50	0.30, 0.20, 0.06
Células primarias totales de pulmón	20000	78	14	1.4	50	0.498, 0.498, 0.498.

6.4 Resultados de la viabilidad celular en líneas celulares de pulmón

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad mostraron una citotoxicidad selectiva hacia células tumorales de pulmón. Esto pudo observarse al contrastar los efectos producidos por las cinco formulaciones de AgNPs en dos líneas tumorales de pulmón H1299 y A549 contra la viabilidad observada en el modelo bronquial sano Beas-2B.

6.4.1 Viabilidad celular en modelos tumorales

Los resultados de la viabilidad celular muestran que todas las formulaciones de AgNPs redujeron la viabilidad celular de la línea tumoral A549 a valores menores al 20%, mientras que

para el segundo modelo tumoral H1299 se observó el mismo comportamiento exceptuando la concentración más baja de AgNPs 5.5 μ M, la cual tuvo una viabilidad celular promedio de aproximadamente 50% para las cinco formulaciones (**figuras 13 y 15** respectivamente). Estos resultados muestran un potente efecto citotóxico selectivo hacia los modelos pulmonares tumorales en comparación con el modelo de línea celular sano y el modelo primario sano. Con esto en mente se procedió al cálculo de la concentración inhibitoria media (IC50) la cual se usa convencionalmente para determinar la potencia de un posible agente antiproliferativo con pruebas de citotoxicidad basadas en células. En este caso fue calculada para observar la potencia antiproliferativa de las AgNPs Argovit® en los modelos de células cancerígenas A549 y H1299.

La AgNP1 y la AgNP3 presentaron el mayor efecto antitumoral para las líneas A549 y H1299 respectivamente registrando los IC50 más bajos de 15.4 μ M y 6.4 μ M. Para ello se utilizó la siguiente regresión no lineal para ajustar los valores a una curva sigmoide de cinco parámetros donde X representa el logaritmo de la concentración y Y el porcentaje de muerte celular mediante el programa Graphpad Prism. Obteniendo así un orden de citotoxicidad como se indica a continuación: **AgNP1>AgNP5>AgNP2>AgNP4>AgNP3** para A549 y **AgNP3>AgNP1>AgNP2>AgNP4>AgNP5** para H1299. Al ser tan divergentes entre si, estos órdenes de citotoxicidad avalan la existencia de diferentes mecanismos de toxicidad ejercidos por las AgNPs sobre los modelos tumorales. Sin embargo, antes de poder proceder a cualquier conclusión relacionada con el mecanismo es imprescindible examinar y contrastar el orden citotóxico obtenido de las cinco formulaciones de plata Argovit® en los modelos sanos de pulmón.

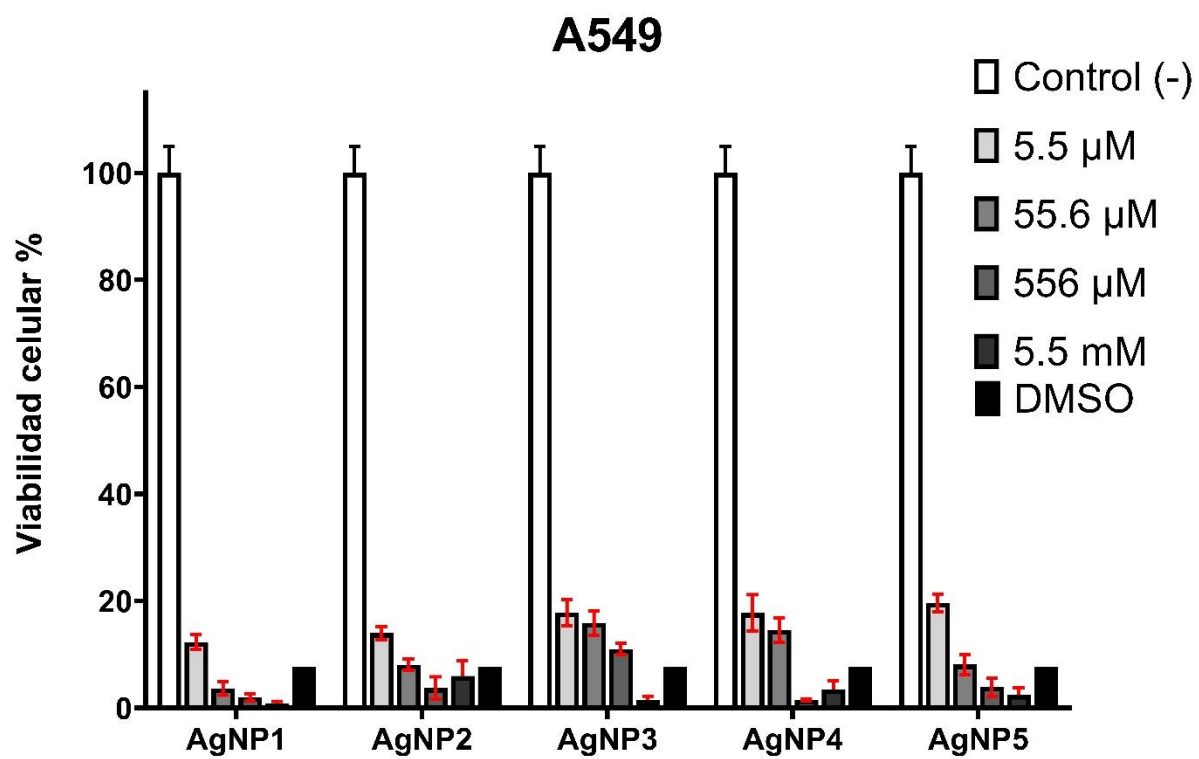


Figura 13. Viabilidad celular de células A549 tratadas con diferentes concentraciones de AgNPs.

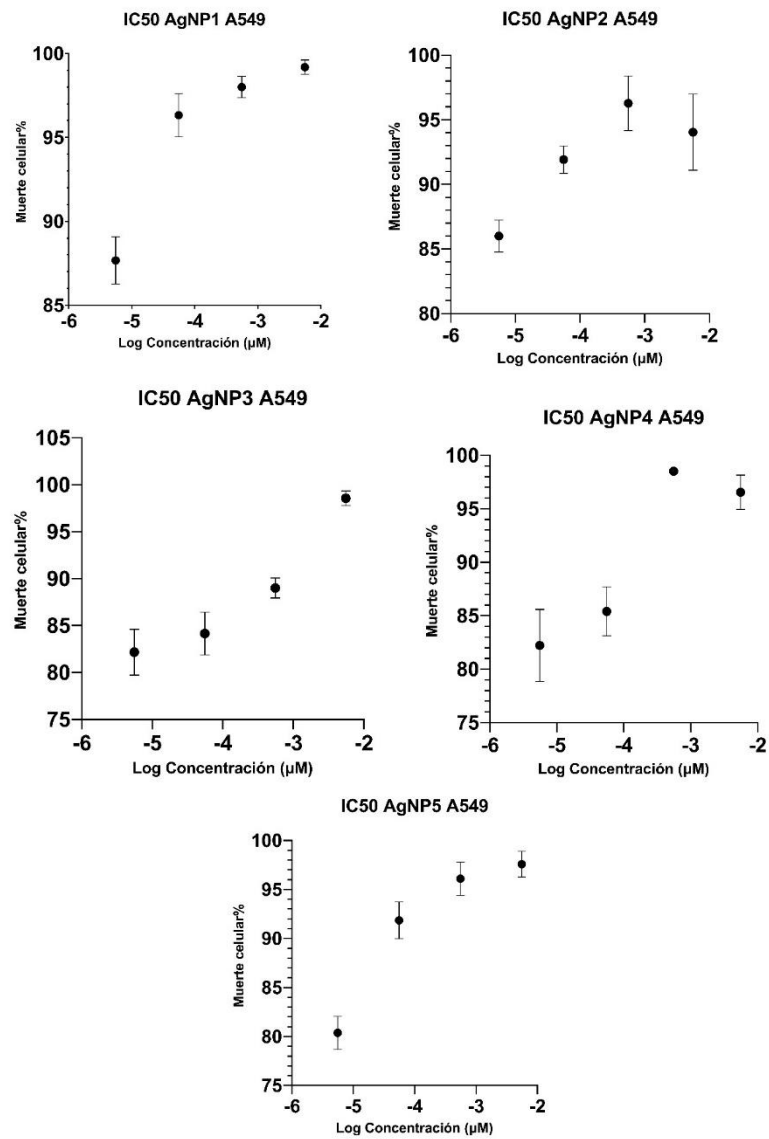


Figura 14. Comparación de la IC50 de las cinco formulaciones de AgNPs contra la línea celular A549.

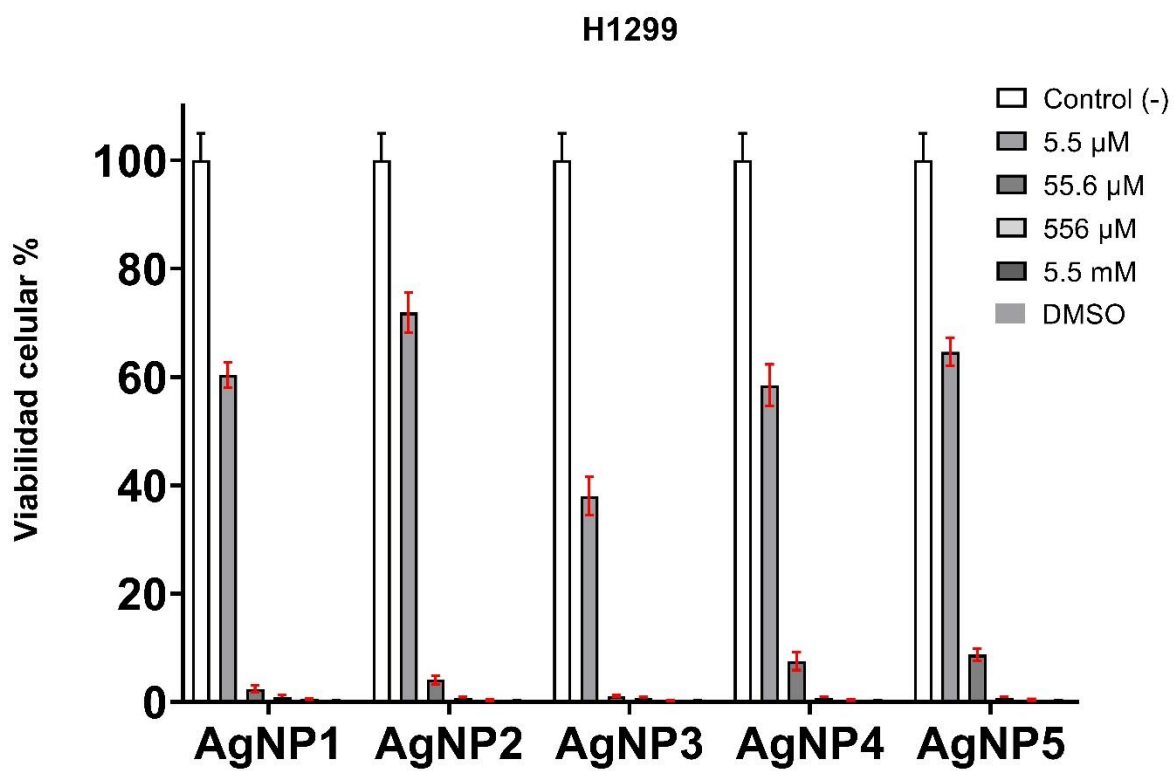


Figura 15. Viabilidad celular de H1299 tratadas con diferentes concentraciones de AgNPs.

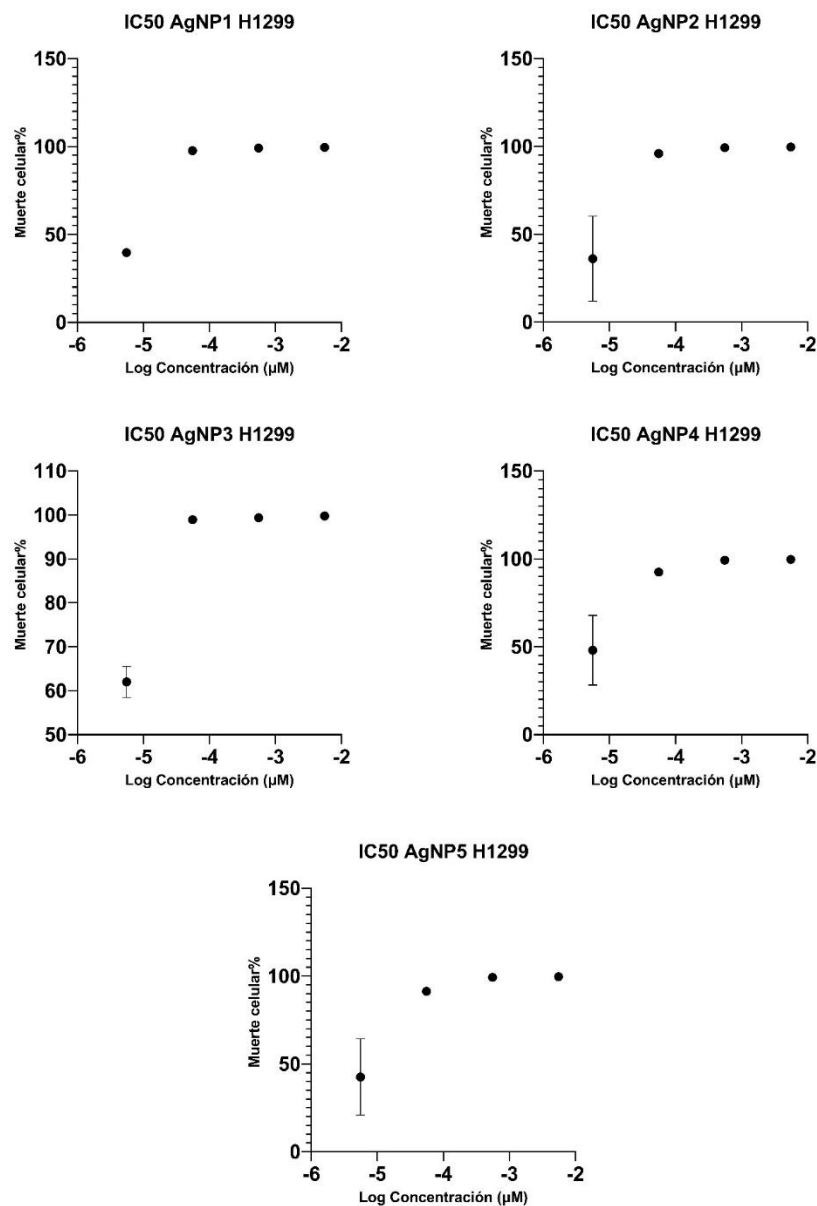


Figura 16. Comparación de IC50 para las cinco formulaciones de AgNPs contra la línea celular H1299.

Tabla 5. IC50 para los modelos tumorales A549 y H1299

Formulación	IC50 A549 (μM)	IC50 H1299 (μM)
AgNP1	15.4	7.9

AgNP2	47.2	8.7
AgNP3	1241.6	6.4
AgNP4	60.8	12.9
AgNP5	19.6	13.8

Mayor efecto antitumoral 

6.4.2 Viabilidad celular en modelos sanos

Las concentraciones más bajas de AgNPs 5.5 μ M, 55.6 μ M no muestran una disminución significativa de la viabilidad celular (superiores al 50%) para todas las formulaciones exceptuando la AgNP5 en el modelo sano Beas-2B (**Figura 17**). Para esto se calcularon las IC₅₀, la formulación AgNP1 presentó el IC₅₀ más alto contra Beas-2B (3026.9 μ M), mientras que la AgNP2 tuvo la menor IC₅₀ contra Beas-2B (32.9 μ M). Lo cual nos habla de que es necesaria aproximadamente una concentración 200 y 43.3 veces mayor de la AgNP1 y AgNP3 para causar un efecto biológico adverso en comparación con la necesaria para inhibir las células tumorales. Estos números tan altos nos brindan una enorme potencia antiproliferativa la cual está definida como la capacidad que tiene cada formulación para inhibir la reproducción celular de células cancerosas. Esta potencia antiproliferativa puede resultar en la reducción del daño citotóxico de células sanas en proporciones significativas (**Figura 18**).

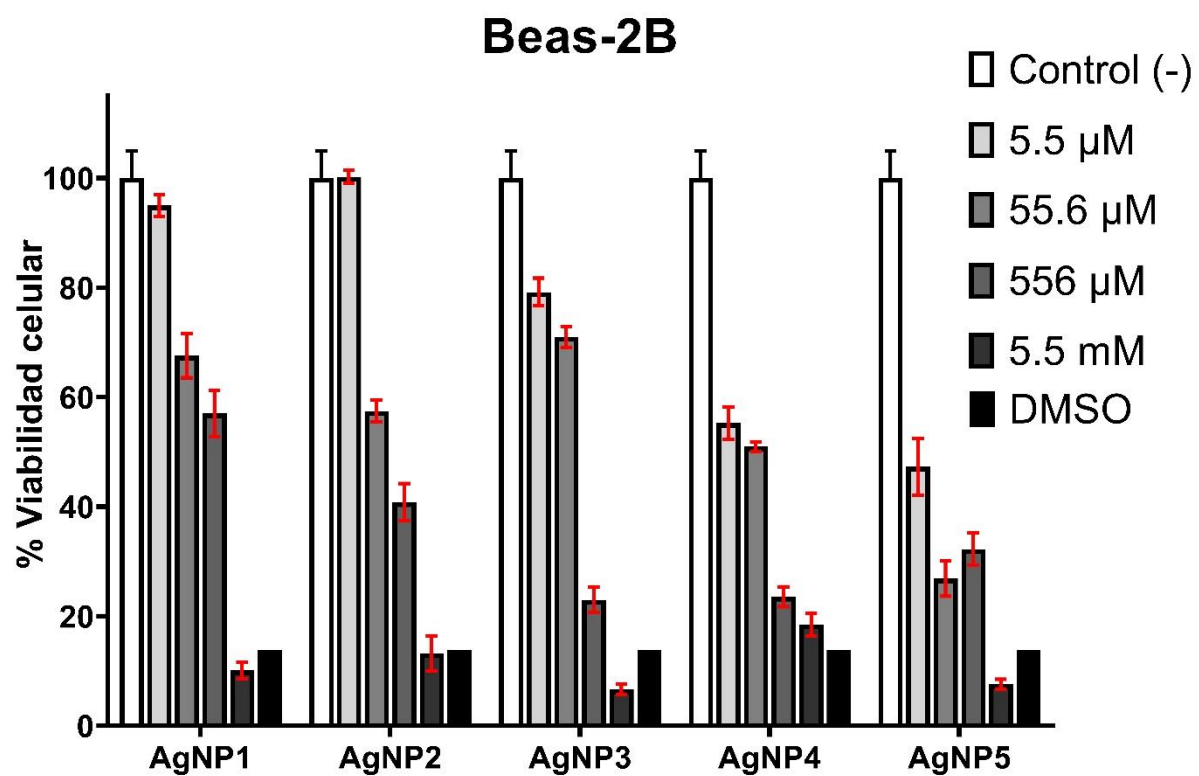


Figura 17. Viabilidad celular de células Beas-2B tratadas con diferentes concentraciones de AgNPs.

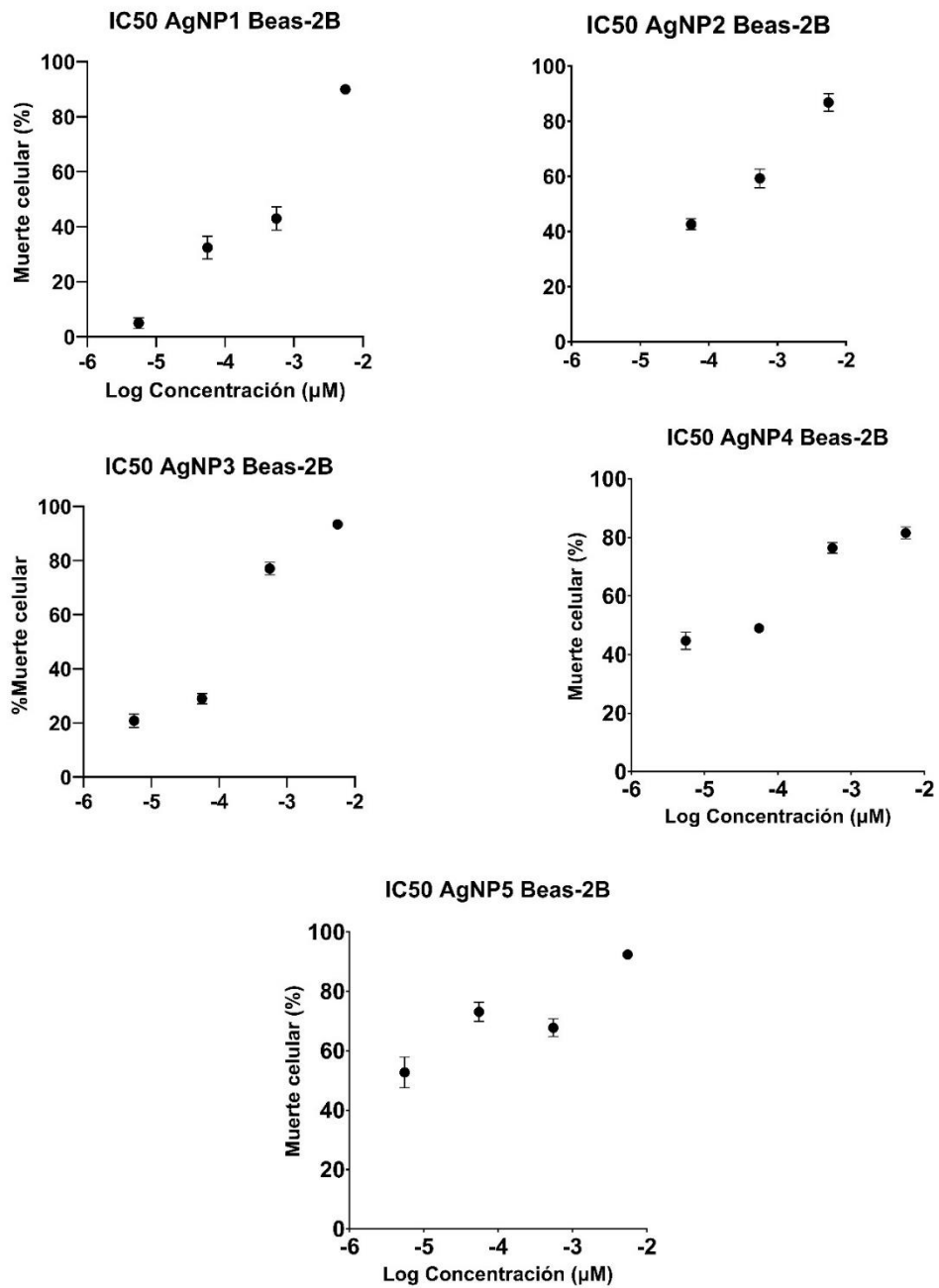


Figura 18. Comparación de IC50 para las cinco formulaciones de AgNPs contra la línea celular Beas-2B.

Tabla 6. IC50 para la línea celular Beas-2B

Formulación	CC50 Beas-2B (μ M)
AgNP1	3026.9
AgNP2	32.9
AgNP3	260
AgNP4	186.6
AgNP5	2600.1

Menor efecto dañino 

6.5 Resultados de la viabilidad celular en cultivos primarios de pulmón

El modelo de cultivos primarios de pulmón del mismo modo que la línea celular Beas-2B exhibió ser resiliente a la citotoxicidad de las distintas formulaciones de AgNPs. En estos se describe una tendencia de manera concentración dependiente en donde la viabilidad de la concentración menor (5.5 μ M) indica viabilidades superiores al 50% para todos los casos. De manera interesante la formulación AgNP5 a pesar de tener la menor viabilidad a la concentración más baja, mostró ser la menos citotóxica con una IC50 de 134.8 μ M en el modelo primario (**figura 20**). Opuestamente a Beas-2B la AgNP1 resultó ser la más toxica con una IC50 de 8 μ M (**tabla 8**).

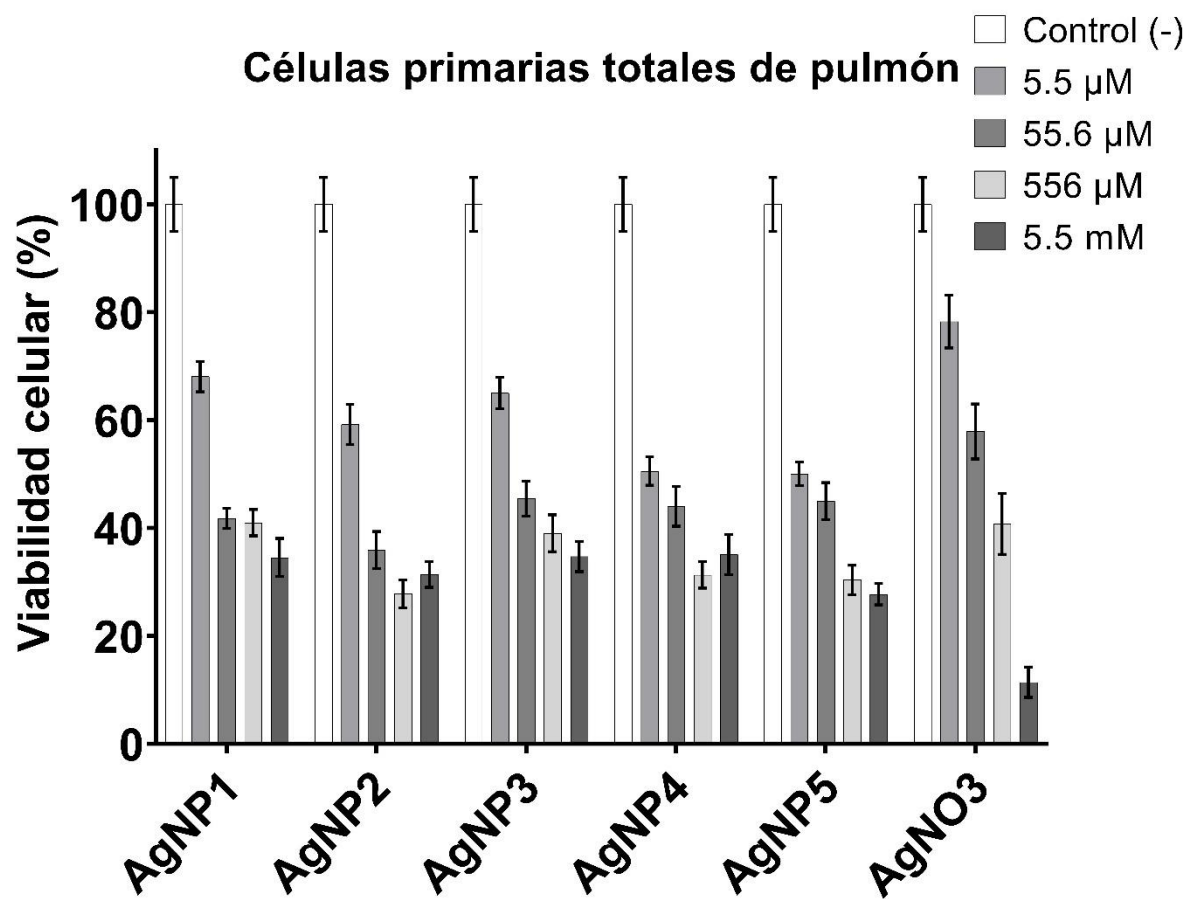
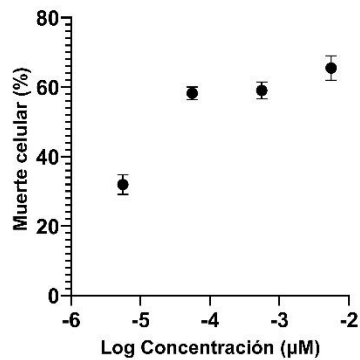
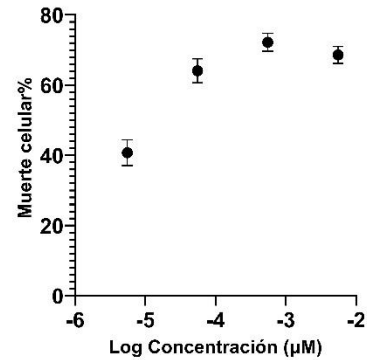


Figura 19. Viabilidad celular de células primarias totales de pulmón tratadas con diferentes concentraciones de AgNPs.

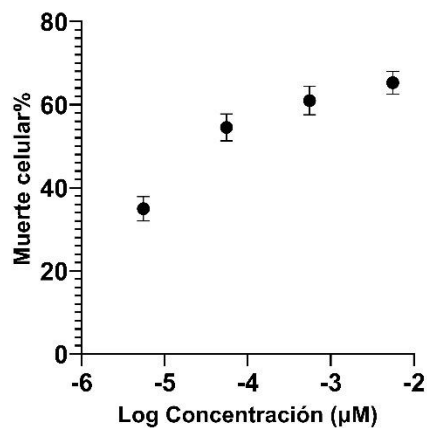
IC50 AgNP1 en células primarias totales de pulmón



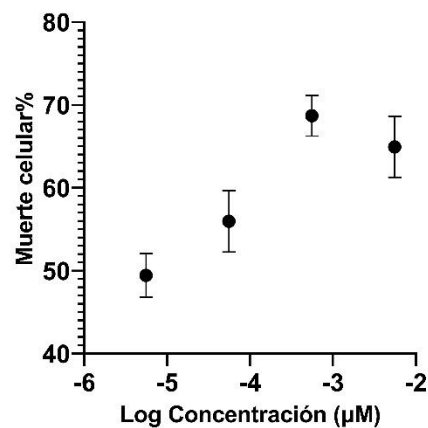
IC50 AgNP2 en células primarias totales de pulmón



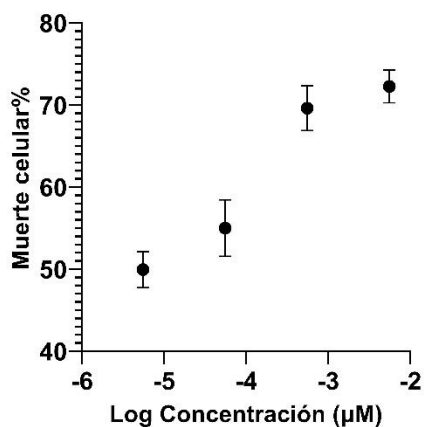
IC50 AgNP3 en células primarias totales de pulmón



IC50 AgNP4 en células primarias totales de pulmón



IC50 AgNP5 en células primarias totales de pulmón



IC 50 AgNO3

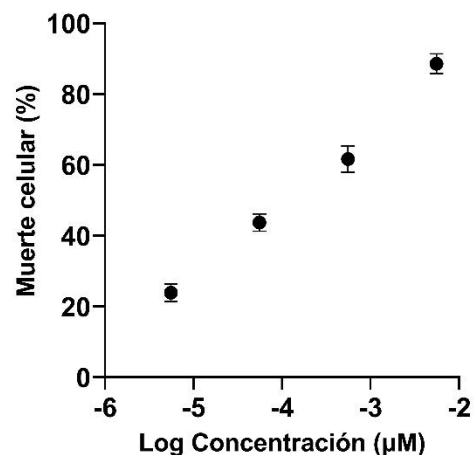


Figura 20. Comparación de IC50 para las cinco formulaciones de AgNPs contra células primarias totales de pulmón.

Se obtuvieron IC50 que disminuyeron de manera dosis dependiente para las formulaciones individuales de Argovit® en CPTP. Donde el menor efecto citotóxico fue encontrado para la formulación AgNP5. Por otro lado, la formulación AgNP1 indujo un efecto citotóxico más rápido en el modelo de células primarias totales de pulmón. Por último las formulaciones AgNP4, AgNP2, y AgNP3 disminuyeron IC50 y por ende en su potencial citotóxico en el orden escrito anteriormente. Con esto fue posible comparar la citotoxicidad de las distintas formulaciones para el panel de cuatro modelos celulares Beas-2B, células primarias totales de pulmón, A549, y H1299 mediante su IC50 en la (tabla 8).

Tabla 7. IC50 para las células primarias totales de pulmón.

Formulación	IC50 Células primarias (μM)
AgNP1	8
AgNP2	39.7
AgNP3	18.2
AgNP4	61
AgNP5	134.8

Menor efecto dañino 

Al comparar contra los resultados de nuestro grupo de investigación para otros modelos primarios se observaron comportamientos significativamente distintos. Estas cinco formulaciones fueron evaluadas en cultivos primarios de aorta, médula, bazo, riñón, hígado, corazón, y monocitos y linfocitos de bazo (Cruz-Ramírez et al., 2021b). Contrario a los resultados para la viabilidad de células totales de pulmón la de estos modelos primarios se mantuvo por arriba del 80% exceptuando el modelo primario de monocitos de bazo. Esto nos

deja ver que el modelo pulmonar resultó ser al menos dos veces más sensible que los investigados previamente.

Tabla 8. Orden de citotoxicidad por IC50

Formulación	Beas-2B	Primarios de pulmón	A549	H1299
AgNP1	5	1	1	2
AgNP2	1	3	3	3
AgNP3	3	2	5	1
AgNP4	2	4	4	4
AgNP5	4	5	2	5

Mayor citotoxicidad 

Menor citotoxicidad 

El control de AgNO₃ resultó ser menos citotóxico para las diversas AgNPs Argovit® en CPTP. La viabilidad de este efecto simulatorio se expuso por debajo del (80%), mostrando una tendencia decreciente de manera dosis dependiente. En contraste, la concentración más alta de AgNO₃ exhibió la menor viabilidad celular para las CPTP por debajo del 15%. Sin embargo, el cálculo de su IC₅₀ (267.9 µM) para este modelo primario mostro ser más alto que las cinco formulaciones Argovit® siendo la formulación más cácala la AgNP5 con un IC₅₀ de 134.8 µM.

Capítulo 7

Discusión de resultados

En este capítulo se discutirán los resultados presentados en el capítulo 6 concernientes a la evaluación del efecto citotóxico de las cinco formulaciones de AgNPs para un panel de tres modelos de líneas celulares y un modelo primario de células totales de pulmón. En esta discusión se propone relacionar las propiedades fisicoquímicas de las distintas formulaciones de AgNPs con los posibles factores biológicos que pueden estar influyendo en la interacción AgNP-célula. Esto con la finalidad de tratar de predecir las posibles causas del efecto selectivo antiproliferativo que presentan las cinco formulaciones de AgNPs Argovit®.

7.1 Selectividad citotóxica de AgNPs

Los resultados muestran que las células sanas resultaron ser más resilientes a la citotoxicidad inducida por las cinco formulaciones de AgNPs en comparación con la contraparte tumoral. La selectividad tumoral de las AgNPs puede atribuirse a los diferentes factores biológicos y propiedades fisicoquímicas que influyen en la interacción célula-AgNP. Entre ellas podemos destacar el tipo de célula pulmonar, la formación de biocorona, el tamaño de las cadenas de PVP, el tamaño de la AgNP, su carga superficial y su contenido total de plata y PVP. Sin embargo, para poder describir las posibles causas de la selectividad tumoral es necesario estudiar tanto los factores biológicos, como las propiedades fisicoquímicas características de cada modelo y formulación de AgNPs en secciones individuales.

7.2 Resultados de la selectividad citotóxica en los modelos celulares de pulmón

Como una primera aproximación para determinar la formulación con mejor potencial como agente antiproliferativo selectivo es necesario calcular los índices de selectividad antitumoral. Para esto se utilizó la siguiente ecuación: $IS: \frac{IC_{50} \text{ del modelo sano}}{IC_{50} \text{ del modelo tumoral}}$ utilizando los valores en la **tabla 9** para el panel de las cinco formulaciones de AgNPs y los cuatro modelos celulares. Este índice de selectividad fungirá como un estimador de la potencia antiproliferativa entre la citotoxicidad en un modelo sano y uno antitumoral. En ese marco entre más alto sea el valor obtenido del índice de selectividad, mayor será su eficacia como agente antiproliferativo.

Tabla 9. Índices de selectividad

Formulación	IC50 (µM)	Línea sana /A549	Línea sana /H1299	
AgNP1	3026.9	195.4	378.4	Beas-2B
	8.0	0.5	1	Células primarias
	15.4			A549
	7.9			H1299
AgNP2	32.9	0.6	3	Beas-2B
	39.7	0.8	4.5	Células primarias
	47.2			A549
	8.7			H1299
AgNP3	260	0.2	40.3	Beas-2B
	18.2	0.01	2.8	Células primarias
	1241.6			A549
	6.4			H1299
AgNP4	186.6	3	14.4	Beas-2B
	61	1	4.7	Células primarias

	60.8			A549
	12.9			H1299
AgNP5	2600.1	132.4	19.6	Beas-2B
	134.8	6.8	1.01	Células primarias
	19.6			A549
	13.8			H1299
AgNO3	267.9			Células primarias

Mayor selectividad 

Menor selectividad 

Los datos del IS claculados muestran valores altos de potencia antiproliferativa para distintas formulaciones de AgNPs. Como ejemplo tenemos el mayor índice de selectividad el cual fue encontrado para la AgNP1 en el modelo Beas-2B, donde los índices de selectividad fueron de 195.4 y 378.4 para la línea A549 y H1299 respectivamente. Esto nos habla de la potencia que tiene la AgNP1 para matar células cancerígenas en comparación de otras formulaciones. En específico esta potencia resultó ser aproximadamente 200 y 400 veces mayor en comparación con la línea celular sana. A este respecto existen trabajos de investigación en donde indican que valores $\geq$ a 10 se relacionan con potenciales agentes antitumorales (Indrayanto et al., 2021). Mientras que otros autores indican que determinaciones $\geq$ a 3 son fuertemente significativas (Weerapreeyakul et al., 2012).

Por otro lado, los índices de selectividad para el modelo de células primarias totales de pulmón resultaron ser menores que su contraparte sana Beas-2B. Encontrando ser las formulaciones más selectivas la AgNP5 contra la línea A549 y la AgNP4 contra el modelo H1299. Estos índices derivaron en valores de 6.8 y 4.7 respectivamente. La AgNP3 mostró la menor selectividad con un valor de 0.01 contra A549 mientras que la AgNP1 fue la menos selectiva para la línea H1299 con un valor de 1 (**tabla 9**). Estos bajos IS descartan a la AgNP1 y AgNP3 como posibles agentes antiproliferativos mientras que respaldan a la AgNP5, AgNP4 como agentes viables. Estos valores fueron ordenados para su futura comparación en la **tabla 10**.

Tabla 10. Orden de selectividad citotóxica

Formulación	Beas-2B/ A549	Beas-2B/ H1299	Primarios de pulmón /A549	Primarios de pulmón /H1299
AgNP1	1	1	4	5
AgNP2	4	5	3	2
AgNP3	5	2	5	3
AgNP4	3	4	2	1
AgNP5	2	3	1	4

Mayor selectividad 

Menor selectividad 

En contraste con el otro modelo sano Beas-2B las células primarias de pulmón mostraron ser más sensibles de manera concentración dependiente y presentaron diferencias significativas en sus índices de selectividad. En la línea celular Beas-2B se puede observar que la AgNP1 mostró ser la menos citotóxica y la AgNP5 una de las más citotóxicas al contrario que para el modelo primario. Esto nos habla de una citotoxicidad modelo dependiente pues las características celulares entre modelos son distintas. Por consiguiente, queda claro que la diferencia en la respuesta citotóxica derivada de la interacción Célula-AgNP será notablemente distinta entre extirpes celulares y más aún entre modelos tumorales y no tumorales (**Tabla 10**).

Esta sensibilidad puede ser descrita de mejor manera comparando los IC50 de las formulaciones más efectivas para ambos modelos sanos contra sus contrapartes tumorales. En esta comparativa queda plasmada una diferencia de sensibilidad de 188.5 y 373.7 veces mayor al efecto citotóxico del modelo primario para las líneas A549 y H1299 respectivamente. La diferencia en los IS para las formulaciones de AgNPs más selectivas en cada modelo sano apoya que como se suponía en la sección introductoria los modelos primarios presentaran una menor resiliencia a la interacción con agentes citotóxicos (**Tabla 9**).

Siguiendo los lineamientos establecidos por (Weerapreeyakul et al., 2012), las formulaciones que presentaron los IS más selectivos son prometedores como posibles agentes antiproliferativos. El orden de selectividad citotóxico deja en claro que existen diversos factores biológicos que pueden estar involucrados en el mecanismo de acción de AgNPs en los distintos

El diagrama ilustra el proceso de selección de AgNPs (nanopartículas de plata) basándose en su sensibilidad y selectividad en diferentes tipos de células. El proceso comienza con una célula humana (representada por una célula con núcleo y membrana) que se divide en dos ramas principales: **Sensibilidad a las AgNPs** y **Selectividad de las AgNPs**.

La rama de **Sensibilidad a las AgNPs** se divide en dos sub-ramas:

- Líneas celulares**: Se muestra un grupo de células rojas. Se indica que se seleccionan las AgNPs con el número 1.
- Cultivos primarios**: Se muestra un ratón. Se indica que se seleccionan las AgNPs con el número 2.

La rama de **Selectividad de las AgNPs** se divide en dos sub-ramas:

- Beas-2B**: Se muestra un grupo de células naranjas. Se indica que se seleccionan las AgNPs con el número 1.
- Células primarias totales de pulmón**: Se muestra un grupo de células amarillas. Se indica que se seleccionan las AgNPs con el número 2.

Finalmente, se muestran los resultados de la selección de AgNPs para cada tipo de célula:

- Para **Líneas celulares** y **Beas-2B**, se seleccionan las AgNPs con el número 1.
- Para **Cultivos primarios** y **Células primarias totales de pulmón**, se seleccionan las AgNPs con el número 2.

En la parte inferior, se detallan las AgNPs seleccionadas para cada tipo de célula:

- AgNPs 1: 1, 5, 4, 2, 3.
- AgNPs 2: 5, 4, 2, 1, 3.

81

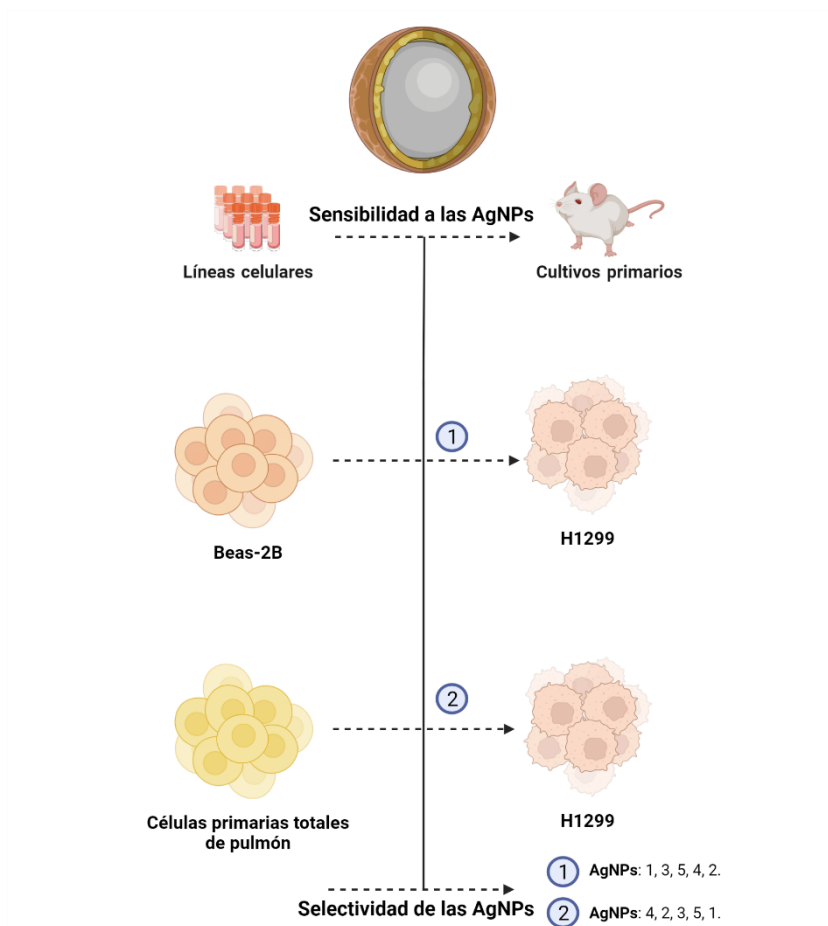


Figura 22. Orden de selectividad de las AgNPs Argovit® en la línea celular Beas-2B y las células primarias totales de pulmón contra el modelo tumoral H1299. En esta imagen se muestra como las AgNPs mostraron ser selectivas contra el modelo tumoral H1299 en un orden distinto para cada modelo sano. En particular las CPTDP elucidaron ser más sensibles que su símil sano la línea Beas-2B.

7.2.1 Propiedades fisicoquímicas afectando la selectividad de las AgNPs

La manipulación de las propiedades fisicoquímicas es una de las mejores herramientas que existe a la hora de sintetizar AgNPs altamente selectivas. Propiedades como el tamaño, carga superficial, aglomeración, potencial redox, y la funcionalización de la superficie han sido reportados como los principales mediadores de la citotoxicidad *in vitro* de AgNPs (Riaz Ahmed et al., 2017b). Dichas propiedades tendrán un efecto significativamente distinto según el modelo celular en el que se evalúen. Sin embargo, está demostrado en la literatura que la citotoxicidad

de AgNPs estará más relacionada con la influencia que tengan estas PF en la internalización de la NP y su eficiencia para la liberación de Ag⁺ en comparación con otras formulaciones (Akter et al., 2018; Hsiao et al., 2015).

7.2.1.1 Tamaño de las AgNPs

Algunos estudios de citotoxicidad pulmonar confirman la capacidad que tienen las AgNP de tamaño pequeño para traspasar la membrana celular intacta generando efectos adversos dentro de la célula (Cunningham et al., 2021; Gliga et al., 2014; Wu et al., 2019). A este respecto los tamaños menores a 20 nm a menudo han sido relacionados con un mayor grado de toxicidad celular (Schraufnagel, 2020). Estas dimensiones permiten que la NP atraviese la membrana celular por penetración directa de los poros o mejorando la captación celular y la translocación por endocitosis (Gliga et al., 2014; Wu et al., 2019). Una vez que las AgNPs son internalizadas, se ha demostrado que ejercen daño en el ADN, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y disrupción lisosomal, entre otros (Holmila et al., 2019; Miyayama et al., 2018; Rim et al., 2013; Tian et al., 2020). Incluso cuando las AgNPs no son internalizadas, se ha demostrado que pueden producir citotoxicidad mediante el enriquecimiento de la vía de señalización mediado por receptores de proteínas de membrana (Liao et al., 2019). Esto como se verá en la **sección 5.3.2** tendrá un resultado distinto según el tipo de célula y su composición membranal.

En este sentido el tamaño de las AgNPs tendrá un impacto directo en la citotoxicidad celular pulmonar para los diferentes modelos biológicos. Las AgNPs de tamaño pequeño (<20) han probado inducir daño en el ADN, producción de ROS y detención del ciclo celular indicativo de apoptosis y necrosis en monocultivos de pulmón (Ávalos et al., 2015; Gliga et al., 2018; Gurunathan et al., 2018; Löfdahl et al., 2020; Rosário et al., 2018). En otro caso, Zhang x. et. al., (X. Zhang & Xiao, 2018) demostraron los efectos de la selectividad antitumoral en pulmón. Mostraron que la línea sana Beas-2B puede superar la citotoxicidad de las AgNP de 12 nm mientras que ejercen una citotoxicidad selectiva contra las células cancerosas.

Este efecto en la selectividad citotóxica puede ser atribuido al tamaño de la AgNP y la capacidad que tengan para ser internalizadas por las células. Holmila et al. comprobaron esta teoría mediante la observación del grado de internalización y su localización dentro de la célula en un panel de cuatro modelos celulares de pulmón. En este trabajo se demostró que una formulación de AgNPs de 23 nm recubiertas de PVP tuvo mayores tasas de internalización en

modelos como Calu-1 y Beas-2B en comparación con A549 y NCI-H358. También se ha propuesto la existencia de diferentes niveles de internalización en modelos de líneas celulares sanas y tumorales, y en modelos primarios (Schlinkert et al., 2015). Esto es un claro indicador de la existencia de diferentes mecanismos de internalización en las diferentes estirpes celulares.

Los resultados de nuestra investigación avalan la posible traza de un daño citotóxico tamaño dependiente. Podemos ver como entre más grande es el tamaño de la nanopartícula, su efecto citotóxico es menor para el modelo sano Beas-2B. Opuesto a esto, el modelo primario presentó una clara tendencia citotóxica tamaño dependiente, pues la formulación de AgNPs más pequeña resultó ser la más tóxica, mientras que la que presenta el mayor tamaño resultó ser la menos tóxica. Los modelos tumorales exhibieron tendencias opuestas entre sí. Para la línea celular A549 la formulación de menor tamaño AgNP1 mostró ser la más toxica, y la segunda para la línea H1299. Caso contrario, la formulación más grande AgNP5 fue la segunda en el orden citotóxico contra A549 y la última en H1299 (**Tabla 11**).

Esto nos indica una mayor sensibilidad tamaño dependiente para las células totales de pulmón y la línea H1299. De modo opuesto para la línea Beas-2B se encontró un tamaño dependencia inversa, mientras que en A549 no se encontró una tendencia fija más que para la nanopartícula más pequeña. Otro parámetro que nos ayuda a ver esta sensibilidad es el diámetro hidrodinámico. En este sentido las formulaciones de diámetro más pequeño 43.8 nm resultaron ser más citotóxicas para H1299 y las segundas más toxicas para las células primarias. La formulación que sigue en orden de diámetro AgNP2 (90.4 nm) fue las más toxica para Beas-2B. Siguiendo esta tendencia el mayor diámetro hidrodinámico resultó el cuarto en orden citotóxico contra células primarias, A549, y H1299. De manera interesante, la formulación AgNP3 con un diámetro intermedio de 121.1 tuvo una muy baja toxicidad para todos los modelos exceptuando A549. Sin embargo, la cuarta AgNP en orden creciente de diámetro fue la más toxica, por lo que podemos decir que no existe un patrón tan claro de dependencia en relación con el radio hidrodinámico.

Tabla 11. Orden de citotoxicidad en función del orden de tamaños

Formulación	Beas-2B	Primarios de pulmón	A549	H1299	Orden de tamaños	Orden de diámetro hidrodinámico
-------------	---------	---------------------	------	-------	------------------	---------------------------------

AgNP1	5	1	1	2	1	4
AgNP2	1	3	3	3	4	2
AgNP3	3	2	5	1	3	1
AgNP4	2	4	4	4	2	5
AgNP5	4	5	2	5	5	3

Mayor citotoxicidad 

Menor citotoxicidad 

Por otra parte, es preciso dejar claro que la internalización no resultará siempre en una respuesta inmediata por parte de la célula (Schlinkert et al., 2015). Esto implica la presencia e influencia de otras propiedades fisicoquímicas intrínsecas de las AgNPs que pueden estar afectando la citotoxicidad intracelularmente. De manera curiosa incluso entre modelos tumorales se encontraron diferencias significativas para las distintas formulaciones Argovit®. Esto hace que sea necesario el estudio profundo de otras propiedades fisicoquímicas que puedan tener una influencia citotóxica intracelular (**Tabla 8**).

7.2.1.2 Reactividad superficial de las AgNPs

Como ejemplo de otra propiedad sumamente importante a la hora de evaluar la citotoxicidad de AgNPs tenemos la reactividad superficial. Las dimensiones en el orden de los nanómetros dotan a la NP de una alta reactividad biológica. Esto es debido al aumento de la relación superficie/volumen, lo que le permite tener un mayor número de átomos de plata e interacción con los componentes pulmonares. en su superficie (Ferdous & Nemmar, 2020). Esta reactividad puede ser mejorada en gran medida modificando la superficie de las AgNPs con un agente de recubrimiento estabilizador agregado. Este agente estabilizador influirá en gran medida en la carga superficial, la solubilidad y/o la hidrofobicidad y, por lo tanto, el proceso de formación de biocorona, la captación de células pulmonares y el traspaso de la barrera biológica pulmonar (Warheit et al., 2008).

Tabla 12. Orden de citotoxicidad en función de la carga superficial

Formulación	Beas-2B	Primarios de pulmón	A549	H1299	Orden de carga superficial
AgNP1	5	1	1	2	2
AgNP2	1	3	3	3	4
AgNP3	3	2	5	1	5
AgNP4	2	4	4	4	1
AgNP5	4	5	2	5	3

Mayor citotoxicidad 

Menor citotoxicidad 

En nuestro trabajo pueden apreciarse tendencias distintas en el orden citotóxico contra la carga superficial. La formulación con una menor carga superficial AgNP4 mostró ser menos tóxica en promedio que su contraparte AgNP3 para los distintos modelos celulares y más en específico para los modelos H1299 y células primarias de pulmón. En yuxtaposición la formulación AgNP1 y AgNP2 que son las segundas y cuartas en orden de carga superficial respectivamente, fueron en promedio las menos citotóxicas para el panel de los cuatro modelos celulares. Sin embargo, la formulación AgNP1 presentó la mayor toxicidad en Beas-2B lo cual nos dicta una citotoxicidad dependiente de la carga superficial más notable en este modelo celular (**tabla 12**).

Estos efectos tan variables relacionados a la citotoxicidad de la carga superficial pueden estar relacionados a una diferente interacción biológica con los distintos modelos. Similar a nuestros resultados Chen et al. (Chen et al., 2020) demostraron la citotoxicidad de PVP-AgNPs con características muy similares a la AgNP2 y AgNP3. Estas PVP-AgNPs presentaron un tamaño promedio de 24 ± 3 nm y una carga superficial más alta de -7.753 ± 0.508 . Dicha formulación no indujo una citotoxicidad drástica en un modelo primario de pulmón con un IC₅₀ superior a los 100 µg/ml. Interesantemente nosotros también encontramos que las dos formulaciones con mayor carga superficial resultaron ser de las menos citotóxicas en promedio para los cuatro modelos celulares.

Para tener margen más amplio en la discusión de este parámetro fisicoquímico se analizaron formulaciones con valores más altos de carga superficial. Este fue el caso de Homila y su grupo de investigación (Holmila et al., 2019) los cuales evaluaron la citotoxicidad de PVP-AgNPs con un tamaño de 23 ± 14 nm y un potencial-Z de -35.9 ± 7.8 en otro panel de cuatro líneas celulares. En su estudio se pueden ver IC₅₀ de aproximadamente 25, 10, 7 y mayores de 50 µg/ml para la línea A549, Beas-2B, Calu-1, NCI-H358 respectivamente. Esta formulación resultó ser más toxica para la línea Calu-1 y muy poco tóxica para NCI-H358. En este trabajo el índice de selectividad de Beas-2B/A549 fue menor que el de nuestra formulación AgNP1, AgNP2 AgNP4 y AgNP5. Esto es indicativo de la existencia de una mayor selectividad antitumoral independiente del tamaño y la carga superficial en el caso de las formulaciones Argovit® la cual, podemos especular que se encuentra en su funcionalización superficial.

7.2.1.3 Funcionalización superficial de las AgNPs

Una de las características más importantes que se pueden manipular para mejorar la biocompatibilidad y especificidad de las AgNPs es la funcionalización de la superficie. Estos proporcionan a las AgNPs una selectividad inferida hacia las células pulmonares tumorales mediante la interacción con receptores tumorales específicos. Este ha sido el caso de muchas terapias diana ampliamente estudiadas en células de cáncer de pulmón no pequeñas (p. ej., mutaciones de EGFR y ROS1, y translocaciones de ALK) y varios receptores de células de superficie en células de pulmón de cáncer pequeñas (p. ej., GPCR, CXCR4, GLUT1, PETA/CD151, ALCAM/CD166, IGF1R y FGFR, NCAM/CD56, RTK, ASCL1, SOX2, 4 y 11, OCT4, NANOG, PAX5, MYC) (Teicher, 2014; Valentino et al., 2018).

La funcionalización de la superficie de las AgNPs es un factor clave que influye en la captación celular y su retención dentro de los pulmones (Alessandrini et al., 2017). Las AgNPs pueden estar recubiertos por varios agentes para atacar los receptores tumorales específicos de pulmón. Las AgNP funcionalizadas se pueden subdividir en cuatro grandes familias: biogénicas, fitogénicas, poliméricas o, sin recubrimiento. Estos agentes pueden actuar como estabilizadores evitando la aglomeración de AgNPs, reduciendo así la captación por las células pulmonares sanas y por ende su citotoxicidad. En la investigación reciente presentada en **la tabla1**, quedó claro que cada recubrimiento produce un nivel diferente de citotoxicidad para las células pulmonares siendo el PVP el más estable y menos tóxico.

El uso médico de la polivinilpirrolidona está altamente documentado en una amplia gama de aplicaciones, como farmacéutica, medicina, cosmética y alimentos (Robinson et al., 2018). La PVP puede actuar como estabilizador y agente reductor en la preparación de nanopartículas de plata debido a su naturaleza anfifílica y baja toxicidad (Koczkur et al., 2015). Este agente estabilizante en combinación con las AgNPs ha sido considerado por diferentes autores como la formulación más estable que puede proteger a las nanopartículas de la formación de agregados y reducir la mono dispersión (Huang et al., 2014). Esto puede ser corroborado en la tabla de caracterización fisicoquímica **tabla3**, donde los índices de polidispersidad se mantuvieron en un intervalo de 0.270 a 0.813 para nuestras cinco formulaciones.

Siguiendo el análisis de esta caracterización fisicoquímica queda claro que lo que más diferencia una formulación de otra, es el tipo de PVP utilizado para su recubrimiento y la longitud de sus cadenas. La formulación AgNP5 caracterizada por tener la longitud de cadena de PVP más corta resultó ser una de las menos nocivas para todos los modelos celulares exceptuando la línea A549. Esto se vuelve interesante al comparar con la segunda en orden de tamaño que sería la AgNP1. Esta formulación resulta tener una longitud en las cadenas de PVP más grande un promedio de 793 veces mayor que la AgNP5. A su vez esta mostró ser la más citotóxica para los modelos primarios y la línea A549 y la segunda en orden para H1299. Estos tamaños fueron acomodados en orden y contrastados contra la potencia citotóxica de los IC50 (**Tabla 13**).

Tabla 13. Orden de citotoxicidad contra tamaño de PVP

Formulación	Beas-2B	Primarios de pulmón	A549	H1299	Orden de tamaño del PVP
AgNP1	5	1	1	2	2
AgNP2	1	3	3	3	3,4
AgNP3	3	2	5	1	3,4
AgNP4	2	4	4	4	5
AgNP5	4	5	2	5	1

Mayor



Menor

Para determinar de mejor manera la influencia que presenta el PVP es necesario tomar en consideración la proporción que existe entre la cantidad de este y el porcentaje de plata metálica de cada formulación. Si bien las diferencias en las tasas Ag/PVP % w/w no presentan valores muy lejanos entre sí, existen algunas diferencias que pueden estar marcando una posible tendencia en la citotoxicidad. Los resultados señalan que entre menor es este cociente la formulación será más toxica para la línea H1299. Similarmente valores menores en este cociente derivaran en valores más pequeños de toxicidad para A549. En caso opuesto para la línea sana Beas-2B se observa que mayores cocientes generan una menor toxicidad. Por otro lado, para el modelo de células primarias de pulmón el cociente más grande resultó en IC50 mayores mientras que el segundo más grande resultó en IC50 menores, lo cual nos dicta la carencia de un patrón significativo para este modelo en particular. Aunque de manera interesante a valores intermedios se encontró una disminución de la toxicidad dependiente del Cociente de Ag/PVP % w/w (Tabla15).

Tabla 14. Tasa de Ag/PVP

Formulación	Ag/PVP % w/w	Cociente de Ag/PVP % w/w
AgNP1	1.14/19.62	0.0581
AgNP2	1.32/24.49	0.0538
AgNP3	1.26/24.43	0.0515
AgNP4	1.19/20.92	0.0568
AgNP5	1.31/21.67	0.0604

Tabla 15. Comparación del orden citotóxico contra orden en la tasa de Ag/PVP

Formulación	Beas-2B	Primarios de pulmón	A549	H1299	Tasa Ag/PVP % w/w

AgNP1	5	1	1	2	4
AgNP2	1	3	3	3	2
AgNP3	3	2	5	1	1
AgNP4	2	4	4	4	3
AgNP5	4	5	2	5	5

Mayor



Menor



Tabla 16. Orden de selectividad citotóxica vs parámetros fisicoquímicos

Formulación	Beas-2B/A549	Beas-2B/H1299	Primarios de pulmón/A549	Primarios de pulmón/H1299	Orden de tamaños	Orden de diámetro hidrodinámico	Orden de carga superficial	Tasa de Ag/PVP
AgNP1	1	1	4	5	1	4	2	4
AgNP2	4	5	3	2	4	2	4	2
AgNP3	5	2	5	3	3	1	5	1
AgNP4	3	4	2	1	2	5	1	3
AgNP5	2	3	1	4	5	3	3	5

Mayor



Menor



Teorizando esta relación [Ag]/[PVP] se esperaría que una longitud más corta en las cadenas de PVP que recubren la nanopartícula haría que la formulación fuera menos estable en medio acuoso. Al disminuir su longitud las AgNPs tenderán a aglomerarse generando una mayor toxicidad. Esto conllevaría a un mayor efecto en la sobreproducción de ROS intracelular y por ende a una mayor disminución en la viabilidad celular a IC50 más bajas. Esto resultó ser cierto para las células totales primarias de pulmón, la línea sana Beas 2B y la línea tumoral H1299. De igual forma esto resultó ser cierto para la segunda AgNP en orden de tamaño la AgNP1 en la

línea alveolar de células cancerosas A549. Esto no hace más que confirmar nuestra teoría acerca de la existencia de un mecanismo citotóxico tipo caballo de troya mediado por el daño al ADN de las ROS el cual prevemos que estará en función del grado de internalización presente en los distintos modelos. Es por ello por lo que es imprescindible exponer que posibles factores biológicos están siendo involucrados en esta diferencia en la captación de las AgNPs por parte de la célula.

7.2.2 Expresión diferencial de genes en modelos pulmonares

Esperando obtener resultados similares a los de nuestros colegas, se procedió a la compilación de material bibliográfico concerniente a la expresión diferencial de genes en modelos pulmonares en la **tabla 17**. Esto con la finalidad de poder proponer las diferentes causas de la citotoxicidad, las razones de la selectividad antitumoral y las posibles vías de señalización enriquecidas en estos modelos. Este análisis nos ayudó a concluir acerca del posible mecanismo de acción de Argovit® para un panel de cuatro modelos pulmonares *in vitro*. A su vez nos sirve como un marcador biológico final de potenciales enfermedades que puedan desarrollarse en el sistema respiratorio. Entre los genes diferencialmente expresados más prominentes se encontraron aquellos relacionados con la apoptosis como P53, Cas3, Cas9, Bax, Bid y Bak; y una subexpresión en los genes bloqueadores de la apoptosis Bcl-2 y Bcl-xL. A pesar de que la sobreexpresión de estos genes pone a las AgNPs como excelentes agentes terapéuticos selectivos, se encontraron otros tantos que muestran efectos adversos en la salud como lo son TGFβ1, MMP2, NOXO1, SOD2, sftpd, mir146, mir155, NOTCH3 y MRAS. Esto nos estimuló aún más a determinar qué tan selectivas serían estas nuevas formulaciones contra las células tumorales en comparación de los modelos propuestos sanos de pulmón.

Tabla 17. Genes diferencialmente expresados y su implicación biológica en células pulmonares para distintas formulaciones de AgNPs con diferentes propiedades fisicoquímicas.

Genes diferencialmente expresados (DEGs)	Vías de señalización celular	Tamaño de las AgNPs (nm)	Recubrimiento de las AgNPs	Línea celular	Significado biológico	Ref
p53↑ p21↑ Mdm2↓ caspase-3↑	Daño celular. Daño al ADN. Apoptosis.	20	PVP	A549	División celular y destrucción celular (supresión tumoral). Proceso de muerte celular (apoptosis, necrosis e inflamación). Disminución de la regulación negativa de p53.	(Blanco et al., 2017)
ATM↑ Hemo oxigenasa-1↑	Ciclo celular. Daño al ADN. Apoptosis.	10 y 20	PVP	A549	Sensor de daño de ADN. Procesos inflamatorios y homeostasis del hierro.	(Löfdahl et al., 2020)
Bax↑ Casp3↑ Casp9↑ miR-192↑ Bcl2↓	Ciclo celular. Apoptosis.	10.63	Artemisa oliveriana	A549. MRC-5.	Señalización pro-apoptotica. Disminución del mecanismo anti-apoptotico. Promoción de la activación de la vía p53.	(Fard et al., 2018)
VEGFC↑ MAP2K1↑ FOS↑ MAPK13↑ PTGS2↑ COX2↑ IL1B↑ IL6↑	Crecimiento celular (senecencia). Ciclo celular.	25	PVP	Fibroblastos pulmonares humanos (NHLF). MRC-5.	Promoción de la angiogénesis y crecimiento endotelial. Incremento en la proliferación, diferenciación y regulación del ciclo celular. Incremento en la mitogénesis. Aumento de los efectos proinflamatorios.	(Chen et al., 2020)

p53↑ p21↑ Bid↑ Bax↑ Bak ↑ Cyt C↑ Bcl-2↓ Bcl-xL↓	MAPK2, TNF, IL17, P13k-AKT, NF- Kappa B, Apoptosis.	5,40	Wogonin	A549	División celular y destrucción celular (supresión tumoral). Proceso de muerte celular (apoptosis, necrosis e inflamación). Disminución en la regulación negativa de la apoptosis.	(Gurunath an et al., 2018)
(COL1A1, COL1A2, COL6A2, COL11A1, COL16A1, COL18A1, COL21A1) ↑ COL17A1 ↓ MMP2 (IV, V, VII, X) ↑ MMP11, MMP19 inhibition of metallo-proteases ↑ TGFβ1, TGFBR1 ↑ BAMBI ↓ AGTR1, PGF, and PDGF ↑ CDH1 ↑ CDH12 ↓ NOTCH3 ↑ MMP2 ↑	Carcinogénesis. fibrosis hepática. Regulación de la transición mesenquimatosa epitelial. ROS.	10,75	Citrato	Beas-2B	Procesos biológicos relacionados con el colágeno. Incremento en el número de metalopeptidasas de matriz. Incremento en el número de metaloпротеasas. Aumento en el crecimiento fibrótico. Aumento en el receptor de la fibrosis pulmonar. Subida en el número de enzimas antioxidantes totales.	(Gliga et al., 2018)

MRAS ↑ HIF1α ↓ (GSTM1, GSTM2, GSTM3, GSTT2/ GSTT2B) ↑ NQO1 ↑ EPHX1 ↑ CAT ↓						
TFEB↓ LC3B-II↑ LAMP1→ P62↑ Bax↑ Bcl-xL↓ casp3↑ NF-kB↓ p53↑	Apoptosis. Necrosis.	10,20	PVP	Modelo 2D y 3D con y sin hidra proteína.	División celular y destrucción celular (supresión tumoral). Proceso de muerte celular (apoptosis, necrosis e inflamación). Disminución en la biogénesis lisosomal y la autofagia. Incremento en la producción de proteínas asociadas a microtúbulos. Disminución en la transcripción del ADN.	(J. A. Lee et al., 2020)
SLC26A4↑ Duox1↑ Ect2 ↑ sftpa1↑ sftpd↑ muc1↑ cftr ↑ MT1A y MT2A↑ NOXO1 y SOD2↑ mir146, mir155, mir21 y mir224 ↑	Nrf2. Regulación de procesos inflamatorios. Regulación de metales. Daño en el ADN. Regulación del ciclo celular. Procesos inflamatorios.	14	Sin recubrir	Cultivo 3D organotípico primario de células pequeñas de las vías respiratorias.	Aumento en la regulación de la mucosa. Incremento en la producción de surfactante pulmonar. Alza en el número de metalotioneínas. Subida en las enzimas antioxidantes. Aumento en factores de transcripción relacionados con asma y alergia. Aumento en la migración e invasión celular.	(Guo et al., 2018)

	Respuesta inmunomodulatorias. ROS. Remodelación de tejidos. Sobrecarga de metales.					
HMOX-1↑ NQO1 ↓ SOD1↑ MT-1A, MT-1B y MT-2A↑ CASP7 ↑ FAS ↑ HSP70 ↑ GST ↓ VCAM-1 ↑ ICAM-1 ↓ NF-kB ↓ IL-6 ↑ COX-2↓	Nrf2. Regulación de los procesos inflamatorios. Metalotioneínas antioxidantes que se unen a metales. Apoptosis	20, 200	Sin recubrir	Modelo 3D representativo de la barrera alveolar.	Subida en las enzimas antioxidantes. Alza en el número de metalotioneínas. Proceso de muerte celular (apoptosis, necrosis e inflamación). Disminución en la biosíntesis de prostanoídes. Aumento en la producción de proteínas chaperonas. Incremento en la producción de proteínas de adhesión vascular.	(Fizeşan et al., 2019)
Drp1↑ p-Drp1↑ Opal↓ Mfn2 ↓ Casp3↑	Fisión. Fusión. Apoptosis.	10, 20	Sin recubrimiento.	Ratas Sprague-Dawley.	Aumento en la fisión mitocondrial. Disminución en la regulación de la estabilidad mitocondrial y producción energética. Proceso de muerte celular (apoptosis, necrosis e inflamación).	

Las flechas apuntando hacia arriba indican una sobreexpresión genética, las que se encuentran señalando hacia abajo muestran una subreexpresión génica, y las que se encuentran apuntando hacia la derecha indican que no hubo cambios significativos. **p53**: División celular y destrucción celular (Supresión de tumores); **Cas-3**: Proceso de muerte celular (apoptosis, necrosis e inflamación); **Bax**: regulador antiapoptótico; **BCL2**: Bloquea la muerte apoptótica; **MMP2 (matriz metaloproteínasa-2)**: matriz-metalopeptidasa involucrada en la degradación de colágenos (IV, V, VII, X); **NQO1 (NAD(P)H deshidrogenasa [quinona] 1)**: decodifica enzimas antioxidantes multifuncionales inducibles; **SOD1 (superóxido dismutasa 1)**: gen codificador de proteínas; **NF-KB1 (Nuclear Fac-tor Kappa B Subunit 1)**: transcripción de ADN y desarrollo de células inmunitarias; **PTGS2/COX2 (prostaglandina-endoperóxido sintasa 2)**: mediador de respuestas de estrés fisiológico como infección e inflamación; **HMOX1 (Heme Oxygenase 1)**: Proceso inflamatorio y homeostasis del Fe; **IL6 (Interleucina 6)**: Proliferación celular y supervivencia a largo plazo; **Slc26a4**: regulación epitelial exprimida/mucina; **NOTCH3**: mantenimiento de vasos sanguíneos; **TGFβ1**: crecimiento celular, proliferación celular, diferenciación celular y apoptosis; **Sftpd**: Defensa pulmonar contra agentes extraños y toxinas.

7.2.3 Factores biológicos afectando la selectividad tumoral de las AgNPs

En primera instancia al comparar las células sanas contra las células tumorales podemos encontrar algunas marcadas diferencias morfológicas que pueden afectar directamente el nivel de citotoxicidad para los distintos modelos celulares. Desde hace décadas las células cancerígenas han sido caracterizadas por tener morfologías y tamaños irregulares, múltiples núcleos y nucleolos de mayor tamaño, y citoplasma más pequeño [Baba AI, Cătoi C. Comparative Oncology. Bucharest (RO): The Publishing House of the Romanian Academy; 2007. Chapter 3, TUMOR CELL MORPHOLOGY. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553/>], [(Alves et al., 2016)]. Por otro lado, las células cancerígenas presentan un PH extracelular (PHe) ligeramente más ácido que las células sanas entre 0.3-0.7 unidades (Hao et al., 2018) y un PH intracelular más alcalino (>7.2). Finalmente, podemos observar diferencias significativas en los componentes de su membrana celular. Entre estas diferencias podemos encontrar un metabolismo alterado de lípidos lo cual propicia la existencia de niveles mayores de algunos lípidos como es el caso de la fosfatidilserina entre otros (Szlasa et al., 2020).

Con esto en mente es posible relacionar la diferencia entre las citotoxicidades para células sanas y células tumorales con las morfología y estructura celular. Es claro que al poseer un tamaño irregular las células tumorales internalizaran de diferente manera las AgNPs que aquellas con una estructura uniforme. Esta diferencia en uniformidad tendrá a su vez un efecto en el contenido total de lípidos de membrana, enzimas y carbohidratos que actúan como receptores específicos de nutrientes. La diferencia en el contenido membranal total de receptores dotará a las células tumorales de una mayor capacidad para absorber nutrientes especialmente azúcares y aminoácidos [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553/>].

Se sabe que las AgNPs al interactuar con el medio biológico presentarán un efecto de enmascaramiento por medio de la formación de una biocorona externa con moléculas y proteínas circundantes (J. Shannahan, 2017). Como fue establecido en la **sección X** las nanopartículas interactuarán con proteínas, aminoácidos, azúcares, sales y vitaminas presentes en el medio de cultivo suplementado. Diversos autores han mostrado esta formación de biocorona en AgNPs en medio de cultivo *in vitro* (Argentiére et al., 2016; Miclăuș et al., 2016; J. Shannahan, 2017). Entre estos resultados podemos encontrar la adhesión de distintas proteínas

a las PVP-AgNPs de manera tamaño y carga superficial dependiente. En estos estudios se encontró que entre más negativo sea el potencial-Z y más grande sea el diámetro hidrodinámico de la AgNPs; más proteínas anfífilas serán unidas a su superficie (J. H. Shannahan et al., 2013)

A pesar de que las cinco formulaciones de AgNPs resultaron ser sumamente citotóxicas para los modelos tumorales pueden verse algunas tendencias que nos ayudan a determinar que en efecto estas propiedades biológicas pueden estar aumentando o disminuyendo su potencial antitumoral. Basándonos en los resultados discutidos anteriormente podemos expresar que las células tumorales presentan una mayor tasa de internalización de AgNPs contrario a la de los modelos sanos. Esto puede atribuirse a la incrementada necesidad que poseen las células tumorales de adquirir nutrientes lo cual las lleva a introducir estas PVP-AgNPs enmascaradas por la BP en una mucho mayor tasa que las células no cancerígenas. Una mayor internalización por ende propiciara una mayor tasa de liberación de iones Ag^+ intracelular lo cual a su vez está relacionado con un mayor efecto citotóxico (Hsiao et al., 2015). Estos resultados van de la mano con los nuestros pues podemos observar que la viabilidad de la línea celular A549 resultó en todas las concentraciones menor al 20%. Mientras que la viabilidad del segundo modelo tumoral H1299 a excepción de la concentración 5.5 μM de igual forma se ubicó por debajo del 20%.

7.2.3.1 Factores biológicos afectando la selectividad tumoral de las AgNPs en células sanas de pulmón

En este sentido, las células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE), ya sean primarias o inmortalizadas, son el modelo convencionalmente más utilizado para la evaluación *in vitro* del daño bronquial por AgNPs. La línea celular Beas-2B y el modelo de células primarias pulmonares NHBE son las dianas primarias para la citotoxicidad en las células bronquiales. Curiosamente, a pesar de las diferencias en ambos tipos de células epiteliales, este modelo ha demostrado la ausencia de citotoxicidad significativa en varios estudios (Haase et al., 2017; Schlinkert et al., 2015; X. Zhang & Xiao, 2018). Sin embargo, también se ha informado que los modelos primarios resultan ser más sensibles a distintas formulaciones de AgNP funcionalizadas que la línea celular inmortalizada Beas-2B. Estos resultados van de la mano con los reportados en nuestro trabajo experimental, pues el modelo de células primarias totales de pulmón resultó ser mucho más sensible que Beas-2B. Sobre todo, para la formulación AgNP1. Esto puede atribuirse a la capacidad de las células Beas-2B para formar rápidamente uniones

estrechas en condiciones sumergidas, mientras que las células primarias necesitan más tiempo de adaptación (Gliga et al., 2018).

En contraste con los modelos bronquiales sanos, se ha informado muy poco sobre el efecto antiproliferativo de AgNPs en células tumorales bronquiales (BTC). Como único ejemplo en la literatura, Holmila y colaboradores (Holmila et al., 2019) encontraron que las células epiteliales humanas de carcinoma bronqueoalveolar (NCI-H358) expuestas a 10 y 20 nm de PVP-AgNP no muestran efectos citotóxicos. Esta línea de células tumorales en particular dio como resultado resistencia a las AgNPs en un panel de cuatro tipos de células pulmonares. Este efecto se relacionó con el nivel más bajo de contenido mitocondrial en comparación con sus contrapartes, lo que hace que NCI-H358 sea menos susceptible a la inducción de EROs. En nuestro caso los modelos utilizados no presentan esta disminución en el contenido mitocondrial por lo cual no se observaron estos efectos tan resilientes, mientras que similarmente nuestros resultados de la viabilidad de Beas-2B presentaron disminuir de manera concentración dependiente

7.2.3.2 Factores biológicos afectando la selectividad tumoral de las AgNPs en células cancerígenas de pulmón

La línea tumoral A549 es uno de los modelos más reportados en la literatura. Sin embargo, la evaluación de la citotoxicidad en el modelo H1299 esta escasamente estudiada. La principal diferencia biológica entre ambos modelos tumorales radica en la ausencia del gen de supresión tumoral P53 en H1299. Esta ausencia clasifica a este modelo como invasivo mientras que A549 es considerado como no invasivo. La pérdida de función biológica en el gen p53 ausencia puede verse en muchos canceres humanos lo cual ha dificultado de sobremanera la eliminación de células tumorales por apoptosis utilizando agentes quimioterapéuticos (Viktorsson et al., 2005). Como podemos observar en diversos modelos pulmonares la interacción célula-AgNPs produce la sobreexpresión del gen p53 y la disminución de sus reguladores negativos generando así la muerte selectiva mediada por apoptosis (**Tabla 17**).

A pesar de que la muerte por apoptosis en células expuestas a AgNPs esta mediada por la activación de la ruta p53 esta puede ser producida por otras vías. En particular se ha demostrado que la eliminación de las células tumorales puede ser eliminadas por apoptosis mediada por el estrés mitocondrial sin involucrar a p53 (Kovács et al., 2016). En este sentido el

análisis de la expresión diferencial de genes en células pulmonares nos permitió visualizar que posibles implicaciones biológicas conlleva la interacción de distintas nanopartículas reportadas en la literatura y así compararlas con Argovit®. Esto nos permitirá proponer el posible mecanismo de acción y las causas de la selectividad citotóxica.

En primera instancia podemos advertir que en efecto la interacción de AgNPs resultó en la sobreexpresión de p53 para los modelos Beas-2B, A549 y en modelos primarios de pulmón (Blanco et al., 2017; Fard et al., 2018; Gliga et al., 2014; Gurunathan et al., 2018; J. A. Lee et al., 2020). A su vez se encontraron trazas de un efecto en la sobreexpresión de los genes pro apoptóticos P53, Cas3, Cas9, Bax, Bid y Bak; y una subexpresión en los genes bloqueadores de la apoptosis Bcl-2 y Bcl-xL para estos modelos celulares (Blanco et al., 2017; Chen et al., 2020; Fard et al., 2018; Gurunathan et al., 2018; J. A. Lee et al., 2020). Sin embargo, la selectividad radica en el nivel de sobreexpresión y subexpresión de los genes para cada modelo en particular. En los modelos sanos se encontró un aumento en la expresión de p53 de aproximadamente 1.8 veces mientras que para la línea A549 se encontraron valores por encima de 4 (Gliga et al., 2014; Gurunathan et al., 2018). Esto nos habla de la incrementada selectividad que presentan distintas formulaciones de plata para inducir muerte celular en células tumorales en comparación con los modelos sanos por medio de procesos apoptóticos.

Estos hallazgos concuerdan con los de nuestro equipo de investigación en un trabajo previo. En dicha investigación se prueba el mecanismo de apoptosis como principal medio de muerte celular en la línea celular de cáncer colorrectal HCT-15 (Cruz-Ramírez et al., 2021b). Sin embargo, para el caso de estas cinco formulaciones Argovit® se encontró que el principal mediador de la apoptosis celular es la generación de EROs mitocondrial lo cual nos puede estar hablando de un enriquecimiento de la ruta p53. Contrario a nuestros resultados la viabilidad en células tumorales con la presencia de p53 (A549), elucidaron una mayor disminución en la viabilidad celular desde la concentración más baja 5.5 μ M. Caso contrario la que presentaba niveles casi nulos de p53 (H1299) exhibió ser mucho más resistente a las concentraciones más bajas. Esto da paso a que podamos afianzar un poco más la existencia de una muerte pro-apoptótica selectiva mediada por p53 en modelos tumorales y sanos de pulmón.

7.3 Posible mecanismo citotóxico de las AgNPs en los modelos celulares de pulmón

Día a día estamos expuestos tanto de forma voluntaria como la involuntaria al creciente número de nanopartículas transportadas por el aire a través de las vías respiratorias. Tras la inhalación, el recorrido que siguen estas NPs hace de nuestros pulmones la primera línea de defensa. Aun sabiendo esto, se han realizado muy pocos estudios para dilucidar los posibles efectos sobre la salud que puede acarrear la exposición prolongada a estos agentes externos. Si las AgNPs son capaces de atravesar las diversas barreras físicas y bioquímicas, y finalmente la defensa inmune, podrán ser internalizadas por las células alveolares y bronquiales y algunas otras permearán a través de la superficie de intercambio gaseoso accediendo a la vía sistémica, distribuyéndose por todo el cuerpo, induciendo la quimiotaxis.

Es por ello por lo que es de suma importancia evaluar el posible mecanismo de acción que ejercen estas AgNPs en modelos *in vitro* para posteriormente extrapolarlas a modelos *in vivo*. Para esto es necesario tomar en consideración las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de la nanopartícula y los posibles factores biológicos que pueden estar involucrados en la interacción AgNP-célula. Estas propiedades deben ser relacionadas entre sí para los diversos modelos celulares y formulaciones de nanopartículas para intentar predecir las posibles causas de la selectividad. En este trabajo encontramos que PF como el tamaño, el diámetro hidrodinámico, la carga superficial, la funcionalización de la superficie, el cociente del contenido [Ag]/[PVP], el tipo de célula pulmonar y la formación de biocorona tendrán un impacto significativamente distinto en función también de los modelos celulares.

Con esto en mente se propuso que las AgNPs serán internalizadas en mayor medida por las células tumorales en contraparte con los modelos sanos de pulmón. Esto fue atribuido a un probable efecto de enmascaramiento de las AgNPs al interactuar el PVP que recubre su membrana con las proteínas, aminoácidos, vitaminas y azúcares presentes en el medio de cultivo celular. Se sabe que las células tumorales al poseer un mayor tamaño y un número incrementado de receptores de nutrientes en su membrana celular internalizaran de manera más rápida las AgNPs enmascaradas sin identificar el contenido interno formado por un núcleo de plata. Aun cuando las AgNPs también pueden ser internalizadas en las células sanas, creemos que en el periodo de 24 h de exposición una menor cantidad de AgNPs logra ingresar. Lo cual explica las diferencias en el efecto citotóxico, siendo mucho más potente para las células tumorales que

para las sanas. Notablemente se pudo apreciar que el modelo primario de células totales de pulmón resultó ser más sensible que la línea bronquial sana Beas-2B y que la línea cancerígena H1299 carente del gen p53 resultó ser menos sensible que su contraparte tumoral A549.

Si bien las principales rutas de internalización celular de las AgNP son la endocitosis endosomal o lisosomal, también pueden presentarse otras formas de internalización. Entre ellas encontramos la difusión pasiva, la peroxidación lipídica y la ruptura de la membrana (Morais et al., 2020). Se ha demostrado que incluso las AgNPs más grandes que no pueden someterse a endocitosis generan efectos citotóxicos a través de vías de transducción mediadas por receptores de manera indirecta (X.-F. Zhang et al., 2016).

La primera serie de efectos dañinos a nivel celular se observará a nivel de membrana. Es bien sabido que las AgNPs pueden interactuar directamente con la membrana provocando una disminución de la rigidez de la misma o su ruptura, de la misma forma puede producirse un bloqueo de los canales iónicos mediado por la aglomeración de las AgNPs o la posible disolución en iones Ag^+ en la membrana, impidiendo así la correcta homeostasis celular y por tanto el correcto funcionamiento de la célula. Finalmente, estas pueden interactuar con los receptores proteicos de la membrana activando vías de señalización de ROS (Akter et al., 2018; Yin et al., 2019). Los efectos sobre la citotoxicidad celular luego de la translocación en los diferentes orgánulos se presentan en forma de disrupción y oxidación mitocondrial afectada por el estallido de ROS debido a la acumulación de iones de plata, factores que disminuyen el potencial de la membrana mitocondrial, otro efecto notable se presenta en la núcleo celular donde las AgNP interactúan con los puentes disulfuro de las proteínas y el azufre presente en los ácidos nucleicos, generando daño estructural al contenido genético, y la desregulación de vías y genes importantes para la supervivencia celular (Akter et al., 2018; Gliga et al., 2014).

Estos efectos encontrados en la literatura comparados con los de nuestro trabajo de investigación nos permitieron proponer el posible mecanismo de acción *in vitro* de AgNPs para los modelos pulmonares aquí evaluados. El proceso por el cual las AgNP se internalizan para posteriormente ejercer citotoxicidad dentro de la célula se conoce como el mecanismo del caballo de Troya. Esto regularmente es mediado por sistemas de endocitosis mediada por endosomas los cuales se dirigen directamente a los lisosomas. Los lisosomas presentan un entorno ácido lo que propiciara la liberación de grandes cantidades tóxicas de iones Ag^+ (Jalink et al., 2020). Una vez que los AgNP se internalizan en las células y son disueltas, los iones Ag^+

se translocarán directamente a la mitocondria o al núcleo. Este proceso provocará la sobreproducción de EROs mitocondrial lo cual tendrá un efecto directo en la expresión diferencial de genes pro apoptóticos intercedidos por la activación de la ruta p53 para los distintos modelos celulares exceptuando H1299 la cual presentará procesos apoptóticos independientes de p53 **Fig23**.

Como se esperaba el modelo de CPTP resultó ser más sensible que las líneas celulares. Por este motivo se utilizó como parámetro del efecto que produciría la liberación de iones Ag^+ en cada formulación con su porcentaje de plata específico. Esto nos permite sugerir que el efecto de las AgNPs no se debe únicamente a la liberación de iones Ag^+ si no mas bien como sustenta nuestro grupo de investigación a la generación de EROs. Con esto en mente es posible ir encaminándonos hacia la propuesta de un posible efecto citotóxico atribuido a las AgNPs como ente completo y no a la liberación de iones Ag^+ . Sin embargo, aún es necesario analizar las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs y los posibles factores biológicos que pueden estar implicados en la toxicidad celular.

En este estudio, realizamos una investigación exhaustiva de los genes diferencialmente expresados. El resultado de esta expresión diferencial entre diferentes tipos de células pulmonares indica claramente que las AgNP, independientemente de las PF o factores biológicos; tendrán un inminente impacto en la reprogramación transcripcional. Sin embargo, también fue posible notar que distintas propiedades PF y FB resultaron en una mayor selectividad y mayor efecto citotóxico para los modelos utilizados. Esto nos dicta que los cambios en la expresión de genes específicos de células pulmonares pueden verse como el punto final biológico de la exposición a AgNP *in vitro* más no indicarán las posibles causas del grado de diferenciación génica (**Tabla17**). Por ello imperativo decir que el correcto estudio de las propiedades fisicoquímicas y factores biológicos inherentes en la interacción AgNP-célula serán el punto clave en la determinación y formulación formulaciones altamente selectivas extrapolables a modelos más complejos como los modelos *in vivo*.

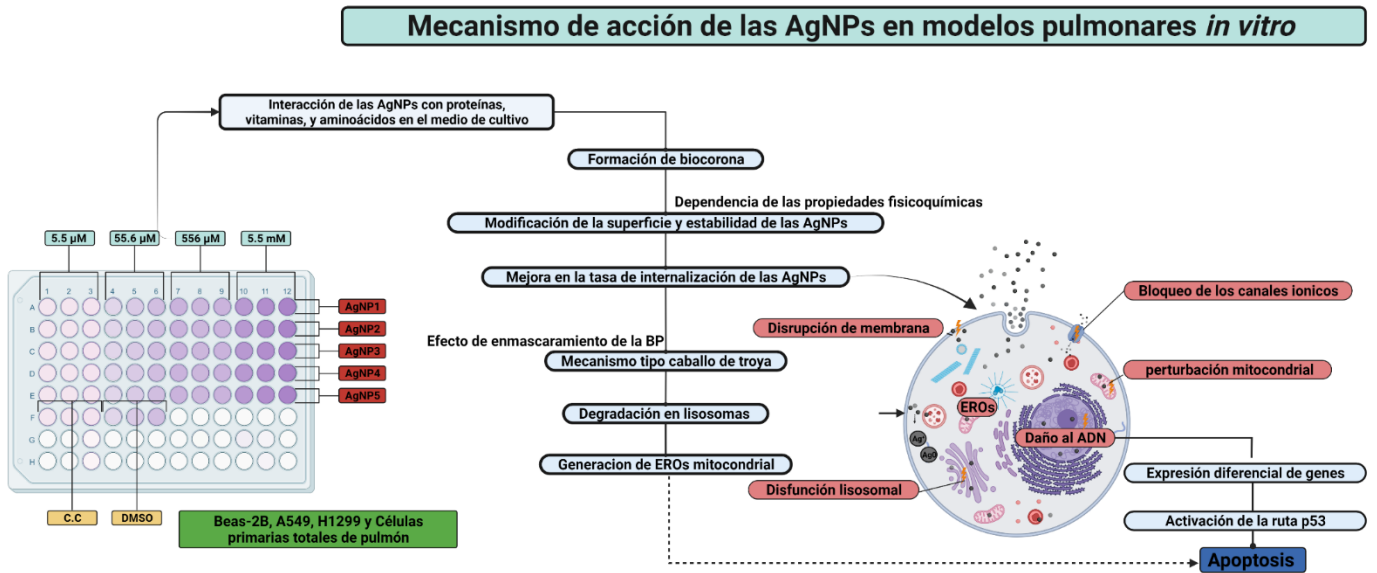


Figura 23. Comparación de IC50 para las cinco formulaciones de AgNPs contra células primarias totales de pulmón.

Capítulo 8

Conclusiones

En este capítulo se realizará una síntesis de los resultados más importantes encontrados en este trabajo de tesis titulado “Comparación del efecto citotóxico de AgNPs en modelos con líneas celulares y cultivos primarios”.

8.1 Comparación del efecto citotóxico de AgNPs en modelos con líneas celulares y cultivos primarios de pulmón

La determinación de la viabilidad celular en un panel de cuatro modelos celulares pulmonares ante el estímulo de cinco formulaciones de AgNPs nombradas como AgNP1, AgNP2, AgNP3, AgNP4 y AgNP5 englobadas como Argovit®, los resultados muestran un claro efecto citotóxico selectivo para los modelos tumorales de pulmón. Adicionalmente, se observa una marcada tendencia concentración dependiente para los cuatro modelos celulares. Sin embargo, esta tendencias se presentó en mucho menor medida en modelos sanos que sus contrapartes tumorales. En el caso de los modelos celulares sanos también se observa un efecto concentración dependiente sobre la viabilidad celular, siendo los modelos primarios más sensibles que la línea celular Beas-2B. Lo mismo pudo encontrarse para el caso de las líneas cancerígenas de pulmón en las cuales A549 fue más sensible que su símil tumoral H1299.

Para determinar las posibles causas de este efecto selectivo y de la sensibilidad aumentada entre modelos fue necesario un análisis exhaustivo de las propiedades fisicoquímicas

y factores biológicos involucrados en la interacción AgNP-célula. Entre estos factores destacaron el tamaño de la nanopartícula, su diámetro hidrodinámico, la carga superficial, la funcionalización de la superficie, el cociente del contenido [Ag]/[PVP], el tipo de célula pulmonar y la formación de biocorona. Para poder contrastar estas propiedades fue preciso el cálculo de las IC50 en modelos sanos y tumorales con la finalidad de determinar el orden citotóxico para los distintos modelos celulares: **AgNP2> AgNP4> AgNP3> AgNP5> AgNP 1 en Beas-2B, AgNP1>AgNP3>AgNP2>AgNP4>AgNP5 en CPTP AgNP1>AgNP5>AgNP2>AgNP4>AgNP3 para A549 y AgNP3>AgNP1>AgNP2>AgNP4>AgNP5 para H1299.**

Los resultados fueron ordenados para comparar el efecto citotóxico en función de las propiedades fisicoquímicas para mostrar posibles tendencias (**Tabla 18**). Se observó que tamaños pequeños de AgNPs resultaron ser más tóxicos para las células primarias totales de pulmón, A549 y H1299. Por otro lado, se encontró una tendencia que muestra una dependencia de la citotoxicidad con el diámetro hidrodinámico para las primeras tres AgNPs en orden de diámetro en H1299 y células primarias. Caso contrario a la tendencia encontrada en A549. Analizando la carga superficial se pudo notar como al ser más negativo el potencial z de las distintas formulaciones, la citotoxicidad en A549 disminuyó, mientras que al disminuir este valor la citotoxicidad también disminuyó en los modelos primarios. Por último, pero no menos importante pudo comprobarse que para la longitud de cadena más pequeña de PVP presente en la AgNP5 la cual era aproximadamente 800 veces menor que su próxima en orden exhibió los mayores efectos citotóxico para los distintos modelos exceptuando A549. Este tamaño tan pequeño resultó en un mayor cociente de [Ag]/[PVP] % w/w lo cual a su vez nos habla de una menor estabilidad de la formulación y de una mayor facilidad para ser degradada y liberar así iones Ag⁺.

Tabla 18. Orden citotoxicidad vs parámetros fisicoquímicos.

Formulación	Beas-2B	Primarios de pulmón	A549	H1299	Orden de tamaños	Orden de diámetro hidrodinámico	Orden de carga superficial	Tasa de Ag/PVP	Orden de tamaño del PVP
AgNP1	5	1	1	2	1	4	2	4	2

AgNP2	1	3	3	3	4	2	4	2	3,4
AgNP3	3	2	5	1	3	1	5	1	3,4
AgNP4	2	4	4	4	2	5	1	3	5
AgNP5	4	5	2	5	5	3	3	5	1

 **Mayor**

 **Menor**

Por lo anterior, se propone un efecto citotóxico de las AgNPs mediado por un mecanismo selectivo de tipo caballo de troya. Los índices de selectividad para cada formulación en líneas sanas y tumorales demuestran la hipótesis, siendo mayor el efecto citotóxico en inducido por las AgNPs en células tumorales que en modelos sanos. Notablemente se obtuvieron valores en un intervalo de 0.2 a 195.4339456 Beas-2B /A549 y de 3.7 a 378.4 para Beas-2B /H1299. En otra instancia los valores de IS para las células primarias totales de pulmón se exhibieron en un intervalo de 0.01 a 6.8 para CPTP/A549 y de 1 a 4.7 para CPTP/H1299. Siendo la AgNP1 la más selectiva contra líneas celulares tumorales y la AgNP2 y AgNP5 las más selectivas para el modelo primario contra A549 y H1299 respectivamente. Estas formulaciones presentaron $IS \geq 3$ y algunas muy por encima de 10 lo cual según los grupos de Indrayanto y Weerapreeyakul las catalogaría como agentes anti-neoplásicos altamente potenciales (Indrayanto et al., 2021; Weerapreeyakul et al., 2012).

Esta selectividad entre modelos fue atribuida en mayor medida a los factores biológicos involucrados entre modelos. Dentro de los cuales se destacó el tipo de célula pulmonar y la formación de biocorona. Como es de esperarse las células tumorales al presentar una morfología distinta y un mayor número de receptores membranales pueden estar internalizando un mayor número de AgNPs en un plazo de 24h al contrario que los modelos sanos. Esto se puede deber a que al interaccionar con el medio de cultivo celular se produjo la formación de una biocorona proteica enmascarante en las AgNPs la cual les permitió ser captadas por las células y en mayor medida por los receptores de nutrientes sobreexpresados en las células tumorales. Por otro lado, se propone que el ambiente tumoral al ser ligeramente más ácido generara una disolución

temprana de las AgNPs lo cual incrementa la liberación de Ag^+ . Esto también le confiere una elevada selectividad hacia las células cancerígenas en contraposición con los modelos sanos.

Pese a que se encontró una marcada tendencia selectiva anticancerígena cabe destacar que existieron diferencias significativas en la selectividad entre modelos sanos y entre modelos tumorales. Esta disimilitud se atribuyó a una mayor sensibilidad por parte de los modelos primarios en comparación con las líneas celulares debidas a la conservación de biomarcadores específicos y de la morfología celular procedente del huésped de origen. En comparación, el incremento en sensibilidad para la línea A549 en contraste con H1299 se atribuye a los niveles casi nulos de P53 para el caso del último modelo mencionado. Los efectos de la citotoxicidad celular de las formulaciones Argovit® fueron propuestos por apoptosis mediada por la activación de la vía p53. Siendo esto resultado de la generación de EROs mitocondrial y la expresión diferencial de genes.

Capítulo 9

Referencias

- Akter, M., Sikder, Md. T., Rahman, Md. M., Ullah, A. K. M. A., Hossain, K. F. B., Banik, S., Hosokawa, T., Saito, T., & Kurasaki, M. (2018). A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008>
- Alessandrini, F., Vennemann, A., Gschwendtner, S., Neumann, A., Rothballer, M., Seher, T., Wimmer, M., Kublik, S., Traidl-Hoffmann, C., Schloter, M., Wiemann, M., & Schmidt-Weber, C. (2017). Pro-Inflammatory versus Immunomodulatory Effects of Silver Nanoparticles in the Lung: The Critical Role of Dose, Size and Surface Modification. *Nanomaterials*, 7(10), 300. <https://doi.org/10.3390/nano7100300>
- Alves, A. C., Ribeiro, D., Nunes, C., & Reis, S. (2016). Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(9), 2231–2244. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.025>
- Argentiere, S., Cella, C., Cesaria, M., Milani, P., & Lenardi, C. (2016). Silver nanoparticles in complex biological media: assessment of colloidal stability and protein corona formation. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(8), 253. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3560-5>
- Ávalos, A., Haza, A. I., Mateo, D., & Morales, P. (2015). Effects of silver and gold nanoparticles of different sizes in human pulmonary fibroblasts. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 25(4), 287–295. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1025347>
- BéruBé, K., Prytherch, Z., Job, C., & Hughes, T. (2010). Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology*, 278(3), 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.04.004>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Blanco, J., Lafuente, D., Gómez, M., García, T., Domingo, J. L., & Sánchez, D. J. (2017). Polyvinyl pyrrolidone-coated silver nanoparticles in a human lung cancer cells: time- and dose-dependent influence over p53 and caspase-3 protein expression and epigenetic effects. *Archives of Toxicology*, 91(2), 651–666. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1773-0>
- Bobyk, L., Tarantini, A., Beal, D., Veronesi, G., Kieffer, I., Motellier, S., Valsami-Jones, E., Lynch, I., Jouneau, P.-H., Pernet-Gallay, K., Aude-Garcia, C., Sauvaigo, S., Douki, T., Rabilloud, T., & Carriere, M. (2021). Toxicity and chemical transformation of silver nanoparticles in A549 lung cells: dose-rate-dependent genotoxic impact. *Environmental Science: Nano*, 8(3), 806–821. <https://doi.org/10.1039/D0EN00533A>
- Chen, B., Chai, Q., Xu, S., Li, Q., Wu, T., Chen, S., & Wu, L. (2020). Silver nanoparticle-activated COX2/PGE2 axis involves alteration of lung cellular senescence in vitro and in vivo. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204, 111070. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111070>
- Cruz-Ramírez, O. U., Valenzuela-Salas, L. M., Blanco-Salazar, A., Rodríguez-Arenas, J. A., Mier-Maldonado, P. A., García-Ramos, J. C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., & Toledano-Magaña, Y. (2021a). Antitumor Activity against Human Colorectal Adenocarcinoma of Silver Nanoparticles: Influence of [Ag]/[PVP] Ratio. *Pharmaceutics*, 13(7), 1000. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071000>
- Cruz-Ramírez, O. U., Valenzuela-Salas, L. M., Blanco-Salazar, A., Rodríguez-Arenas, J. A., Mier-Maldonado, P. A., García-Ramos, J. C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., & Toledano-Magaña, Y. (2021b). Antitumor

- Activity against Human Colorectal Adenocarcinoma of Silver Nanoparticles: Influence of [Ag]/[PVP] Ratio. *Pharmaceutics*, 13(7), 1000. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071000>
- Cunningham, B., Engstrom, A. M., Harper, B. J., Harper, S. L., & Mackiewicz, M. R. (2021). Silver Nanoparticles Stable to Oxidation and Silver Ion Release Show Size-Dependent Toxicity In Vivo. *Nanomaterials*, 11(6), 1516. <https://doi.org/10.3390/nano11061516>
- Das, S., & Chaudhury, A. (2011). Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 12(1), 62–76. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9563-0>
- Dhas, N. L., Raval, N. J., Kudarha, R. R., Acharya, N. S., & Acharya, S. R. (2018). Core-shell nanoparticles as a drug delivery platform for tumor targeting. In *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines* (pp. 387–448). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813661-4.00009-2>
- Ebnesajjad, S. (2006). Surface and Material Characterization Techniques. In *Surface Treatment of Materials for Adhesion Bonding* (pp. 43–75). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-081551523-4.50006-7>
- Ekstrand-Hammarström, B., Akfur, C. M., Andersson, P. O., Lejon, C., Österlund, L., & Bucht, A. (2012). Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B. *Nanotoxicology*, 6(6), 623–634. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.598245>
- Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review. (2005). *The Annals of Occupational Hygiene*. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mei019>
- Fahmy, H. M., Mosleh, A. M., Elghany, A. A., Shams-Eldin, E., Abu Serea, E. S., Ali, S. A., & Shalan, A. E. (2019). Coated silver nanoparticles: synthesis, cytotoxicity, and optical properties. *RSC Advances*, 9(35), 20118–20136. <https://doi.org/10.1039/C9RA02907A>
- Fard, N. N., Noorbazargan, H., Mirzaie, A., Hedayati Ch, M., Moghimiyani, Z., & Rahimi, A. (2018). Biogenic synthesis of AgNPs using Artemisia oliveriana extract and their biological activities for an effective treatment of lung cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup3), S1047–S1058. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1528983>
- Farjadian, F., Ghasemi, A., Gohari, O., Roozantan, A., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2019). Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. *Nanomedicine*, 14(1), 93–126. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0120>
- Fayez, H., El-Motaleb, M. A., & Selim, A. A. (2020). Synergistic Cytotoxicity Of Shikonin-Silver Nanoparticles As An Opportunity For Lung Cancer. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 63(1), 25–32. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3818>
- Ferdous, Z., Al-Salam, S., Greish, Y. E., Ali, B. H., & Nemmar, A. (2019). Pulmonary exposure to silver nanoparticles impairs cardiovascular homeostasis: Effects of coating, dose and time. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 367, 36–50. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.006>
- Ferdous, Z., & Nemmar, A. (2020). Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2375. <https://doi.org/10.3390/ijms21072375>
- Fizeşan, I., Cambier, S., Moschini, E., Chary, A., Nelissen, I., Ziebel, J., Audinot, J.-N., Wirtz, T., Kruszewski, M., Pop, A., Kiss, B., Serchi, T., Loghin, F., & Gutleb, A. C. (2019). In vitro exposure of a 3D-tetraculture representative for the alveolar barrier at the air-liquid interface to silver particles and nanowires. *Particle and Fibre Toxicology*, 16(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0297-1>
- Gao, W., Li, L., Wang, Y., Zhang, S., Adcock, I. M., Barnes, P. J., Huang, M., & Yao, X. (2015). Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology*, 20(5), 722–729. <https://doi.org/10.1111/resp.12542>
- Gliga, A. R., di Bucchianico, S., Lindvall, J., Fadeel, B., & Karlsson, H. L. (2018). RNA-sequencing reveals long-term effects of silver nanoparticles on human lung cells. *Scientific Reports*, 8(1), 6668. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25085-5>
- Gliga, A. R., Skoglund, S., Odnevall Wallinder, I., Fadeel, B., & Karlsson, H. L. (2014). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-11>
- Guo, C., Buckley, A., Marczylo, T., Seiffert, J., Römer, I., Warren, J., Hodgson, A., Chung, K. F., Gant, T. W., Smith, R., & Leonard, M. O. (2018). The small airway epithelium as a target for the adverse pulmonary effects of silver nanoparticle inhalation. *Nanotoxicology*, 12(6), 539–553. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1465140>

- Gurunathan, S., Kang, M., & Kim, J.-H. (2018). Combination Effect of Silver Nanoparticles and Histone Deacetylases Inhibitor in Human Alveolar Basal Epithelial Cells. *Molecules*, 23(8), 2046. <https://doi.org/10.3390/molecules23082046>
- Haase, A., Dommershausen, N., Schulz, M., Landsiedel, R., Reichardt, P., Krause, B.-C., Tentschert, J., & Luch, A. (2017). Genotoxicity testing of different surface-functionalized SiO₂, ZrO₂ and silver nanomaterials in 3D human bronchial models. *Archives of Toxicology*, 91(12), 3991–4007. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2015-9>
- Hao, G., Xu, Z. P., & Li, L. (2018). Manipulating extracellular tumour pH: an effective target for cancer therapy. *RSC Advances*, 8(39), 22182–22192. <https://doi.org/10.1039/C8RA02095G>
- Himanen, S. v., & Sistonen, L. (2019). New insights into transcriptional reprogramming during cellular stress. *Journal of Cell Science*, 132(21). <https://doi.org/10.1242/jcs.238402>
- Holmila, R. J., Vance, S. A., King, S. B., Tsang, A. W., Singh, R., & Furdai, C. M. (2019). Silver Nanoparticles Induce Mitochondrial Protein Oxidation in Lung Cells Impacting Cell Cycle and Proliferation. *Antioxidants*, 8(11), 552. <https://doi.org/10.3390/antiox8110552>
- Hsiao, I.-L., Hsieh, Y.-K., Wang, C.-F., Chen, I.-C., & Huang, Y.-J. (2015). Trojan-Horse Mechanism in the Cellular Uptake of Silver Nanoparticles Verified by Direct Intra- and Extracellular Silver Speciation Analysis. *Environmental Science & Technology*, 49(6), 3813–3821. <https://doi.org/10.1021/es504705p>
- Hu, G., & Christman, J. W. (2019). Editorial: Alveolar Macrophages in Lung Inflammation and Resolution. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02275>
- Huang, W., Zhang, L., Yang, Q., & Wang, Z. (2014). Polyvinylpyrrolidone as an Efficient Stabilizer for Silver Nanoparticles. *Chinese Journal of Chemistry*, 32(9), 909–913. <https://doi.org/10.1002/cjoc.201400349>
- Hussell, T., & Bell, T. J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature Reviews Immunology*, 14(2), 81–93. <https://doi.org/10.1038/nri3600>
- Indrayanto, G., Putra, G. S., & Suhud, F. (2021). Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research (pp. 273–307). <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2020.07.005>
- Jalink, K., Cheng, S. S. Y., ben Ireland, S., & Louise Meunier, M. A. F. (2020). Silver nanoparticle uptake in the human lung assessed through in-vitro and in-silico methods. *Environmental Pollution*, 259, 113880. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113880>
- Jedrejczak-Silicka, M. (2017). History of Cell Culture. In *New Insights into Cell Culture Technology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/66905>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Koczkur, K. M., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L., & Skrabalak, S. E. (2015). Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Transactions*, 44(41), 17883–17905. <https://doi.org/10.1039/C5DT02964C>
- Kovács, D., Igaz, N., Keskeny, C., Béltéky, P., Tóth, T., Gáspár, R., Madarász, D., Rázga, Z., Kónya, Z., Boros, I. M., & Kiricsi, M. (2016). Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis. *Scientific Reports*, 6(1), 27902. <https://doi.org/10.1038/srep27902>
- Kumar, P. S., Pavithra, K. G., & Naushad, Mu. (2019). Characterization techniques for nanomaterials. In *Nanomaterials for Solar Cell Applications* (pp. 97–124). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813337-8.00004-7>
- Lee, J. A., Yeo, M.-K., & Kim, S. S. (2020). Hydra protein reduces the toxicity of Ag–PVP nanoparticles in a 3D A549 cell line. *Molecular & Cellular Toxicology*, 16(1), 73–81. <https://doi.org/10.1007/s13273-019-00061-w>
- Lee, S., & Jun, B.-H. (2019). Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 865. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>
- Leithner, K., Wohlkoenig, C., Stacher, E., Lindenmann, J., Hofmann, N. A., Gallé, B., Guelly, C., Quehenberger, F., Stiegler, P., Smolle-Jüttner, F.-M., Philipsen, S., Popper, H. H., Hrzenjak, A., Olschewski, A., & Olschewski, H. (2014). Hypoxia increases membrane metallo-endopeptidase expression in a novel lung cancer ex vivo model – role of tumor stroma cells. *BMC Cancer*, 14(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-40>
- Liao, C., Li, Y., & Tjong, S. (2019). Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 449. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>
- Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X., & Low, S. C. (2013). Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 381. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-381>

- Löfdahl, A., Jern, A., Flyman, S., Kåredal, M., Karlsson, H. L., & Larsson-Callerfelt, A.-K. (2020). Silver Nanoparticles Alter Cell Viability Ex Vivo and in Vitro and Induce Proinflammatory Effects in Human Lung Fibroblasts. *Nanomaterials*, 10(9), 1868. <https://doi.org/10.3390/nano10091868>
- Loiseau, A., Asila, V., Boitel-Aullen, G., Lam, M., Salmain, M., & Boujday, S. (2019). Silver-Based Plasmonic Nanoparticles for and Their Use in Biosensing. *Biosensors*, 9(2), 78. <https://doi.org/10.3390/bios9020078>
- Mason, R. J. (2006). EPITHELIAL CELLS | Type II Cells. In *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (pp. 138–142). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00140-X>
- Medici, S., Peana, M., Nurchi, V. M., & Zoroddu, M. A. (2019). Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(13), 5923–5943. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01439>
- Miclăuş, T., Beer, C., Chevallier, J., Scavenius, C., Bochenkov, V. E., Enghild, J. J., & Sutherland, D. S. (2016). Dynamic protein coronas revealed as a modulator of silver nanoparticle sulphidation in vitro. *Nature Communications*, 7(1), 11770. <https://doi.org/10.1038/ncomms11770>
- Miserocchi, G., Mercatali, L., Liverani, C., de Vita, A., Spadazzi, C., Pieri, F., Bongiovanni, A., Recine, F., Amadori, D., & Ibrahim, T. (2017). Management and potentialities of primary cancer cultures in preclinical and translational studies. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 229. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1328-z>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Mittal, J., Pal, U., Sharma, L., Verma, A. K., Ghosh, M., & Sharma, M. M. (2020). Unveiling the cytotoxicity of phytosynthesised silver nanoparticles using *Tinospora cordifolia* leaves against human lung adenocarcinoma A549 cell line. *IET Nanobiotechnology*, 14(3), 230–238. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2019.0335>
- Miyayama, T., Fujiki, K., & Matsuoka, M. (2018). Silver nanoparticles induce lysosomal-autophagic defects and decreased expression of transcription factor EB in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Toxicology in Vitro*, 46, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.10.009>
- Morais, M., Teixeira, A. L., Dias, F., Machado, V., Medeiros, R., & Prior, J. A. v. (2020). Cytotoxic Effect of Silver Nanoparticles Synthesized by Green Methods in Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(23), 14308–14335. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01055>
- Mukherjee, A., Paul, M., & Mukherjee, S. (2019). Recent Progress in the Theranostics Application of Nanomedicine in Lung Cancer. *Cancers*, 11(5), 597. <https://doi.org/10.3390/cancers11050597>
- OGATA, S., HOMMA, S., SASAHIRA, A., KAWAMURA, F., KOGA, J., & MATSUMOTO, S. (2004). Fluorination Reaction of Uranium Dioxide by Fluorine. *Journal of Nuclear Science and Technology*, 41(2), 135–141. <https://doi.org/10.3327/jnst.41.135>
- Oluwafemi, O. S., Sakho, E. H. M., Parani, S., & Lebepe, T. C. (2021). Characterization techniques for ternary I–III–VI quantum dots. In *Ternary Quantum Dots* (pp. 117–135). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818303-8.00007-1>
- Pastor, D. M., Poritz, L. S., Olson, T. L., Kline, C. L., Harris, L. R., Koltun, W. A., Chinchilli, V. M., & Irby, R. B. (2010). Primary cell lines: false representation or model system? a comparison of four human colorectal tumors and their coordinately established cell lines. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 3(1), 69–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20369042>
- Pezzulo, A. A., Starner, T. D., Scheetz, T. E., Traver, G. L., Tilley, A. E., Harvey, B.-G., Crystal, R. G., McCray, P. B., & Zabner, J. (2011). The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(1), L25–L31. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00256.2010>
- Radiom, M., Sarkis, M., Brookes, O., Oikonomou, E. K., Baeza-Squiban, A., & Berret, J.-F. (2020). Pulmonary surfactant inhibition of nanoparticle uptake by alveolar epithelial cells. *Scientific Reports*, 10(1), 19436. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76332-7>
- Rajisha, K. R., Deepa, B., Pothan, L. A., & Thomas, S. (2011). Thermomechanical and spectroscopic characterization of natural fibre composites. In *Interface Engineering of Natural Fibre Composites for Maximum Performance* (pp. 241–274). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857092281.2.241>
- Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B., & Tekade, R. K. (2019). Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery* (pp. 369–400). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8>

- Riaz Ahmed, K. B., Nagy, A. M., Brown, R. P., Zhang, Q., Malghan, S. G., & Goering, P. L. (2017a). Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicology in Vitro*, 38, 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.10.012>
- Riaz Ahmed, K. B., Nagy, A. M., Brown, R. P., Zhang, Q., Malghan, S. G., & Goering, P. L. (2017b). Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicology in Vitro*, 38, 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.10.012>
- Richter, M., Piwocka, O., Musielak, M., Piotrowski, I., Suchorska, W. M., & Trzeciak, T. (2021). From Donor to the Lab: A Fascinating Journey of Primary Cell Lines. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.711381>
- Rim, K.-T., Song, S.-W., & Kim, H.-Y. (2013). Oxidative DNA Damage from Nanoparticle Exposure and Its Application to Workers' Health: A Literature Review. *Safety and Health at Work*, 4(4), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2013.07.006>
- Robinson, B. v., Sullivan, F. M., Borzelleca, J. F., & Schwartz, S. L. (2018). *PVP*. Routledge. <https://doi.org/10.1201/9780203741672>
- Rosário, F., Hoet, P., Nogueira, A. J. A., Santos, C., & Oliveira, H. (2018). Differential pulmonary in vitro toxicity of two small-sized polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 81(15), 675–690. <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1468837>
- Samimi, S., Maghsoudnia, N., Eftekhari, R. B., & Dorkoosh, F. (2019). Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems. In *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery* (pp. 47–76). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00003-9>
- Saravanakumar, K., Chelliah, R., MubarakAli, D., Oh, D.-H., Kathiresan, K., & Wang, M.-H. (2019). Unveiling the potentials of biocompatible silver nanoparticles on human lung carcinoma A549 cells and *Helicobacter pylori*. *Scientific Reports*, 9(1), 5787. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42112-1>
- Schlinkert, P., Casals, E., Boyles, M., Tischler, U., Hornig, E., Tran, N., Zhao, J., Himly, M., Riediker, M., Oostingh, G. J., Puentes, V., & Duschl, A. (2015). The oxidative potential of differently charged silver and gold nanoparticles on three human lung epithelial cell types. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12951-014-0062-4>
- Schraufnagel, D. E. (2020). The health effects of ultrafine particles. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(3), 311–317. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0403-3>
- Schyns, J., Bureau, F., & Marichal, T. (2018). Lung Interstitial Macrophages: Past, Present, and Future. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/5160794>
- Shannahan, J. (2017). The biocorona: a challenge for the biomedical application of nanoparticles. *Nanotechnology Reviews*, 6(4), 345–353. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0098>
- Shannahan, J. H., Lai, X., Ke, P. C., Podila, R., Brown, J. M., & Witzmann, F. A. (2013). Silver Nanoparticle Protein Corona Composition in Cell Culture Media. *PLoS ONE*, 8(9), e74001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074001>
- Stoddart, M. J. (2011). *Cell Viability Assays: Introduction* (pp. 1–6). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
- Sunil Gowda, S. N., Rajasowmiya, S., Vadivel, V., Banu Devi, S., Celestin Jerald, A., Marimuthu, S., & Devipriya, N. (2018). Gallic acid-coated silver nanoparticle alters the expression of radiation-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small lung cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 52, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.06.015>
- Szlasa, W., Zendran, I., Zalesińska, A., Tarek, M., & Kulbacka, J. (2020). Lipid composition of the cancer cell membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 52(5), 321–342. <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09846-4>
- Teicher, B. A. (2014). Targets in small cell lung cancer. *Biochemical Pharmacology*, 87(2), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.09.014>
- Tian, S., Saravanan, K., Mothana, R. A., Ramachandran, G., Rajivgandhi, G., & Manoharan, N. (2020). Anti-cancer activity of biosynthesized silver nanoparticles using *Avicennia marina* against A549 lung cancer cells through ROS/mitochondrial damages. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 3018–3024. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.029>
- Tortella, G. R., Rubilar, O., Durán, N., Diez, M. C., Martínez, M., Parada, J., & Seabra, A. B. (2020). Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. *Journal of Hazardous Materials*, 390, 121974. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121974>
- Valentino, F., Borra, G., Allione, P., & Rossi, L. (2018). Emerging targets in advanced non-small-cell lung cancer. *Future Oncology*, 14(13s), 61–72. <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0099>

- Viktorsson, K., de Petris, L., & Lewensohn, R. (2005). The role of p53 in treatment responses of lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(3), 868–880. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.192>
- Ward, H. E., & Nicholas, T. E. (1984). Alveolar type I and type II cells. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 14(5 Suppl 3), 731–734. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6598039>
- Warheit, D. B., Sayes, C. M., Reed, K. L., & Swain, K. A. (2008). Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacology & Therapeutics*, 120(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.07.001>
- Weerapreeyakul, N., Nonpunya, A., Barusrux, S., Thitimetharoch, T., & Sripanidkulchai, B. (2012). Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line. *Chinese Medicine*, 7(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-7-15>
- Wu, M., Guo, H., Liu, L., Liu, Y., & Xie, L. (2019). Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 14, 4247–4259. <https://doi.org/10.2147/IJN.S201107>
- Yeasmin, S., Datta, H. K., Chaudhuri, S., Malik, D., & Bandyopadhyay, A. (2017). In-vitro anti-cancer activity of shape controlled silver nanoparticles (AgNPs) in various organ specific cell lines. *Journal of Molecular Liquids*, 242, 757–766. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.047>
- Yin, S., Liu, J., Kang, Y., Lin, Y., Li, D., & Shao, L. (2019). Interactions of nanomaterials with ion channels and related mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 176(19), 3754–3774. <https://doi.org/10.1111/bph.14792>
- Yu, K., Chen, B., Aran, D., Charalel, J., Yau, C., Wolf, D. M., van 't Veer, L. J., Butte, A. J., Goldstein, T., & Sirota, M. (2019). Comprehensive transcriptomic analysis of cell lines as models of primary tumors across 22 tumor types. *Nature Communications*, 10(1), 3574. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11415-2>
- Zhang, D., Ramachandran, G., Mothana, R. A., Siddiqui, N. A., Ullah, R., Almarfadi, O. M., Rajivgandhi, G., & Manoharan, N. (2020). Biosynthesized silver nanoparticles using *Caulerpa taxifolia* against A549 lung cancer cell line through cytotoxicity effect/morphological damage. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3421–3427. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.017>
- Zhang, X., & Xiao, C. (2018). Biofabrication of silver nanoparticles and their combined effect with low intensity ultrasound for treatment of lung cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 181, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.03.004>
- Zhang, X.-F., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines: An in Vitro Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1603. <https://doi.org/10.3390/ijms17101603>