



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



BIOINGENIERÍA

EFFECTO ANTITUMORAL SINÉRGICO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
BIOINGENIERO

PRESENTA:
MARÍA DOLORES RIVERA GUZMÁN

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. KARLA OYUKY JUÁREZ MORENO
CO-DIRECTORA DE TESIS:
DRA. DORA LUZ FLORES GUTIÉRREZ

MIEMBROS DEL COMITÉ:
DR. DAVID CERVANTES VÁSQUEZ
DRA. NINA BOGDANCHIKOVA
M.C.S. NAYELI GUADALUPE GIRÓN VÁZQUEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, SEPTIEMBRE 2017

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

**EFFECTO ANTITUMORAL SINÉRGICO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y
FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA:

MARÍA DOLORES RIVERA GUZMÁN

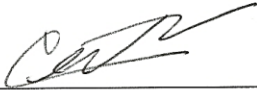
Aprobada por:



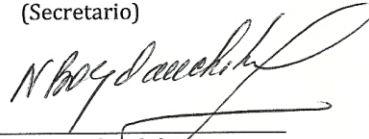
Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Director
(Presidente)



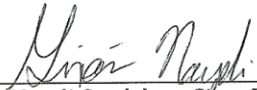
Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez
Codirector
(Secretario)



Dr. David Cervantes Vásquez
Sinodal
(Vocal)



Dra. Nina Bogdanchikova
Sinodal
(Vocal)



M.C.S. Nayeli Guadalupe Giron Vázquez
Sinodal
(Vocal)

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. obtenidos de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.



María Dolores Rivera Guzmán

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la co-dirección de la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno.

Este trabajo fue financiado por los proyectos de Infraestructura del CONACYT No. 269071 y la Red Internacional de Bionanotecnología con impacto en Biomedicina, Alimentación y Bioseguridad bajo la responsabilidad técnica de la Dra. Nina Bogdanchikova (Proyecto CONACYT No. 279889). Durante la realización de este trabajo, la alumna, recibió una beca de ayudantía de investigador SNI del nivel 3 por parte de la Dra. Nina Bogdanchikova.

RESUMEN

Uno de los mayores inconvenientes de la quimioterapia, son sus efectos secundarios tóxicos (cito- y genotóxicos) y la adquisición de resistencia múltiple a fármacos por parte de las células cancerígenas. Esto hace que la quimioterapia sea inefectiva y ocasione una mala prognosis en los pacientes. Por ello, es necesario generar nuevas herramientas para el tratamiento del cáncer con menores efectos secundarios. En este sentido, el uso de nanopartículas de plata (AgNPs) ha sido ampliamente explorado como agente antiproliferativo. Sin embargo, a excepción de las AgNPs Argovit, usadas en este trabajo, se ha reportado que todas las demás formulaciones de AgNPs generan daño genotóxico en células de mamífero a concentraciones levemente superiores de las inhibitorias medias. Además, las AgNPs Argovit, son las únicas que cuentan con certificaciones internacionales para su uso como cosmético y en medicina humana y veterinaria.

Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó *in vitro* el efecto antiproliferativo sinérgico de diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con diversas concentraciones de tamoxifen en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231. El tamoxifen, es uno de los primeros fármacos utilizados en los esquemas de quimioterapia contra el cáncer de mama. Mientras que las líneas celulares fueron seleccionadas porque representan a los dos tipos de cáncer de mama más frecuentes: el hormono-dependiente (MCF-7) y el triple-negativo (MDA-MB-231).

Para evaluar los efectos antiproliferativos de la combinación de AgNPs y tamoxifen, se realizaron ensayos de citotoxicidad por colorimetría por MTT y ensayos de evaluación del tipo de muerte celular mediante citometría de flujo. Además, se evaluó la integridad morfológica de las células mediante microscopía óptica.

Los resultados obtenidos indican que existe un efecto antiproliferativo sinérgico de las AgNPs en combinación con el tamoxifen, lo que provoca una muerte celular potenciada. Se observó que las células MDA-MB-231 son más susceptibles al tratamiento combinado, ya que exhiben una muerte celular tres veces mayor que con los tratamientos individuales con AgNPs o tamoxifen. Mientras que las células MCF-7 resultaron ser menos sensibles al tratamiento combinado, pues únicamente con las concentraciones más altas de tamoxifen y AgNPs se observa una muerte celular de casi 30%. Es decir, al menos dos veces más que con los tratamientos individuales de nanopartículas o fármaco. Estos resultados fueron corroborados mediante citometría de flujo y por microscopía óptica, en donde se observó que en los tratamientos antes mencionados, las células presentaban claros signos de efectos citotóxicos, como son: una disminución considerable de su tamaño, morfología celular redondeada y desprendimiento de la caja de cultivo celular.

Por lo tanto, es posible concluir que existe un efecto sinérgico resultante de la combinación de AgNPs y el fármaco antineoplásico tamoxifen que provoca la muerte de las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno, directora de esta investigación, por la orientación, seguimiento y supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la paciencia, motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos meses.

Agradezco el interés mostrado por mi trabajo, las correcciones y sugerencias recibidas por la Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez, el Dr. David Cervantes Vásquez, la Dra. Nina Bogdanchikova y la M.C.S. Nayeli G. Girón Vázquez, miembros del comité tutorial.

A la “Red Internacional de Bionanotecnología con impacto en Biomedicina, Alimentación y Bioseguridad” por el financiamiento recibido a lo largo de esta tesis a través del proyecto CONACYT No. 279889.

A los profesores de la carrera de bioingeniería UABC, al grupo de Bionanotecnología del CNyN.

Al CONACYT por el financiamiento brindado para realizar este trabajo de investigación a través del Proyecto de Infraestructura No. 269071.

A la Dra. Nina Bogdanchikova por la beca de “Ayudante de SNI 3” otorgada a través del Sistema Nacional de Investigadores del CONACYT.

Quiero hacer extensiva mi gratitud a mis amigos y compañeros de licenciatura, por todas las experiencias que viví con ellos a lo largo de estos 4 años. Pero, sobre todo, quiero agradecer a Alison Ortega, Yarithza Pérez, Perla Contreras y José Gatica, es por ellos que soy lo que soy ahora.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión y paciencia recibido de mis padres y hermanos.

Le agradezco a Dios por haber estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A todos ustedes, muchas gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Generalidades sobre el cáncer de mama.....	12
1.2 El cáncer de mama como problema mundial de salud	14
1.3 La situación del cáncer de mama en México	15
1.4 Tratamientos convencionales contra el cáncer	17
1.5 Efectos secundarios de la quimioterapia	19
1.6 Adquisición de resistencia múltiple a fármacos (MDR) por las células de cáncer	20
1.7 Mecanismos de la resistencia múltiple a fármacos	21
1.8 Estrategias generadas para superar la resistencia múltiple a fármacos en cáncer	22
1.9 Contrarrestando la resistencia múltiple a fármacos con la nanotecnología.....	23
1.10 Nanopartículas de plata como nanomaterial más utilizado en aplicaciones bionanotecnológicas	25
2. HIPÓTESIS	28
3. OBJETIVOS	28
4. METODOLOGÍA	29
4.1. Cultivo de células	29
4.1.1 Subcultivo de las células de cáncer de mama y tripsinización	30
4.2 Criopreservación de células	30
4.3 Preparación de las disoluciones de AgNPs a diferentes concentraciones de plata metálica ...	31
4.4 Ensayos de viabilidad celular por ensayo colorimétrico (reducción del MTT)	33
4.5 Ensayos de sensibilidad celular a fármacos antineoplásicos	36
4.7 Evaluación morfológica de las células de cáncer de mama	39
4.8 Ensayo de muerte celular por apoptosis y necrosis	39
4.9 Análisis estadístico	40
5. RESULTADOS	41
5.1 Determinación in vitro de la concentración media inhibitoria (IC_{50}) de las AgNPs en células de cáncer de mama	41
5.2 Evaluación de la morfología de células de cáncer de mama expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs.....	42
5.3 Evaluación de la muerte celular por apoptosis y necrosis de células de cáncer de mama expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs.....	45
5.4 Determinación in vitro de la concentración media inhibitoria (IC_{50}) del tamoxifen en células de cáncer de mama	46

5.5 Evaluación de la morfología de células de cáncer de mama expuestas a diferentes concentraciones de tamoxifen	48
5.7 Evaluación del tipo de muerte celular por apoptosis y necrosis en células de cáncer de mama expuestas a diferentes concentraciones de tamoxifen	50
5.8 Evaluación el efecto sinérgico de las AgNPs en combinación con tamoxifen en células de cáncer de mama MCF-7	51
5.9 Evaluación de la morfología de células de cáncer de mama MCF-7 expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con tamoxifen	54
5.10 Evaluación del tipo de muerte celular en células de cáncer de mama MCF-7 expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con tamoxifen.....	57
5.11 Evaluación el efecto sinérgico de las AgNPs en combinación con el tamoxifen en células de cáncer de mama MDA-MB-231.....	60
5.12 Evaluación de la morfología de células de cáncer de mama de la línea celular MDA-MB-231 expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con tamoxifen.....	62
5.13 Evaluación del tipo de muerte celular de la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 expuesta a diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con tamoxifen	65
6. DISCUSIÓN	68
7. CONCLUSIONES	72
8. PERSPECTIVAS	73
9. REFERENCIAS	74

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Índice de tablas

Tabla 1. Líneas celulares obtenidas de metástasis.....	13
Tabla 2. Fármacos utilizados para el tratamiento de cáncer de mama	18
Tabla 3. Concentraciones de AgNPs utilizadas en los ensayos MTT para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231	35
Tabla 4. Concentraciones de AgNPs y tamoxifen utilizados en manera conjunta en los ensayos MTT para las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231	38

Índice de figuras

Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial.....	14
Figura 2. Incidencia de tumor maligno de mama en mujeres de 20 años y más, por entidad federativa.	16
Figura 3. Tasa de mortalidad del cáncer de mama por entidad federativa.....	17
Figura 4. Nanopartículas de plata Argovit	32
Figura 5. Evaluación de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de AgNPs en células de cáncer de mama.	42
Figura 6. Evaluación morfológica de la citotoxicidad de las diferentes concentraciones de AgNPs en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con respecto al control. .	43
Figura 7. Evaluación morfológica de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de AgNPs en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con respecto las células control	44
Figura 8. Tipo de muerte celular inducido por las diferentes concentraciones de AgNPs en células de cáncer de mama.	46
Figura 9. Evaluación de la citotoxicidad del tamoxifen a diferentes concentraciones en la línea de cáncer de mama.....	47
Figura 10. Evaluación morfológica del efecto citotóxico de diferentes concentraciones de tamoxifen en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con respecto a las células control	49
Figura 11. Evaluación morfológica del efecto citotóxico de diferentes concentraciones de tamoxifen en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con respecto su control.....	49
Figura 12. Evaluación del tipo de muerte celular inducido por tamoxifen en las líneas celulares de cáncer de mama.	51
Figura 13. Efecto antiproliferativo sinérgico de las AgNPs en presencia de diferentes concentraciones de fármaco tamoxifen en células de cáncer de mama MCF-7...	53
Figura 14. Evaluación morfológica de la línea celular MCF-7 incubada con diferentes concentraciones de AgNPs y tamoxifen.....	56
Figura 15. Evaluación del tipo de muerte celular inducido por la incubación con diferentes concentraciones de AgNPs en células de cáncer de mama MCF-7 y tamoxifen .	59

Figura 16. Evaluación de la actividad citotóxica sinérgica de las diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con diferentes concentraciones de tamoxifen.	61
Figura 17. Evaluación del cambio morfológico inducido en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 en relación a la concentración de AgNPs agregadas en combinación con el tamoxifen.....	64
Figura 18. Evaluación del tipo de muerte celular de la línea celular MDA-MB-231 expuesta a diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con una concentración fija de tamoxifen	67

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades sobre el cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad extremadamente compleja y diversa y es una de las principales causas de muerte en mujeres. El cáncer de mama se caracteriza por el crecimiento no controlado de células malignas en el tejido epitelial mamario. Y puede originarse en el revestimiento interior de los ductos de leche o en los lóbulos que le suministran leche a la glándula mamaria. Un cáncer de mama que empieza desde los ductos es llamado carcinoma ductal (tipo de cáncer de mama más común), mientras que el que se desarrolla en los lóbulos es conocido como carcinoma lobular, que es menos común.

Los primeros síntomas del cáncer de mama usualmente son: un área de tejido grueso en el pecho de la mujer, o un bulto. Del mismo modo, se reportan como síntomas dolores en las axilas y pechos, picaduras o enrojecimiento de la piel del pecho, bultos en las zonas axilares, área de tejido endurecido en los senos, supuración de los senos, descamación de la piel de los senos, cambio de apariencia, forma y tamaño en los senos ¹.

Para la investigación del cáncer de mama humano se dispone de una amplia variedad de líneas celulares obtenidas tanto de animales de experimentación como de pacientes. Las líneas celulares obtenidas de tejido metastásico son bastante más fáciles de obtener que en el caso de los tumores primarios, especialmente cuando las metástasis son a líquido pleural. Estas líneas celulares de cáncer de mama se registran en la Tabla 1 y se clasifican en función de la localización metastásica a partir de la cual han sido aisladas ².

Tabla 1. Líneas celulares obtenidas de metástasis.

Metástasis a líquido pleural	
Origen celular (metástasis a líquido pleural)	Nombre de la línea celular
De carcinoma intraductal	MCF-7, MDA-MB-134VI, MDA-MB-415, MDA-MB-435s, T47D, ZR-75-27, MDA-MB-468, EFM-19, EP, MW, 600 PE, 21-MT-1, 21MT-2, MFM-223, VACC-245, VACC-265, VAVV-1179
De carcinoma papilar	MDA-MB-175VII, DMC-42
De adenocarcinoma	SK-BR-3, MDA-MB-436, MDA-MB-453
De carcinoma medular	MDA-MB-231
De carcinoma lobular	MDA-MB-330
Metástasis a líquido ascítico	
De carcinoma intraductal	ZR-75-1, ZR-75-30

Cabe destacar que, de todas estas líneas, sólo algunas han sido profundamente investigadas desde el punto de vista de su dependencia hormonal, de los receptores de membrana para diferentes factores de crecimiento, de la acción mitogénica o antimitogénica de éstos, etc. El modelo hormono-dependiente de línea celular más utilizada ha sido la MCF-7 (células que son caracterizadas por la de expresión de los receptores de estrógeno, progesterona, HER2 y HER2-) ³, mientras que uno de los prototipos más utilizados para el estudio de células hormono independientes ha sido la línea MDA-MB-231 (células agresivas e invasivas que son resistentes a varios agentes anticancerígenos) ⁴.

1.2 El cáncer de mama como problema mundial de salud

A nivel mundial, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres, con una incidencia que aumenta dramáticamente con la edad ⁵. Para el año 2012, se estimaron 1.67 millones de nuevos casos a nivel mundial (25% de todos los casos de cáncer). La incidencia varía a nivel mundial de manera importante, con rangos de 27 casos por cada 100,000 mujeres en África y el este de Asia, hasta 96 casos por cada 100,000 mujeres en América del norte.

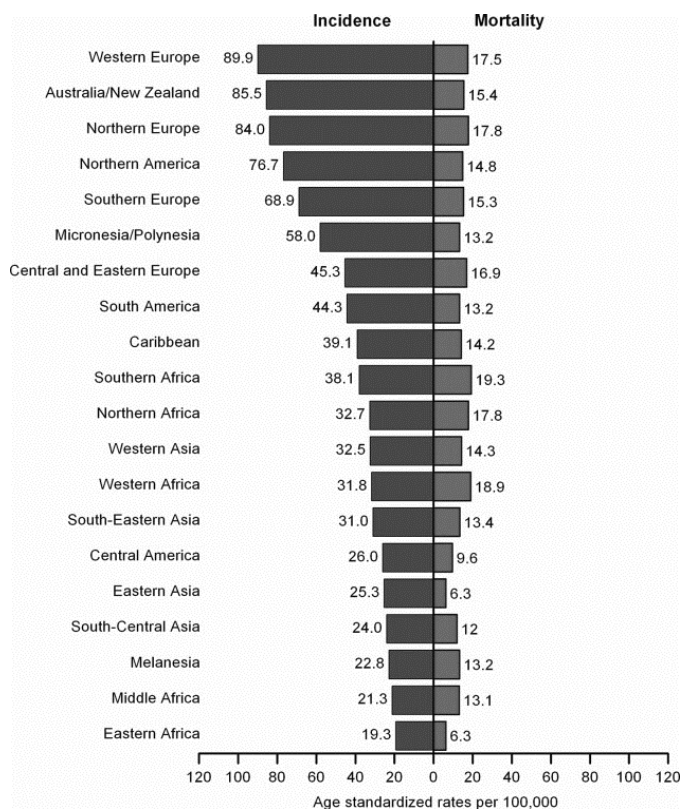


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial. GLOBOCAN 2008.

A nivel mundial, el cáncer de mama se clasifica como la quinta causa de muerte por cáncer (522,000 muertes registradas) del cual representa la causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres provenientes de regiones menos desarrolladas (324,000 muertes registradas,

14.3% del total), y representa ahora la segunda causa de muerte en regiones más desarrolladas (198 muertes registradas, 15.4% del total) después del cáncer de pulmón⁶.

1.3 La situación del cáncer de mama en México

En México, el cáncer de mama también es el más frecuente en mujeres ⁷. De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), para el año 2012, se reportó una incidencia de 26.64 casos por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años.

En 2015, la incidencia de tumor maligno de mama entre la población de 20 años y más es de 14.80 casos nuevos por cada 100,000 personas. En las mujeres, alcanza su punto máximo en las del grupo de 60 a 64 años (68.05 por cada 100,000 mujeres de ese grupo de edad). Por entidad federativa, en 2015, el cáncer de mama tiene mayor incidencia en los estados de Colima, Campeche y Aguascalientes (101.08, 97.60 y 96.85 casos nuevos por cada 100 000 mujeres de 20 y más años, respectivamente).

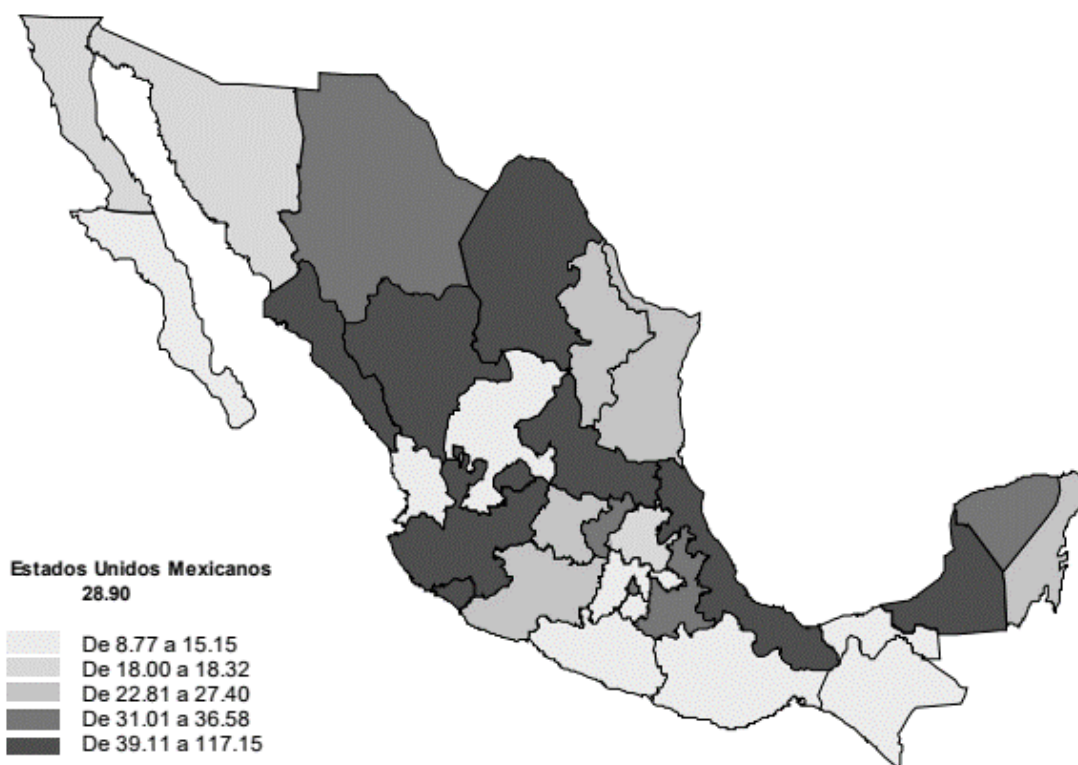


Figura 2. Incidencia de tumor maligno de mama en mujeres de 20 años y más, por entidad federativa. INEGI, 2013.

En 2014, la tasa de mortalidad por tumor maligno de mama en el país es de 15 defunciones por cada 100,000 mujeres de 20 y más años de edad. Por entidad federativa, Coahuila ocupa el primer lugar con la tasa más alta de mortalidad por cáncer de mama en mujeres mayores de 20 años, con 20.92 por cada 100 mil y supera ligeramente al Distrito Federal (19.91) y a Nuevo León con 19.56 fallecimientos por cada 100 mil mujeres. Por otra parte, las entidades con las tasas más bajas son Oaxaca, Guerrero y Campeche (7.65, 8.75 y 8.83 por cada 100 mil mujeres de 20 años y más, respectivamente)⁸.

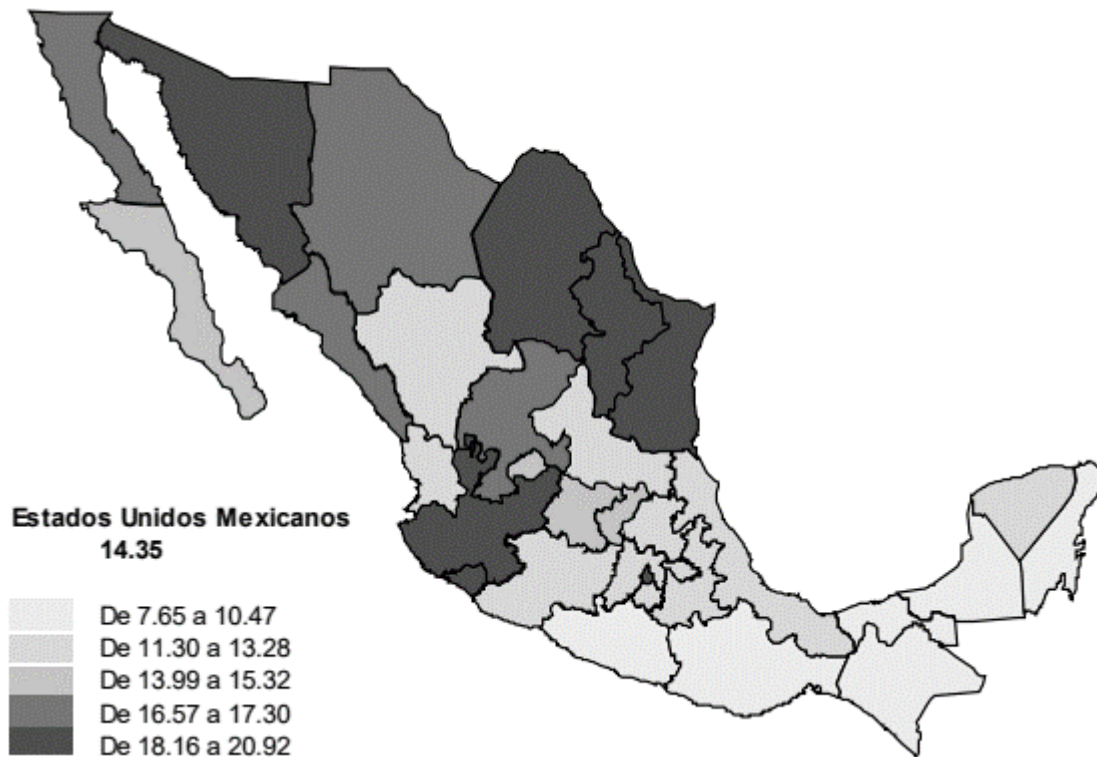


Figura 3. Tasa de mortalidad observada de cáncer de mama en mujeres de 20 años y más, por entidad federativa. INEGI, 2013.

1.4 Tratamientos convencionales contra el cáncer

En la actualidad, el tratamiento primario del cáncer es la cirugía (mastectomía)⁹ o la lumpectomía¹⁰ con el objetivo de extraer el tumor por completo. Sin embargo, existen ocasiones en las que el tumor es imposible de extirpar, en ese caso, la quimioterapia es un tratamiento auxiliar comúnmente utilizado en mujeres con cáncer de alto riesgo. Implica utilizar uno o más de un tipo de fármacos antineoplásicos o quimioterapéuticos que

interfieren con el ADN de las células de rápido crecimiento, debido a que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos, interfieren en el proceso de replicación y/o transcripción.

El propósito de utilizar agentes quimioterapéuticos es para prevenir que las células cancerosas se multipliquen, se propaguen mediante metástasis y ocasionen la muerte del paciente ¹¹. Algunos de estos fármacos se administran oralmente, y se pueden tomar en casa, mientras que otros requieren de una pequeña hospitalización o tratamiento ambulatorio al ser administrados por vía intravenosa. Los fármacos más utilizados para el tratamiento de esta enfermedad se describen en la Tabla 2 ¹².

La mayoría de los fármacos quimioterapéuticos ejercen su efecto sobre la proliferación celular lo que conlleva a la destrucción de las células cancerosas, por lo que la exposición crónica a estos fármacos, puede ocasionar el desarrollo de resistencia a un tipo de medicamento en específico ¹³.

Tabla 2. Fármacos utilizados para el tratamiento de cáncer de mama.

Mecanismo de acción	Nombre en español
Agentes alquilantes	Ciclofosfamida, cisplatino, oxaliplatino
Antimetabolitos	5-fluoroacilo (5-FU), citarabina, 6-mercaptopurina, fludarabina fosfato
Antibióticos citotásticos	Dactinomicina, bleomicina, daunomicina, doxorubicina
Agentes antimitóticos	Vinblastina, vincristina, paclitaxol
Inhibidores de la topoisomerasa I	Irinotecán (CPT-11)
Agentes hormonales	Antiestrógeno (tamoxifen)

1.5 Efectos secundarios de la quimioterapia

Una gran cantidad de tratamientos quimioterapéuticos tienen efectos citotóxicos en células normales los cuales provocan efectos secundarios en el paciente ¹⁴.

Los efectos gastrointestinales son los más frecuentes. Las náuseas, vómitos y trastornos del ritmo intestinal (diarrea, estreñimiento) son casi generales en todo tipo de quimioterapia ¹⁵. El ondasetrón, el tropisetrón y el granisetrón son fármacos muy activos que evitan el vómito inmediato tras la administración del quimioterapéutico. Así, hoy día es rara la toxicidad gastrointestinal tras la quimioterapia. La diarrea suele ser más una consecuencia de la mucositis (inflamación de las mucosas) que en muchas ocasiones acompaña al tratamiento. Se suele presentar la segunda semana después del tratamiento quimioterapéutico. En ocasiones, se acompaña de mucositis rectal (hemorroides) ¹⁶. La mucositis es una complicación frecuente. En ocasiones, puede ser importante, impidiendo que la persona pueda ingerir alimentos.

Por otro lado, las infecciones oculares como la conjuntivitis se pueden presentar después de la segunda semana de tratamiento. En ocasiones, es facilitada por la caída de las pestañas que provocan algunos tratamientos quimioterapéuticos. El tratamiento es sintomático con colirios de lágrimas artificiales.

A veces los tratamientos provocan alteraciones ungueales, que pueden producir la caída de la uña. Se suele presentar en las uñas de los pies donde los pequeños traumatismos de la

marcha actúan sobre una uña debilitada por el tratamiento quimioterapéutico. La alopecia es la toxicidad más frecuente que ocasiona el tratamiento con antraciclinas (adriamicina). La alopecia secundaria a las antraciclinas suele ser universal y se recupera tras finalizar el tratamiento. El ritmo de recuperación del cabello es de 8 a 12 mm por mes.

Los efectos secundarios hormonales también son apreciables después de un tratamiento con quimioterapéuticos, por ejemplo, en las pacientes premenopáusicas, la quimioterapia puede producir amenorrea. Los trastornos del ciclo menstrual no son raros. En ocasiones, las menstruaciones son muy abundantes, y se precisa un aporte férrico para evitar la anemia. La anemia se suele presentar como una toxicidad acumulada tras varios ciclos de tratamiento. El aporte de hierro puede ser de ayuda. Es más habitual que la anemia sea secundaria a los desarreglos del ciclo menstrual¹⁷. Por otra parte, fármacos antineoplásicos de tipo hormonal, como el tamoxifen, producen efectos secundarios como la ausencia de la menstruación, aumento de los síntomas de la menopausia, sofocaciones, aumentos de peso, sequedad vaginal e incremento en el riesgo de fenómenos tromboembólicos¹⁸.

1.6 Adquisición de resistencia múltiple a fármacos (MDR) por las células de cáncer

La quimioterapia es el tratamiento más efectivo durante el periodo logarítmico del crecimiento de las células cancerosas. Sin embargo, cuando los tumores se vuelven macroscópicos la efectividad de varios agentes quimioterapéuticos se ve reducida debido a que sólo parte de la población celular se encuentra dividiendo activamente.

Teóricamente, si la población celular se puede reducir lo suficiente por otros métodos como la cirugía o la radioterapia, la quimioterapia podría ser más efectiva debido a la alta fracción de las células restantes que se encontrarían en el crecimiento logarítmico ¹⁹.

La adquisición de resistencia múltiple a fármacos (MDR, *Multi-Drug Resistance* por sus siglas en inglés), es un fenómeno donde el tratamiento con un agente quimioterapéutico confiere resistencia a ese fármaco y a varios otros agentes no relacionados. Los tumores usualmente consisten en mezclas de poblaciones de células malignas, algunas de las cuáles son fármaco-sensibles mientras que otros son fármaco-resistentes. La quimioterapia mata a las células fármaco-sensibles, pero deja en medio una alta proporción de células fármacoresistentes. A medida que el tumor comienza a crecer de nuevo, la quimioterapia puede fallar debido a que el tumor restante es ahora resistente ²⁰.

1.7 Mecanismos de la resistencia múltiple a fármacos

La resistencia a las terapias se ha correlacionado con la presencia de al menos dos “bombas” o transportadores moleculares en las membranas de células tumorales que activamente expulsan los fármacos quimioterapéuticos del interior celular. Esto permite que las células tumorales evadan los efectos citotóxicos de los fármacos.

Las bombas proteicas comúnmente encontradas para conferir MDR en células de cáncer de

mama pertenecen a la familia de transportadores ABC, algunos ejemplos más importantes son la glicoproteína-P (Pgp, codificada por el gen *ABCB1*), la proteína asociada a la resistencia múltiple a fármacos (MRP1, codificada por el gen *ABCC1*), y la también conocida proteína de resistencia de cáncer de mama BCRP, la cual es codificada en el gen *ABCG2*²¹.

Las pacientes con cáncer que no responden a la quimioterapia, usualmente tienen una alta cantidad de RNA mensajero para la expresión proteica de varias de las bombas transportadoras ABC, las cuales se localizan en el lado citoplasmático de la membrana, resultando una expulsión incrementada del fármaco²².

Debido a su función e importancia, este tipo de proteínas y sus genes se han convertido en uno de los blancos moleculares para el estudio de los tratamientos para combatir el cáncer²³.

1.8 Estrategias generadas para superar la resistencia múltiple a fármacos en cáncer

A la fecha debido a la falta de métodos *in vivo* para la detección de la MDR, varios de los fenotipos tumorales sólo pueden ser detectados mediante el aislamiento de las células cancerosas de los tejidos primarios y realizando pruebas de su tolerancia a los fármacos quimioterapéuticos.

Los indicadores de resistencia comúnmente utilizados incluyen las mediciones de la concentración media inhibitoria (IC₅₀, del inglés *Inhibitory Concentration*), índice de resistencia (RI, del inglés *Resistance Index*), la tasa de expulsión de fármacos citotóxicos, el índice de proliferación celular, la curva de crecimiento celular y el índice de apoptosis, entre algunos otros.

Entre los ensayos comúnmente utilizados para probar la resistencia de las células tumorales se encuentran el ensayo de viabilidad celular por reducción de sales de tetrazolio o MTT, experimentos de acumulación y retención de doxorubicina, pruebas de sensibilidad a fármacos, detección de los genes de resistencia múltiple a fármacos, tecnología con chips genéticos y la tecnología de detección de alto rendimiento para la identificación de los genes que confieren a la resistencia múltiple a fármacos, los cuales involucran técnicas de biología molecular como la técnica de microarreglos ²⁴.

1.9 Contrarrestando la resistencia múltiple a fármacos con la nanotecnología

La MDR es uno de los grandes desafíos en la quimioterapia ²⁵, y por lo tanto, se han desarrollado varias estrategias para superarla, como la modificación de los regímenes de quimioterapia, inactivación de genes y bloqueo de las proteínas MDR, uso de inhibidores de los transportadores ABC, etc. ²⁶. Sin embargo, ninguna ha sido totalmente efectiva y existe una necesidad para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas contra la MDR en los pacientes

con cáncer.

De acuerdo con diversas investigaciones, la nanotecnología ofrece una serie de estrategias para contrarrestar la MDR. Las nanopartículas son plataformas excelentes para mejorar la eficacia terapéutica de los agentes anticancerígenos debido a sus propiedades fisicoquímicas con las que se puede reducir la toxicidad y potencialmente evitar el problema de la resistencia a fármacos ²⁷.

Cabe destacar que debido a su tamaño nanométrico, las nanopartículas pueden atravesar el flujo de los fármacos de las proteínas transportadoras ABC ya que se internalizan mediante endocitosis específica (i.e. mediada por receptor) lo que resulta en una mayor acumulación del fármaco ²⁸.

Los nanomateriales son definidos como aquellos materiales cuyos principales componentes tengan un tamaño de entre 1 y 100 nanómetros; se usan actualmente en diversas aplicaciones y productos de consumo tecnológico. Los nanomateriales en medicina son utilizados en la investigación relacionada con la cura de enfermedades o reparación de tejidos dañados ²⁹.

Los nanomateriales presentan aplicaciones potenciales en el área oncológica, las cuales involucran:

- (i) Prevención y control del cáncer,
- (ii) Detección temprana del cáncer,
- (iii) Mejorar la técnica de visualización y obtener la localización exacta del tumor,
- (iv) Entrega específica hacia las células cancerígenas de fármacos eficaces contra el

tumor.

1.10 Nanopartículas de plata como nanomaterial más utilizado en aplicaciones bionanotecnológicas

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son uno de los nanomateriales con mayores aplicaciones biomédicas³⁰. Las AgNPs, son clústeres de átomos de plata con un intervalo de tamaño de 1 a 100 nm. Es bien sabido que la plata tiene potentes efectos antimicrobianos, además, ya se ha reportado las propiedades antibacterianas, antivirales, antimicóticas y antiinflamatorias³¹ de diferentes formulaciones de AgNPs, algunas de las cuales han demostrado tener una baja genotoxicidad en células humanas³⁴. Además, el tratamiento de tumores sólidos mediante AgNPs ha sido posible debido a su tamaño nanométrico.

Diversos estudios *in vitro* han demostrado el efecto antineoplásico de las AgNPs en diferentes tipos de células de cáncer, debido al incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), muerte celular programada, disrupción de la función mitocondrial, depleción de ATP, arresto celular y apoptosis^{33,34}. Además, se ha demostrado que los efectos citotóxicos y genotóxicos en líneas celulares de mamífero expuestos a las AgNPs son tiempo y dosis dependiente³⁵.

En este punto, es importante mencionar que las diversas formulaciones de AgNPs que se encuentran disponibles en el mercado, difieren en la forma de la nanopartícula, distribución

de tamaño, estabilidad de la nanopartícula, proceso de síntesis, contenido de plata metálica y funcionalización de la superficie. Todos estos factores afectan la citotoxicidad, así como las propiedades químicas superficiales de las AgNPs, que juegan un mayor papel en la interacción de las nanopartículas con los sistemas biológicos.

Se ha reportado que los efectos citotóxicos y genotóxicos, entre otros dependen del tamaño de la nanopartícula ^{36, 37, 38}. Tomando en consideración los efectos citotóxicos de diferentes formulaciones de las AgNPs, se decidió utilizar la preparación comercial Argovit™ como fuente de AgNPs. Este producto ha sido aprobado en Rusia y otros países para su uso en aplicaciones veterinarias y humanas ³⁹.

Hasta la fecha, las AgNPs Argovit son las únicas que cuentan con certificados internacionales de instancias gubernamentales para su uso en aplicaciones médicas. Por ejemplo, cuentan con el certificado del dispositivo médico: esponja hemostática bioabsorbible para su uso interno y externo en cuerpo humano, otorgado por el Servicio Federal de Vigilancia en Salud y Desarrollo Social de Rusia, con número de registro 2011/10301 FSP, desde el 27 de enero de 2014 sin límite de caducidad durante todo el tiempo de producción del dispositivo. Además, cuenta con el certificado de Conclusión Sanitario-Epidemiológico para productos cosméticos con aplicación de gel y crema con base en Argovit, con número de registro N1324458, otorgado por el Servicio Federal de Regulación Técnica y Metrología de Rusia el 23 de octubre de 2013 ³⁹. Y actualmente se comercializan en México por la empresa *Bionag*, con uso cosmético para el tratamiento de enfermedades de la piel como úlceras del pie diabético, dermatitis, etc.

1.11 Antecedentes relevantes de las AgNPs para inhibir la función de la glicoproteína-P (P-gp)

En un estudio publicado por Kóvacš en 2015, se reportó que, en células de cáncer de colon resistentes a fármacos antineoplásicos, las AgNPs pueden reducir significativamente la transcripción de la proteína P-gp, disminuyendo el nivel de expresión de esta proteína y también inhibiendo significativamente su actividad como transportador de fármacos. Por lo tanto, se demostró que las AgNPs son capaces de inhibir la actividad del eflujo de ciertos quimioterapéuticos en células cancerígenas con resistencia a fármacos mediante la inhibición de la proteína P-gp. De esta forma, se determinó que la combinación de las AgNPs con diferentes fármacos antineoplásicos, restauraba la susceptibilidad a dichos fármacos por parte de células de cáncer de colon quimiorresistentes ⁴⁰.

Hasta la fecha y de acuerdo con nuestro conocimiento, el trabajo reportado por Kóvacš y colaboradores, es el único en el que se ha reportado el uso de las AgNPs para modular la función de un transportador de fármacos de la familia ABC, y cuya implicación biológica, radica en la restauración de la sensibilidad a fármacos antineoplásicos por parte de células quimiorresistentes, demostrando con ello que su eficacia en tratamientos terapéuticos puede ser explorada *in vitro* e *in vivo*.

2. HIPÓTESIS

La combinación de un fármaco antineoplásico con AgNPs tiene un efecto de antiproliferación sinérgico en células de cáncer de mama.

3. OBJETIVOS

Establecer las concentraciones adecuadas de AgNPs y fármaco antineoplásico para generar un efecto antitumoral sinérgico *in vitro* en células de cáncer de mama.

Objetivos específicos:

- a) Determinar *in vitro* la concentración media inhibitoria (IC_{50}) de las AgNPs en células de cáncer de mama.
- b) Determinar *in vitro* la IC_{50} de un fármaco antineoplásico convencional en células de cáncer de mama.
- c) Evaluar el efecto sinérgico que tienen las AgNPs en combinación con el fármaco antineoplásico en células de cáncer de mama.

4. METODOLOGÍA

4.1. Cultivo de células

Para el cultivo y mantenimiento de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) y MCF-7 (ATCC HTB-22), se utilizó el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Media también conocido como DMEM (Sigma-Aldrich Cat. D777) que contiene sales inorgánicas, aminoácidos esenciales, vitaminas, glucosa y rojo fenol. Para las células MDA-MB-231, el medio de cultivo se preparó al disolver 13.5 g de medio DMEM en polvo en 1 litro de agua desionizada previamente esterilizada. Además, se le agregaron 10 ml de L-glutamina (Sigma-Aldrich Cat. G6392), 10 ml de solución antibiótica/antimitótica (Sigma Aldrich Cat. A5955) y 100 ml de suero fetal bovino (Bench-Mark Gemini, Bio Products, USA), los componentes adicionales se agregaron para enriquecer el medio de cultivo y el antibiótico para evitar la contaminación por microorganismos. El medio de cultivo para las células MCF-7 fue el DMEM adicionalmente suplementado con 10 mg de insulina recombinante bovina (Sigma Aldrich Cat. I1882). Una vez preparados, los medios se esterilizaron por filtración a través de un filtro con un poro de 0.22 μm .

Los cultivos celulares se realizaron en cajas Petri de cultivo celular de 10 cm sensibilizadas debido a que las células MDA-MB-231 y MCF-7 son de tipo adherente. Las cajas con el cultivo celular se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Las células se mantuvieron en cultivo hasta que se observó una confluencia celular del 80-90%, en ese caso las células eran despegadas de la caja Petri y cultivadas en una nueva caja. Este procedimiento se realizó para obtener un

subcultivo y favorecer la fase *lag* de las células de cáncer. Para desprender las células de cáncer adheridas a la caja de cultivo se utilizó tripsina/EDTA que es una enzima proteolítica que hidroliza los enlaces de unión intra e intercelulares.

4.1.1 Subcultivo de las células de cáncer de mama y tripsinización

Para realizar el subcultivo celular, primero se retiró el medio de cultivo de las cajas Petri, se realizó un lavado adicionando 3 ml de PBS 1X estéril y se agregó 1 ml de tripsina/ EDTA e inmediatamente se incubaron las cajas a 37° C durante 3 minutos. Después se agregó 1 ml de PBS 1X estéril. Y se recuperaron las células en un tubo cónico estéril de 15 ml y se aforó con medio de cultivo a 10 ml para inactivar la acción de la tripsina/EDTA. Posteriormente, se centrifugaron las células a 1,200 rpm durante 5 minutos a 21°C. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron con 2 ml de medio de cultivo. Las células se distribuyeron equitativamente en dos cajas Petri de cultivo celular nuevas de 10 cm con 10 ml de medio de cultivo cada una. Por último, los cultivos celulares se colocaron en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂. Todo el procedimiento se realizó bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel A2.

4.2 Criopreservación de células

La criopreservación de las células es una técnica comúnmente utilizada para almacenar grandes cantidades de células congelándolas evitando la cristalización y la lisis celular. Para ello se utiliza un medio especial de criopreservación, compuesto por 50% de medio de cultivo

celular (v/v), 40% de suero fetal bovino (v/v) y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (v/v). Para llevar a cabo la criopreservación de las células cultivadas en placas de Petri, primero se realizó una tripsinación del cultivo para separar las células individuales. Después, se colocaron en un tubo cónico estéril de 15 ml y se aforó con 10 ml de medio de cultivo. Posteriormente, se centrifugaron las células a 1,200 rpm durante 5 minutos a 21°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 2 ml de medio de criopreservación por cada millón de células. Las células se colocaron en criotubos (1ml por cada millón de células). Por último, los criotubos se congelaron a -70°C hasta el momento de realizar los ensayos correspondientes.

4.3 Preparación de las disoluciones de AgNPs a diferentes concentraciones de plata metálica

Las AgNPs de la formulación Argovit™, fueron proporcionadas por la Red Internacional de Bionanotecnología con impacto en Biomedicina, Alimentación y Bioseguridad (CONACyT). Proviene del Centro de Investigación y desarrollo Vector-Vita, Rusia. Tienen un tamaño promedio de 30 ± 15 nm y un diámetro hidrodinámico de 70 nm³⁸. En la figura 4, se presentan imágenes por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las AgNPs Argovit™, las cuales son una solución al 20% (en peso) de AgNPs que consiste en 1.2% de plata metálica y que se encuentran recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP, 10-30 kD) al 18.8% (w/v). La concentración de plata metálica del producto es de 12,000 µg/mL⁴¹.

Las diferentes diluciones de trabajo de AgNPs, se realizaron tomando en cuenta la

concentración de plata metálica presente en la solución de Argovit. Por lo tanto, cuando se hace referencia a la concentración de AgNPs, es importante considerar que se refiere en realidad al contenido total de plata metálica presente en dicha disolución. Las concentraciones para los tratamientos se obtuvieron al realizar diluciones de 1:10 y 1:100 de AgNPs al 20% en medio DMEM con el objetivo de no tomar menos de 1 μ l de volumen al momento de agregarlas a las cajas de cultivo.

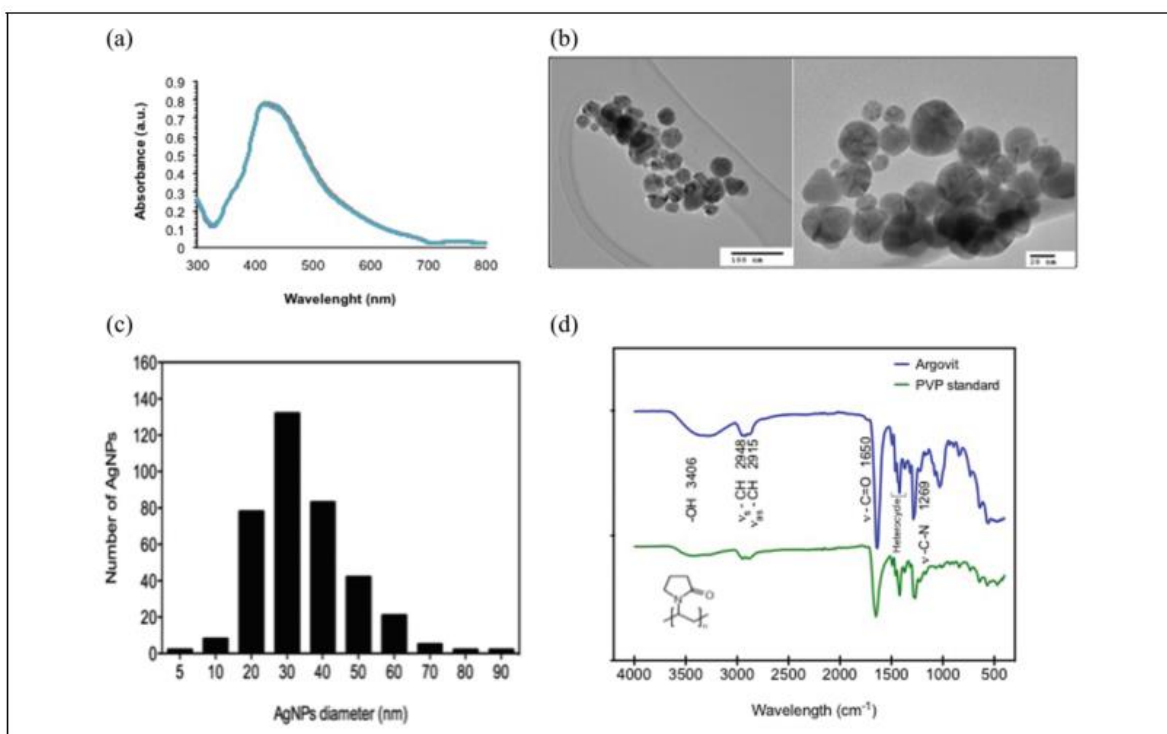


Figura 4. Nanopartículas de plata ArgovitTM. (a) Espectro UV-VIS de la preparación de las AgNPs en agua desionizada. (b) AgNPs observadas por microscopía electrónica de transmisión. (c) Histograma de dispersión de tamaño de las nanopartículas de las AgNPs. (d) Espectro ATR-FTIR de las AgNPS comparadas con el espectro del PVP sólido. Juárez-Moreno Karla, 2016.

4.4 Ensayos de viabilidad celular por ensayo colorimétrico (reducción del MTT)

La reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es considerado como un estándar en los ensayos de citotoxicidad, ya que es altamente sensible y se ha catalogado como un ensayo de detección de alto rendimiento. Por lo tanto, en este trabajo se realizaron diferentes experimentos por triplicado para evaluar el efecto citotóxico y el efecto sinérgico de las AgNPs y del fármaco antineoplásico mediante ensayos colorimétricos para medir la viabilidad celular, como el ensayo en placa por reducción del reactivo MTT.

Para el ensayo de viabilidad celular por reducción del MTT, se colocaron 12,500 células MCF-7 ó MDA-MB-231 en cada pozo de una placa de 96-pozos y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Después del tiempo de incubación, se prepararon las concentraciones de AgNPs descritas en la Tabla 3 en un volumen final de 100 µl de medio de cultivo. Una vez que se prepararon las diferentes soluciones de trabajo de las AgNPs, éstas se agregaron a las concentraciones asignadas a cada pozo y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Adicionalmente, se utilizó medio de cultivo sin AgNPs como blanco y como control negativo, se agregó DMSO, el cual induce muerte celular.

Al término del tiempo de incubación con AgNPs, el medio de cultivo fue descartado y las placas se lavaron tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos PBS 1x a pH 7.4. Posteriormente, se agregaron 10 µl del reactivo MTT (a una concentración de 5 mg/ml)

(Sigma-Aldrich M-8910) y 90 μ l de medio DMEM sin suplementar, y se incubaron en total oscuridad por 4 horas a 37°C con un atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, se agregaron 100 μ l de isopropanol absoluto para disolver los cristales del formazán y se incubó la placa por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Por último, la absorbancia de la placa de cultivo celular fue medida con un espectrofotómetro de placa a 570 nm, tomándose como referencia (blanco) una longitud de onda de 690 nm, este valor fue restado de los valores de la absorbancia a 570 nm de cada medición.

Los resultados se graficaron tomando en cuenta el valor de la absorbancia obtenido para el control positivo (células MCF-7 y MDA-MB-231 en medio de cultivo sin AgNPs) como el 100% de viabilidad celular. Posteriormente, las mediciones de absorbancia para cada condición experimental fueron convertidas a porcentajes de sobrevivencia celular, teniendo como referencia el valor del control positivo. Todos los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente y con triplicados internos para su comparación. Los datos se presentan como el promedio de los experimentos con su respectiva desviación estándar.

Tabla 3. Concentraciones de AgNPs utilizadas en los ensayos MTT para las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231.

Tratamiento	Concentración de AgNPs (µg/ml)
NP1	20
NP2	10
NP3	5
NP4	2.5
NP5	1.25
NP6	0.625
NP7	0.325
NP8	4.5
NP9	4
NP10	3.5
NP11	3
NP12	2
NP13	1.5
NP14	1
NP15	0.5
NP16	0.5
NP17	0.45
NP18	0.40
NP19	0.35
NP20	0.30
NP21	0.20
NP22	0.15
NP23	0.10
NP24	0.05

4.5 Ensayos de sensibilidad celular a fármacos antineoplásicos

La viabilidad de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 en presencia de diferentes concentraciones de tamoxifen fue determinada por ensayos de viabilidad celular, los cuales se realizaron de la misma forma descrita en la sección 4.4. Estas concentraciones se reportan utilizadas anteriormente en otros trabajos demostrando que estas no ejercen actividad genotóxica^{53, 54, 55, 57, 58}.

4.6 Ensayos de sinergia de AgNPs y fármacos antineoplásicos en células de cáncer de mama

Con el objetivo de analizar el efecto sinérgico que produce el tamoxifen en conjunto con las AgNPs en las dos líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, primeramente, se seleccionaron los cuatro tratamientos con AgNPs de la Tabla 3 en donde se obtuvo una viabilidad celular del 80, 75, 50 y 25%. Posteriormente se decidió combinar estos tratamientos con el fármaco antineoplástico tamoxifen (Sigma-Aldrich Cat. T5648).

Para llevar a cabo el ensayo de viabilidad celular por reducción del MTT, se colocaron 12,500 células de cáncer de mama (de línea celular MCF-7 ó MDA-MB-231) en cada pozo de una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5 % de CO₂. Después del tiempo de incubación, se prepararon las concentraciones de AgNPs descritas en la Tabla 4 y se agregaron al mismo tiempo que las concentraciones de tamoxifen que también están

indicadas en la Tabla 4. Después de haber agregado los tratamientos asignados a cada pozo, las células se incubaron por 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Adicionalmente, se utilizó medio de cultivo sin AgNPs y sin tamoxifen como control positivo de viabilidad celular y DMSO sin AgNPs y sin tamoxifen como control negativo de viabilidad celular. Los tratamientos así como la incubación de las células con éstos, fueron realizados en oscuridad.

Al término del tiempo de tratamiento el medio de cultivo se descartó y las placas con células se enjuagaron tres veces con la solución PBS1x. Posteriormente, se agregaron 10 µl de la solución del reactivo MTT (5 mg/ml) y 90 µl de medio DMEM sin suplementar, y se incubaron en total oscuridad por 4 horas a 37°C con un atmósfera de 5% de CO₂. Por último, se añadieron 100 µl de isopropanol absoluto para solubilizar los cristales de formazán, incubando las células por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm, tomándose como referencia (blanco) una longitud de onda de 690 nm.

Los resultados obtenidos se graficaron tomando en cuenta el valor de la absorbancia obtenido para el control positivo (células MCF-7 y MDA-MB-231 en medio de cultivo sin AgNPs) como el 100% de viabilidad celular. Las mediciones de absorbancia para cada condición experimental fueron convertidas a porcentajes de sobrevivencia teniendo como referencia el valor del control positivo. Todos los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente y con triplicados internos para su comparación. Los datos se presentan como el promedio de los experimentos con su respectiva desviación estándar.

Tabla 4. Concentraciones de AgNPs y tamoxifen utilizados en manera conjunta en los ensayos MTT para las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231.

Tratamiento	Concentración AgNPs (µg/ml)	Concentración De tamoxifen (µg/mL)
A1	5	5.51
A2	4.5	5.51
A3	3.5	5.51
A4	2.5	5.51
B1	5	7.43
B2	4.5	7.43
B3	3.5	7.43
B4	2.5	7.43
C1	5	9.28
C2	4.5	9.28
C3	3.5	9.28
C4	2.5	9.28
D1	-----	5.51
D2	-----	7.43
D3	-----	9.28
E1	5	-----
E2	4.5	-----
E3	3.5	-----
E4	2.5	-----

4.7 Evaluación morfológica de las células de cáncer de mama

Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 fueron sembradas en cajas de 12 pozos con medio DMEM y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente, las células se trataron con las distintas concentraciones de AgNPs y tamoxifen utilizadas en los ensayos de sinergia descritos en la Tabla 4 y se incubaron nuevamente durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Después de este procedimiento, la morfología celular se visualizó con un microscopio invertido Axio LabA1 (Zeiss, Alemania) y se tomaron fotografías de cada tratamiento para su posterior comparación.

4.8 Ensayo de muerte celular por apoptosis y necrosis

Se llevó a cabo el análisis de muerte celular inducido por apoptosis y necrosis de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 incubadas con AgNPs, tamoxifen y con los tratamientos de sinergia. Las mediciones se realizaron mediante citometría de flujo utilizando una tinción celular con ioduro de propidio y YO-PRO® (Thermofisher Cat. V13243). La fluorescencia se detectó a 235 nm con el filtro BL1, a 230 nm con el filtro BL2, a 300 nm con el filtro BL3 y a 400 nm con el filtro BL4. Los datos de la citometría de flujo fueron analizados mediante el software Attune NxT (Life Technologies) y graficados como el resultado de la medición de tres repeticiones.

4.9 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron de manera independiente por triplicado y con triplicados internos. Los datos se evaluaron mediante la prueba de Krustal-Wallis y mediante análisis de la varianza (ANOVA) con uno y dos factores mediante el software GraphPad Prism versión 7.03. Los resultados se consideraron estadísticamente significantes cuando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

Para establecer las concentraciones adecuadas de AgNPs y fármacos antineoplásicos para generar un efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama, fue necesario determinar *in vitro* la concentración media inhibitoria (IC_{50}) de las AgNPs en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

5.1 Determinación in vitro de la concentración media inhibitoria (IC_{50}) de las AgNPs en células de cáncer de mama

Para determinar la concentración media inhibitoria (IC_{50}) de las AgNPs en células de cáncer de mama, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Como se muestra en la Figura 5, estos resultados fueron graficados como el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la concentración de AgNPs añadidas al cultivo.

En la Figura 5a, se observa un decremento en la viabilidad de las células de cáncer de mama MCF-7, con respecto a la concentración de AgNPs adicionadas, en un claro efecto dosis-dependiente. En el caso de la viabilidad de las células MDA-MB-231 que se muestra en la figura 5b, se observa que conforme se aumenta la concentración de AgNPs se reduce la viabilidad celular, lo cual también se le atribuye a un efecto dosis-dependiente. Es de destacar que en las concentraciones de 4.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs se observa que la viabilidad celular

cae abruptamente hasta llegar a una viabilidad del 17 % aproximadamente, lo que es considerado como una citotoxicidad franca.

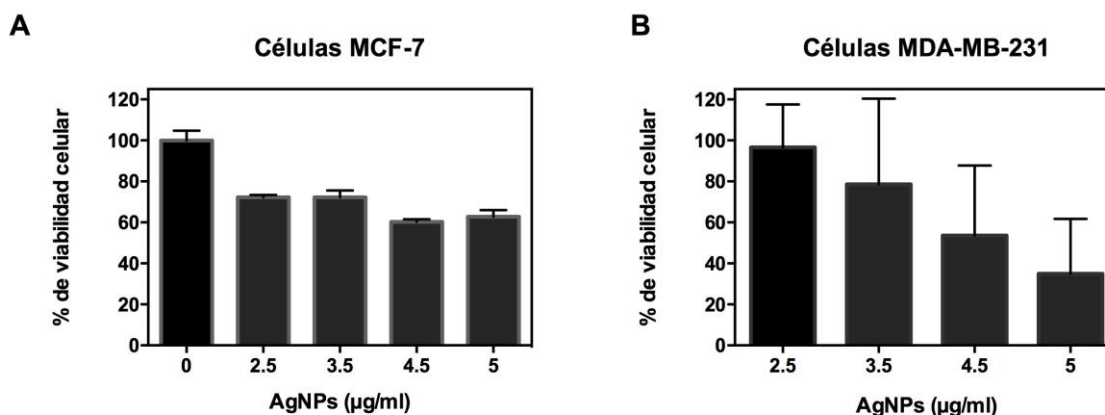


Figura 5. Evaluación de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de AgNPs en células de cáncer de mama a) MCF-7 y b) MDA-MB-231.

De esta forma, los resultados mostrados en la Figura 5, permiten determinar que la IC_{50} de las AgNPs es de 7.45 $\mu\text{g/ml}$ para la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y 4.53 $\mu\text{g/ml}$ para la línea celular MDA-MB-231. Por lo que, aparentemente, la línea celular más susceptible al tratamiento con AgNPs es la MDA-MB-231, pues se requiere de una menor concentración de nanopartículas para ocasionar una muerte celular del 50%.

5.2 Evaluación de la morfología de células de cáncer de mama expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs

Se sabe que los cambios drásticos en la morfología de la célula están asociados a los procesos

de muerte celular, y debido a que los resultados graficados en la Figura 5 demostraron un decremento en la viabilidad celular, se decidió tomar fotografías para corroborar dichos resultados.

Después de haber incubado las células de cáncer de mama MCF-7, con las diferentes concentraciones de AgNPs, se documentó el cambio en la morfología celular. Como se observa en la Figura 6, conforme aumenta la concentración de AgNPs existe una mayor cantidad de células desprendidas de la monocapa celular. Además, es evidente la modificación de la morfología de las células y su tamaño respecto de las células control, que no fueron tratadas con AgNPs. Lo que demuestra una muerte celular que va incrementando con respecto a la concentración de nanopartículas añadidas.

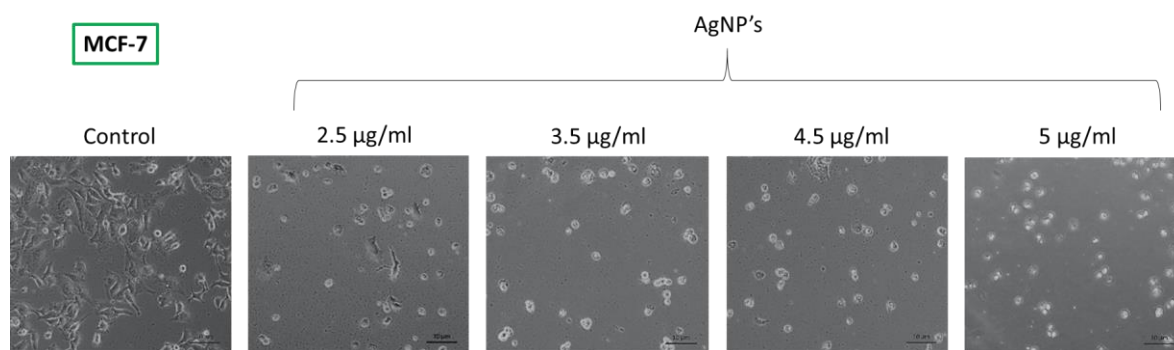


Figura 6. Evaluación morfológica de la citotoxicidad de las diferentes concentraciones de AgNPs en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con respecto al control (células sin AgNPs). Observado por microscopía óptica a un aumento de 100x.

En el caso de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, en la Figura 7, se observa que a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs no existen cambios morfológicos significativos con respecto al control (células sin tratamiento), pero en las concentraciones de 3.5, 4.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs se observa un desprendimiento de las células de la monocapa, además de cambios en el tamaño y morfología celular, ya que claramente las células son más pequeñas y de forma irregular, además que se encuentran totalmente desprendidas de la monocapa celular, lo que evidentemente denota un proceso de muerte celular.

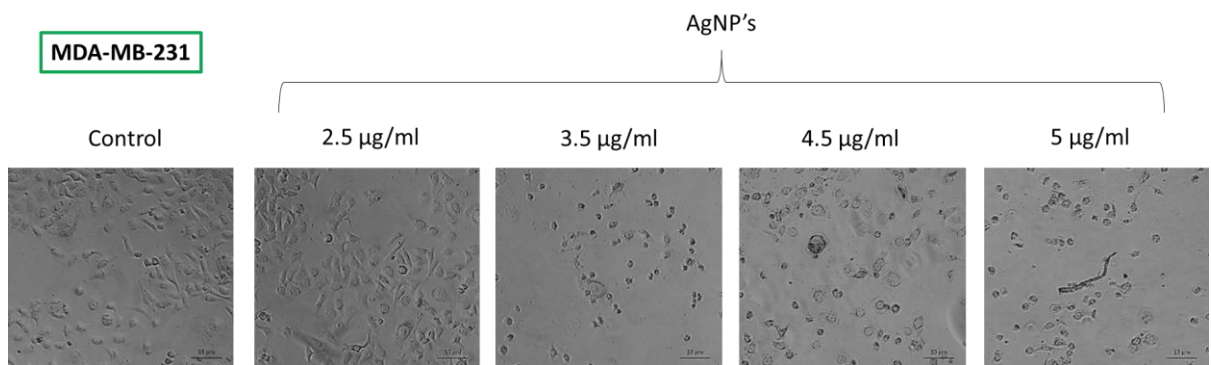


Figura 7. Evaluación morfológica de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de AgNPs en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con respecto a las células control (sin AgNPs). Observado por microscopía óptica a un aumento de 100x.

5.3 Evaluación de la muerte celular por apoptosis y necrosis de células de cáncer de mama expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs.

Para determinar el tipo de muerte (necrosis o apoptosis) que ocasionaba la exposición de AgNPs en células de cáncer de mama, se realizó un análisis por citometría de flujo. Estos resultados se muestran en la Figura 8, en donde se graficaron como el porcentaje de eventos registrados para cada tipo de muerte celular, con respecto a la concentración de AgNPs añadidas al cultivo.

Para el caso de las células de cáncer de mama MCF-7, en la Figura 8a se puede observar que las células sin AgNPs (0 $\mu\text{g/ml}$) presentan 1.59% de necrosis, 8.69% de apoptosis temprana y un 11.53% de apoptosis tardía. Exceptuando la concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs en donde se registra 1.06% de necrosis, 9.75% de apoptosis temprana y un 22.92% de apoptosis tardía en las células, en todas las demás concentraciones de AgNPs, la inducción tanto de la necrosis como de la apoptosis es muy similar al control sin tratamiento. Sin embargo, esto cambia en la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs, en donde se presenta un 12.83% de apoptosis temprana y 37.49% de apoptosis tardía.

En la Figura 8b, para el caso de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 sin AgNPs (0 $\mu\text{g/ml}$) se presenta 0.91% de necrosis, 1.17% de apoptosis temprana y un 1.52% de apoptosis tardía. Para todas las concentraciones de AgNPs utilizadas, se observa la misma cantidad de necrosis inducida en las células. Sin embargo, el tipo de apoptosis tardía, es diferente, siendo mucho mayor a concentraciones de 2.5; 3.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs.

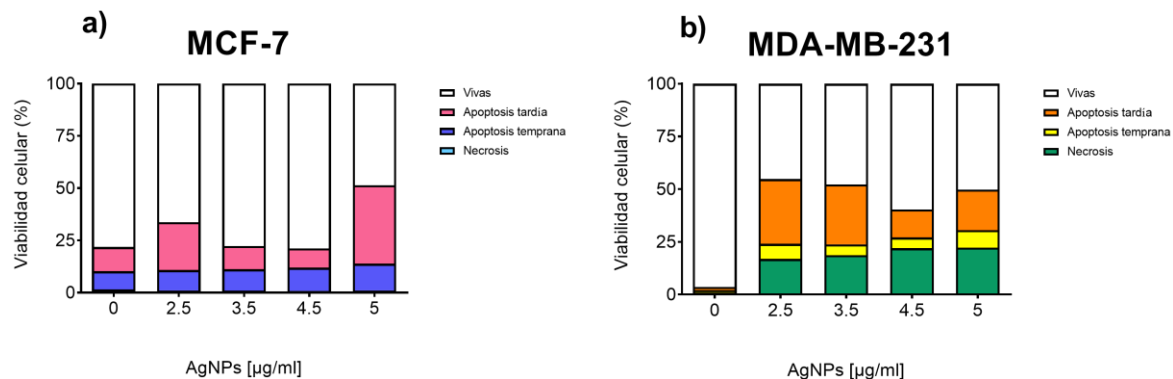


Figura 8. Tipo de muerte celular inducido por las diferentes concentraciones de AgNPs en células de cáncer de mama. a) en la línea celular MCF-7 y b) en la línea celular MDA-MB-231.

5.4 Determinación in vitro de la concentración media inhibitoria (IC_{50}) del tamoxifen en células de cáncer de mama

Para determinar la concentración media inhibitoria (IC_{50}) del tamoxifen en células de cáncer de mama, se realizaron ensayos de viabilidad celular, como se muestra en la Figura 9. Estos resultados, se graficaron como el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la concentración de tamoxifen añadido al cultivo.

En la Figura 9a, se muestran los resultados de la evaluación citotóxica del tamoxifen en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, en donde se observa un decremento de la viabilidad

celular conforme aumenta la concentración de fármaco añadido, lo cual demuestra un efecto dosis-dependiente. De la misma manera, para las células de cáncer de mama MDA-MB-231, se muestran los resultados en la Figura 9b, en donde se observa un decremento de la viabilidad celular conforme aumenta la concentración de tamoxifen añadido, por lo que también se demuestra un efecto dosis-dependiente.

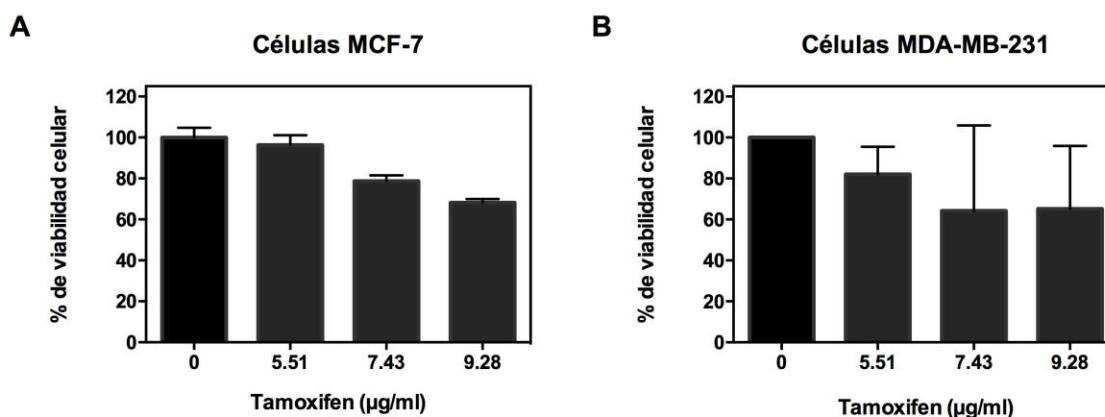


Figura 9. Evaluación de la citotoxicidad del tamoxifen a diferentes concentraciones en la línea de cáncer de mama a) MCF-7 y b) MDA-MB-231.

Entonces, los resultados mostrados en la Figura 9, nos permiten determinar que la IC_{50} del tamoxifen es de 4.50 µg/ml para la línea celular MCF-7 y para el caso de la línea celular MDA-MB-231 es de 4.66 µg/ml.

5.5 Evaluación de la morfología de células de cáncer de mama expuestas a diferentes concentraciones de tamoxifen

Como se mencionó anteriormente, los cambios en la morfología de la célula, están asociados a los procesos de muerte celular, y debido a que los resultados graficados en la Figura 9 demuestran un decremento en la viabilidad celular, se decidió tomar fotografías de las células tratadas con diferentes concentraciones de tamoxifen para corroborarlos.

Después de incubar las células MCF-7 con las diferentes concentraciones de tamoxifen, se tomaron fotografías como se ilustra en la Figura 10, en donde se observa que conforme aumenta la concentración del fármaco, existe una mayor cantidad de células desprendidas de la monocapa. Sin embargo, este cambio es gradual conforme aumenta la concentración del fármaco antineoplásico. Además del desprendimiento de las células, también se observa una ligera modificación de la morfología y del tamaño de algunas células de cáncer de mama.

En la Figura 11, se observan los cambios morfológicos, producidos por la incubación de las diferentes concentraciones de tamoxifen en las células de cáncer de mama MDA-MB-231. Es evidente que conforme aumenta la concentración de tamoxifen existe una mayor cantidad de células desprendidas de la monocapa, y se observa un ligero cambio en el tamaño y la morfología celular.

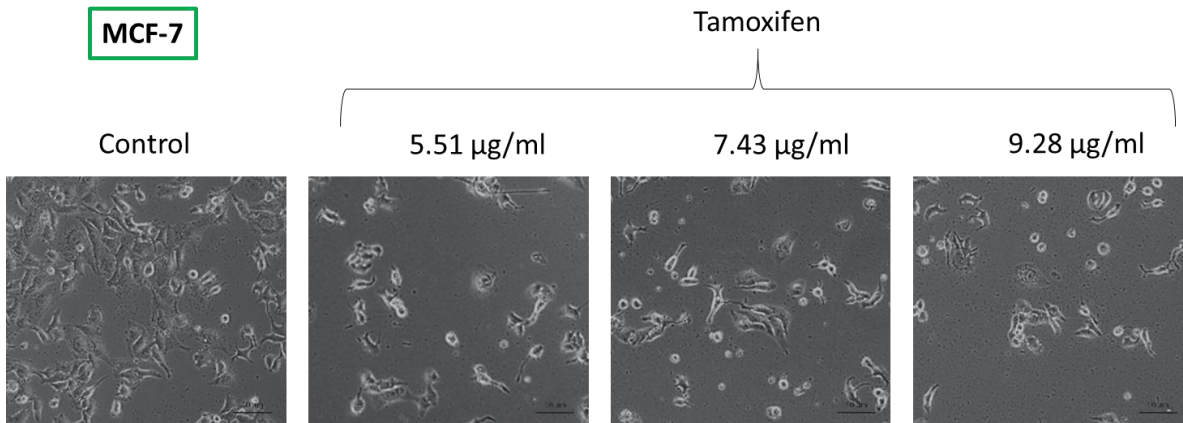


Figura 10. Evaluación morfológica del efecto citotóxico de diferentes concentraciones de tamoxifen en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con respecto a las células control (sin tratamiento). Observado por microscopía óptica a un aumento de 100x.

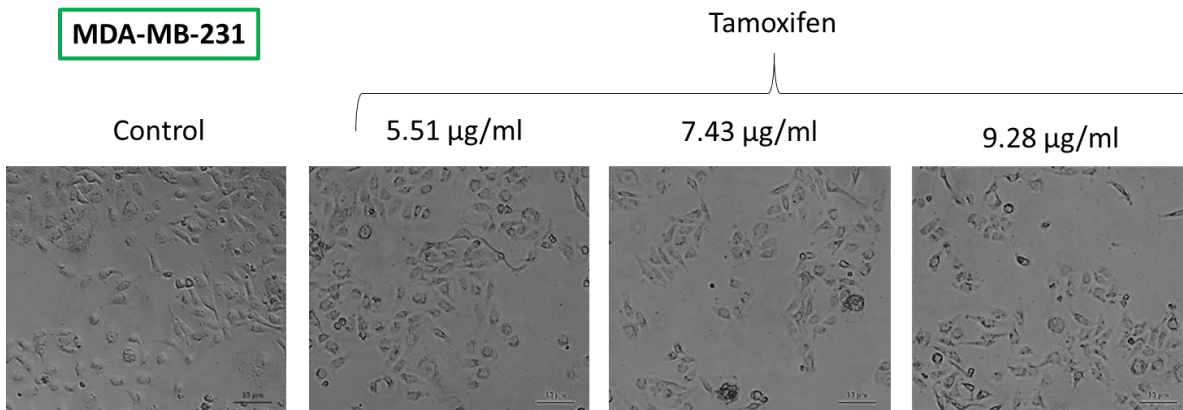


Figura 11. Evaluación morfológica del efecto citotóxico de diferentes concentraciones de tamoxifen en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con respecto su control (células sin tratamiento). Observado por microscopía óptica a un aumento de 100x.

5.7 Evaluación del tipo de muerte celular por apoptosis y necrosis en células de cáncer de mama expuestas a diferentes concentraciones de tamoxifen

Para determinar el tipo muerte celular (por apoptosis o necrosis) que ocasionaba la exposición de células de cáncer de mama al tamoxifen, se realizó un análisis por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 12, estos resultados, se graficaron como el porcentaje del tipo de muerte celular (necrosis, apoptosis temprana y apoptosis tardía), así como la viabilidad celular con respecto a la concentración de tamoxifen añadida al cultivo.

En la Figura 12a se puede observar que las células de cáncer de mama MCF-7 sin tamoxifen (0 $\mu\text{g/ml}$) presentan 1.59% de necrosis, 8.69% de apoptosis temprana y un 11.53% de apoptosis tardía. Posteriormente, se observa un efecto dosis-dependiente de la apoptosis tardía respecto del aumento de la concentración del fármaco. De tal modo que a una concentración de 7.43 $\mu\text{g/ml}$ se presenta 27.09% de apoptosis temprana y un 12.94% de apoptosis tardía. Mientras que para la concentración de 9.28 $\mu\text{g/ml}$ se registra 13.80% de apoptosis temprana y un 26.53% de apoptosis tardía.

En la Figura 12b se puede observar que las células de cáncer de mama MDA-MB-231 sin tamoxifen (0 $\mu\text{g/ml}$) presentan 0.91% de necrosis, 1.17% de apoptosis temprana y un 1.52% de apoptosis tardía. Posteriormente, se observa un efecto dosis-dependiente de la apoptosis tardía respecto del aumento de la concentración del fármaco. De tal modo que a una concentración de 5.51 $\mu\text{g/ml}$ se presenta 6.66% de apoptosis temprana y un 19.18% de apoptosis tardía. Mientras que para la concentración de 7.43 $\mu\text{g/ml}$ se registra 6.37% de

apoptosis temprana y un 19.66% de apoptosis tardía. Finalmente, a una concentración de 9.28 $\mu\text{g/ml}$ se presenta 6.16% de apoptosis temprana y un 26.46% de apoptosis tardía.

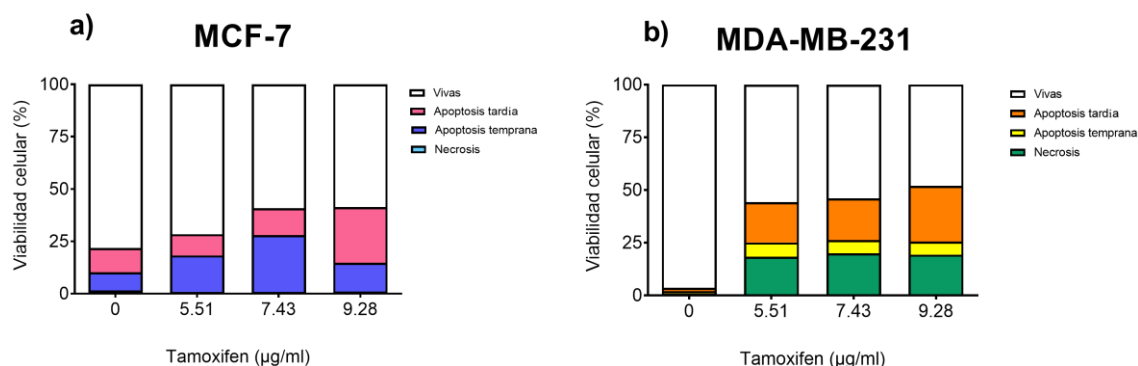


Figura 12. Evaluación del tipo de muerte celular inducido por tamoxifen en las líneas celulares de cáncer de mama a) MCF-7 y b) MDA-MB-231.

5.8 Evaluación el efecto sinérgico de las AgNPs en combinación con tamoxifen en células de cáncer de mama MCF-7

Para evaluar el efecto sinérgico que tienen las AgNPs en combinación con el fármaco antineoplásico en células de cáncer de mama MCF-7, se realizaron ensayos de viabilidad celular, como se muestra en la Figura 13. Estos resultados, se graficaron como el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la concentración de AgNPs añadidas al cultivo y la concentración de tamoxifen utilizado.

Las barras grises de la Figura 13 corresponden a las diferentes concentraciones de AgNPs agregadas al cultivo, mientras que las barras de color morado representan los tratamientos con las diferentes concentraciones de AgNPs y 5.51 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen. Para los tratamientos con AgNPs y 7.43 $\mu\text{g/ml}$ de fármaco, se graficaron los resultados con barras de color azul y para la concentración de 9.28 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen las barras son de color anaranjado.

Como se puede observar en la Figura 13 existe una disminución de la viabilidad celular cuando se agregan diferentes concentraciones de las AgNPs, y este comportamiento es dependiente de la concentración. Se observa una disminución de la viabilidad en las concentraciones de 2.5 y 3.5 $\mu\text{g/ml}$ en combinación con 5.51; 7.43 y 9.28 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen. Por lo que se puede decir que para esas concentraciones de tamoxifen las nanopartículas ayudan a potenciar la muerte celular.

Por otro lado, se observa que no existe una diferencia significativa en la disminución de la viabilidad celular al ser tratadas con 4.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ AgNPs y 5.51 y 7.43 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen. Sin embargo, a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ AgNPs y 25 μM de tamoxifen, sí se observa una diferencia significativa en el tratamiento.

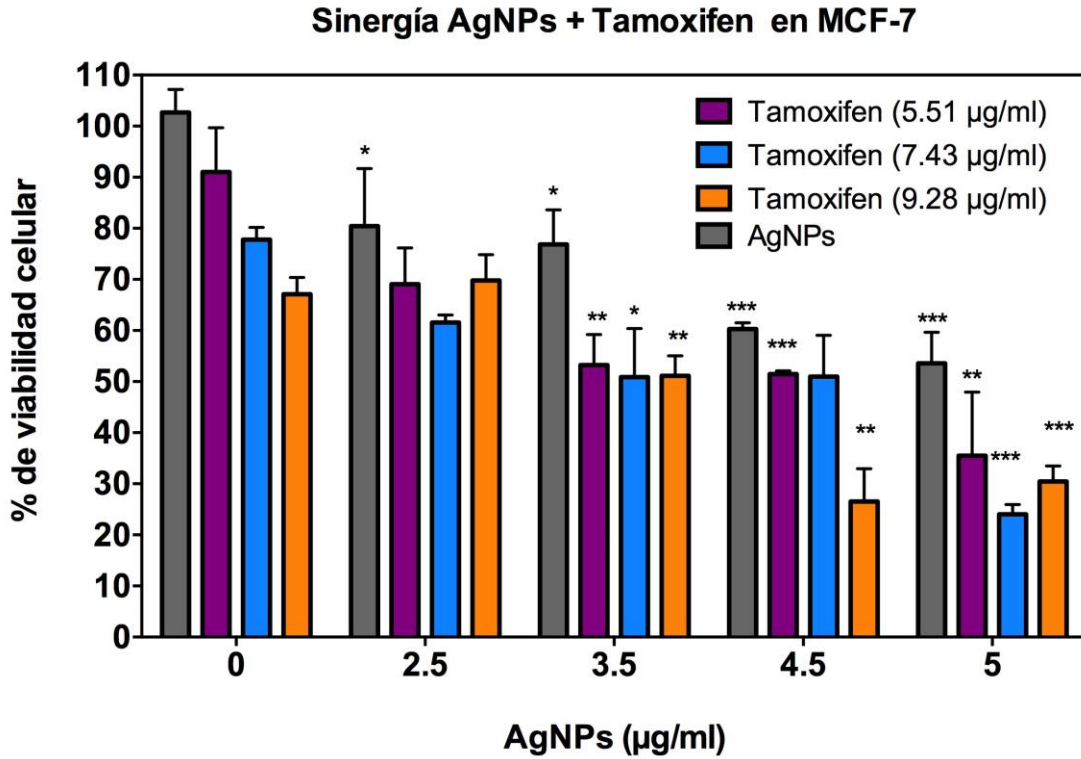


Figura 13. Efecto antiproliferativo sinérgico de las AgNPs en presencia de diferentes concentraciones de fármaco tamoxifen en células de cáncer de mama MCF-7. Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

5.9 Evaluación de la morfología de células de cáncer de mama MCF-7 expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con tamoxifen

Debido a que los resultados graficados en la Figura 13 demuestran un decremento en la viabilidad celular que depende de la combinación de las diferentes concentraciones de AgNPs y fármaco antineoplásico, se decidió tomar fotografías para corroborar dichos resultados.

Después de incubar las células MCF-7 en presencia de diferentes concentraciones de tamoxifen y AgNPs se tomaron las fotografías que se observan en la Figura 14.

En la Figura 14a es posible observar una muerte celular potenciada conforme aumenta la concentración de AgNPs en combinación con una concentración fija de 7.43 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen. Cabe destacar, que en las concentraciones de 3.5, 4.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs, se observa que todas las células han cambiado de morfología y tamaño, además de que su desprendimiento de la placa de cultivo celular es evidente.

También, en la Figura 14b se observa una muerte celular potenciada conforme aumenta la concentración de AgNPs en combinación con una concentración fija de 7.43 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen. Se observa que todas las células han cambiado de morfología, tamaño y que están

desprendidas de la superficie de la placa de cultivo, siendo evidente que a 5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs, existen muy pocas células adheridas a la caja.

Por otro lado, en la Figura 14c se observan cambios en la morfología celular más significativos, en donde se demuestra que las concentraciones de 3.5, 4.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs en combinación con una concentración fija de 9.28 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen, ocasionan un efecto citotóxico en las células MCF-7, provocando un cambio más drástico de tamaño, morfología y la pérdida de la adhesión a la placa de cultivo celular.

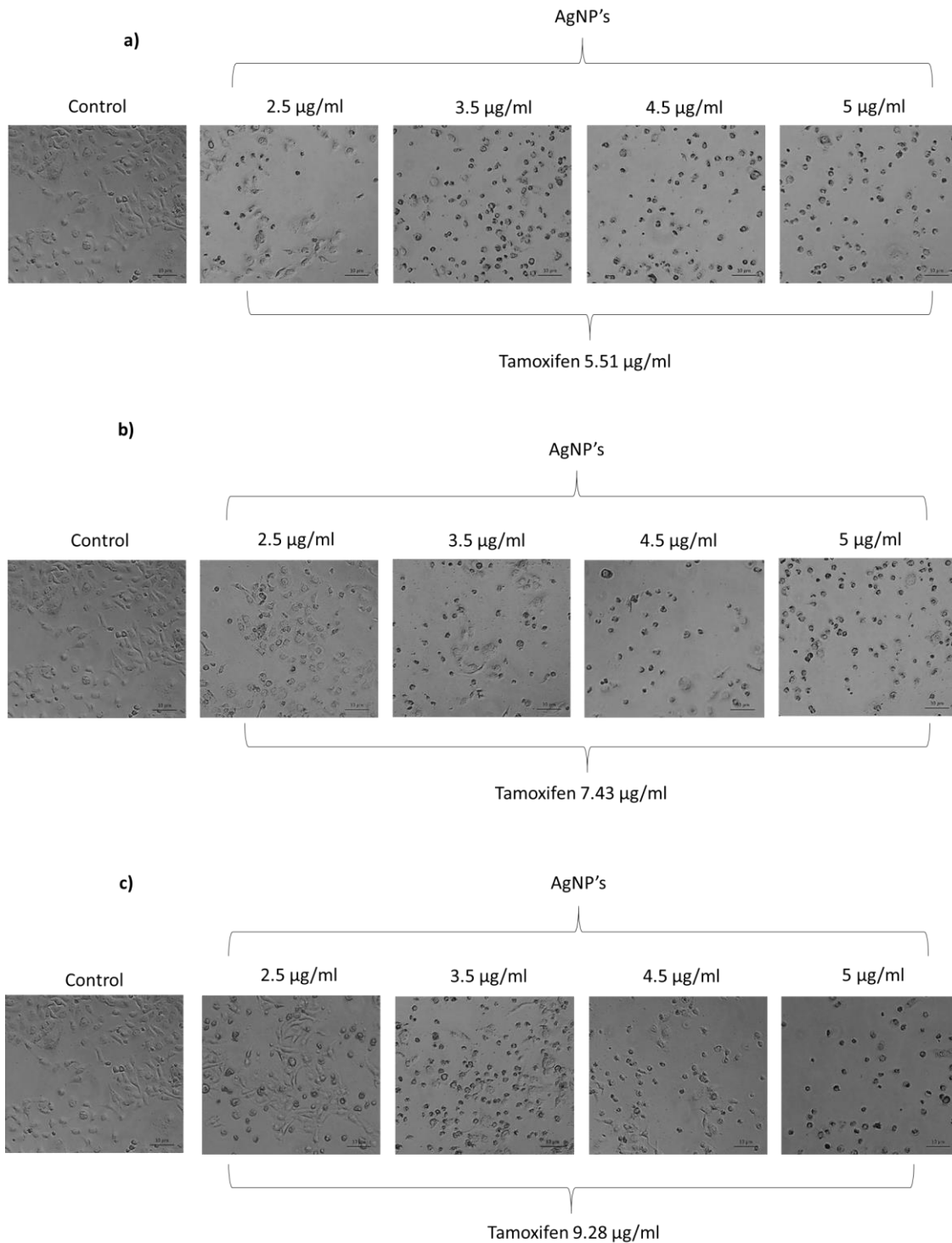


Figura 14. Evaluación morfológica de la línea celular MCF-7 incubada con diferentes concentraciones de AgNPs y tamoxifen. Observado por microscopía óptica a un aumento de 100x.

5.10 Evaluación del tipo de muerte celular en células de cáncer de mama MCF-7 expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con tamoxifen

Para determinar el tipo de muerte celular que ocasionaba la exposición a diferentes concentraciones de AgNPs en combinación de una concentración fija de tamoxifen, en células de cáncer de mama MCF-7, se realizó un análisis por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 15, los resultados se graficaron como el porcentaje del tipo de muerte celular y de células vivas respecto de la concentración de AgNPs añadidas al cultivo.

En la Figura 15a se pueden observar los resultados para el tratamiento de las células MCF-7 incubadas con 5.51 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen y concentraciones crecientes de AgNPs. En los resultados se muestra que las células control, es decir aquellas sin tratamiento con AgNPs (0 $\mu\text{g/ml}$) ni tamoxifen presentan 1.59% de necrosis, 8.69% de apoptosis temprana y un 11.53% de apoptosis tardía. Exceptuando los datos obtenidos para la concentración de 3.5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs (0.90% de necrosis, 13.57% de apoptosis temprana y un 38.23% de apoptosis tardía), en las demás concentraciones de AgNPs, se presenta un incremento en la apoptosis tardía que es proporcional al incremento de la concentración de AgNPs utilizadas, siendo las concentraciones de 4.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs las que presentan un mayor porcentaje de apoptosis tardía, siendo estos 21.64% y 24.39%, respectivamente.

Mientras que para los tratamientos con 7.43 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen, las células MCF-7 sin tratamiento presentaron un 1.59% de necrosis, 8.69% de apoptosis temprana y un 11.53% de

apoptosis tardía. Y exceptuando a los resultados del porcentaje de apoptosis tardía inducido con la incubación con 4.5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs, todas las demás concentraciones de AgNPs, indujeron apoptosis tardía en una mayor proporción que la apoptosis temprana y este comportamiento es dosis-dependiente. Siendo el mejor tratamiento para las concentraciones de 3.5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs en donde se presenta 1.3% de necrosis, 11.28% de apoptosis temprana y un 19.47% de apoptosis tardía y 5 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs, en el que se registraron 1.07% de necrosis, 11.57% de apoptosis temprana y un 25.27% de apoptosis tardía.

Para los tratamientos con 9.28 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen (Figura 15c), las células MCF-7 sin tratamiento presentaron 1.59% de necrosis, 8.69% de apoptosis temprana y un 11.53% de apoptosis tardía. Y exceptuando a los resultados del porcentaje de apoptosis tardía inducido con la incubación con 2.5 y 4.5 $\mu\text{g/ml}$ en AgNPs, se presenta un incremento en la apoptosis tardía que es proporcional al incremento de la concentración de AgNPs utilizadas, siendo la concentración de 3.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ en AgNPs las que presentan un mayor porcentaje de apoptosis tardía, siendo estos 21.37% y 22.54%, respectivamente.

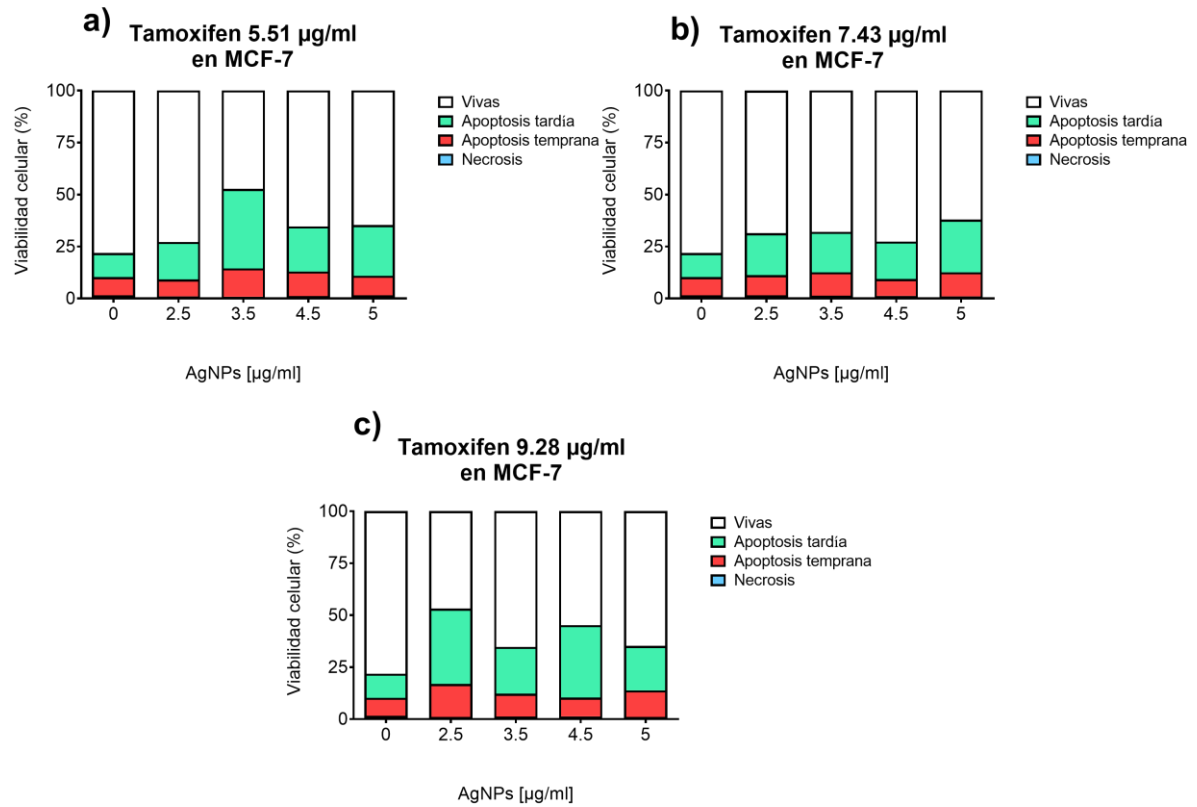


Figura 15. Evaluación del tipo de muerte celular inducido por la incubación con diferentes concentraciones de AgNPs en células de cáncer de mama MCF-7 y las siguientes concentraciones de tamoxifen: a) 5.51 $\mu\text{g/ml}$, b) 7.43 $\mu\text{g/ml}$ y c) 9.28 $\mu\text{g/ml}$.

5.11 Evaluación el efecto sinérgico de las AgNPs en combinación con el tamoxifen en células de cáncer de mama MDA-MB-231

Para evaluar el efecto sinérgico que tienen las AgNPs en combinación con el fármaco antineoplásico en células de cáncer de mama MDA-MB-231, se realizaron ensayos de viabilidad celular, como se muestra en la Figura 16. Estos resultados, se graficaron como el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la concentración de AgNPs añadidas al cultivo y la concentración de tamoxifen utilizado.

Las barras grises de la Figura 16 corresponden a las diferentes concentraciones de AgNPs agregadas al cultivo, mientras que las barras de color azul representan los tratamientos con las diferentes concentraciones de AgNPs y 5.51 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen. Para los tratamientos con AgNPs y 7.43 $\mu\text{g/ml}$ se graficaron los resultados con barras de color rojo y para 9.28 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen de color verde. Como se puede observar en la Figura 16, existe una disminución de la viabilidad celular cuando se agregan diferentes concentraciones de las AgNPs, y este comportamiento es dependiente de la concentración. Por otro lado, se observa que no existe una diferencia significativa en la disminución de la viabilidad celular al ser tratadas con AgNPs y 5.51 y 7.43 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen. Sin embargo, a una concentración de 9.28 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen, sí se observan diferencias significativas en el tratamiento.

Sinergia AgNPs + Tamoxifen en MDA-MB-231

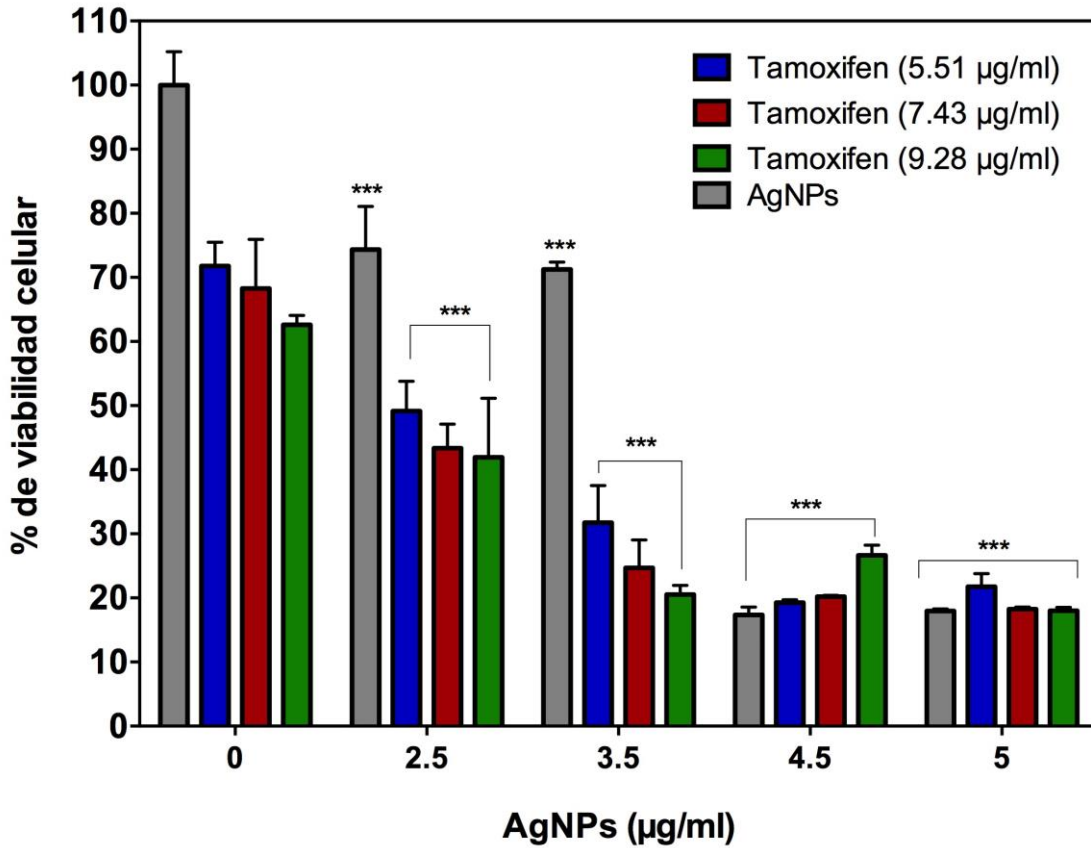


Figura 16. Evaluación de la actividad citotóxica sinérgica de las diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con diferentes concentraciones de tamoxifen en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

5.12 Evaluación de la morfología de células de cáncer de mama de la línea celular MDA-MB-231 expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con tamoxifen

Debido a que los resultados graficados en la Figura 16 demuestran un decremento en la viabilidad celular en los tratamientos de sinergia se decidió tomar fotografías para corroborar dichos resultados.

En la Figura 17a se observa una muerte de las células MDA-MB-231 que es potenciada conforme aumenta la concentración de AgNPs en combinación con una concentración fija de 5.51 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen. Además, se observa que todas las células han cambiado de morfología y tamaño y existe un desprendimiento de células en todas las concentraciones evaluadas de AgNPs en combinación con tamoxifen.

Para el caso de la Figura 17b, se observa una muerte celular potenciada conforme aumenta la concentración de AgNPs en combinación con una concentración fija de 7.43 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen. Es posible observar que las células han cambiado de morfología y se han hecho mucho más pequeñas y redondas, además de que se observan células que se han desprendido de la placa de cultivo y esto es evidente en todas las concentraciones de AgNPs en combinación con Tamoxifen.

En la Figura 17c, se observa una muerte celular mucho más evidente conforme aumenta la concentración de AgNPs añadidas al cultivo celular en combinación con una concentración

fija de 9.28 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen. En las fotografías, es posible identificar que las concentraciones mayores de los tratamientos, ocasionan que las células cambien su morfología a una más redondeada y pequeña. Además de que se desprenden de la caja de cultivo celular, los cuales son claro signos de que las células tienen algún tipo de daño.

MCF-7

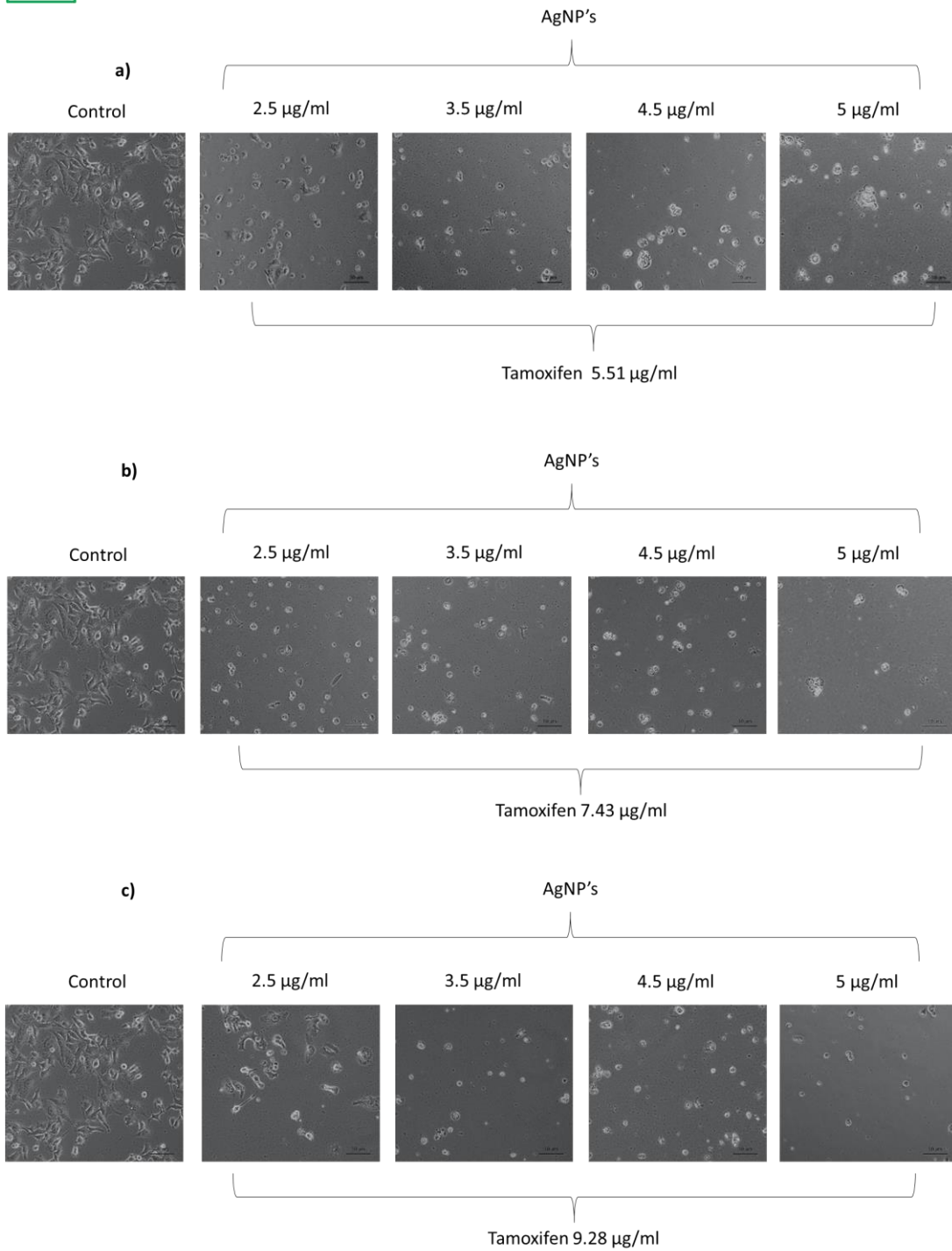


Figura 17. Evaluación del cambio morfológico inducido en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 en relación a la concentración de AgNPs agregadas en combinación con el tamoxifen. Observado por microscopía óptica a un aumento de 100x.

5.13 Evaluación del tipo de muerte celular de la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 expuesta a diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con tamoxifen

Para determinar el tipo de muerte celular que ocasionaba la exposición de diferentes concentraciones de AgNPs en combinación de una concentración fija de tamoxifen en células de cáncer de mama MDA-MB-231, se realizó un análisis por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 15, los resultados se graficaron como el porcentaje del tipo de muerte celular con respecto de la concentración de AgNPs añadidas al cultivo.

En la Figura 18a se puede observar los resultados para el tratamiento de las células MCF-7 incubadas con 5.51 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen y concentraciones crecientes de AgNPs. En los resultados se muestra que las células control, es decir aquellas sin tratamiento con AgNPs (0 $\mu\text{g/ml}$) ni tamoxifen presentan 0.91% de necrosis, 1.17% de apoptosis temprana y un 1.52% de apoptosis tardía. A una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$, se registra 22.56% de necrosis, 5.72% de apoptosis temprana y un 17.17% de apoptosis tardía. A una concentración de 3.5 $\mu\text{g/ml}$ se presenta 21.9% de necrosis, 4.81% de apoptosis temprana y un 21.81% de apoptosis tardía. A una concentración de 4.5 $\mu\text{g/ml}$ se registra 25.36% de necrosis, 5.49% de apoptosis temprana y un 15.29% de apoptosis tardía. A una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ se presenta 24.02% de necrosis, 5.03% de apoptosis temprana y un 17.36% de apoptosis tardía.

Mientras que para los tratamientos con 7.43 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen (Figura 18 b) las células MDA-MB-231 sin tratamiento presentaron un 0.91% de necrosis, 1.17% de apoptosis

temprana y un 1.52% de apoptosis tardía. Para las otras concentraciones de AgNPs, se reporta un porcentaje creciente de apoptosis tardía, del cual se obtiene un efecto de dosis-dependiente. Exceptuando la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ (23.67% de necrosis, 4.86% de apoptosis temprana y un 23.3% de apoptosis tardía). A una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$, se registra 22.04% de necrosis, 4.44% de apoptosis temprana y un 17.83% de apoptosis tardía. A una concentración de 3.5 $\mu\text{g/ml}$ se presenta 22.04% de necrosis, 4.42% de apoptosis temprana y un 20.52% de apoptosis tardía. A una concentración de 4.5 $\mu\text{g/ml}$ se registra 20.33% de necrosis, 5.19% de apoptosis temprana y un 24.27% de apoptosis tardía, siendo esta la concentración que presenta mayor porcentaje de apoptosis tardía.

Para los tratamientos con 9.28 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifen (Figura 18c), las células MDA-MB-231 sin tratamiento presentaron 0.91% de necrosis, 1.17% de apoptosis temprana y un 1.52% de apoptosis tardía. Y exceptuando a los resultados del porcentaje de apoptosis tardía inducido con la incubación con 4.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ en AgNPs, las demás concentraciones de AgNPs, indujeron apoptosis tardía en una mayor proporción que la apoptosis temprana y este comportamiento es dosis-dependiente. A una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$, se registra 12.75% de necrosis, 5.21% de apoptosis temprana y un 33.55% de apoptosis tardía. A una concentración de 3.5 $\mu\text{g/ml}$ se presenta 19.08% de necrosis, 4.71% de apoptosis temprana y un 29.59% de apoptosis tardía.

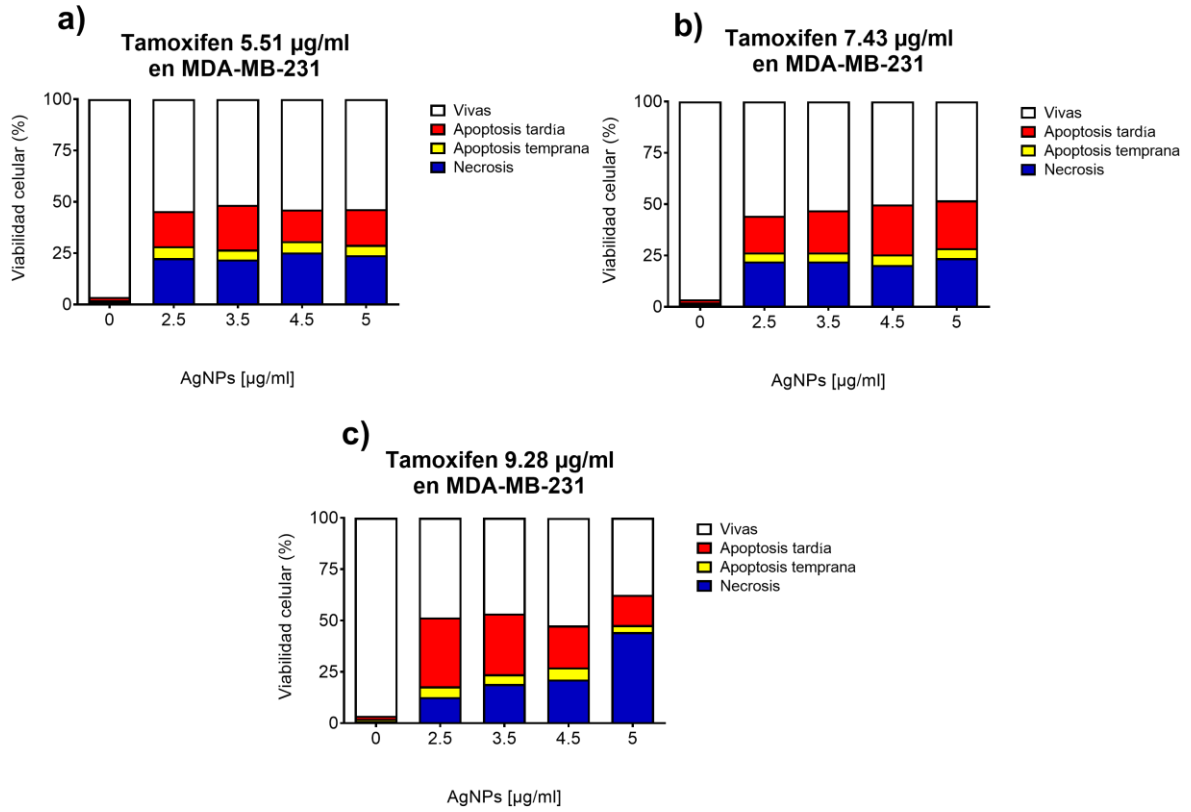


Figura 18. Evaluación del tipo de muerte celular de la línea celular MDA-MB-231 expuesta a diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con una concentración fija de tamoxifen a) 5.51 µg/ml, b) 7.43 µg/ml y c) 9.28 µg/ml.

6. DISCUSIÓN

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son el nanomaterial con mayor número de aplicaciones comerciales y biomédicas debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales^{30, 31}. Por estas razones, la exposición a este tipo de nanomaterial es elevada y justifica el estudio de su citotoxicidad en sistemas biológicos.

Las AgNPs, también han sido estudiadas como agentes antiproliferativos en distintas líneas celulares de mamíferos que incluyen, entre otros, glioblastoma humano (U251), células pluripotentes de carcinoma testicular humano (NT2), células de hepatocarcinoma humano (HepG2), células normales de fibroblastos de pulmón humano (IMR-90) y células mononucleares de sangre periférica humana normal (PBMC)^{28,29,45,46,47,48,49,50,51,52}, encontrándose que las AgNPs inducen citotoxicidad dosis-dependiente en esas líneas celulares evaluadas.

Se ha propuesto que esta acción citotóxica se ejerce por la internalización de las AgNPs o de los iones plata que se liberan de las mismas. En cualquier caso, esta interacción induce la producción de especies reactivas de oxígeno lo que produce daño celular, principalmente, en la mitocondria y, como consecuencia, se desencadena la muerte celular programada o apoptosis³³.

La gran mayoría de los estudios antes mencionados, se especializan en las evaluaciones citotóxicas, pero son escasos los estudios de evaluación genotóxica de las AgNPs en líneas

celulares de mamíferos ^{42,43,44} y en caso de que existan, se ha reportado que todas las concentraciones de esas formulaciones de AgNPs evaluadas son genotóxicas. Entonces, para el caso del tratamiento anticancerígeno, es necesario encontrar nanomateriales con propiedades antiproliferativas y, además, que ocasionen un bajo o nulo efecto genotóxico, esto con la finalidad de disminuir o inclusive eliminar los efectos secundarios asociados a las terapias anticancerígenas *in vivo*.

En el grupo de investigación en el que se desarrolló este trabajo, se descubrió recientemente, que las AgNPs de la formulación ArgovitTM no ocasionaban daños genotóxicos a concentraciones levemente superiores a la IC₅₀, sin embargo, a esa misma concentración sí se observaba un efecto citotóxico en diferentes líneas celulares de cáncer³⁴.

Es importante recalcar que estas nanopartículas son las únicas AgNPs que cuentan con certificados internacionales de instancias gubernamentales para su uso como cosmético, en aplicaciones médicas y en veterinaria. Debido a ello, es que en este trabajo se decidió evaluar el efecto citotóxico de las AgNPs ArgovitTM en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 y su efecto antiproliferativo sinérgico en combinación con el tamoxifen, que es uno de los fármacos de primera línea utilizado en el tratamiento del cáncer de mama.

Los motivos por los que se eligieron las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 es debido a que son las líneas celulares de cáncer de mama más estudiadas, además de ser las más conocidas. Es importante mencionar que la línea celular MCF-7 representa a un tipo de células cancerosas que tienen receptores de estrógeno, progesterona, HER2 y HER2- por lo

que esta línea celular puede procesar el tamoxifen y ser sensible al tratamiento con este fármaco. Por otro lado, la línea celular MDA-MB-231 es una línea celular de cáncer de mama conocida como “triple negativo” lo que significa que no contiene los receptores mencionados anteriormente y es más resistente a fármacos hormono-terapéuticos como el tamoxifen.

Por lo anterior y tomando en cuenta el trabajo reportado por un grupo de investigación de Kóvacs y colaboradores ⁴⁰, en donde encontraron que las AgNPs pueden tener un efecto sinérgico antiproliferativo en combinación con fármacos anticancerígenos en células de cáncer de colon quimiorresistentes, es que surge la idea de combinar las AgNPs con fármacos antineoplásicos, en células de cáncer de mama que tengan una sensibilidad intrínseca disminuida hacia la terapia con el tamoxifen.

Es por eso que en este trabajo se evaluó la citotoxicidad de las AgNPs a distintas concentraciones, que abarcaban una concentración menor y otra superior a la IC_{50} , los resultados demostraron que la viabilidad celular con respecto de la concentración de nanopartículas administrada es dosis-dependiente en ambas líneas celulares (MDA-MB-231 y MCF-7), lo cual concuerda con los resultados previamente reportados por Juárez-Moreno y colaboradores ³⁴. Para el caso de la susceptibilidad al tamoxifen, se observa el mismo efecto en el rango de concentraciones de 5.51 a 9.28 $\mu\text{g/ml}$. Estos efectos fueron identificados y corroborados mediante ensayos de citotoxicidad por colorimetría (ensayos de MTT), imágenes capturadas mediante microscopía óptica y citometría de flujo.

Del mismo modo, se evaluó la citotoxicidad de distintas concentraciones de AgNPs en combinación con el fármaco antineoplásico tamoxifen y se encontró un efecto de muerte celular potenciada en todos los tratamientos administrados en ambas líneas celulares (MDA-MB-231 y MCF-7). Estos efectos fueron identificados y a su vez corroborados mediante ensayos de MTT, imágenes capturadas mediante microscopía óptica y citometría de flujo. Después de llevar a cabo el análisis de los resultados, se puede decir que, la línea celular MDA-MB-231 es más susceptible al tratamiento de AgNPs combinado con tamoxifen.

De esta forma, se puede decir que, este es el primer trabajo en donde se ha encontrado un efecto sinérgico de las AgNPs Argovit en combinación con el fármaco antineoplásico tamoxifen. Donde se reveló que las mejores concentraciones donde se observó un efecto sinérgico entre las AgNPs y el tamoxifen en las células MDA-MB-231 fueron las concentraciones de 3.5µg/ml con el fármaco tamoxifen a una concentración de 7.43 µg/ml debido a que esta concentración de AgNPs no son genotóxicas ³⁴ y esta concentración de tamoxifen provoca muy bajo daño genotóxico ^{53, 54, 55, 57, 58}. Con ello, se abre la oportunidad de estudiar y entender los mecanismos cito y genotóxicos que ocasiona esta combinación en células de mamíferos y células de cáncer, con la posibilidad de utilizar este tipo de nanopartículas en futuras aplicaciones biomédicas en relación al tratamiento del cáncer.

7. CONCLUSIONES

- Se observó que existe un efecto antiproliferativo sinérgico *in vitro*, resultante de la combinación de AgNPs con el fármaco antineoplásico tamoxifen en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.
- Se determinó que las células MDA-MB-231 son tres veces más susceptibles al efecto citotóxico sinérgico que las células MCF-7.
- Se observó un efecto antiproliferativo sinérgico en las células MDA-MB-231 lo que ocasionaba una viabilidad celular menor al 20%, cuando las células fueron tratadas con una concentración de AgNPs de 3.5µg/ml y 7.43 µg/ml del fármaco tamoxifen.
- La combinación del fármaco tamoxifen a una concentración de 9.28 µg/ml junto con las AgNPs a 4.5µg/ml, tienen el mejor efecto sinérgico antiproliferativo en células de cáncer de mama MCF-7, disminuyendo la viabilidad celular al 30%.
- Las AgNPs pueden potenciar el efecto antiproliferativo del tamoxifen en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7, reduciendo en un 20% la cantidad de fármaco utilizado.
- Este trabajo sienta las bases para futuros estudios de optimización de las concentraciones de AgNPs y fármacos antineoplásicos para el tratamiento de otros tipos de cáncer.

8. PERSPECTIVAS

De la información de este trabajo, se ha observado que las AgNPs combinadas con el tamoxifen, promueven la muerte celular por apoptosis en las células de cáncer de mama. Por lo tanto, es importante conocer si estos tratamientos inducen la producción de especies reactivas de oxígeno intracelulares y si éstas pueden regular los procesos tóxicos como el estrés oxidativo celular, lo cual, es uno de los principales mecanismos de inducción de la apoptosis.

El siguiente paso en este trabajo, sería determinar los efectos que las AgNPs tienen sobre el material genético de las células, esto es, los daños al ADN mediante ensayos de genotoxicidad, para determinar si la combinación de las AgNPs y el fármaco tamoxifen induce algún tipo de efecto genotóxico en células de cáncer y en células no neoplásicas.

Sería recomendable emplear técnicas de biología molecular para identificar los mecanismos moleculares que inducen la citotoxicidad en las células de cáncer de mama, en especial, aquellas que son menos sensibles al tamoxifen, como las MDA-MB-231.

Por último, sería importante evaluar esta misma actividad sinérgica en un modelo *in vitro* de células quimiorresistentes, con la finalidad de determinar si la combinación de AgNPs y fármaco antineoplásico, puede re-establecer la sensibilidad al fármaco.

9. REFERENCIAS

- [1] Nordqvist, C. "Breast Cancer: Causes, Symptoms and Treatments." Medical News Today, 2016.
- [2] Hay RJ, Park JG, Gazdar A. Atlas of human tumor cell lines. Academic Press, Inc, 1994.
- [3] Anders, C. K., & Carey, L. A. (2009). Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 9(Suppl 2), S73–S81. <http://doi.org/10.3816/CBC.2009.s.008>.
- [4] Beshay N.M. Zordoky, Diana Bark, Carrie L. Soltys, Miranda M. Sung, Jason R.B. Dyck, The anti-proliferative effect of metformin in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells is highly dependent on glucose concentration: Implications for cancer therapy and prevention, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subject*, Vol. 1840, (2014), 1943–1957.
- [5] R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal, Cancer statistics, 2013, *CA Cancer J. Clin.* 63 (2013) 11–30.
- [6] Online International Agency for Research on Cancer, Globocan. World Health Organization 2012. Recuperado de: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- [7] Cáncer de mama, Instituto Mexicano del Seguro Social. Recuperado de: <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-mama>
- [8] INEGI, Estadísticas a propósito del día internacional contra el cáncer de mama, México, 2013. Recuperado de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/ma ma0.pdf>
- [9] Guillermo Sierra, Cirugía de la mama, Arán Ediciones, 2006 - 414 páginas.
- [10] I. Kirby Bland, Edward M. Copeland, La mama: manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas, Volumen 2, Ed. Médica Panamericana, 2007 – 841 páginas.
- [11] Peto R, Davies C, Godwin J, et al; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet*. 2012;379(9814):432-444.

[12] Roland T. Skeel, Samir N. Khleif, Handbook of Cancer Chemotherapy, 8va. edición Lippincott Williams & Wilkins, 2011 - 875 páginas

[13] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-1717.

[14] Slingerland J. M., Tannock I. F., The basic science of oncology, New York McGraw-Hill, 1998, 134-135.

[15] Gelber S, Coates AS, Goldhirsh, Castiglione M, Marine G, Lindtner J. et al. Effect of pregnancy on overall survival after the diagnosis of early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1671-1675

[16] Adverse effects of treatment. En: De Vita VT, Hellman S, Rsenberg SA, editores. *Cancer principles and practice of oncology*. JB Lippincott Company, 1993.

[17] Las mujeres y el cáncer de mama. Barcelona: Institut Catala d'Oncologia. Servei Catala de la Salut. 1999.

[18] Furr BA, Jordan VC. The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther* 1984; 25: 127-205.

[19] Friedland M. L., The chemotherapy source, Williams & Wilkins, 1996, 63-78.

[20] Nature, Cancer multidrug resistance, *Nature Biotechnology*, Vol. 18, IT18-IT20 (2000), doi:10.1038/80051

[21] M. Dean, A. Rzhetsky, R. Allikmets, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *Genome Res*. 11 (2001) 1156–1166.

[22] B.C. Shaffer, J.P. Gillet, C. Patel, M.R. Baer, S.E. Bates, M.M. Gottesman, Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML, *Drug Resist. Update* 15 (2012) 62–69.

[23] Tiberghien, F. et al. *J. Med. Chem.* 43, 2547–2556 (2000).

[24] Qiong Wu, Zhiping Yang, Yongzhan Nie, Yongquan Shi, Daiming Fan, Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches, *Cancer Letters* 347 (2014) 159–166. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.013>

- [25] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013;13:714-26.
- [26] Tomlinson, D., Martin, H. & Smith, L. Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives. *Breast Cancer Targets Ther.* 1 (2014). doi:10.2147/BCTT.S37638.
- [27] Palakurthi S, Yellepeddi VK, Vangara KK. Recent trends in cancer drug resistance reversal strategies using nanoparticles. *Expert Opin Drug Deliv* 2012;9:287–301.
- [28] Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:771–82.
- [29] Sushree Parida, Tushar Kanti Das, *Nanotechnology and Cancer*, Apollo Medicine, Vol. 5, No. 3 (2008).
- [30] Ge, L. et al. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int. J. Nanomedicine* 9, 2399–407 (2014).
- [31] Lara, H. H., Garza-Treviño, E. N., Ixtapan-Turrent, L. & Singh, D. K. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *J. Nanobiotechnology* 9, 30 (2011).
- [32] Foldbjerg, R. et al. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol. Lett.* 190, 156–162 (2009).
- [33] AshaRani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P. & Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* 3, 279–290 (2009).
- [34] Juarez-Moreno, K. et al. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1–18 (2016).
- [35] Asare N, Instanes C, Sandberg WJ, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology* 2012; 291: 65–72.
- [36] Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP, et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 2011; 32: 9810–9817.
- [37] Ahamed M, Karns M and Goodson M. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233: 404–410.

[38] Sur I, Altunbek M, Kahraman M, et al. The influence of the surface chemistry of silver nanoparticles on cell death. *Nanotechnology* 2012; 23: 375102.

[39] Borrego B, Lorenzo G, Mota-Morales JD, et al. Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of rift valley fever virus in vitro and in vivo. *Nanomedicine NBM* 2016; 12: 1185–1192.

[40] Kovács, D. et al. Silver nanoparticles modulate ABC transporter activity and enhance chemotherapy in multidrug resistant cancer. *Nanomedicine* 12, 601–610 (2015).

[41] R. Vazquez-Muñoz, M. Avalos-Borja, E. Castro-Longoria, Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles, *PLoS One*, 9 (2014).

[42] Neenu Singh, Bella Manshian, Gareth J. S.Jenkins, Sioned M. Griffiths, Paul M. Williams, Thierry G. G. Maffei, Chris J.Wright, Shareen H.Doak, *NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials*, *Biomaterials*, Volume 30, Issues 23–24, 3891-3914 (2009).

[43] Hui Yang, Chao Liu, Dandeng Yang, Huashan Zhang, Zhuge Xi, Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition, *Journal of Applied Toxicology*, vol.29, issue 1, 69-78 (2009).

[44] Amaya Azqueta, Maria Dusinska, The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials, *Front Genet.* 6:239 (2015).

[45] AshaRani, P., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*, 10, 65. <http://doi.org/10.1186/1471-2121-10-65>

[46] Iêda Maria Martinez Paino, Valtencir Zucolotto, Poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles: Activation of neutrophils and nanotoxicology effects in human hepatocarcinoma and mononuclear cells, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Volume 39, Issue 2, 2015, Pages 614-621, ISSN 1382-6689.

[47] Piao, M. J., Kang, K. A., Lee, I. K., Kim, H. S., Kim, S., Choi, J. Y., & Hyun, J. W. (2011). Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology letters*, 201(1), 92-100.

[48] Asare, N., Instanes, C., Sandberg, W. J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M., & Brunborg, G. (2012). Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology*, 291(1), 65-72.

- [49] Wang, Y., Chen, H., Liu, Y., Wu, J., Zhou, P., Wang, Y., & Zhang, N. (2013). pH-sensitive pullulan-based nanoparticle carrier of methotrexate and combretastatin A4 for the combination therapy against hepatocellular carcinoma. *Biomaterials*, 34(29), 7181-7190.
- [50] Kumari, M., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2009). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment*, 407(19), 5243-5246.
- [51] Park, M. V., Neigh, A. M., Vermeulen, J. P., de la Fonteyne, L. J., Verharen, H. W., Briedé, J. J., ... & de Jong, W. H. (2011). The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32(36), 9810-9817.
- [52] Ghosh, M., Manivannan, J., Sinha, S., Chakraborty, A., Mallick, S. K., Bandyopadhyay, M., & Mukherjee, A. (2012). In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 749(1), 60-69.
- [53] Wilson AS, Tingle MD, Kelly MD, Park BK (1995) Evaluation of the generation of genotoxic and cytotoxic metabolites of benzo[a]pyrene, aflatoxin B1, naphthalene and tamoxifen using human liver microsomes and human lymphocytes. *Hum Exp Toxicol* 14:507–515.
- [54] Vijayalaxmi KK, Rai SP (1996) Studies on the genotoxicity of tamoxifen citrate in mouse bone marrow cells. *Mutat Res* 368:109–114.
- [55] Styles, J.A., Davies, R. and Smith, L.L. (1995) Comparison of clastogenic effects induced in rats by tamoxifen and some of its analogues. *Toxicologist*, 15, 82 (abstract 432).
- [56] Dahmer, E. and Rattel, B. (1994) Unlike tamoxifen, droloxifene produces no hepatic tumours in the rat. *Onkologie*, 17, 6–16.
- [57] Williams, G.M., Iatropoulos, M.J. and Hard, G.C. (1992) Long-term prophylactic use of tamoxifen: is it safe? *Eur. J. Cancer Prevent.* 1, 386–387.
- [58] Hirsimaki, P., Hirsimaki, Y., Nieminen, L. and Payne, B.J. (1993) Tamoxifen induces hepatocellular carcinoma in rat liver: a 1 year study with two antiestrogens. *Arch. Toxicol.*, 67, 49–54.