

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



**EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA  
EN MODELOS IN VITRO DE CÁNCER DE MAMA (MCF-7)**

**T E S I S**

que presenta para obtener el grado de  
MAESTRA EN CIENCIAS E INGENIERÍA

**ARANZAZU GONZÁLEZ SCHIEFENBUSCH**

DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA  
CODIRECTOR DE TESIS:  
DR. JUAN CARLOS GARCÍA RAMOS

Ensenada, B. C.

26 de agosto de 2022

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E  
INGENIERÍA**

**EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE NANOPARTÍCULAS DE  
PLATA EN MODELOS IN VITRO DE CÁNCER DE MAMA  
(MCF-7)**

**T E S I S**

que presenta para obtener el grado de MAESTRO EN  
CIENCIAS

**LNT. ARANZAZU GONZÁLEZ SCHIEFENBUSCH**

Aprobado por:



---

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



---

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



---

**SINODAL**  
**DRA. PATRICIA RADILLA  
CHÁVEZ**  
Miembro del Comité



---

**SINODAL**  
**DRA. JUANA CLAUDIA LEYVA  
AGUILERA**  
Miembro del Comité

**RESUMEN** de la Tesis de **ARANZAZU GONZÁLEZ SCHIEFENBUSCH**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**. Ensenada, Baja California, México. Junio de 2022.

**EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MODELOS IN VITRO DE CÁNCER DE MAMA (MCF-7)**

Resumen aprobado por:



**DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA**  
Directora de tesis

A nivel mundial la nanotecnología ha tenido gran auge durante los últimos años gracias a las propiedades que nos brindan los nanomateriales. Dentro de sus múltiples herramientas están las nanopartículas de plata, destacadas por ser una de las más prometedoras debido a las propiedades fisicoquímicas únicas con las que cuenta, como ser un potencial agente anticancerígeno. De acuerdo con la OMS, el cáncer es de las principales causas de muerte mundialmente, el cáncer de mama es un claro ejemplo de la mortalidad y casos nuevos que pueden presentarse año tras año. Es necesario realizar diversos tipos de experimentos para el desarrollo y descubrimiento de nuevos agentes como potenciales fármacos debido a que los componentes pueden resultar tóxicos y desencadenar efectos adversos a corto o largo plazo. Por lo anterior, en el presente trabajo se evalúa el efecto citotóxico y antiproliferativo de cuatro diferentes concentraciones de nanopartículas de plata Argovit™ en la línea celular MCF-7, adenocarcinoma de mama metastásico; un cáncer hormono-dependiente considerada de las líneas más útiles para estudiar la biología del cáncer. Las nanopartículas de plata Argovit™ prometen ser una alternativa para la lucha contra el cáncer ya que estas han probado tener una citotoxicidad baja en células sanas no así en células cancerosas. Los resultados revelados en este trabajo nos dan a conocer que la selectividad por parte de las nanopartículas de plata a las células cancerosas es efectiva, sin embargo, se reporta que la vía de muerte por la que las células mueren es por necrosis.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, cáncer de mama, MCF-7, citotoxicidad

**ABSTRACT** of the thesis, presented by **ARANZAZU GONZÁLEZ SCHIEFENBUSCH** in order to obtain the **MASTER of SCIENCE**.  
Ensenada, Baja California, México. June 2022.

**ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES IN  
IN VITRO MODELS OF BREAST CANCER (MCF-7)**

Approved by:



---

**DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA**  
Thesis Advisor

Worldwide, nanotechnology has boomed in recent years thanks to the properties that nanomaterials provide us. Among its multiple tools are silver nanoparticles, outstanding for being one of the most promising due to their unique physicochemical properties, as being a potential anticancer agent. According to the WHO, cancer is one of the leading causes of death worldwide, breast cancer is a clear example of mortality and new cases that can occur year after year. It is necessary to carry out various types of experiments for the development and discovery of new potential drugs because the components can be toxic and trigger short- or long-term adverse effects. Therefore, in the present work, the cytotoxic and antiproliferative effect of silver nanoparticles Argovit™ at four different concentrations in the MCF-7 cell line was evaluated; metastatic breast adenocarcinoma is hormone-dependent cancer considered one of the most useful lines to study the biology of cancer. Argovit™ promises to be an alternative fighting cancer since they have proven to have low cytotoxicity in healthy cells, not so in cancer cells. The results revealed in this work make us aware that necrosis is the death pathway by which cells die.

Keywords: Silver nanoparticles, breast cancer, MCF-7, cytotoxicity

## **DEDICATORIA**

A mi familia, por apoyarme y motivarme todos los días, por nunca dejar de creer en mí, incluso cuando yo dejé de hacerlo. Por sus palabras de aliento y motivación, por siempre ser mi base y mi soporte, por ayudarme a demostrar lo mucho que puedo lograr con un poco de ayuda cuando todo va mal, por ser siempre luz en mi vida y darme tanto amor. Gracias a cada uno de ustedes por ser parte de mi vida tanto profesional como personal, son lo mejor que la vida me regaló y en esta etapa profesional confirmo que son más de lo que puedo pedir conmigo.

A Rosa María Schiefenbusch, mi madre, “omma”, por escucharme siempre que lo necesito, por decirme lo mucho que valgo cuando estoy perdida, por decirme que estarás conmigo apoyándome sin importar la decisión que tome, por animarme con fotos y videos de mis cachorras y por cada momento que me acompañas en esta vida, por siempre estar de mi lado y creer en mí.

A Juan Oscar González, mi padre, “capitán trueno”, por ser mi ejemplo a seguir, por enseñarme a no darme por vencida, aun cuando las cosas no van bien. Por guiarme y aconsejarme, por buscar conmigo la manera de lograr las metas propuestas, por decirme cuando estoy mal, pero también para decirme que puedo ser mejor de lo que creo que soy capaz, por apoyarme y estar ahí en todo momento sin importar la distancia ni el horario, por confiar en mí.

A Adriana González “Monster”, mi segunda madre y una amiga incondicional, por recordarme lo valiente, fuerte e inteligente que soy, la determinación que tengo y lo que me caracteriza como “Aranchita”, por siempre brindarme palabras de aliento y decirme que puedo mucho más que mis problemas, por ser cómplice de los demás para siempre motivarme y no dejarme caer.

A R. Andrea González, mi hermana, “rous, rana, lady topes”, por siempre ser tan directa, por decirme que no me deje vencer por un pequeño problema, por darme su apoyo y cuidar a mi cachorras, por siempre ser tan ocurrente cuando mis días son apagados, por su léxico tan amplio que la mayoría de veces me enoja pero siempre me hace reír con sus ocurrencias, por siempre darme su mano y decirme que estará ahí para apoyarme.

A Oscar Emilio González, mi hermano, “tete, hijastro”, por enojarse conmigo cuando me dejo vencer, por decirme que todo está en mi cabeza y que si me lo propongo lo lograré, por confiar en mí y en mi determinación, por siempre motivarme indirectamente y por demostrarme tu apoyo de maneras poco usuales, por ser mi gemelito y siempre estar conmigo.

A María José González, mi hermanita, “bebé, princesa”, por siempre decirme lo mucho que me quieres y lo mucho que crees en mí, por hacerme sentir grande, por verme y tenerme en un concepto que amaría ver desde sus ojos. Por siempre tener comentarios lindos y motivarme, por contarme sus cosas y ayudarme con las mías, por verme de una manera única que me hace sentir una “Chita especial”.

A mis angelitos, por ser parte de este crecimiento, porque a pesar de no estar presentes en vida, siempre han sido mi motor, por siempre querer ser mejor para hacerlos sentir orgullosos, porque, aunque no estén aquí siempre tendrán esencia en mi vida.

A Daniel J. Macías, mi amor, “bebelín”, por estar conmigo, por apoyarme y nunca dudar de mí. Por soportarme cuando ni yo me soporto, por siempre tener las palabras adecuadas en el momento necesario, por las muestras de amor y cariño que me regalas cada día, por tomar mi mano, verme a los ojos y decirme que voy a lograrlo, que confíe en mí y que él estará para verme triunfar sin importar lo difícil que sea el camino. Por siempre estar a mi lado.

A cada uno de ustedes les agradezco cada muestra de afecto y cariño, por su confianza, amor incondicional, apoyo y ayuda, sin ustedes esto hubiera sido un difícil camino por recorrer, sin embargo, aquí estoy, concluyendo una parte de mi con ustedes a mi lado. Los amo y agradezco infinitamente que sean parte viva de mí.

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Yanis Toledano, por aceptarme en este proceso, por hacerme crecer profesional y emocionalmente. Por desbloquear aptitudes en mí y compartir su conocimiento conmigo, por corregirme y brindarme su apoyo, especialmente, por guiarme y ayudarme a concluir una meta más profesionalmente.

A mi codirector de tesis, Dr. Juan Carlos García, por siempre cuestionarme sobre lo que hago, el por qué, para qué y cómo lo lograré. Por sus enseñanzas, por todos los comentarios constructivos y pláticas de discusión, por ser parte de este proceso profesional.

A mi Sinodales: Dra. Patricia Radilla, Dra. J. Claudia Leyva, Dr. Miguel A. Méndez, por aceptar ser parte de mi comité de tesis, por brindarme conocimiento y hacerme una mejor profesional, por su confianza para el desarrollo de este trabajo y por siempre aconsejarme y sugerir cambios para ser mejor. Por ser parte importante para lograr concluir mi maestría.

A dos de mis incondicionales, Alexa Kokhab, “mijish”, gracias por siempre estar para mí y ser la mejor amiga. Alberto Ortega, “niño, bodoque”, gracias por motivarme y escucharme. Les agradezco por estar cada día y cuando más los necesito, por no hartarse de mí y siempre sacarme miles de sonrisas. Por hacerme sentir valiosa, por estar conmigo en la distancia y demostrarme tanto cariño y lealtad.

A mis “onion boys”, Sandra Méndez “Sandy” y Juan Carlos Munguia, “Juan” por ayudarme con la fluorescencia, por enseñarme micronúcleos y cromosomas, gracias por siempre compartir su conocimiento conmigo y acudir a mi llamado de auxilio cuando los necesito (el secreto es hacer círculo de cebollitas). También gracias por darme galletitas y taxcales, delicia total. Gracias por su energía, ayuda y apoyo.

A mis niños medicina, Leslie Cota “Les”, Neyli Herrera “Ney”, Maybelline Yoryeth “May” y Sebastián López “Tían”, por siempre confiar en mí, por enseñarme y aprender de ustedes, por hacerme sentir segura y profesional. Por hacer mis días felices cada que estaban en lab, mis días favoritos eran por ustedes, por cuidar células conmigo y siempre

estar atentos a todo. Gracias por ser parte de este trayecto de mi vida, estoy segura que lograran muchísimo y serán excelentes profesionistas. Los quiero mucho

A Nadia Krupskaya “Krups”, Michelle Silvera “Mich” y Arlette Amaro “Arlettsita”, por siempre ser mis compañeras, colegas y amigas, por contar células conmigo, perder la vista con fluorescencia y siempre hacerme sentir cómoda, por hacerme reír y por acompañarme en esta etapa y aprender conmigo.

A Laura González y Alejandra Ávila, por ser parte importante de este proceso, por confiar en mí y ayudarme en todo. Por enseñarme el mejor lugar para comer, “I Love Chicken”, y ser unas grandes amigas, por hacer mi tiempo en lab más ameno con su compañía y pláticas.

A cada uno de ustedes les agradezco este tiempo, dentro y fuera del laboratorio, sus enseñanzas, confianza y hacer mi tiempo siempre más ameno, más divertido, más interesante y feliz. Aprecio a cada uno de ustedes y los quiero mucho

A la familia Montalvo Guzmán, gracias por hacerme ser parte de su familia, por siempre estar pendientes de mí, por ayudarme cuando no tenía a quién acudir, por estar cuando me sentía perdida, por motivarme y siempre brindarme su apoyo. Los quiero mucho

A Sonia González, por hacerme sentir siempre en casa, por cada detalle y estar siempre para mí, por ser una gran amiga, gracias por hacerme sentir parte de su familia y dejarme cuidar de Brutus por este tiempo, son una gran familia y agradezco su atención hacia mí. Los quiero mucho

A estas dos familias, gracias por abrirme las puertas de sus casas y hacerme sentir tranquila y segura, saber que tengo personas en quien confiar y que puedo contar con ellas.

Al laboratorio de Química Medicinal y Nanomedicina y Nanotoxicología de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California campus Valle Dorado y a sus miembros.

A la Red Internacional de Bionanotecnología con impacto en Biomedicina, Alimentación y Bioseguridad del Conacyt y a sus miembros.

## ÍNDICE

1. Introducción	4
1.1 Nanociencia y nanotecnología	4
1.2 Nanomateriales en sectores de impacto económico	5
1.3 Nanomedicina	10
1.4 Nanopartículas de plata	11
1.5 Cáncer	13
1.6 Cáncer de mama	16
1.7 Detectando el cáncer	19
2. Justificación	22
3. Antecedentes	23
3.1 Nanopartículas de plata Argovit™	23
3.2 Líneas celulares	24
3.2.1 Línea celular de cáncer de mama MCF-7	24
4. Marco teórico	25
4.1 Aplicaciones de las AgNP Argovit™	25
4.2 Aplicación de líneas celulares	26
4.2.2 Viabilidad celular	28
4.2.3 Prueba de exclusión de azul tripano	28
4.2.3 Muerte celular	29
4.2.4 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo	30
4.2.5 Anión superóxido (O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> )	31
4.3 AgNP Argovit™ contra el cáncer	31
5. Hipótesis	32
6. Objetivos de la investigación	32
6.1 Objetivo general	32
6.2 Objetivos específicos	32
7. Metodología	32
7.1 Formulaciones de AgNP	33

7.2	Mantenimiento y conservación de la línea celular MCF-7	34
7.2.1	Descongelar células MCF-7	34
7.2.2	Mantenimiento y proliferación de línea celular MCF-7	34
7.2.3	Pase de células	35
7.2.4	Congelar células	35
7.3	Preparación de Disolución concentradas	35
7.3.1	Nanopartículas de plata	35
7.3.2	Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ )	36
7.3.3	Doxorrubicina (DOX)	37
7.4	Conteo en cámara de Neubauer	38
7.5	Ensayo de viabilidad en caja de 96 pozos	39
7.5.1	Tinción con azul tripano	40
7.5.2	Conteo de viabilidad con cámara Neubauer	40
7.6	Determinación de vía de muerte celular	40
7.6.1	Tinción de células	40
7.6.2	Microscopía de fluorescencia	41
7.7	Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	41
7.7.1	Tinción de células	41
7.7.2	Microscopía de fluorescencia	41
8.	Resultados	42
8.1	Ensayo de exclusión vital de azul tripano	42
8.2	Vía de Muerte celular	46
8.3	Especies Reactivas de Oxígeno	49
9.	Discusión	50
10.	Conclusiones	53

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b> Número estimado de casos nuevos de mujeres con cáncer en 2020, México de todas las edades... ..	21
<b>Figura 1.2.</b> Número estimado de casos nuevos de hombres con cáncer en 2020, México de todas las edades... ..	22
<b>Figura 1.3.</b> Incidencia de cáncer de mama en la población de 20 años y más por sexo 2010 a 2019. Por cada 100 mil individuos de 20 años y más de cada sexo.....	24
<b>Figura 1.4.</b> Tasa de mortalidad por cáncer de mama en mujeres de 20 años y más, por grupos de edad 2020. Defunciones por cada 100 mil mujeres... ..	25
<b>Figura 3.1.</b> Línea celular de adenocarcinoma metastásico de mama MCF-7. A) pase 0, recién descongeladas, B) pase 1, primera división, C) 75% de confluencia, D) 85% de confluencia.....	31
<b>Figura 4.1.</b> Prueba de exclusión vital con azul tripano. A) Células de levadura, B) Células MCF-7. Las células refringentes son las vivas (verde), mantienen su membrana celular intacta y no permite el paso al colorante, mientras que en las células no viables (amarillo) el colorante penetra la membrana permitiendo el ingreso al citoplasma. A) Tomada de Eureka Brewing. B) Adaptada de Martínez-Torrez, (2016) [47] .....	35
<b>Figura 7.1.</b> Realización de disoluciones iniciales de AgNPs Argovit™, formulación 4 y 5... ..	42
<b>Figura 7.2.</b> Cálculos para realizar la disolución inicial de doxorubicina con una concentración de $13.8\mu\text{M}$ y la dilución para obtener una disolución $0.69\mu\text{M}$ ... ..	44
<b>Figura 7.3.</b> Cámara de Neubauer y acercamiento a cuadrantes que se observan por medio del microscopio.....	44
<b>Figura 7.4.</b> Distribución del ensayo de viabilidad en placa de 96 pozos, triplicado independiente. A1-6 controles, A7-9 doxorubicina, B1-3 ( $1\mu\text{M}$ ) AgNP4, B4-6 ( $10\mu\text{M}$ ),	

B7-9 (100 $\mu$ M), B10-12 (1mM). C1-3 (1 $\mu$ M) AgNP5, C4-6 (10 $\mu$ M), C7-9 (100 $\mu$ M), C10-12 (1mM)..... 45

**Figura 7.5.** Distribución del ensayo de vía de muerte y ROS en placa de 96 pozos. En la fila A1-3 se encuentra control (+), a A4-6 control (-), A7-9 doxorubicina (0.69 $\mu$ mol), A10-12 AgNO<sub>3</sub> (1 $\mu$ m) B1-3 AgNP4 (1  $\mu$ M) y B4-6 AgNP5 (1 $\mu$ M).....48

**Figura 8.1.** Viabilidad celular de las formulaciones 4 y 5 de AgNP Argovit™ en línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7)... .....50

**Figura 8.2.** Viabilidad celular de la formulación 4 de AgNP Argovit™ en línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7)... ..... 51

**Figura 8.3.** Viabilidad celular de la formulación 5 de AgNP Argovit™ en línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7)... ..... 52

**Figura 8.4.** Muerte celular provocada por la formulación 5 de AgNP Argovit™ en línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7). En la parte superior de la barra podemos encontrar la muerte por necrosis, en la parte central la muerte apoptótica y en la parte inferior las células viables .....53

**Figura 8.5.** Imágenes fluorescentes de la línea celular MCF-7 expuesta a distintos estímulos para la determinación de vía de muerte celular teñidas con anexina V y yoduro de propidio. A)AgNP4 a 1  $\mu$ M, B)AgNP 5 a 1 $\mu$ M, C) Dox, D) AgNO<sub>3</sub>..... 54

**Figura 8.6.** Imagen fluorescente con doble marca positiva. Primero se induce muerte por apoptosis y posteriormente muerte necrótica. Células teñidas con AV/IP.....54

**Figura 8.5.** Determinación de ROS provocada por AgNP Argovit™ en línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7). Barras en color gris son el porcentaje de células con ROS, barras rayadas horizontalmente son el porcentaje de células viables .....55

## Índice de acrónimo

**NM** – Nanomateriales

**NT** – Nanotecnología

**nm** – Nanómetros

**NP** – Nanopartículas

**ARN** – Ácido ribonucleico

**AgNP** – Nanopartículas de plata

**PVP** – Polivinilpirrolidona

**PEG** – Polietilenglicol

**AgNO<sub>3</sub>** – Nitrato de plata

**ROS** – Especies Reactivas de Oxígeno

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**OMS** – Organización Mundial de la Salud

**INCan** – Instituto Nacional de Cancerología

**INEGI** – Instituto Nacional de Estadística y Geografía

**MCF-7** – Fundación de Cáncer de Michigan

**DFU** – Úlcera de pie diabético

**WSSV** – Síndrome de la Mancha Blanca

**CDV** – Moquillo Canino

**SARS-Cov-2** – Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus-2

**ATP** – Adenosín Trifosfato / Trifosfato de Adenosina

**(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)** – Anión superóxido

**SOD** – Superóxido Dismutasa

**mg** – Miligramo

**ml** – Mililitro

**μl** – Microlitro

**mM** – Milimolar

**μM** – Micromolar

**rpm** – Revoluciones por minuto

**DMEM** - Medium Dulbecco's Modified Eagle

**SSF** – Solución Salina Fisiológica

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**AgNP4** – Formulación 4 de Nanopartículas de plata Argovit™

**AgNP5** – Formulación 5 de Nanopartículas de plata Argovit™

**Dox** – Doxorrubicina

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**AV** – Anexina V

**IP** – Yoduro de Propidio

**SPH** - Sangre periférica humana

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.1</b> Tipos de nanomateriales sintéticos, su descripción e imagen representativa.....	13
<b>Tabla. 1.2</b> Tasa de incidencia, mortalidad y prevalencia de cáncer a 5 años a nivel mundial, ambos sexos, todas las edades... ..	20
<b>Tabla 1.3.</b> Tasa de incidencia, mortalidad y prevalencia de cáncer a 5 años a nivel nacional (México), ambos sexos, todas las edades... ..	23
<b>Tabla 1.4.</b> Costos unitarios de tratamientos para el cáncer de mama, descripción de los tratamientos y los efectos secundarios que pueden presentarse .....	27
<b>Tabla 7.1.</b> Características y propiedades de las formulaciones AgNP4 y AgNP5. Tomada y adaptada de Cruz-Ramirez,; et al. (2021). Antitumor Activity Against Human Colorectal Adenocarcinoma of Silver Nanoparticles: Influence of [Ag]/[PVP] Ratio. <i>Pharmaceutics</i> . 13. 1000. 10.3390/pharmaceutics13071000 .....	39
<b>Tabla 8.1.</b> Porcentaje de citotoxicidad por triple triplicado de AgNP4 y AgNP5 Argovit™ en células de mama MCF-7 .....	49

# Capítulo 1

## Introducción

En este capítulo se abordará sobre la nanotecnología, la nanociencia y las herramientas que esta ciencia nos brinda a una escala nanométrica haciéndolas únicas y funcionales dentro de la escala entre 1 a 100 nanómetros. Se busca crear nuevas alternativas para combatir enfermedades, principalmente, el cáncer. Esta enfermedad a nivel mundial se encuentra dentro de las primeras posiciones, presentando un alto número de defunciones y nuevos casos año con año.

### 1.1 Nanociencia y nanotecnología

Los nanomateriales (NM) son un producto nanotecnológico que ha existido a lo largo de los años de una forma no visible ante el ojo humano debido a su diminuto tamaño. Estos materiales son considerados de creciente importancia gracias a que cuentan con propiedades fisicoquímicas únicas [1]. La nanociencia es una ciencia multidisciplinaria que se encarga de estudiar y manipular la materia a escala nanométrica, que va de 1 a 100 nanómetros (nm) [2]. Mientras que la nanotecnología (NT) se encarga de desarrollar aplicaciones y dispositivos con base en las propiedades que presentan los nanomateriales [3].

La nanotecnología pretende innovar y desarrollar dispositivos de alto impacto en cualquier área, ya sea ambiental, alimenticia, textil, tecnológica, automotriz, biológica, entre otras [4]. El área de aplicación de la NT dependerá específicamente de la forma, síntesis y finalidad para lo que se manipule la materia. Estos materiales son conocidos como nanomateriales y existen en el medio ambiente con características naturales o pueden ser creados de forma sintética aplicando técnicas especiales, lo que les confiere propiedades fisicoquímicas únicas.

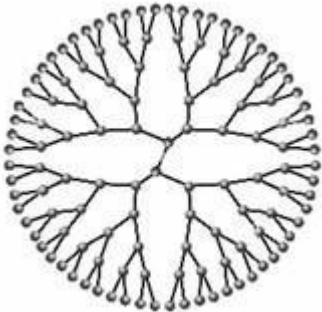
Dentro de las propiedades físicas podemos incluir el tamaño, la forma y superficie mientras que en las químicas se encuentran la estructura molecular, composición y estado en el que se encuentra, estas distintas propiedades son definidas por el tipo de interacción que pueda existir entre los constituyentes del nanomaterial. Considerando que el espacio

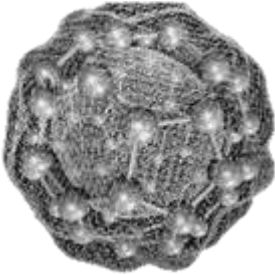
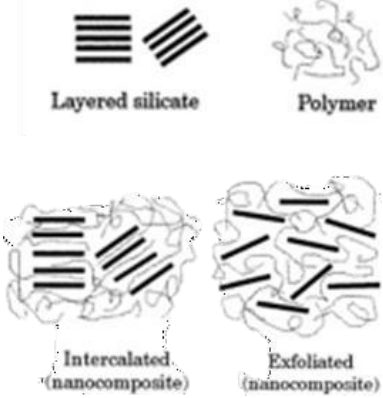
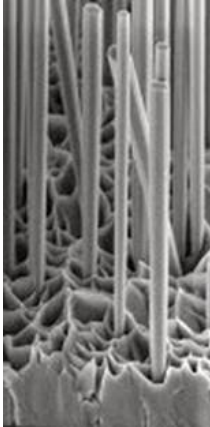
donde se encuentran será menor, eventualmente se tendrán nuevos efectos gracias al confinamiento espacial, que hace que los niveles energéticos donde están los electrones dentro de las partículas sean modificados [5].

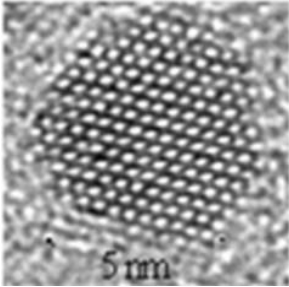
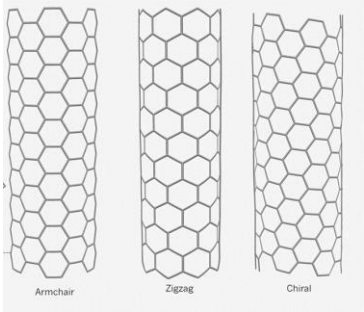
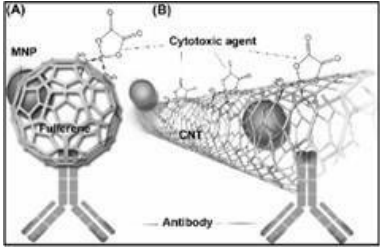
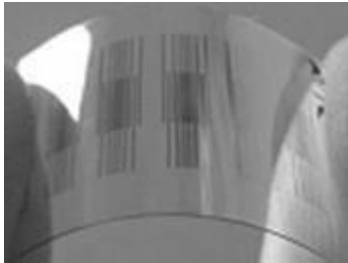
Gracias a todas estas manipulaciones de tamaño y sus propiedades fisicoquímicas únicas, los materiales a nivel nanométrico tienen una infinidad de aplicaciones en diversas áreas y pueden ser subdivididos en nanopartículas (NP), nanocapas y nanocompuestos (**Tabla 1.1**). En lo que respecta a la síntesis de estas nanoestructuras se distinguen dos alternativas, técnica *top-down* que radica en la fabricación de nanomateriales a partir de bloques o materiales de mayor escala que se sintetiza por procesos fisicoquímicos hasta llegar a la escala nanométrica y técnica *bottom-up* que consiste en construir nanoestructuras átomo a átomo o molécula a molécula permitiendo ensamblar átomos y moléculas de manera independiente [6].




**Tabla 1.1** Tipos de nanomateriales sintéticos, su descripción e imagen representativa.

Tomado de Flores, 2013

Nanomateriales	Descripción	Imagen representativa
<b>Dendrimeros</b>	Son moléculas tridimensionales y su estructura es semejante a la de un árbol, cuenta con una rama central y a partir de ella se forman más ramas, donde cada una de ellas puede tener una función determinada	

<p><b>Nanopartículas</b></p>	<p>Pieza compuesta de uno o varios elementos elemento en con al menos una dimensión en el intervalo de 1 a 100 nm</p>	
<p><b>Nanocompositos</b></p>	<p>Compuestos multifacéticos que cuentan con 1, 2 o 3 dimensiones, utilizados para desarrollar nuevos materiales flexibles, estos pueden unirse con otras nanopartículas (NP) o con materiales de dimensiones más grandes</p>	
<p><b>Nanoalambres</b></p>	<p>Estructuras filamentosas con una dimensión entre 1 a 100 nm. Pueden participar como recubrimiento de receptores biológicos específicos a ciertos tipos de microorganismos que en un medio pueda modificar su conductividad eléctrica</p>	

<p><b>Nanobiosensores fotónicos</b></p>	<p>Se basa en nanopartículas de oro o magnéticas que puedan relacionarse con puntos cuánticos de energía de radiación electromagnética</p>	
<p><b>Nanotubos</b></p>	<p>Son alótropos del carbono cuya estructura es una lámina de grafeno enrollada sobre sí misma y estos pueden tener diversas capas</p>	
<p><b>Nanobombas</b></p>	<p>Conglomerado de nanotubos de carbono con un recubrimiento de anticuerpos que al exponerse a la luz y calor son insuficientes para aclarar la energía concentrada y “explotan”</p>	
<p><b>Nanosensores</b></p>	<p>Pequeños dispositivos que tienen como finalidad detectar una determinada acción externa,</p>	

	temperatura, presión o compuesto químico	
Nanomotores	Ejemplo de engranaje atómico elaborado por un ordenador	
Nanotransportadores	Transportan fármacos y ADN facilitando la capacidad de enviar un fármaco al blanco deseado	
Nanocáscara	Son nanopartículas que crean una capa delgada metálica que permite recubrir una estructura esférica de silicio	

## 1.2 Nanomateriales en sectores de impacto económico

A continuación, se describen algunas de las aplicaciones de nanomateriales más altamente reportadas en diferentes sectores de impacto económico.

- Alimentos: En esta área se utilizan nanobiosensores para detectar patógenos; también se usan nanocompuestos para mejorar la producción alimentaria aumentando su resistencia mecánica y térmica, disminuyendo la transferencia de oxígeno a productos enlatados.

- **Construcción:** Las nanopartículas pueden ser aplicadas como aditivos en recubrimientos orgánicos, en pinturas y barnices, también se utilizan para adhesivos que absorben radiación para un secado más rápido. Existen nanomateriales aplicados en cemento, hormigón, entre otros, para mejorar funcionalidades como durabilidad, fortaleza, resistencia al agua y/o fuego, y estabilidad térmica.
- **Biomédica:** Se emplean nanomateriales para mejorar el diagnóstico precoz y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, cáncer y otras, también se aplican nanopartículas para mejorar productos farmacéuticos y nanosensores para diagnóstico clínico.
- **Electrónica:** Nanotubos de carbono para microchips y dispositivos más pequeños, veloces y eficientes, nanocables cuánticos más resistentes, ligeros y conductores, se encuentran dentro de los más reportados.
- **Tecnologías de la información y las telecomunicaciones:** Memorias *MRAM*, que mantienen información en bits dentro de campos magnéticos y cuentan con gran ahorro de energía, son más rápidas e incluso más resistentes.
- **Energía:** Semiconductores para fabricar paneles solares que multiplican la cantidad de luz solar y sea convertida en corriente eléctrica, turbinas eólicas más fuertes y ligeras.
- **Medio ambiente:** Purificación de aire con iones, depuración de aguas residuales con nanoburbujas o nanofiltración para metales pesados, nanocatalizadores para reacciones químicas.
- **Textil:** Tejidos inteligentes que no se manchan ni se arrugan, protegen contra el fuego, repelen el agua y gestionan el control térmico.
- **Automotriz:** Nanofibras de carbono más fuertes y ligeras que el acero para motores, agentes reforzantes en neumáticos, recubrimientos anticorrosión, entre otros.

Asimismo, la nanotecnología es de especial interés en el área biomédica, específicamente para el diagnóstico y tratamiento de cáncer [7]. Un claro ejemplo de la NT en esta área son las NP, las cuales han tenido un gran auge en biomedicina. Las NP pueden ser de base metálica, tres ejemplos de estas son los puntos cuánticos, NP de oro y plata y óxidos metálicos [8] e incluso pueden ser a base de carbono. La estructura más utilizada es

esférica, aunque también pueden ser tubulares o elipsoidales; entre las propiedades más destacables que tienen estas nanopartículas se encuentran, su bajo peso molecular, la dureza, elasticidad y la posible conducción de electricidad.

### **1.3 Nanomedicina**

En la actualidad los nanomateriales han sido una puerta de beneficios y retos que se abre a nuevas oportunidades de desarrollo especialmente para la medicina y la biología al punto que es posible caracterizar, diseñar y producir materiales con propiedades específicas para su uso en aplicaciones clínicas. Esta subdisciplina de la nanociencia es conocida como nanomedicina, la cual es de las más prometedoras dentro los avances tecnológicos aún en desarrollo. Sin embargo, a pesar de que existen estos avances, se requiere de investigación interdisciplinaria para potenciar y perfeccionar el progreso y crecimiento de dichos materiales y evitar que estos presenten efectos secundarios en pacientes. Para eso, la nanociencia se ve comprometida a desarrollar productos farmacéuticos seguros realizando evaluaciones diagnósticas *in vitro* e *in vivo*.

En particular, las nanopartículas han destacado porque juegan un papel importante en distintos procesos para la mejora de tratamientos y prevención de enfermedades, estas ofrecen una alternativa en tratamientos contra el cáncer, hepatitis y enfermedades infecciosas, entre otras [9]. Algunas de las nanopartículas más reportadas son las siguientes:

**Cerámicas:** compuestas por óxidos, carburos, carbonatos y fosfatos, cuentan con una alta resistencia al calor e inercia química. Se aplica en fotocatalisis, fotodegradación de colorantes, administración de fármacos e imágenes.

**A base de lípidos:** cuentan con un núcleo sólido y una matriz con moléculas lipófilas solubles y el núcleo externo se estabiliza por surfactantes y emulsionantes. Se utilizan como portadores de fármacos y para la liberación de ARN en la terapia del cáncer

**Aleación:** las aleaciones pueden ser bimetálicas y están influenciadas por las características de cada metal. Destacan en sus aplicaciones ortopédicas, en diagnóstico de cáncer y como biosensores

**Magnéticas:** son reportadas como biocompatibles y conservan su estabilidad coloidal, resisten la agregación si su interacción magnética se reduce. Se ocupan

principalmente en tratamientos selectivos de cáncer (hipertermia magnética) y manipulación de células madre, así como en la administración guiada de fármacos e imágenes por resonancia magnética

Poliméricas: los polímeros en nanopartículas se han utilizado como sistema de suministro de fármacos dirigidos y sostenidos, para administrar fármacos en dianas evitando efectos adversos, pueden incorporarse a la superficie o químicamente a las nanopartículas que portan carga. Se utiliza un polímero que hace estable a la NP en un ambiente biológico e intercede en la biodistribución.

Dendrímicos: en estas nanopartículas el fármaco puede estar encapsulado en la red de dendrímicos por medio de enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacción iónica o por medio de enlaces covalentes

Quitosa: este biopolímero actúa como bioadhesivo gracias a su solubilidad en agua y al tener carga positiva se une a mucoproteínas que tienen carga negativa, así prolonga el tiempo de permanencia de medicamentos unidos a quitosanos en el cuerpo y aumentando la biodisponibilidad del fármaco

Proteicas: en la superficie de la NP existe adsorción de proteínas y se rige por afinidades de unión de proteína-nanopartícula, así como proteína-proteína. Al unirse las proteínas a la NP forman una biocorona que hace posible su interacción con sistemas biológicos permitiendo que el sistema inmune lo reconozca como propio y dándole libertad de circulación en el organismo

## **1.4 Nanopartículas de plata**

Por su parte, las nanopartículas de plata (AgNP) se encuentran dentro de las más estudiadas por sus propiedades y potenciales aplicaciones biomédicas [10,11]. Las AgNPs aparte de contener plata pueden contar con distintos tipos de recubrimiento, en la literatura podemos encontrar citrato de sodio, polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol (PEG) entre los más reportados. Existen diferentes métodos para la síntesis de las AgNPs, las distintas rutas de síntesis dan lugar a diferentes tamaños, morfologías y estabilidad. Los métodos de síntesis de las AgNPs son, la síntesis física, la química y la biológica o mejor conocida como síntesis verde. En general, los procesos son clasificados como top-down (de

lo grande a lo más pequeño) o bottom-up (de lo más pequeño a lo grande) como se mencionó anteriormente.

La síntesis física utiliza métodos top-down provocando un desgaste, enfriamiento repetido y/o fotolitografía. Los métodos bottom-up, como la síntesis química que es una de las más usadas para la síntesis de AgNPs. Se utiliza sal de plata, reductores y un estabilizante o agente de terminación que controlará su tamaño, los estabilizantes cuentan con surfactantes y ligandos o polímeros. Finalmente, la síntesis biológica o síntesis verde busca ser amigable con el medio ambiente utilizando agentes reductores y agentes de terminación ecológicos como proteínas, péptidos, carbohidratos, algas, levaduras, entre otros más. La síntesis, es el procedimiento donde se definen los tres parámetros más importantes: el tamaño, la morfología y la carga de superficie, los cuales influyen en la estabilidad física y la distribución de las AgNPs [12].

El interés por la plata no es reciente, ya que este elemento químico se ha utilizado en la medicina desde hace siglos. La plata tiene propiedades antimicrobianas, lo que permite su uso en vendajes para el cuidado y tratamiento de heridas evitando infecciones. También se ha utilizado para el manejo de quemaduras y en gotas que contenían nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) al 1% para los recién nacidos, evitando enfermedades que causan ceguera. Además, se ha utilizado contra las verrugas, tratamientos de cistitis e infecciones de vías urinarias en niños. En la actualidad ha demostrado efectividad frente al VIH-1, hepatitis B y logra inhibir enfermedades parasitarias [13]. Las AgNPs han tenido gran impacto en su aplicación como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de cáncer [14]. No obstante, la actividad biológica de las AgNPs depende de las diversas propiedades fisicoquímicas. El interés en estas nanopartículas es debido a ciertas propiedades que presentan haciéndolas funcionales para transporte y liberación de fármacos como la adición de moléculas que permitan atravesar barreras biológicas, teniendo como ventaja entregar el fármaco en un órgano o célula diana evitando que se presente una toxicidad en el sistema biológico [15].

Sin embargo, su aplicación se ve limitada por la falta de estudios sistemáticos que permitan determinar los posibles efectos adversos a la salud humana [16]. La reactividad de las AgNPs, el tipo de célula y tipo de agente reductor que se emplea para su síntesis son elementos indispensables que pueden ser clave para determinar su toxicidad [17] y prevenir

efectos adversos por parte de estas, que pueden dispersarse al sistema cardiovascular y al sistema nervioso central provocando cardiotoxicidad, neurotoxicidad o inmunotoxicidad [18]. Las nanopartículas de plata siguen siendo evaluadas específicamente a bajas concentraciones, ya que altas concentraciones han mostrado que pueden ser sumamente tóxicas por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y causar procesos inflamatorios a nivel celular teniendo consecuencias que pueden llegar incluso a la muerte celular.

Las AgNPs han probado tener efecto antitumoral, pero cuando estas son administradas a concentraciones bajas pueden generar aberraciones cromosómicas y daños en el ADN [9]. De igual manera estas son utilizadas como transportadores de fármacos[17], este proceso es llevado a cabo por una liberación controlada, es decir, el fármaco se coloca al interior del sistema nanoparticulado y se recubre con una serie de polímeros o moléculas que causan una liberación prolongada y libere el fármaco específicamente cuando la NP este en el sitio diana, debido al camino recorrido por la AgNP se provoca un desgaste del recubrimiento haciendo que los poros queden expuestos y el fármaco, pueda liberarse en el sitio correspondiente [18].

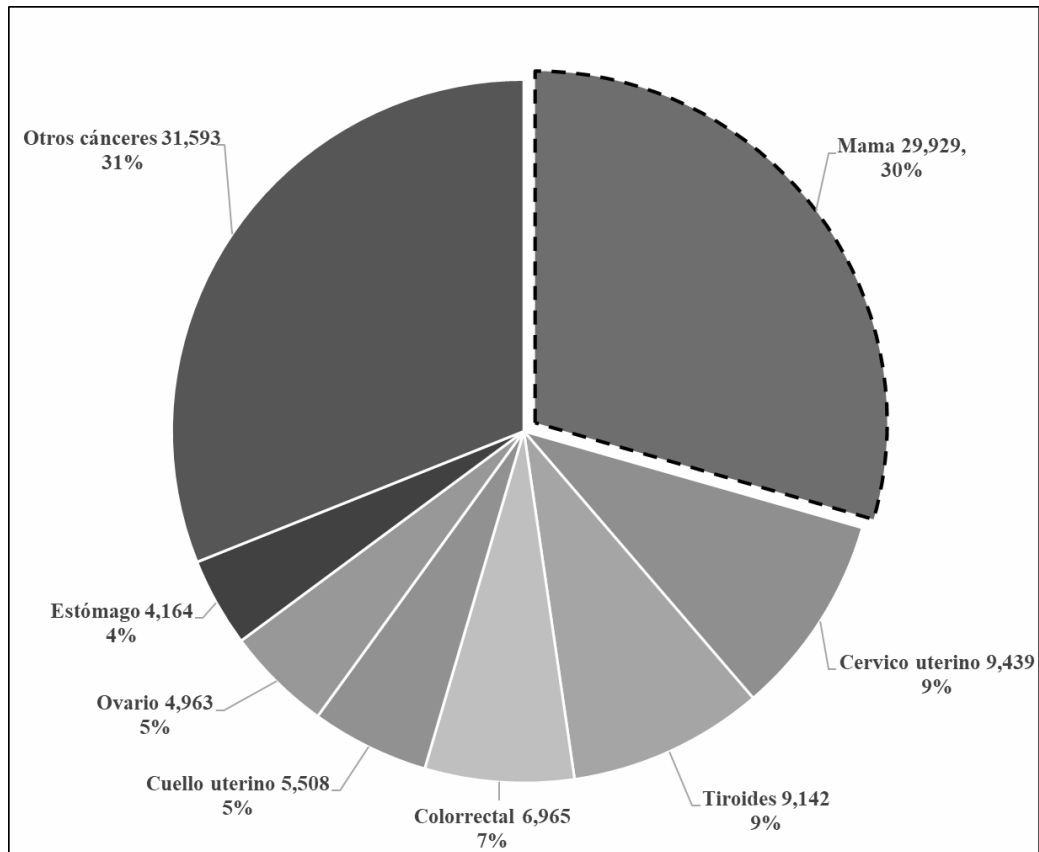
## **1.5 Cáncer**

El cáncer es una enfermedad que se genera a partir de células que crecen rápida e incontroladamente excediendo las células normales, dando como resultado un tumor [14]. Estudios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), mencionan que existen ciertos factores que causan mutaciones en genes y proteínas provocando una división celular descontrolada que induce tumores y generando neoplasias, estos factores son conocidos como carcinogénicos y pueden ser genéticos o externos. Entre los factores externos encontramos tres categorías: químicas, físicas y biológicas, entre ellos podemos encontrar tabaquismo, mala alimentación, falta de actividad física, luz solar, estrés, contaminantes ambientales, infecciones y genética [19]. En la actualidad a nivel mundial, el cáncer, es una de las principales causas de muerte al año, esta enfermedad es considerada un problema socio-sanitario de primer orden debido a su alta incidencia. Según datos de la OMS, el cáncer ocupa el segundo lugar de muertes a nivel mundial y su incidencia incrementa conforme a la edad de la persona.

En el año 2015 se estima que el cáncer causó 8.8 millones de muertes, mientras que, en el año 2020, se sabe que la tasa de mortalidad fue de casi 10 millones de personas, con una incidencia de casi el doble [19], previendo que para el año 2030 existirá un aumento que sobrepasará los 20 millones anuales [20]. La mayoría de los cánceres que afectan a la población a nivel mundial son especialmente 5 tipos: mama, pulmón, colorrectal, próstata y estómago (**tabla 1.2**) [21], teniendo en América Latina un estimado de 2.1 millones anuales [27].

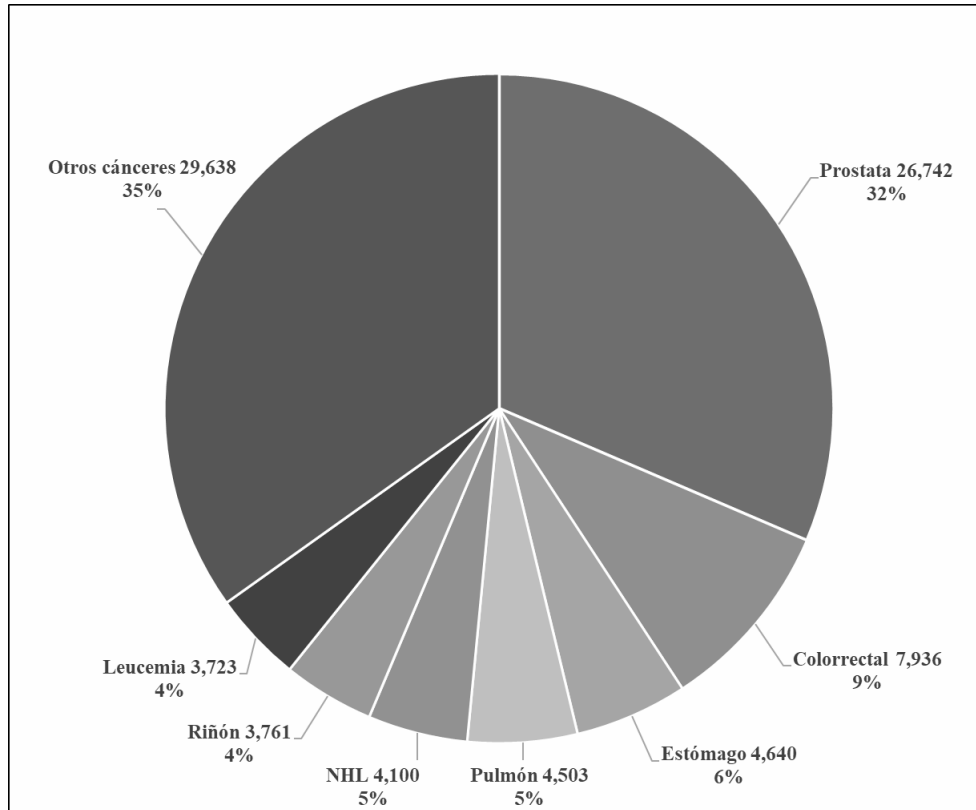
**Tabla. 1.2** Tasa de incidencia, mortalidad y prevalencia a 5 años a nivel mundial, ambos sexos, todas las edades.

<b>CÁNCER A NIVEL MUNDIAL</b>			
<b>Tipo de cáncer</b>	<b>Incidencia</b>	<b>Mortalidad</b>	<b>Prevalencia</b>
<b>Mama</b>	2 261 419	684 996	7 770 717
<b>Pulmón</b>	2 206 771	1 796 144	2 604 791
<b>Colorrectal</b>	1 931 590	935 173	5 253 335
<b>Próstata</b>	1 414 259	375 304	4 956 901
<b>Estómago</b>	1 089 103	768 793	1 805 968



**Figura 1.1** Número estimado de casos nuevos de mujeres en 2020, México de todas las edades

En México, las muertes causadas por cáncer ocupan el tercer lugar después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes [22]. Conforme a datos de *GLOBOCAN 2018* en México, los últimos seis años se contaba con una población de más de 130 millones de habitantes con una prevalencia de más de 480 mil casos y se registraron más de 190 mil casos nuevos, dejando una mortalidad de 84 mil individuos aproximadamente [23]. En el año 2020, los cánceres con mayor incidencia de casos nuevos son: para la población femenina, cáncer de mama, cérvico uterino, tiroides, colorrectal y cuerpo uterino (**figura 1.1**), mientras que para la población masculina son: próstata, colorrectal, estómago, linfoma no Hodgkin (**figura 1.2**).



**Figura 1.2.** Número estimado de casos nuevos de hombres en 2020, México de todas las edades

## 1.6 Cáncer de mama

En particular, el cáncer de mama es la neoplasia con mayor prevalencia e incidencia en mujeres con un aumento de más del 36.6% anualmente [21]. Este cáncer se desarrolla en la glándula mamaria y se debe a que las células de mama proliferan en la zona lobular, que es donde se produce la leche o la zona ductal, por donde circula la leche hacia el pezón. El cáncer de mama más común en las mujeres es el ductal, con un 80%, mientras que el lobular tiene una incidencia menor al 10% [24]. El cáncer puede ser *in situ*, lo que significa que la proliferación celular no traspasa la pared biológica y por ello no invade el tejido que lo rodea o carcinoma invasivo, en donde el tumor prolifera y traspasa la frontera natural anatómica del ducto o lóbulo invadiendo tejido circundante, el cáncer se transporta a otros órganos y los perjudica, proceso conocido como metástasis.

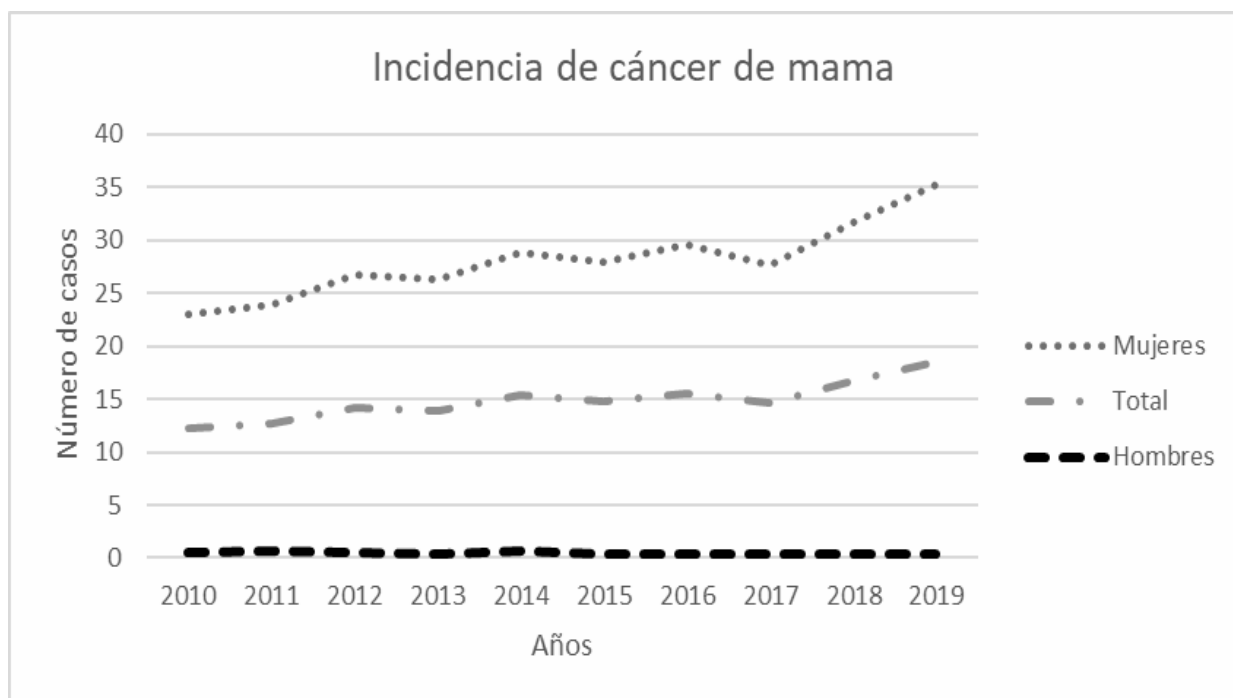
A nivel mundial, en el año 2020 se registró una incidencia de más de 2.26 millones de casos, dejando una mortalidad total de 684 996 personas a causa del cáncer de mama, más del 50% de los decesos fueron mujeres [19,25]. Dentro de estas cifras, en México se estiman 7 931 número de muertes a causa del cáncer de mama, es decir, más del 15% de casos descienden y, se estiman 29 929 de casos nuevos, más del 25%, posicionándolo en primer lugar tanto de mortalidad como de incidencia (**Tabla 1.3**).

**Tabla 1.3.** Tasa de incidencia, mortalidad y prevalencia a 5 años a nivel nacional (México), ambos sexos, todas las edades

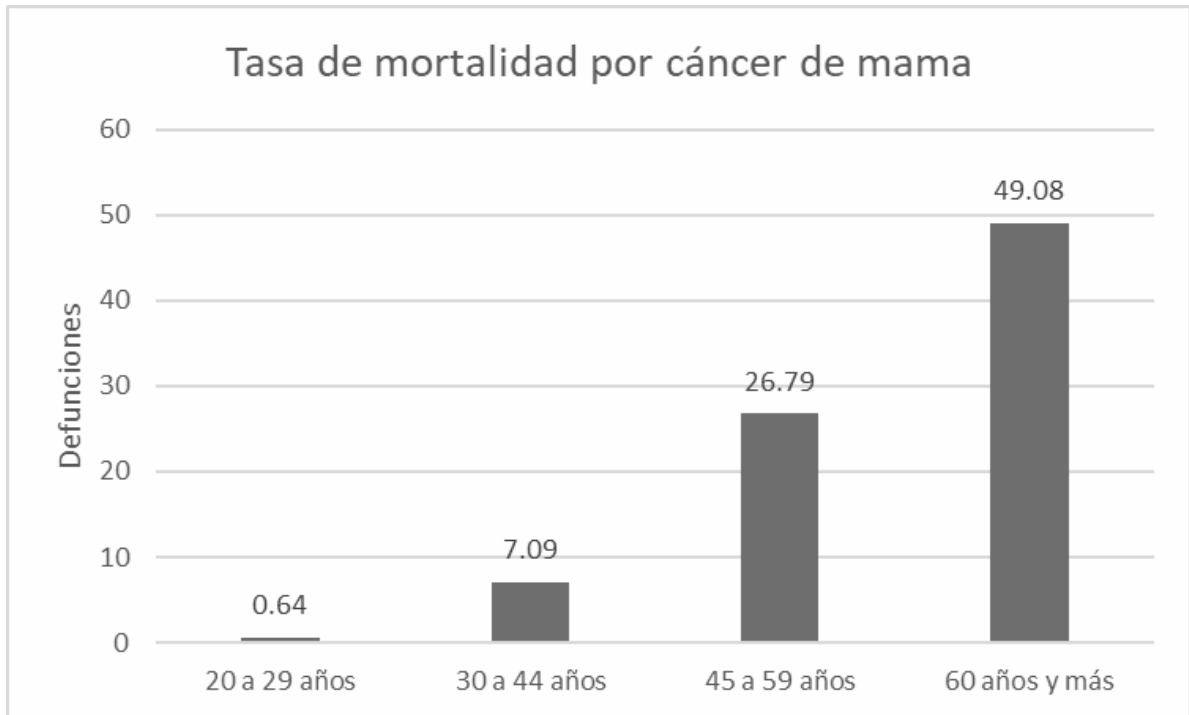
<b>Tipo de cáncer</b>	<b>Incidencia</b>	<b>Mortalidad</b>	<b>Prevalencia</b>
<b><u>Mama</u></b>	<u>29 929</u>	<u>7 931</u>	<u>99 288</u>
<b>Próstata</b>	26 742	7 457	90 670
<b>Colorrectal</b>	14 901	7 755	37 473
<b>Tiroides</b>	11 227	956	37 094
<b>Cervicouterino</b>	9 439	4 335	25 026

En particular, el cáncer de mama cuenta con una morbilidad de más de dos millones de casos anualmente, con una prevalencia a cinco años de aproximadamente ocho millones de casos a nivel mundial; mientras que, en México, el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) explica que es el más frecuente en el país con 27 mil 500 casos por año [26], cuenta con una prevalencia a cinco años de 99 288 casos, ocupando el primer lugar seguido del cáncer colorrectal en la población femenina. En nuestro país, en el año 2019 se registraron 15 286 casos nuevos de cáncer de mama, 167 casos son hombres y 15 119 casos son mujeres. La tasa de incidencia es de 18.55 casos nuevos por cada 100,000 mujeres y

0.42 casos nuevos por cada 100,000 hombres, ambos entre la población de 20 años en adelante (**Figura 1.3**) [13, 27].



**Figura 1.3.** Incidencia de cáncer de mama en la población de 20 años y más por sexo 2010 a 2019. Por cada 100 mil individuos de 20 años y más de cada sexo.



**Figura 1.4.** Tasa de mortalidad por cáncer de mama en mujeres de 20 años y más, por grupos de edad 2020. Defunciones por cada 100 mil mujeres.

La tasa de mortalidad por cáncer de mama en México, según cifras preliminares del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), es de 1 086 094 fallecimientos en el año 2020, dentro de estas cifras el 0.64% pertenece a mujeres de entre 20 a 29 años, el 7.09% a mujeres de entre 30 a 44 años, el 26.79% a las mujeres entre 45 y 59 años, mientras que el 49.08% corresponde a mujeres mayores de 60 años (**Figura 1.4**) [13].

## 1.7 Detectando el cáncer

Lo anterior nos muestra un incremento en el número de defunciones directamente proporcional a la edad, siendo uno de los principales factores la falta de métodos de detección temprana del cáncer. Existen estudios que nos permiten detectar el cáncer como, por ejemplo:

- Mamografía: Imagen del interior de la mama que nos permite identificar tumores pequeños o un carcinoma ductal *in situ*.
- Tomosíntesis: Se utilizan rayos X para tomar imágenes desde distintos ángulos y se usa computadora para crear imágenes tridimensionales de la mama por medio de las imágenes.
- Resonancia magnética: Se utiliza un imán y ondas de radio, se toman imágenes del cuerpo por partes para detallar imágenes entre partes y distinguir tejidos sanos y enfermos.
- Análisis de sangre u orina: Detectan presencia de marcadores tumorales, que son sustancias que generan las células cancerosas o células del cuerpo como respuesta al cáncer.
- Tomografía computarizada: Imágenes tomadas por máquina de rayos X. Pueden crear imágenes 3D más detalladas del interior del cuerpo.
- Tomografía nuclear: Se ocupa material radioactivo para tomar imágenes del interior del cuerpo, el cual perderá su radioactividad y se eliminará por heces u orina.
- Termografía: Procedimiento por medio de una cámara especial que detecta el calor para registrar la temperatura de la piel que cubre las mamas.
- Muestreo de tejido: Se toman células del tejido de la mama para observarlas al microscopio y un profesional analiza la muestra.

Los pronósticos varían en función del diagnóstico, cuando este último es tardío el cáncer se encontrará en una etapa avanzada haciendo que las oportunidades de tratamiento y el pronóstico de vida sean menos beneficiosos para los individuos. Es por lo que, en las últimas cinco décadas se han desarrollado diferentes tratamientos contra el cáncer de mama, desde tratamientos quirúrgicos hasta quimioterapéuticos. A pesar de su existencia, uno de los principales inconvenientes es que los tratamientos pueden ocasionar efectos secundarios que varían de una persona a otra y dependiendo del método utilizado, estos efectos pueden ir desde cansancio hasta el desarrollo de otro tipo de cáncer [28]. De igual manera, las terapias actuales existentes tienen costos elevados y varían conforme a cada paciente, en ciertos casos pueden ser necesarios más de un tratamiento para un solo paciente (**tabla 1.4**) [29]. En México estos tratamientos no son cubiertos por la seguridad social, lo que limita a los pacientes a poder tener acceso a ellos [22].

**Tabla 1.4.** Costos unitarios de tratamientos para el cáncer de mama, descripción de los tratamientos y los efectos secundarios que pueden presentarse. Datos tomados de (Knaul et al., 2009)

<b>Tratamiento</b>	<b>Costo unitario de tratamiento</b>	<b>Descripción de tratamiento</b>	<b>Efectos secundarios</b>
Quimioterapia	\$7, 034 - 30,806 por sesión	Uso de medicamentos contra el cáncer administrados vía oral o intravenosa	Daño a células de distintos órganos, cansancio, pérdida de cabello, náuseas, vómitos y anemia
Inmunoterapia	\$5,500	Uso de medicamentos que estimulan el sistema inmunitario para que reconozca y destruya a las células cancerosas	Cansancio, falta de aire, pérdida de peso, disminución de apetito, diarrea, problemas para dormir y llagas en el cuerpo
Lumpectomía	\$11, 503 - 13,947	Cirugía con conservación del seno	Dolor en el seno. Hinchazón temporal y cambio en la forma del seno
Mastectomía	\$20,054 - 20, 489	Cirugía que extirpa totalmente el seno	Dolor en la parte del seno, acumulación de la sangre en la herida, limitación de

			movimiento y dolor en terminales nerviosas
Radioterapia	\$9,991	Tratamiento con rayos de alta energía que destruye células cancerosas	Cansancio, problemas en la piel, caída de cabello, y recuentos sanguíneos bajos

La tasa de supervivencia promedio a cinco años en la población afectada por el cáncer de mama invasivo no metastásico es del 90% mientras que la tasa de supervivencia promedio a diez años con cáncer de mama invasivo no metastásico es del 85% [30]. Por el contrario, si el cáncer de mama es invasivo, pero se encuentra sólo en la mama, la tasa de supervivencia a cinco años es del 99% para las mujeres. Si el cáncer se encuentra afectando los ganglios linfáticos el porcentaje de supervivencia a cinco años es del 86%. En caso de que el cáncer se haya diseminado a cualquier otra parte del cuerpo, la probabilidad de vida será mucho menor a las mencionadas anteriormente, a cinco años la tasa de supervivencia será de un 27% aproximadamente [31]. La posibilidad de mejorar la calidad de vida de los individuos enfermos de cáncer es dependiente de distintos factores como el tiempo de detección, tamaño de bulto, rapidez de crecimiento, cantidad de ganglios afectados y eficiencia del tratamiento. Cabe recalcar que las estadísticas de sobrevivencia son una estimación.

## Capítulo 2

### Justificación

A pesar de que en la actualidad se cuenta con distintos tratamientos para el cáncer, el número de muertes aumenta año con año y lamentablemente se presentan nuevos casos de cáncer de mama multidrogoresistentes [32]. En este sentido la nanotecnología brinda posibles alternativas para el tratamiento de cáncer utilizando nanopartículas, las cuales cuentan con propiedades fisicoquímicas que proporcionan una actividad biológica

particular en modelos celulares y animales [33]. Existen estudios donde se reporta que las nanopartículas de plata no dañan a las células sanas e inhiben exitosamente el crecimiento de células tumorales. Al mismo tiempo, investigadores demuestran que la respuesta de las AgNP es positiva, alta, e incluso podría ser accesible para cualquier paciente [25]. Gracias a las características que han mostrado en biomedicina [34], se busca generar herramientas que sean seguras y viables para tratar a los pacientes de cáncer.

Para poder generar nuevas alternativas como tratamientos para el cáncer existen distintos tipos de estudios que van desde lo teórico hasta la fase clínica. Primero se estudia el problema desde el nivel más básico para así generar ideas de las nuevas herramientas que se utilizarán como alternativa. En este estudio se aplicaron ensayos *in vitro*, es decir, se experimenta directamente en las células de cáncer de mama humano. El uso de las líneas celulares es viable gracias a la facilidad que brindan para diseñar experimentos con múltiples réplicas para distintos usos. Cuentan con un número de pases ilimitado, ya que estas son células inmortalizadas, son fáciles de mantener y su proliferación con las condiciones adecuadas es rápida conservando sus características. El uso de un tipo celular bien caracterizado y diferenciado puede brindar confianza y seguridad en los datos generados en cuanto a la validez de los resultados obtenidos *in vitro*, mismos pueden diferir de lo que pueda observarse *in vivo*, de ahí la importancia de la reproducibilidad.

## **Capítulo 3**

### **Antecedentes**

#### **3.1 Nanopartículas de plata Argovit™**

Las AgNP Argovit™ han reportado una baja toxicidad en diversos modelos estudiados, haciéndolo idóneo como alternativa para combatir diferentes enfermedades sin presentar efectos adversos a las células normales [35, 36]. Respecto a los estudios *in vitro* se han

obtenido muy buenos resultados, atacando a células diana sin tener un efecto secundario o adverso a otros tipos celulares presentes [67].

### **3.2 Líneas celulares**

La línea celular es un cultivo continuo capaz de proliferar y crecer en condiciones especiales, son subcultivos de cultivos primarios y pueden proceder de animales, humanos o plantas [38]. Las células sirven como modelo para estudiar la fisiología y bioquímica de las células sanas y enfermas. Dentro de las ventajas que estas presentan son el precio y la facilidad de manipulación, su uso es principalmente aplicable a la investigación y producción a gran escala de compuestos biológicos [39]. La mayoría de las células, ya sean animales o vegetales, logran vivir, dividirse e inclusive contar con propiedades diferenciales dependiendo de donde se cultiven y los medios de cultivo que se utilicen para el mantenimiento de la línea celular [40].

Existen dos tipos de cultivos celulares, adherentes y en suspensión. Los cultivos adherentes se pegan al contenedor donde se encuentran y crecen en monocapa, en otras palabras, crecen en una capa unicelular [41]. El cultivo en suspensión es cuando las células se quedan flotando en el medio de cultivo celular sin tener la necesidad de adherirse a algo sólido para poder proliferar [42]. La línea celular utilizada en este estudio fue la MCF-7, células de cáncer de mama adherentes hormono-dependientes.

### **3.3 Aplicación de líneas celulares**

Las líneas celulares son utilizadas como herramientas para estudios, principalmente en la biología celular y molecular, permiten estudiar su morfología, citotoxicidad y genotoxicidad de diferentes sustancias, entre otros estudios más. Existen distintas aplicaciones experimentales, así como diversas líneas celulares que pueden ser estudiadas de manera *in vitro* [46]. Se utilizan principalmente porque son el punto de partida para muchas aplicaciones tecnocientíficas en el área de la salud. De las ventajas que tienen es que son accesibles, menos costosas y son fáciles de trabajar en comparación con un organismo más completo.

La línea celular es creada a partir de un cultivo primario, lo cual implica que el número de células aumente, su población sea homogénea y las características de las células se conservarán por generaciones con las condiciones adecuadas [47], pueden ser congeladas en nitrógeno líquido o a temperaturas de  $-80^{\circ}\text{C}$  y ser almacenadas por periodos largos sin perder sus propiedades. Las líneas celulares ofrecen un modelo valioso para experimentos preliminares, sin embargo, después de cierto número de divisiones, las células perderán su capacidad de proliferar llegando a una etapa conocida como senescencia y morirán, perdiendo así la línea celular. Las líneas celulares se utilizan principalmente en investigación y desarrollo de fármacos como modelo de tejido sano o tejido enfermo para conocer ciertos procesos biológicos, analizar el metabolismo, pruebas de detección y citotoxicidad de fármacos, estudiar la función de los genes y la producción de vacunas, anticuerpos y/o compuestos biológicos [48].

### **3.3.1 Citotoxicidad**

La toxicidad que se genera por agentes externos a la célula provocando un daño se conoce como citotoxicidad. Son efectos adversos que se ven reflejados en la disrupción de la membrana o en procesos celulares, ambos efectos son fundamentales para la supervivencia, funcionamiento y la proliferación celular [49]. El componente se considera citotóxico si existe interferencia y perjudica a las células. Los ensayos de citotoxicidad son utilizados en los productos cosméticos, farmacéuticos y plantas, todo esto con la finalidad de medir la viabilidad celular es decir la inhibición del crecimiento celular [50]. Existen pruebas que determinan la citotoxicidad de los compuestos, estos ensayos de citotoxicidad se ocupan para el desarrollo y descubrimiento de nuevos potenciales a fármacos. Dependiendo hacia donde estén dirigidos estos ensayos, permiten que el compuesto en desarrollo continúe y avance a nuevas pruebas, en el caso de no cumplir los objetivos se podrá descartar, ya que puede provocar efectos adversos a los propuestos.

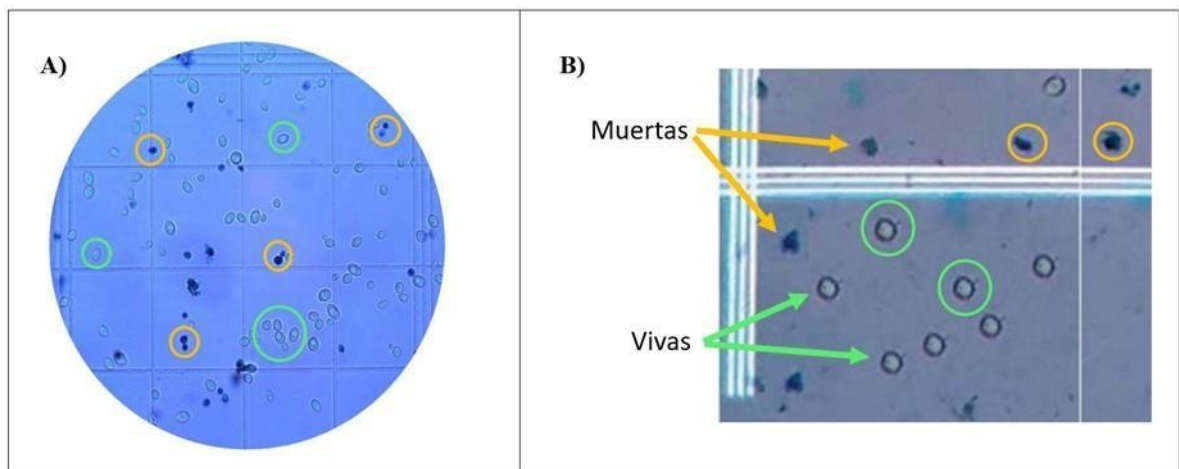
### **3.3.2 Viabilidad celular**

El ensayo de viabilidad celular nos ayuda a identificar a las células que se encuentran vivas después de ser expuestas a algún tratamiento. Permiten determinar actividad enzimática, rompimiento de la integridad de la membrana y producción de ATP

junto con otros indicadores. Se utiliza en pruebas de citotoxicidad, nos revela los efectos que se generan por inducción del compuesto probado. Podemos identificar si las células están muertas o vivas por medio del ensayo de exclusión vital.

### 3.3.3 Prueba de exclusión de azul tripano

Este ensayo nos permite detectar las células vivas y muertas ya que estarán expuestas a azul a tripano. El azul tripano penetrará únicamente en las células muertas, las células vivas son impermeables a este colorante, ya que su membrana se encuentra completamente intacta evitando el paso al colorante, mientras que las muertas tendrán disrupción en la membrana permitiendo el paso al azul tripano (**Figura 3.1**). Para ver un efecto con el azul tripano, primero las células se exponen al tratamiento con el compuesto y se incuban por un tiempo definido, tras ser expuestas e incubadas se agrega el azul de tripano y por medio de un microscopio óptico se observan y podemos determinar si la célula está viva o muerta dependiendo el color que se refleje, si la célula es viable se verá clara, si la célula está muerta tendrán el citoplasma color azul.



**Figura 3.1.** Prueba de exclusión de azul tripano. A) Células de levadura, B) Células MCF-7. Las células refringentes son las vivas (círculos verdes), mantienen su membrana celular intacta y no permite el paso del colorante, mientras que en las células no viables (círculos amarillos) el colorante penetra la membrana permitiendo el ingreso al citoplasma.

A) Tomada de *Eureka Brewing*. B) Adaptada de Martínez-Torrez, (2016).

### **3.3.4 Muerte celular**

La muerte celular es un parámetro biológico que diagnostica el estado en que se encuentra la célula, es decir, si es viable o no. La determinación de vía de muerte celular nos revela condiciones exactas de las células a un nivel fisiológico, morfológico y genético [51]. Si las células que se exponen a los agentes presentan una activación en secuencia de complejas vías biológicas y genéticas que resulten en daños a nivel estructural, funcional y fisiológico, estos agentes podrían no tener aplicabilidad médica ya que se representa un riesgo celular elevado [52]. Dentro de los factores que provocan la muerte celular está el estrés oxidativo, falta de nutrientes, cambios bruscos de temperatura, agentes nocivos, entre otros [53].

La muerte celular puede ocurrir por medio de dos vías, apoptosis o necrosis, dependiendo la forma en cómo muere la célula. La apoptosis es una muerte programada, en esta vía existen interacciones proteicas, entrecruzamientos, rompimientos y degradación, de igual forma existe un reordenamiento estructural y un consumo de energía para poder concluir su ciclo celular, el tiempo en que tarde este proceso depende del tipo de célula [54]. La necrosis, al contrario de la apoptosis, tiene un desorden y es independiente de energía, existen cambios definitivos en el núcleo y la integridad de la membrana se pierde, también se sabe que presenta disfunción en mitocondria y se eleva el volumen celular y libera el material genético al exterior de la célula [55]. La diferencia entre estas dos vías es que la apoptosis se queda con su material genético en el interior de la célula evitando que existan daños colaterales y no provocará inflamación mientras que la necrosis liberará todo su contenido exponiendo a otros organelos y existirán procesos inflamatorios. Para determinar por qué vía muere la célula existen distintos tipos de ensayos, en este trabajo se utilizó Alexa Fluor 488, donde más adelante se explica el proceso.

### **3.3.5 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producto del metabolismo aeróbico fisiológico normal [56]. Estas especies contienen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, al entrar en un estrés ambiental sus niveles varían y provocan un desbalance dejando daños significativos a las células, este estado es conocido como estrés oxidativo. El

estrés oxidativo se caracteriza por presentar un desequilibrio entre la generación y eliminación de ROS, lo cual se vincula al envejecimiento y desarrollo de afecciones cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y el cáncer entre otras [57]. El desbalance existente es debido a la sobreproducción de ROS y el sistema de defensa antioxidante provoca un daño y por consecuencia una rotura de la función celular.

Las ROS están presentes en la señalización celular, pero a bajas concentraciones, de igual manera pueden participar para defensa contra agentes infecciosos, por el contrario, estas especies causaran daños irreversibles a lípidos, ácidos nucleicos y proteínas celulares a altas concentraciones [58]. El término de especies reactivas de oxígeno hace referencia a dos tipos de moléculas: los radicales libres y los no radicales [59]. Los radicales libres son moléculas autosuficientes mientras cuenten con uno o más electrones desapareados en su última órbita, su configuración paramagnética la hace inestable y altamente reactiva pudiendo entrar en contacto con moléculas que integren la estructura celular, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [60, 61].

El radical libre más común es el de oxígeno, a concentraciones altas, por encima de los niveles atmosféricos provoca daños reversibles e irreversibles pudiendo resultar en la muerte celular [62]. Estas moléculas se hacen letales debido a que pierden el equilibrio con sustancias prooxidantes y antioxidantes desencadenando estrés oxidativo dejando como resultado procesos patológicos. El oxígeno oxida compuestos reduciéndose como consecuencia a la ganancia de electrones, dicho con otras palabras, al incrementar un electrón al oxígeno teniendo un estado fundamental se creará el anión superóxido y si se agrega otro electrón se tendrá el anión peróxido, ya no siendo un radical libre debido a que no cuenta con electrones desapareados [63].

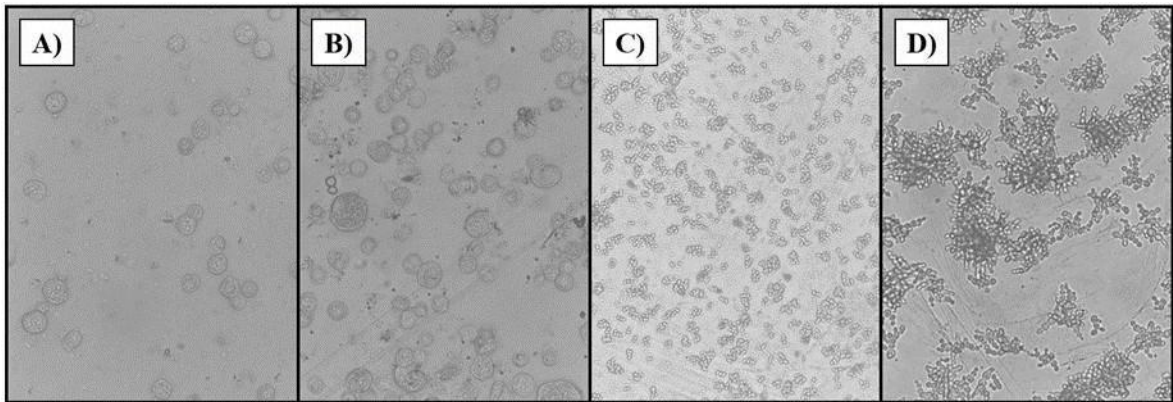
### **3.3.6 Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )**

El ion superóxido es generado por la reducción de un electrón de oxígeno, es el radical más común y abundante a nivel celular. Puede originarse por dos fuentes, cadena respiratoria mitocondrial y fagocitosis [64]. El sistema biológico libera la superóxido dismutasa (SOD), que es una enzima que mantiene la concentración del anión superóxido en un nivel estándar, pero al excederse el anión superóxido y/o las defensas antioxidantes

son débiles se desencadenará estrés oxidativo causando daños a biomoléculas y alterando su función fisiológica [65].

### 3.4 Línea celular de cáncer de mama MCF-7

La línea celular MCF-7, acrónimo de *Michigan Cancer Foundation*, (**Figura 3.2**) son células epiteliales aisladas del tejido mamario de una paciente blanca de 69 años con adenocarcinoma metastásico, considerada de bajo potencial maligno. La línea celular conserva características del epitelio mamario diferenciado entre ellas, la capacidad de procesar estradiol por medio de los receptores de estrógeno citoplasmáticos y la capacidad de formar cúpulas. De igual manera expresan el oncogén WNT7B [43], el cual juega papel fundamental en el desarrollo, renovación de tejidos y enfermedades humanas. Es un regulador crítico de genes y está involucrado en el desarrollo, invasión y metástasis del tumor [44].



**Figura 3.2.** Línea celular de adenocarcinoma metastásico de mama MCF-7. A) pase 0, recién descongeladas, B) pase 1, primera división, C) 75% de confluencia, D) 85% de confluencia. Imágenes con aumento (40X)

## Capítulo 4

## **Marco teórico**

### **4.1 Aplicaciones de las AgNP Argovit™**

Las AgNPs Argovit™ han sido estudiadas para combatir diversas enfermedades y generar una nueva opción para tratamientos efectivos y seguros. Dentro de los tratamientos donde se han implementado las AgNP Argovit™ como alternativa se encuentran:

- Úlceras de pie diabético (DFU), es una complicación común en pacientes que padecen diabetes mellitus y están expuestos a infecciones microbianas que pueden llegar a provocar la amputación completa del pie infectado. Las AgNP se utilizaron como tratamiento para las úlceras de pie diabético de grado II y III de la clasificación de Wagner, su administración fue tópica y se continuó con la administración de antibióticos convencionales. Los resultados fueron positivos al tener una mejora significativa en menos de 25 días tras someterse al tratamiento con AgNP [45].
- Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus-2 (SARS-CoV-2), es una infección provocada por un virus de fácil propagación entre individuos. Los estudios tuvieron como respuesta que las AgNP muestran un efecto inhibitorio sobre la infección, existe una interferencia con proteínas estructurales del virus e inhibe la capacidad para unirse a receptores celulares o unirse a material genético mediante la inhibición de su replicación [37].

### **4.2 AgNP Argovit™ contra el cáncer**

Existen estudios donde se reporta que las AgNP Argovit™ se han administrado a cultivos de diferentes líneas celulares cancerígenas entre ellas células de cáncer de cuello uterino (HeLa), pulmón (H1299 y H1437), próstata (DU-145), colon (HT-29 y DLD-1) y mama (MDA-MB-231 y MCF-7). El motivo de usar distintas líneas es para probar si las AgNP inhiben eficazmente la viabilidad celular de líneas celulares de cáncer dependientes y no dependiente de hormonas. Tras exponer las células por 12 y 24h a tratamientos con AgNP se observa que la viabilidad disminuye significativamente siendo dependiente del tiempo y la dosis, las AgNP a 20µg/ml de plata metálica presentan alta citotoxicidad en

ambos tiempos de incubación. Sin embargo, con 10µg/ml, existe una disminución radical en la viabilidad celular en las líneas celulares menos en las células de próstata DU-145. La susceptibilidad de muerte varía dependiendo del tiempo de exposición y concentración. Respecto a la generación de ROS, se reveló que la línea celular MCF-7 es más susceptible a la formación de ROS después de la incubación con AgNP viéndose un efecto en las primeras 12h. En las líneas celulares MDA-MB-231, HeLa y MCF-7 se observa una diferencia significativa dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición. El estudio brinda información sobre la citotoxicidad provocada por las AgNP, la cual no está relacionada con la dependencia hormonal de las células cancerosas, sino con la generación intracelular de ROS y la muerte apoptótica [66].

## **Capítulo 5**

### **Hipótesis**

Las nanopartículas de plata Argovit™ inducen un efecto citotóxico significativo en líneas tumorales de cáncer de mama demostrando selectividad, dando como resultado un efecto antiproliferativo.

## **Capítulo 6**

### **Objetivos de la investigación**

#### **6.1 Objetivo general**

Determinar el efecto antiproliferativo de nanopartículas de plata en una línea celular cancerígena humana.

#### **6.2 Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto antiproliferativo de nanopartículas de plata Argovit™ en un cultivo de línea tumoral de mama.
- Determinar la vía de muerte celular inducida por las nanopartículas de plata.

- Analizar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cultivos tratados con AgNPs.

## Capítulo 7

### Metodología

En este capítulo se dan a conocer las formulaciones de AgNP Argovit™ que se utilizaron, el procedimiento seguido para el cuidado, mantenimiento y conservación de la línea celular MCF-7 y el método para la realización de los ensayos de viabilidad, ensayo de vía de muerte y la determinación de generación de especies reactivas de oxígeno.

#### 7.1 Formulaciones de AgNP

Las formulaciones de nanopartículas de plata Argovit™ utilizadas en este proyecto fueron proporcionadas amablemente por la Dra. Nina Bogdanchikova del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM y el Dr. Vasily Burmistrov del Centro Científico y de Producción Vector Vita Ltd.® (Novosibirsk, Rusia). Las AgNP son proporcionadas como una suspensión acuosa con una concentración de 200 mg/ml. En nuestra nomenclatura interna, las formulaciones utilizadas son la 4 y la 5, AgNP4, AgNP5, respectivamente. Las diferencias entre estas formulaciones se presentan en la Tabla 7.1

**Tabla 7.1.** Características y propiedades de las formulaciones AgNP4 y AgNP5. Tomada y adaptada de Cruz-Ramirez; et al. (2021)

Propiedades	AgNP4	AgNP5
Diámetro medio de núcleos metálicos ØAg (nm)	16.4 ± 8.1	30.6 ± 23.2
Distribución de tamaño de TEM (nm)	5–40	5–80
PVP	K-30 *	12.6 kDa
Diámetro hidrodinámico Øhidro (nm)	483.2	121.1

Índice de polidispersidad (PDI)	0.555	0.280
Potencial zeta $\zeta$ (mV)	-0.464	-1.46
Resonancia de plasmón superficial ( $\lambda$ )	406, 549	429
Análisis TGA		
Plata metálica (% p/p)	1.19 $\pm$ 0.01	1.31 $\pm$ 0.01
PVP (% p/p)	20.92 $\pm$ 0.42	21.67 $\pm$ 0.50
H <sub>2</sub> O (% p/p)	77.89 $\pm$ 0.80	77.02 $\pm$ 0.40
Morfología	Principalmente esférica	Esférica

\*K-30: 45,000 – 58,000 Da.

## 7.2 Mantenimiento y conservación de la línea celular MCF-7

### 7.2.1 Descongelar células MCF-7

La línea celular de carcinoma de mama humano MCF-7 (HTB-22) fue adquirida de la ATCC (American Type Culture Collection). Se descongelan a temperatura ambiente y se siembran en caja Petri con 9mL de medio DMEM alto en glucosa (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10 $\mu$ L de antibiótico/antimicótico concentrado. La caja Petri con células se homogeniza y se deja incubando a una temperatura de 37°C, 95% de humedad, bajo una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

### 7.2.2 Mantenimiento y proliferación de línea celular MCF-7

Diariamente se revisa el cultivo celular en el microscopio invertido para supervisar la proliferación de las células. Una vez que se alcanza una confluencia de alrededor del 60%, o en caso de observar restos celulares derivados del descongelamiento, se realiza un

cambio de medio. Para el cambio de medio se toma todo el medio celular con ayuda de una micropipeta, se coloca en un tubo cónico y se centrifuga a 2200 rpm por 10 minutos. El concentrado celular se resuspende en 5mL de medio DMEM alto en glucosa y se siembra en una caja Petri de 10 ml agregando suficiente medio con 10  $\mu$ l de antibiótico/antimicótico 1X, se mueve cuidadosamente en forma circular para homogeneizar el medio celular con el antibiótico y se mete a incubar nuevamente. Este proceso se repite las veces que sea necesario hasta alcanzar el 80% de confluencia.

### **7.2.3 Pase de células**

El pase celular se realiza una vez que se cuenta con el 80% de confluencia en nuestra caja Petri, a este proceso se le conoce como “Pase” y es necesario para preservar la línea celular. Para este método se utiliza un raspador (scraper) para despegar las células del fondo de la caja, el medio se resuspende con una micropipeta y se toman 2 mL de la caja inicial para sembrar en otra caja Petri; una vez transferido el contenido celular en la caja se afora el volumen a 10 ml con medio DMEM alto en glucosa suplementado. Finalmente, se incuba bajo las mismas condiciones descritas en las secciones anteriores.

### **7.2.4 Congelar células**

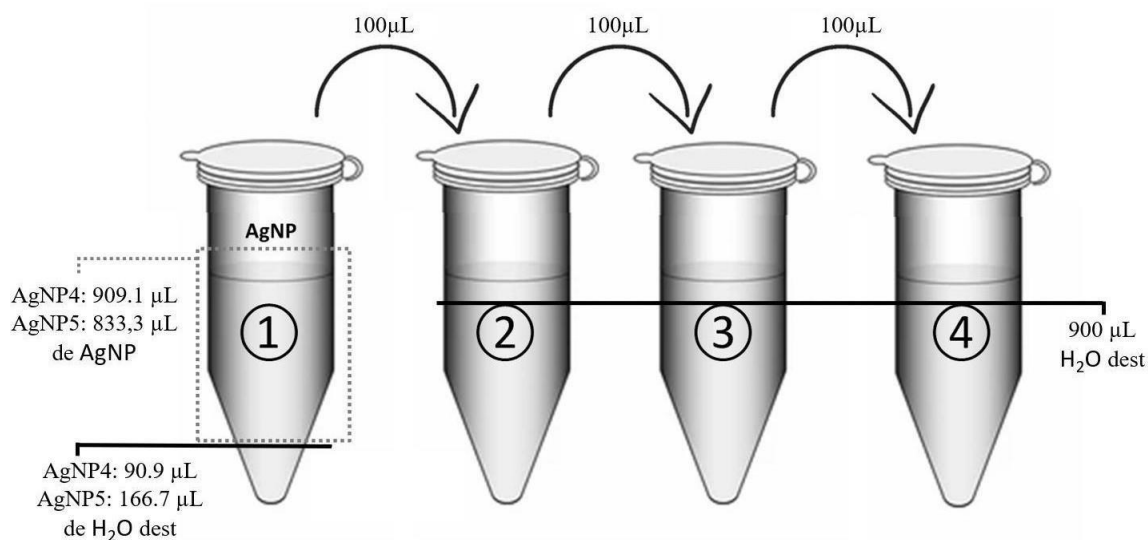
Con el objetivo de preservar la línea celular se congela al menos un vial de cada pase realizado siguiendo el procedimiento que se describe a continuación. Primero, con ayuda de un raspador se despegan las células que se encuentran adheridas a la caja, se homogeneiza el cultivo con ayuda de una micropipeta, se pasa a un tubo cónico (15 mL) para ser centrifugado a 1800 rpm durante 10 minutos. Se decanta el sobrenadante, se agregan 1.5 mL de medio suplementado con 10% de suero bovino fetal para resuspender el concentrado celular que se trasvasa a un criovial. Finalmente se agregan 160  $\mu$ l (10%) de dimetilsulfóxido (DMSO), se cierra el vial e inmediatamente se coloca en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, después de este tiempo se coloca en un ultracongelador para ser almacenadas a  $-86^{\circ}\text{C}$ .

## 7.3 Preparación de disoluciones iniciales

### 7.3.1 Nanopartículas de plata

Las formulaciones que se utilizaron para preparar las disoluciones iniciales fueron las denominadas Argovit™ AgNP4 y AgNP5. Para este proceso se agitaron manualmente para homogeneizar las nanopartículas. Se preparan 4 disoluciones con en escala logarítmica considerando el contenido de plata metálica de cada formulación de AgNPs. Las concentraciones de trabajo fueron 1 mM, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ M.

Para la primer disolución inicial de cada formulación se tomaron 909.1  $\mu$ l de AgNP4 + 90.9  $\mu$ l de agua destilada y 833.3  $\mu$ l de AgNP5 + 166.7  $\mu$ l de agua destilada. Estas mezclas se colocaron en un su respectivo tubo de microcentrífuga ① teniendo nuestra primera concentración (1mM) de cada formulación de nanopartículas. A partir de esta concentración ① se preparan 3 diluciones. El procedimiento es el siguiente, al tubo ② se le agregan 900  $\mu$ l de agua destilada y 100  $\mu$ l del tubo ① y se agita por unos minutos para homogeneizar la muestra y obtener una concentración 100  $\mu$ M. El procedimiento se repite para generar los tubos ③ y ④ con cencentraciones 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ M, respectivamente. (**Figura 7.1**).



**Figura 7.1.** Realización de Disolución concentradas de AgNPs Argovit™, formulación 4 y 5.

### 7.3.2 Nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>)

Para las disoluciones de AgNO<sub>3</sub> se consideraron las concentraciones más alta y baja de AgNPs preparadas, es decir 1 mM y 1 μM. De la disolución más diluida se preparó una dilución 1:1 con solución salina fisiológico (SSF) resultando en una concentración final de 0.5 μM.

### 7.3.3 Doxorrubicina (DOX)

Para la doxorrubicina se utilizó la concentración inhibitoria media máxima (IC<sub>50</sub>) reportada en la literatura, 0.69 μM. Los cálculos para realizar el disolución concentrada de doxorrubicina con una concentración inicial de 13.8μM y una final de 0.69μM se muestran a continuación.

*PM Dox: 543.52 g/mol*

*Concentración: 13.8μM*

*13.8 μmol en 1L*

*$n = m/PM$*

*$M = mol/L$*

$$m = (n)(PM) = (13.8 \times 10^{-6} \frac{mol}{L})(543.52 \frac{g}{mol}) = 7.500 \times 10^{-3} \frac{g}{L}$$

$$13.8 \mu mol/L = (13.8 \times 10^{-6} mol/L)(150 \times 10^{-6} L) = 2.07 \times 10^{-9} mol$$

$$m = (n)(PM) = (2.07 \times 10^{-9} mol)(543.52 g/mol) = 1.125 \times 10^{-6} g = 1.125 \mu g$$

$$1 mg/ml \quad n = ((1 \times 10^{-3} g)/543.52 g/mol) = ((1.84 \times 10^{-6} mol)/1 \times 10^{-3} L)$$

$$= 1.84 \times 10^{-6} mol/L = 1.84 \mu M$$

*$C1V1 = C2V2$*

$$V1 = ((13.8 \times 10^{-6} mol/L)(1 \times 10^{-3} L)/(1.84 \times 10^{-6} mol/L)) = 7.5 \times 10^{-6} L$$

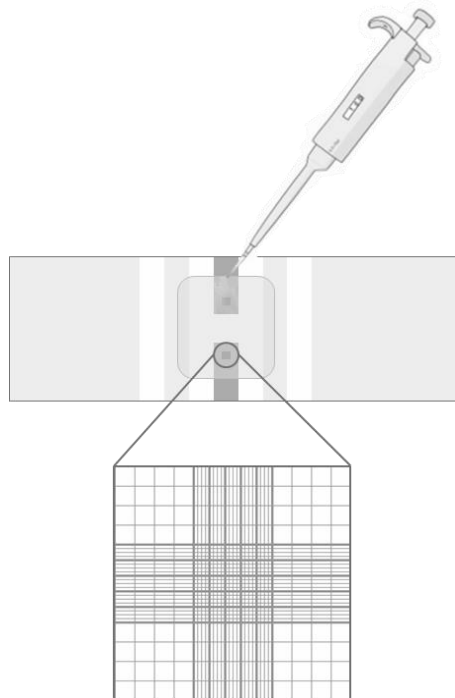
*Stock Dox: 7.5μL de doxorrubicina + 992.5μL de agua destilada*

Teniendo un total de 1000μL de disolución concentrada.

## 7.4 conteo en cámara de Neubauer

Para la realización de cada ensayo primero es necesario contar las células que hay en las cajas de cultivo para poder calcular el volumen necesario que deberá ser agregado a cada pozo de una caja de 96 pozos.

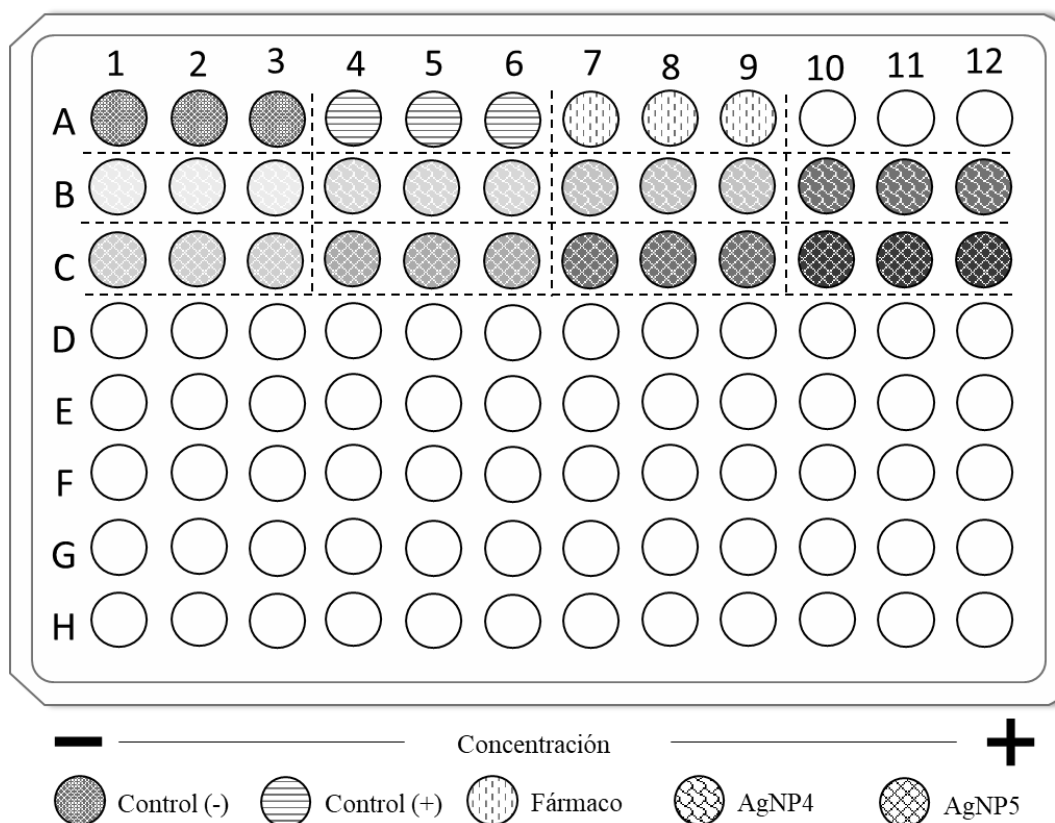
El conteo celular se realiza con la ayuda de una cámara de Neubauer. Primero se resuspende el contenido de cada caja Petri en las que se realizó el cultivo. Una vez resuspendido y con ayuda de una micropipeta, se colocan 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular entre un cubreobjetos y la cámara de Neubauer. Con un microscopio óptico observamos y contamos las células presentes en cada cuadrante. La cámara cuenta con cuatro cuadrantes que contienen 16 cuadros cada uno como se muestra en la **figura 7.2**, se suma el número de células contadas en los 4 cuadrantes y se promedia el resultado. Después se multiplica el promedio calculado por 10,000 y el resultado de esta multiplicación será la cantidad de células que se tendrán en 1000  $\mu\text{l}$  es decir, en 1 mL de medio de cultivo.



**Figura 7.2.** Cámara de Neubauer y acercamiento a cuadrantes que se observan por medio del microscopio.

## 7.5 Ensayo de viabilidad en caja de 96 pozos

Se siembran 20,000 células por pozo en una caja de 96 pozos (**figura 7.3**). Una vez realizado el conteo del número de células presentes en cada caja de cultivo como se describió en la sección anterior, se realiza una regla de tres para saber cuántos microlitros de suspensión celular se usarán para montar todo el ensayo, una vez determinado la cantidad de microlitros de suspensión celular se divide por el número de pozos total que se utilizarán para el ensayo. Cada pocito tendrá un volumen final de 200ul, es decir que se tendrán 190ul de medio celular y 10  $\mu$ l del estímulo correspondiente en cada pozo, los estímulos son nuestras AgNPs 4 y 5 a cuatro diferentes concentraciones (1 mM, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ M), control positivo (DMSO) y el fármaco de primera elección (DOX), control negativo (medio de cultivo) . Una vez montado el ensayo, se deja incubando 24 horas a 37°C, 95% de humedad y en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>. Se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado.



**Figura 7.3.** Distribución del ensayo de viabilidad en placa de 96 pozos, triplicado independiente. En la fila A1-6 controles, A7-9 doxorubicina, fila B la AgNP4, B1-3 (1uM), B4-6 (10uM), B7-9 (100uM), B10-12 (1mM) y fila C la AgNP5, ambas AgNP están a cuatro concentraciones de menor a mayor concentración de izquierda a derecha respectivamente.

### 7.5.1 Tinción con azul tripano

Una vez transcurridas las 24 h de incubación, se tiñen y se fijan cada uno de los pozos. Se agregan 10  $\mu$ l de azul tripano 1:4 a cada pozo y se dejan a temperatura ambiente por 2-3 minutos, para posteriormente agregar 40  $\mu$ l de formaldehído al 3.7% para fijar las células. Después, se procede a contar por microscopía óptica utilizando la cámara de Neubauer.

### 7.5.2 Conteo de viabilidad con cámara Neubauer

El proceso es el mismo que el descrito anteriormente, en esta ocasión se realizará un conteo doble y con ayuda del microscopio veremos algunas células de color azul, como resultado de muerte celular y daño a la membrana, lo que provoca que el azul tripano pueda internalizarse en las células.

## 7.6 Determinación de vía de muerte celular

Se siembran 100,00 células por pozo en una caja de 96 pozos y se monta un ensayo como el descrito en la sección anterior, para este se utiliza la concentración más baja de AgNPs (1  $\mu$ M) tomando en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular. Se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado (**Figura 7.5**).

### 7.6.1 Tinción de células

Pasadas las 24 horas, la caja se coloca en el refrigerador por 20 minutos, se resuspende y se transfiere a microtubos para centrifugar a 2200 rpm durante 10 minutos, desechamos el sobrenadante y agregamos 100  $\mu$ l de amortiguador de enlace. Se deja incubando por 15 minutos, se agita cada uno y adicionamos 2  $\mu$ l de Anexina V a 1X (AV),

agitamos y posteriormente incubamos 5 minutos. Posteriormente se le añade 1  $\mu$ l de ioduro de propidio (IP), resuspendemos e incubamos 15 minutos. Pasando el tiempo, el contenido de cada microtubo se regresa a la placa de 96 pozos y se procede a visualizar en el microscopio. Para evitar el fotoblanqueo el procedimiento se realiza en un entorno oscuro o con luz muy baja.

### **7.6.2 Microscopía de fluorescencia**

Primero se enfocan las células con el microscopio óptico, cerramos el paso de la luz y con ayuda del espectrofotómetro, ajustamos la intensidad. En la computadora, con ayuda del programa ZEN podemos ver nuestras células con fluorescencia. Las células que mueren por apoptosis se observan de color verde, mientras que las necróticas pueden observarse en color rojo.

## **7.7 Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Se siembran 100 000 células por pozo en una caja de 96 pozos y se monta un ensayo como el descrito en la sección anterior, nuevamente se utiliza la concentración más baja de AgNPs (1 $\mu$ M) tomando en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado (**Figura 7.5**).

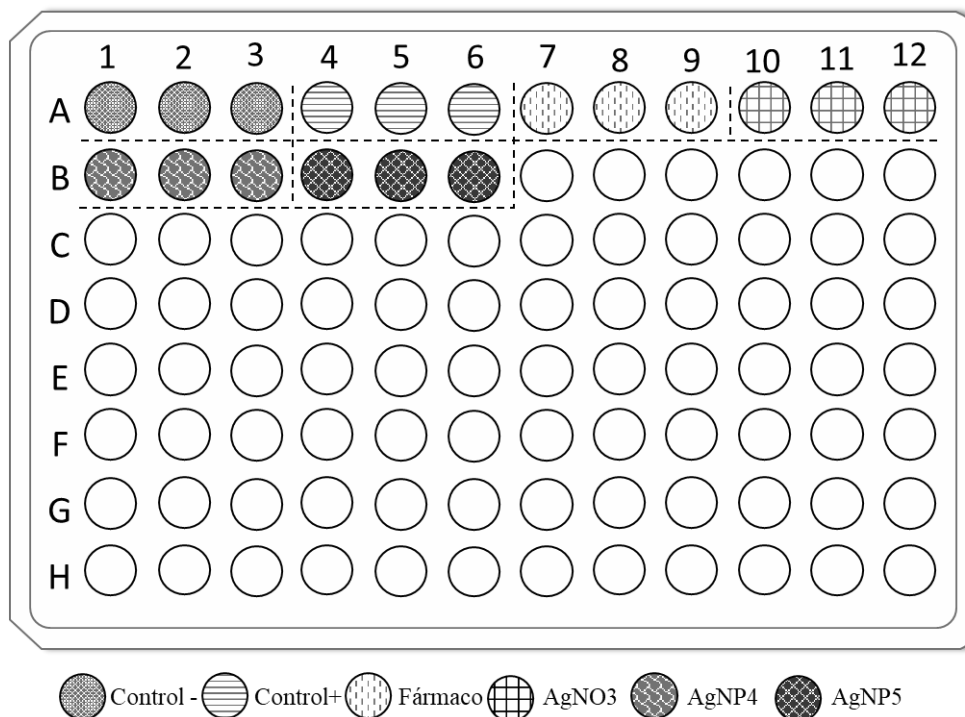
### **7.7.1 Tinción de células**

Pasadas las 24 horas de incubación con las sustancias estudiadas, resuspendemos nuestro cultivo celular y agregamos 2  $\mu$ l de reactivo rojo MitoSOX y se deja incubando por 45 minutos, pasando el periodo de incubación se procede a visualizar las células con ayuda del microscopio de fluorescencia. Para evitar el fotoblanqueo el procedimiento se realiza en un entorno oscuro o con luz muy baja.

### **7.7.2 Microscopía de fluorescencia**

Como en la metodología anterior, las células son enfocadas con el microscopio óptico, posterior a esto cerramos el paso de la luz y con ayuda del espectrofotómetro, ajustamos la intensidad de los rayos UV. En la computadora, con ayuda del programa ZEN

podemos ver nuestras células con fluorescencia. El reactivo MitoSOX es un fluoróforo que va directamente a la mitocondria de la célula viva y por medio de la oxidación del reactivo rojo MitoSOX por reacción con el ion superóxido se genera una fluorescencia roja.



**Figura 7.5.** Distribución del ensayo de vía de muerte y ROS en placa de 96 pozos. En la fila A 1-6 se encuentra control (+), control (-) A 7-9 la doxorubicina, A 10-12 el AgNO<sub>3</sub>, en la fila B 1-3 la AgNP4 (1  $\mu$ M) y B 4-6 la AgNP5 (1 $\mu$ M)

## Capítulo 8

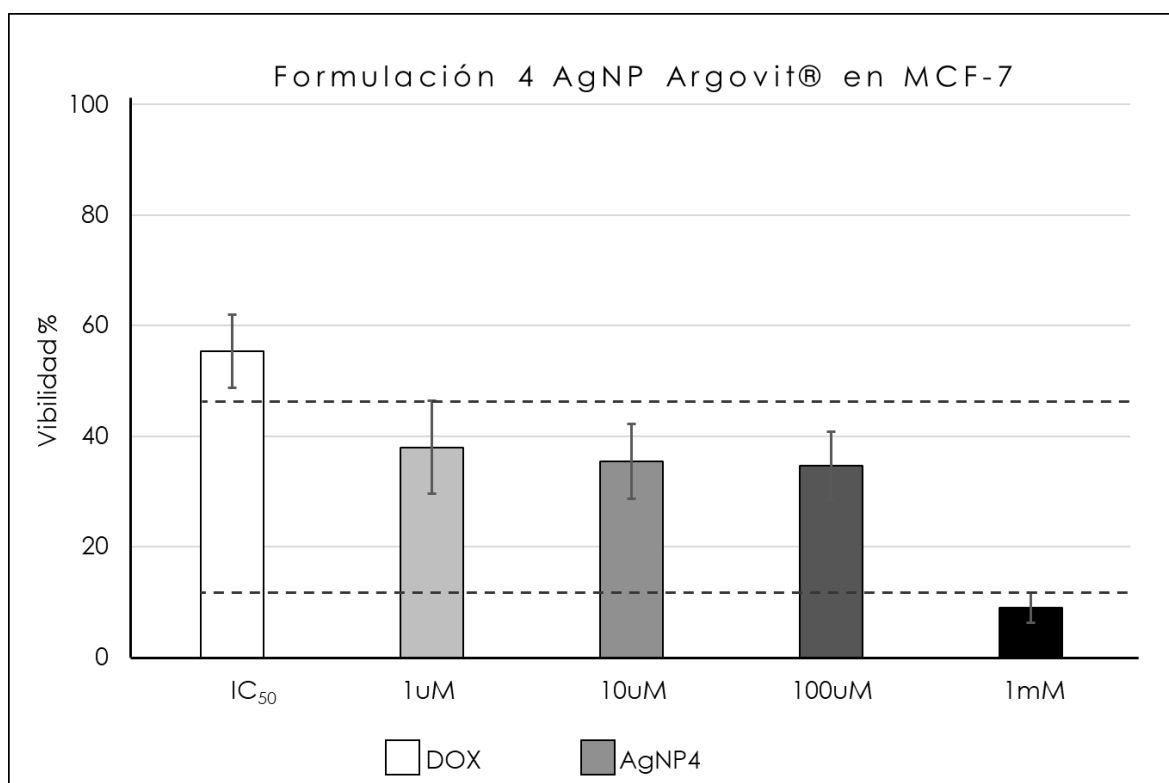
### Resultados

#### 8.1 Ensayo de exclusión vital de azul tripano

La selectividad citotóxica de las formulaciones de AgNP 4 y AgNP5 se calcula exponiendo a los cultivos *in vitro* de cáncer de mama (MCF-7) a concentraciones 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 1 mM. El tiempo de exposición es de 24 horas, durante ese lapso se mantienen en incubación a 37°C, el ensayo con azul tripano indica cuál de las

concentraciones de AgNP logra inhibir una mayor proliferación celular de cáncer de mama MCF-7.

Tras el tiempo de incubación con tratamiento, los conteos en cámara de Neubauer revelan que la doxorubicina induce un 55% de disminución en la viabilidad celular, el cual coincide con lo encontrado en la literatura para la línea celular MCF-7 y confirma la reproducibilidad de la evaluación. En la formulación 4 y 5 de las AgNP Argovit™ se observa un efecto significativamente diferente en comparación con el control negativo e incluso con el fármaco de primera elección DOX.

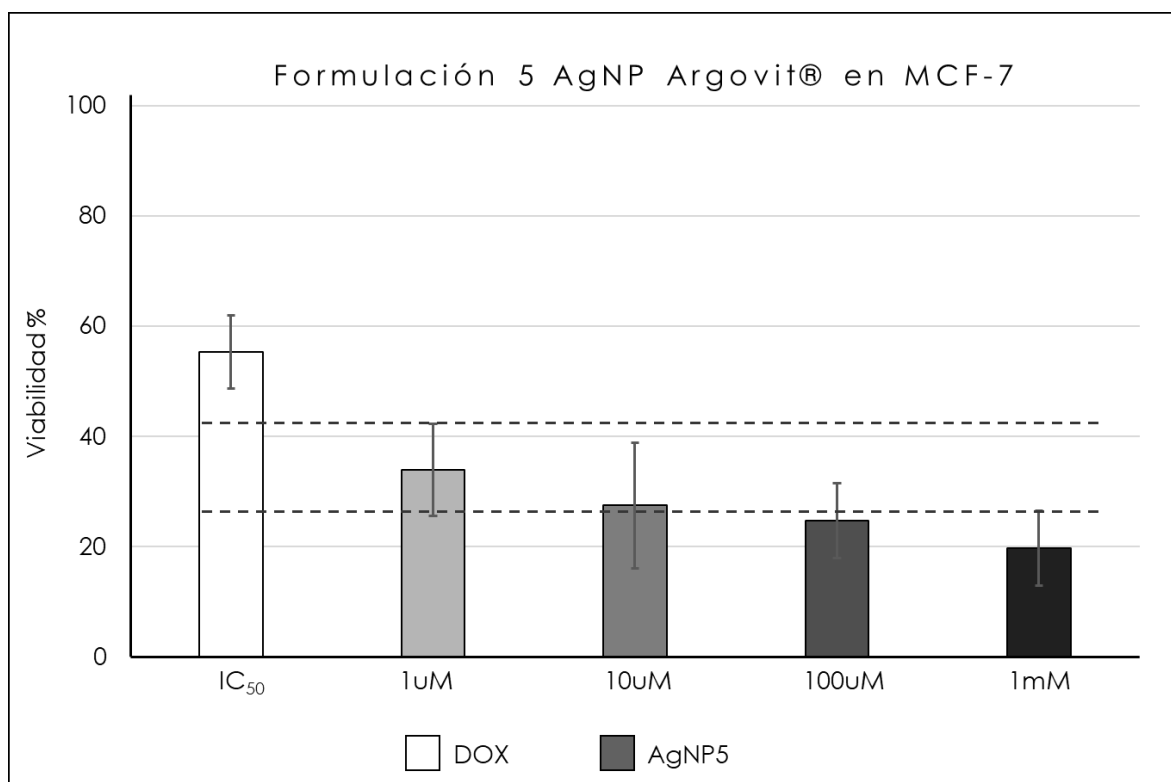


**Figura 8.1.** Viabilidad celular de cultivos de línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 obtenidos tras su exposición a diferentes concentraciones (1 μM, 10 μM, 100 μM y 1 mM considerando el contenido de plata metálica) de la formulación 4 de AgNP Argovit™ y Dox (0.69 μM).

Si nos enfocamos en las concentraciones de AgNP4 (**Figura 8.1**) no se observan diferencia sustancial en la respuesta de viabilidad celular entre la concentración 1 μM, 10

$\mu\text{M}$  y  $100 \mu\text{M}$ . Todas estas concentraciones generar una disminución de viabilidad del 62 al 65%. Por otro lado, con la concentración más alta ( $1\text{mM}$ ) se observa una disminución de viabilidad casi 30% mayor que la observada con las otras concentraciones alcanzando un 91% de inhibición de la proliferación. Para todas las concentraciones evaluadas, la respuesta citotóxica de AgNP4 fue mayor que la registrada con DOX. Si consideramos a la plata contenida en la AgNP como el agente activo, la formulación AgNP4 sería tan potente como Dox para eliminar células tumorales (**Tabla 8.1**).

En el caso de la AgNP5 (**Figura 8.2**) podemos notar que existe una diferencia sustancial de la viabilidad celular encontrada para el control negativo respecto a aquellos cultivos expuestos a las AgNP de más del 60%. Tomando en cuenta la concentración más baja de AgNP5 ( $1\mu\text{M}$ ) y comparándola con el IC<sub>50</sub> de la DOX, se observa una diferencia significativa de  $\approx 20\%$ . Las diferencias estadísticas entre las concentraciones de las AgNP5 son equiparables desde la más alta ( $1\text{mM}$ ) hasta la más baja ( $1\mu\text{M}$ ) (**Tabla 8.1**).



**Figura 8.2.** Viabilidad celular de cultivos de línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 obtenidos tras su exposición a diferentes concentraciones ( $1 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$  y

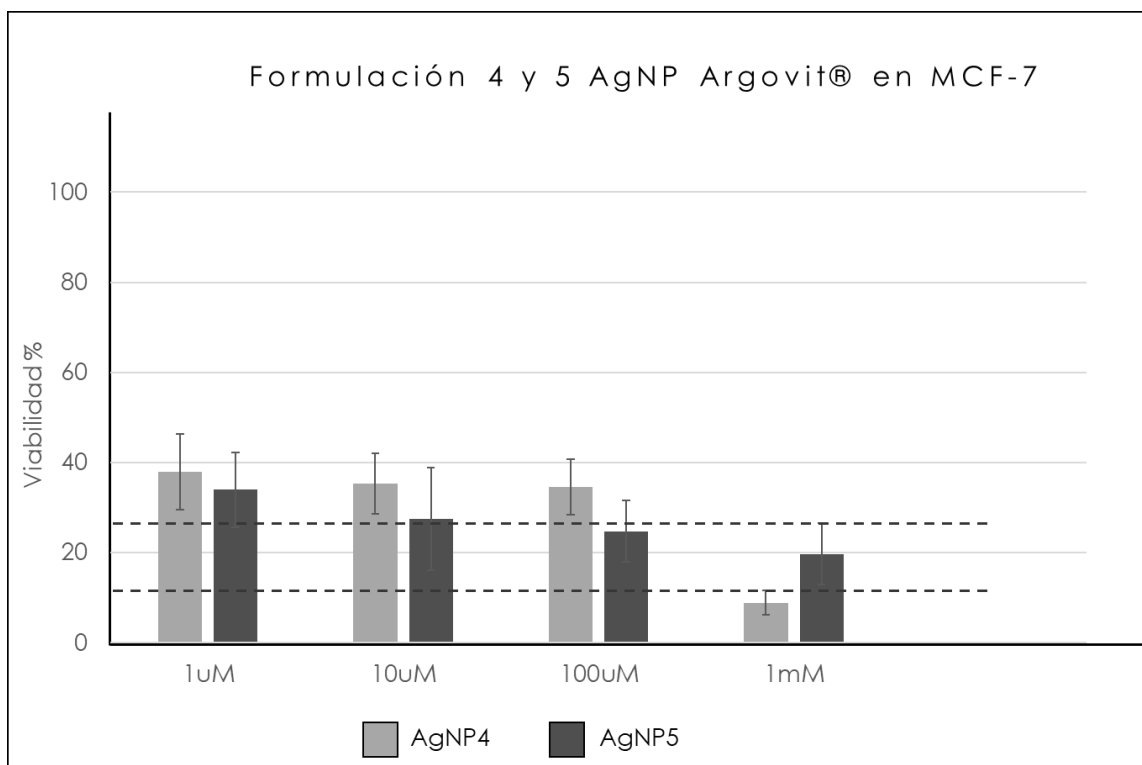
1 mM considerando el contenido de plata metálica) de la formulación 5 de AgNP Argovit™ y Dox (0.69 µM).

**Tabla 8.1.** Porcentaje de citotoxicidad por triple triplicado de AgNP4 y AgNP5 Argovit™

Concentración AgNP	Control negativo	% Citotoxicidad celular			Promedio	Desviación Estándar
<b>AgNP4</b>						
1 µM	100 %	39.94	39.28	34.71	37.98 %	± 8.4
10 µM	100 %	37.69	37.47	30.93	35.36 %	± 6.7
100 µM	100 %	40.23	33.62	29.99	34.61 %	± 6.1
1mM	100 %	6.24	10.82	9.73	8.93 %	± 2.7
<b>AgNP5</b>						
1 µM	100 %	36.60	31.15	34.20	33.98 %	± 8.3
10 µM	100 %	30.57	29.04	22.87	27.49 %	± 11.4
100 µM	100 %	23.32	24.40	26.57	24.76 %	± 6.8
1mM	100 %	14.59	23.45	21.06	19.70 %	± 6.7
<b>DOX</b>						

IC <sub>50</sub> (0.69 μM)	100 %	62.45	64.77	38.85	55.36 %	± 6.6
----------------------------	-------	-------	-------	-------	---------	-------

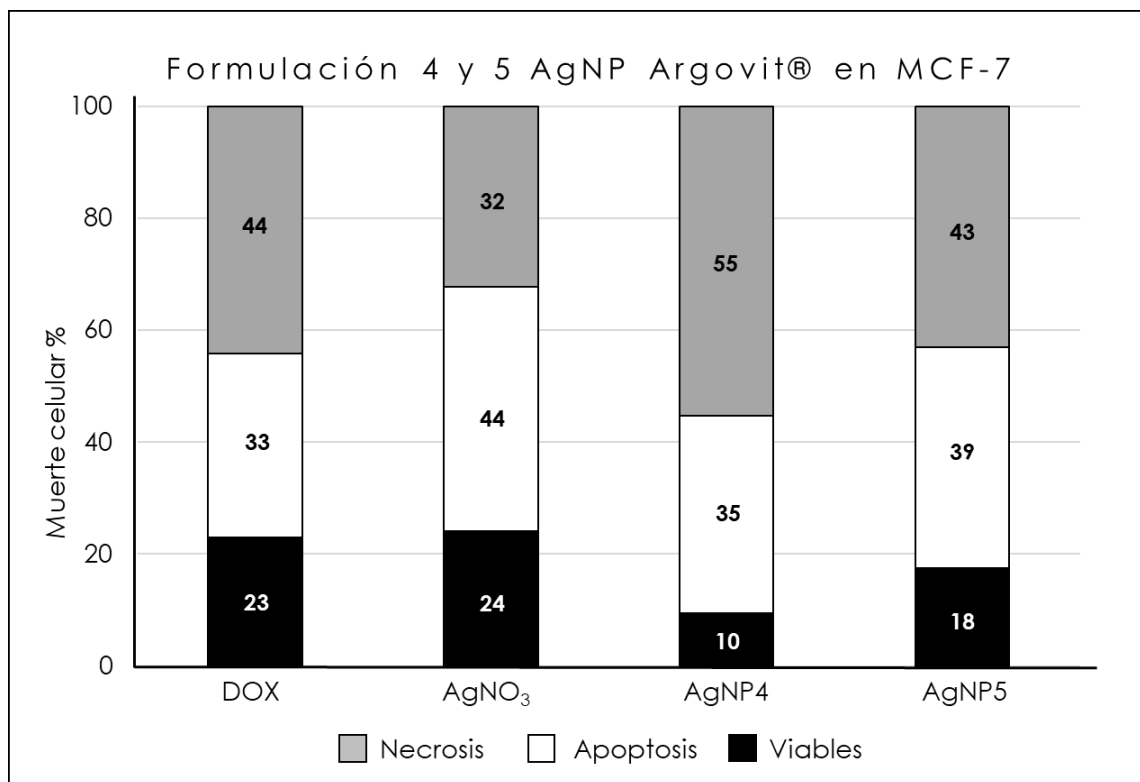
El efecto antiproliferativo de ambas formulaciones, AgNP4 y AgNP5, es prácticamente el mismo. Las concentraciones 1, 10 y 100 μM no presentan diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular entre ellas, en la concentración más alta (1mM) podemos observar que se ve una diferencia significativa con respecto a la concentración más baja (1μM).



**Figura 8.3.** Viabilidad celular de las formulaciones 4 y 5 de AgNP Argovit™ en línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7)

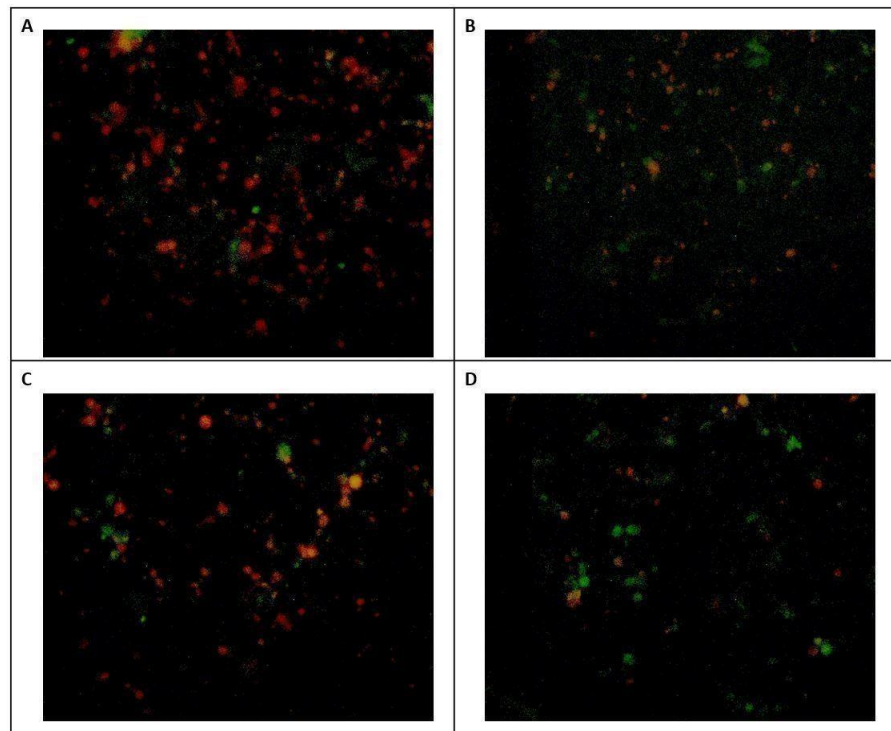
## 8.2 Vía de Muerte celular

El ensayo de vía de muerte celular revela que las AgNP, tanto la formulación 4 como la 5, con una concentración de 1  $\mu\text{M}$  producen más de un 50% de células con marcadores positivos asociados a muerte celular (90% y 82% respectivamente), en comparación con nuestro fármaco de primera elección, el cual presenta el 77% de muerte celular (**Figura 8.4**). El nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) a una concentración 0.5 $\mu\text{M}$  produce un 76% de muerte celular, siendo menor que el efecto producido por las nanopartículas y la doxorubicina. La muerte celular provocada por las AgNPs puede deberse a la liberación de iones plata o por la generación de especies reactivas de oxígeno. Por los resultados que observamos en la **Figura 8.4**, se muestra que las AgNP4, AgNP5 inducen mayormente una muerte necrótica (55 y 43%, respectivamente). De igual manera la doxorubicina induce muerte por necrosis (44%) y el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) induce muerte celular por apoptosis en las células MCF-7 (44%).



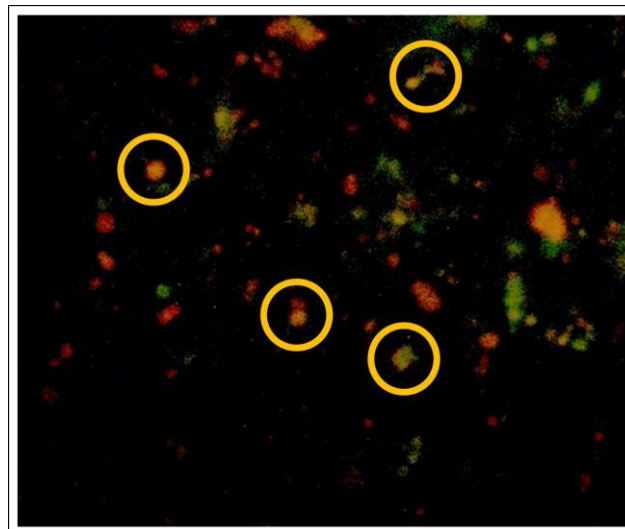
**Figura 8.4.** Muerte celular provocada por una concentración 1  $\mu\text{M}$  de las formulaciones 4 y 5 de AgNP Argovit<sup>TM</sup>, nitrato de plata (0.5 $\mu\text{M}$ ) y fármaco de primera elección (Dox 0.69  $\mu\text{M}$ ) en línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7). En la parte superior de la barra podemos encontrar la muerte necrótica (gris), en la parte central la muerte apoptótica (blanco) y en la parte inferior las células viables (negro).

La **Figura 8.5** muestra las imágenes de fluorescencia de los cultivos celulares expuestos a los diferentes agentes. Las células que presentan una fluorescencia verde son consideradas apoptóticas y aquellas con una fluorescencia roja son necróticas. Es clara la diferencia de apoptosis/necrosis inducida por las AgNPs y el AgNO<sub>3</sub> al comparar las fotografías A y B de la figura 8.5 con la imagen del inciso C.



**Figura 8.5.** Imágenes fluorescentes (40X) de la línea celular MCF-7 expuesta a distintos estímulos para la determinación de vía de muerte celular teñidas con anexina V y yoduro de propidio. Inciso A) AgNP4 1  $\mu\text{M}$ , B) AgNP 5 1  $\mu\text{M}$ , C) Dox 0.69  $\mu\text{M}$ , D) Nitrato de plata (0.5 $\mu\text{M}$ ).

Notamos también que la AgNP4 es la más potente contra las células MCF-7 induciendo necrosis en más del 50% y aunque en la AgNP5 también se tiene una mayor muerte por vía necrótica, no se tiene una diferencia significativa respecto a las muertas por vía apoptótica. A su vez, en este ensayo de vía de muerte se observaron células dobles positivas, lo que quiere decir que las células mueren por apoptosis y posteriormente debido a la alta exposición de yoduro de propidio, este penetra la membrana logrando teñir la célula de manera que parezca que su vía de muerte es necrótica. En algunos trabajos lo anterior se clasifica como apoptosis tardía. Gracias a que se tiñó con Anexina V, las células con marcaje doble positivo tendrán un color anaranjado (**Figura 8.6**). Para facilitar el análisis de los datos no se cuantificaron los eventos dobles positivos.



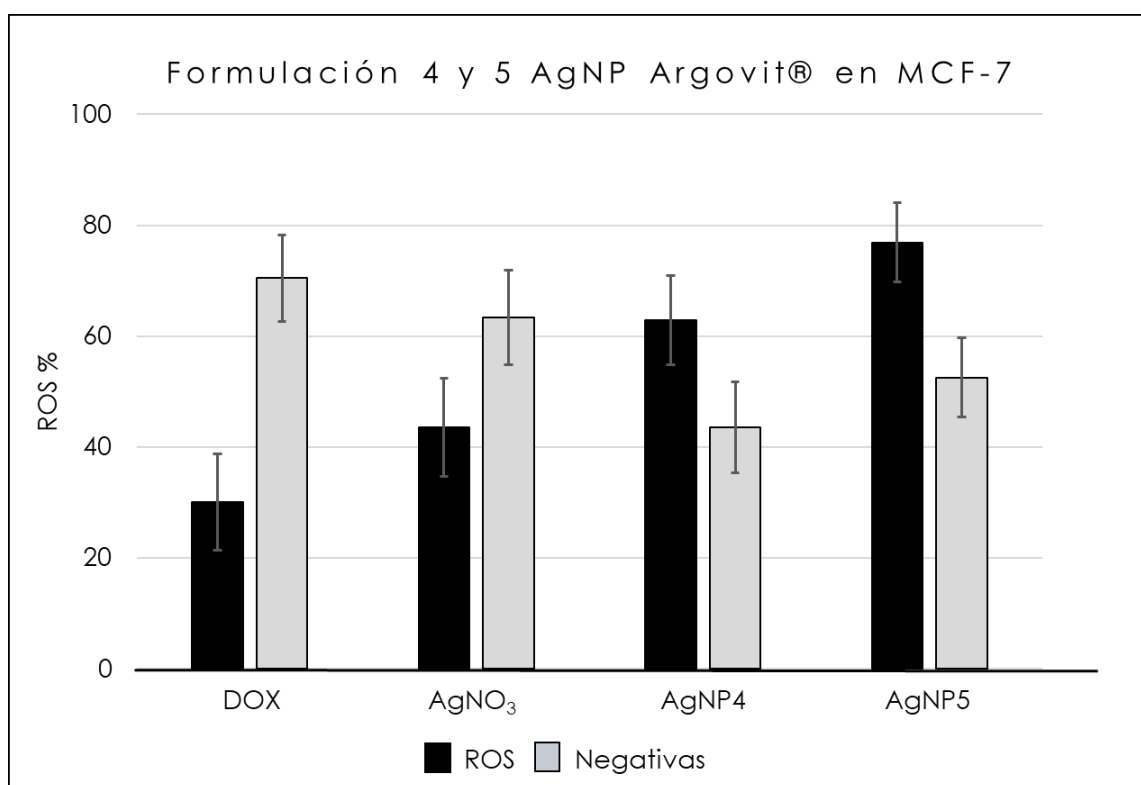
**Figura 8.6.** Imagen fluorescente de doble positiva (40X). Primero se induce muerte por apoptosis y posteriormente muerte necrótica. Células teñidas con AV/IP.

### 8.3 Especies Reactivas de Oxígeno

La determinación de especies reactivas de oxígeno revela que las células tienen un alto nivel de estrés oxidativo, principalmente en las células tratadas con las nanopartículas de plata. Esta inducción de estrés oxidativo a través de la generación de ROS logra causar daño a componentes celulares como, por ejemplo, al ADN o a la membrana celular. La internalización de las AgNP o de iones plata, liberados de la misma nanopartícula, pueden provocar una sobreproducción de ROS capaz de inducir citotoxicidad en la línea celular

cancerosa MCF-7. De acuerdo con los resultados obtenidos con otras líneas tumorales humanas y murinas [72], nos enfocaremos a cuantificar la producción de ROS mitocondriales.

Observado detalladamente la **Figura 8.5**, encontramos que la AgNP5 produce casi un 80% de ROS en nuestras células, mientras que la AgNP4 produce un 60%. Comparándolas con el fármaco de primera elección, hay una diferencia significativa de más del 30%. También se observa una diferencia significativa con el nitrato de plata ( $0.5\mu\text{M}$ ), que produce entre 15 y 35% menos ROS en la mitocondria comparado con las formulaciones de AgNPs. Estos valores se toman en cuenta para proponer si la citotoxicidad tiene una contribución importante por los iones plata liberados o por la internalización de la AgNP.



**Figura 8.5.** Determinación de ROS de AgNP Argovit™ en línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7). Barras en color negro son el porcentaje de células con ROS, barras color gris son el porcentaje de células negativas a la tinción de ROS.

## Capítulo 9

### Discusión

Dentro de los requerimientos terapéuticos más importantes del cáncer están la eficacia y la toxicidad selectiva, las nuevas alternativas buscan dañar únicamente a las células cancerosas sin afectar a las células normales, a pesar de ser un requisito esencial para un tratamiento eficaz y seguro contra el cáncer. En esta enfermedad también participa el sistema inmune, el cual juega un papel fundamental en la batalla para combatir el cáncer [12], por lo que se busca que estas alternativas no afecten negativamente a las células participantes en el sistema inmunitario. Por esta razón y buscando nuevas alternativas se estudiaron las células MCF-7 expuestas a un tratamiento de AgNP a distintas concentraciones.

Las nanopartículas de plata debido al gran auge que tienen en la actualidad cuentan con un extenso número de aplicaciones tanto comerciales como biomédicas gracias a sus propiedades fisicoquímicas únicas, sin embargo, deben realizarse los distintos estudios de citotoxicidad en diversos sistemas biológicos. Dentro de sus múltiples aplicaciones, las AgNP se proponen como agentes antiproliferativos en líneas celulares de mamíferos [4] ya que inducen citotoxicidad dosis-dependiente en ciertas líneas reportadas [1, 3, 6].

La acción citotóxica se cree que está ligada a la internalización de las nanopartículas de plata o de los iones plata que se liberan de las mismas [5]. La interacción de las AgNPs o los iones plata con diferentes biomoléculas induce producción de especies reactivas de oxígeno provocando daño celular, en nuestro caso primordialmente en mitocondria, causando la muerte celular [3]. Buscando alternativas para tratamientos anticancerígenos, se debe buscar nanomateriales que cuente con propiedades específicas como antiproliferativas y que tenga una genotoxicidad nula o en su defecto que sea baja, esto con el objetivo de no presentar efectos secundarios o disminuirlos.

La evaluación citotóxica de AgNP se ha reportado en distintas líneas celulares con la finalidad de determinar su efecto toxicológico, sin embargo, la genotoxicidad también juega un papel importante, siendo menos estudiado y reportado en la literatura. Se ha

reportado que algunas de las formulaciones de nanopartículas de plata Argovit™ no provocan daños genotóxicos, pero sí citotóxicos en líneas celulares a una determinada concentración [67]. En el presente trabajo se determinó el efecto citotóxico de dos formulaciones Argovit™ en la línea celular de cáncer mamario humano MCF-7, esta línea celular presenta receptores de estrógeno, progesterona, HER2 y HER2-, es decir, es hormono-dependiente. Se escogió este modelo celular por ser una de las líneas celulares de cáncer de mama más estudiadas.

En el primer ensayo, se determinó la viabilidad celular por microscopía óptica por medio del ensayo de exclusión vital por tinción de azul tripano. Después se continúa con la determinación de vía de muerte celular por microscopía de fluorescencia por tinción celular con Anexina V y yoduro de propidio. Finalmente se determina la generación de especies reactivas de oxígeno por microscopía de fluorescencia por tinción celular con el reactivo rojo MitoSOX. Para determinar la viabilidad, la vía de muerte celular y la generación de ROS, los ensayos celulares fueron expuestos a AgNP durante 24 horas y posteriormente se realizó la tinción correspondiente.

Los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad nos demuestran que la respuesta citotóxica en la línea celular de adenocarcinoma mamario humano expuestos a AgNP Argovit™ inducen un efecto citotóxico independiente de la concentración, pues el intervalo de concentraciones evaluadas 1µM-1 mM produce entre 6 y 65% de disminución en la viabilidad celular. De la misma manera, se puede identificar una cantidad de restos celulares en ciertos tratamientos, principalmente en las concentraciones más altas (100 µM y 1mM de AgNP). Es importante señalar que esta evidencia experimental se obtuvo gracias a que el conteo se realizó forma manual con ayuda del microscopio óptico y nos permite identificar efectos inducidos por las nanopartículas de plata en las células cancerosas como la lisis celular. A partir del estudio, podemos determinar claramente que las células no tratadas con AgNP muestran una mayor confluencia de células en monocapa y adheridas con una membrana celular intacta.

Gurunathan et al. [68] estudió el efecto en la línea celular MCF-7 de AgNP anisotrópicas obtenidas por síntesis verde utilizando *Escherichia fergusonii*. Los autores de dicho trabajo determinaron que sus AgNP reducen la viabilidad celular en las MCF-7 de

manera dependiente de la concentración tras exponerlas por 24h y que estas son citotóxicas en una concentración superior a 20  $\mu\text{g/mL}$ .

A pesar de que las AgNP Argovit™ cuentan con propiedades fisicoquímicas totalmente diferentes, no se observa una diferencia significativa en la actividad antiproliferativa reportada en este trabajo. Por lo que se le puede atribuir a los porcentajes de plata metálica y PVP que contienen ambas nanopartículas, siendo las propiedades más similares dentro de su formulación.

Al comparar las Argovit™ con otro tipo de AgNP podemos observar que el porcentaje de inhibición de crecimiento que nos brindan las Argovit™ es más elevado a las AgNP comparadas. Ullah et al. [69] reporta unas AgNP sintetizadas con extracto de fagonia indica, se evaluaron en la misma línea tumoral de cáncer de mama MCF-7 a una concentración de 12.35 $\mu\text{g/mL}$  durante 24 hrs teniendo como resultado una citotoxicidad del 50%. Kumar et al. [73] Evaluaron la citotoxicidad de AgNP-floroglucinol por síntesis verde a una concentración de 12.35 $\mu\text{M}$ , (aprox. 9 veces mayor a la nuestra (9.05 $\mu\text{M}$ ) obteniendo una citotoxicidad del 50% mientras que en nuestro caso a una menor concentración se tiene el  $\approx 60\%$  en ambas formulaciones de AgNP Argovit™.

Cruz-Ramírez et al. [72], evaluaron el efecto citotóxico en la línea celular HCT-15, se observa que no hay un efecto citotóxico dependiente de la concentración, pero son menos efectivas para inhibir la proliferación celular. En el caso de HCT 15 una concentración de 5.5  $\mu\text{M}$  produce una disminución de la viabilidad del 60%. En el caso de MCF-7, una concentración 5 veces menor (1  $\mu\text{M}$ ) produce una disminución entre 62 y 65%. Lo anterior puede significar que las células de mama MCF-7 son al menos cinco veces más sensibles al efecto de las formulaciones 4 y 5 de Argovit™ en comparación con la sensibilidad encontrada para cáncer de colon HCT-15.

Por otra parte, existen evaluaciones en cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica humana (SPH), Blanco-Salazar [74], reporta en su estudio concentraciones  $\approx 5$  veces mayores a las utilizadas en este trabajo, teniendo como resultado que estas formulaciones de AgNP Argovit™ no causan ningún efecto citotóxico en los linfocitos. Lo que nos lleva a pensar que si bien, las AgNP inducen muerte celular por necrosis en líneas

tumorales pueden no presentar efectos adversos en células sanas debido a que no se presenta un efecto citotóxico en cultivos primarios como la SPH la cual es considerada una línea de defensa del organismo.

El ensayo de vía de muerte celular revela que la vía por la que las células MCF-7 expuestas a un tratamiento con AgNP (1  $\mu\text{M}$ ) mueren en su mayoría es por necrosis. En ambas formulaciones de las AgNP Argovit™ se tiene un alto número de células necrosadas en comparación con células apoptóticas. La muerte celular por necrosis puede deberse a que existe daño en la mitocondria o daño en el ADN que provoca disrupción en la membrana y perdiendo su integridad celular, esto como consecuencia deja salir el contenido al espacio extracelular.

Se ha reportado que la doxorrubicina induce la detención del ciclo celular en la fase G2/M en la línea celular MCF-7 causando muerte por apoptosis. En el estudio realizado por Berzegar et al. [13] se utilizó un tiempo de 48h de exposición al fármaco a un  $\text{IC}_{50}$  de 0.5 $\mu\text{M}$ . En este estudio se usó un  $\text{IC}_{50}$  de 0.69  $\mu\text{M}$  y un tiempo de exposición de 24h, lo que puede influir en la vía de muerte identificada. Los resultados publicados por Ullah et al. [69] muestran que la muerte de las células MCF-7 expuestas a un tratamiento de AgNP por síntesis verde es por vía apoptótica.

Las AgNP pueden modificar diversas vías bioquímicas que pueden comprometer la viabilidad de las células MCF-7. Comparando los datos reportados en la literatura, sabemos que en células de colon la principal vía de muerte celular es apoptosis lo que nos permite proponer que las células de cáncer de mama son mucho más sensibles a comparación con las células de colón.

Cruz-Ramírez et al., 2021 [72] determinó niveles de ROS producidos en la línea celular HCT-15 y se obtuvo un 40% de células con sobreproducción de ROS en mitocondria, mientras que en las células tumorales MCF-7 observamos entre el 60 y 80% de superóxido mitocondrial, contando con un mayor número de células que generan especies reactivas oxígeno.

Existen evidencias que involucran a las especies reactivas de oxígeno como fundamentales en el tratamiento del cáncer, por lo que en este trabajo se cuantificó la generación de ROS, las cuales se cree que están vinculadas con la alteración oxidativa celular. La rapidez de su producción y la prontitud de disipación son factores clave para la generación de daño en la célula. Existe una hipótesis que se basa en diferentes grados de malignidad en las líneas celulares, por lo que el sistema antioxidante juega un papel importante en la regulación de concentración intracelular de las ROS [70].

En la **figura 8.5** podemos observar que el nivel de ROS en la mitocondria de células MCF-7 expuestas a las dos formulaciones de Argovit™ es elevado. Dentro de las principales especies reactivas de oxígeno está el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que es generado en la mitocondria como subproducto de la cadena de transporte electrónico por medio de una transferencia de electrones incompleta al oxígeno molecular [18]. Si el mecanismo antioxidante de la célula es deficiente, se tendrá una acción por parte del superóxido en la mitocondria aumentando su concentración para así, finalmente, terminar con la vida de la célula. Existen estudios previos que muestran evidencia de un mecanismo molecular de AgNP que induce la generación de ROS, siendo este uno de los principales factores de la muerte celular [67], lo cual coincide con nuestros resultados. El nivel de ROS reflejado en nuestros resultados nos demuestra que la generación de especies reactivas de oxígeno está ligada en la mayor parte a la muerte desencadenada en la línea celular MCF-7 tratadas con AgNP.

## **Capítulo 10**

### **Conclusiones**

A partir de los estudios realizados sobre viabilidad, determinación de vía de muerte celular y generación de especies reactivas de oxígeno en la línea celular MCF-7 tratadas con dos formulaciones de AgNP Argovit™ podemos mencionar las siguientes conclusiones:

Se observa un efecto antiproliferativo *in vitro* en las células cancerosas MCF-7 cuando estas se encuentran en presencia de las AgNP Argovit™, lo que podemos concluir que están potenciando el efecto antiproliferativo.

Ambas formulaciones a concentraciones de 1, 10 y 100uM son tan efectivas como la doxorubicina, mientras que la concentración más alta (1mM) es 1.8 veces más efectiva

Se determinó que la vía de muerte celular de la línea celular MCF-7 de ambas formulaciones encontrando que la contribución de necrosis y apoptosis es similar, 50 y 30% para las AgNP4 y AgNP5 Argovit™ respectivamente.

A su vez podemos concluir que la citotoxicidad puede ser generada por la internalización de las AgNP o la liberación de iones plata de las mismas, siendo cualquiera de los dos casos esta interacción provoca estrés oxidativo por medio de especies reactivas de oxígeno mitocondriales provocando muerte celular a una diferente concentración.

Se determinó la generación de ROS mitocondrial y observamos que las AgNP producen alrededor de tres veces más superóxido mitocondrial que nuestro fármaco de primera elección evaluado, la doxorubicina.

Se considera que las formulaciones de AgNP Argovit™ pueden ser una alternativa al uso de doxorubicina ya que en linfocitos de SPH no presentan efectos citotóxicos.

Este trabajo sienta bases para estudios futuros de optimización de las concentraciones y formulaciones de AgNP Argovit™ y fármacos antineoplásicos para combatir el cáncer.

## Referencias

1. Wang, Y., Chen, H., Liu, Y., Wu, J., Zhou, P., Wang, Y., & Zhang, N. (2013). pHsensitive pullulan-based nanoparticle carrier of methotrexate and combretastatin A4 for the combination therapy against hepatocellular carcinoma. *Biomaterials*, 34(29), 7181-7190
2. American Chemistry Council. (S/F). *What Is Nanotechnology*. 2011, de

American Chemistry Coucil Sitio web:

[https://nanotechnology.americanchemistry.com/What-is-Nanotechnology-/](https://nanotechnology.americanchemistry.com/What-is-Nanotechnology/)

3. 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>
4. Davis, M., Chen, Z. & Shin, D. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov* 7, 771–782 (2008).  
<https://doi.org/10.1038/nrd2614>
5. Yeruva, L., Elegbede, JA y Carper, SW (2008). El jasmonato de metilo disminuye la fluidez de la membrana e induce la apoptosis a través del receptor 1 del factor de necrosis tumoral en las células de cáncer de mama. *Medicamentos contra el cáncer* , 19 (8), 766–776. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32830b5894>
6. 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.
7. European Chemical Agency. (S/F). Uso de la nanotecnología para combatir el cáncer. S/F, de European Chemical Agency Sitio web:<https://chemicalsinourlife.echa.europa.eu/es/fighting-cancer-using-nanotechnology>
8. Solmeclas. (2018). ¿Qué son las Nanopartículas? Tipos y propiedades de estas partículas. 2018, de Solmeclas Sitio web: <https://solmeclas.com/que-son-nanoparticulas-tipos/>
9. Neenu Singh, Bella Manshian, Gareth J. S.Jenkins, Sioned M. Griffiths, Paul M. Williams, Thierry G. G. Maffeis, Chris J.Wright, Shareen H.Doak, *NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials*, *Biomaterials*, Volume 30, Issues 23–24, 3891-3914 (2009).
10. Asharani, Kah Mun, Prakash, Valiyaveetil. (2009). Cytotoxicity and Genotoxicity Of Nanoparticles in Human Cells. En *American Chemical Society*(279-290). Singapore: ACSNANO
11. Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., et al., 2007.

- Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 3, 95–101.
12. Eastman, A., & Perez, R. P. (2006). New targets and challenges in the molecular therapeutics of cancer. In *British Journal of Clinical Pharmacology* (Vol. 62, Issue 1, pp. 5-14). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2006.02720.x>
  13. Berzegar, E., S., Komeili Movahhed, T., Atashpour, S., Ghahremani, M. H., Ostad, S. N., & Azizi, E. (2015). Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines. *Iranian Journal of Basic Medica Sciences*, 18(4), 334-342. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2015.4281>
  14. Espinosa, Sáenz, Castañeda. (2018). Aplicaciones De Nanopartículas De Plata Para Combatir El Cáncer De Mama. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 10 (19), 1-5.
  15. 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).
  16. Ávalo A, et al. (2013). Nanopartículas de Plata: Aplicaciones y Riesgos Tóxicos para la Salud Humana y el Medio Ambiente. *Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7 (2), 1-23
  17. Amaya Azqueta, Maria Dusinska, The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials, *Front Genet.* 6:239 (2015).
  18. Carvajal Carvajal, Carlos. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100. Retrieved June 14, 2022, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es)
  19. Organización Mundial de la Salud. (2021). Cáncer, datos y cifras. 2021, de Organización Mundial de la Salud Sitio web: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer#:~:text=El%20c%C3%A1ncer%20es%20una%20de,2%2C21%20millones%20de%20defunciones>
  20. Organización Mundial de la Salud. (2017). List of Bacterias for which New Antibiotics are Urgently Needed 2017, Organización Mundial de la Salud. Sitio

web:

<https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacterias-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

21. Cancer Country Profile. (2020). México. 2020, de Organización Mundial de la Salud Sitio web:  
[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=4-cancer-country-profiles-2020&alias=51536-mexico-cancer-profile-2020&Itemid=270&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=4-cancer-country-profiles-2020&alias=51536-mexico-cancer-profile-2020&Itemid=270&lang=es)
22. Prevención y diagnóstico oportuno en Cáncer A.C. (2016). Sociedad Mexicana de Oncología. México: Permanyer México
23. The global Cancer Observatory. (2018). World, Globocan 2018. 2019, de Organización Mundial de la Salud Sitio web:  
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
24. Breastcancer.org. (2017). Tipos de cáncer de mama. 2017, de Breastcancer.org Sitio web: <https://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos>
25. Yáñez., Velásquez. (2013). Combaten cáncer de mama con nanopartículas de plata. 2013, de Agencia de noticias del Estado Mexicano rotativo Sitio web:  
<http://www.notimex.gob.mx/>
26. Instituto Nacional de Cancerlogía. (2020). Prevención y detección temprana disminuyen mortalidad por cáncer. 2020, de Gobierno de México Sitio web:  
<https://www.gob.mx/salud/prensa/041-prevencion-y-deteccion-temprana-disminuyen-mortalidad-por-cancer>
27. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2016). Estadísticas a propósito del Día Mundial de la Lucha Contra el Cáncer de Mama (19 de octubre). 2016, de Instituto Nacional de Estadística y Geografía Sitio web:  
<https://www.inegi.org.mx/app/saladeprensa/noticia.html?id=2958>
28. National Cancer Institute. (2018). Side Effects of Cancer Treatment. 2019, de National Cancer Institute Sitio web: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/side-effects>
29. Centers of Disease Control and Prevention. (2018). How is Breast Cancer

- Treated?. 2018, de Centers of Disease Control and Prevention Sitio web:  
[https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic\\_info/treatment.htm](https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/treatment.htm)
30. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2021. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2021
  31. Jyoti D. Patel. (2021). Cáncer de mama: Estadísticas. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Sitio web:  
<https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-mama/estadisticas>
  32. Kieny., Gröhe., (2017). Priority pathogens. 2017, de World Health Organization Sitio web:  
<https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
  33. Elda Maria del Rocio Coutiño Rodríguez RAPG, Rebeca García Román, Luis Alfredo Herbert Doctor (2010) Plata coloidal y salud Universalud;6 (12):56
  34. European Commission. (2014). Are silver nanoparticles safe? Implications for health, the environment and microbial resistance. 2020, de European Commission. Sitio web:  
[https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific\\_committees/docs/citizens\\_silvernanoparticles\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/docs/citizens_silvernanoparticles_en.pdf)
  35. Ochoa-meza, A. R., Álvarez-sánchez, A. R., Romo-quiñonez, C. R., Barraza, A., Magallón-barajas, F. J., Chávez-sánchez, A., García-ramos, J. C., Toledano-magaña, Y., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., & Mejía-ruiz, C. H. (2019). Fish and Shellfish Immunology Silver nanoparticles enhance survival of white spot syndrome virus infected *Penaeus vannamei* shrimps by activation of its immunological system. *Fish and Shellfish immunology*, 84(April 2018), 1083-1089. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.007>
  36. Bogdanchikova, N. & Vazquez-Munoz, Roberto & Huerta-Saquero, Alejandro & Pena-Jasso, Antonio & Aguilar-Uzcanga, Gildardo & Picos-Díaz, Paola & Pestryakov, Alexey & Burmistrov, Vasilii & Martynyuk, Oxana & Vazquez Gomez, Roberto & Almanza, Horacio. (2016). Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs. *International Journal of Nanotechnology*. 13.

227.

37. Almanza, R.; et al. (2021). Evaluación de nanopartículas de plata para la prevención de la infección por SARS-CoV-2 en trabajadores de la salud: in vitro e in vivo. Recuperado: 12 de diciembre de 2021. URL: Evaluación de nanopartículas de plata para la prevención de la infección por SARS-CoV-2 en trabajadores de la salud: in vitro e in vivo (plos.org)
38. García, R., (2020). Curiosidades de la genética. La increíble historia de las inmortales células HeLa (Parte 1). 14 de marzo 2022, de Genotipia Sitio web: <https://genotipia.com/la-increible-historia-de-las-inmortales-celulas-hela-parte-1/>
39. Lonza. (2020). An Introduction to Cell Culture. [https://bioscience.lonza.com/lonza\\_bs/MX/en/cell-culture](https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/MX/en/cell-culture)
40. Segretín, M., (2002). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). P. 1-6
41. Binder. (2019). El delicado arte del cultivo de células.
42. ThermoFisher Scientific. (2022). Adherent Cell Culture vs. Suspension Cell Culture. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-lines/adherent-vs-suspension-culture.html>
43. Myracroduon, A., Armazenamento, C. D. E., Smith, R., & Probert, R (2000). *Storage Conditions*. 85-98
44. Tengjiao Song, Jiangshun Yang, Jing Zhou, Zhe Chen and Xiaofeng Yuan, 2019. A Review of the Mechanisms of Wnt7b in the Process of Malignant Tumor Invasion and Metastasis. *International Journal of Pharmacology*, 15: 523-532.
45. Alejandro, C., Hernández, A., Juarez-moreno, K., & Castañeda-juarez, M. E. (2017). *Silver Nanoparticles for the Rapid Healing of Diabetic Foot Ulcers*. 4(1), (1-6). <https://doi.org/10.23937/2378-3664.1410019>

46. Segeritz, C. P., & Vallier, L. (2017). Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. In Basic Science Methods for Clinical Researchers. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>
47. Tengjiao Song, Jiangshun Yang, Jing Zhou, Zhe Chen and Xiaofeng Yuan, 2019. A Review of the Mechanisms of Wnt7b in the Process of Malignant Tumor Invasion and Metastasis. *International Journal of Pharmacology*, 15: 523-532.
48. Kaur, G., & Dufour, J. M. (2012). Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, 2(1), 1–5. <https://doi.org/10.4161/spmg.19885>
49. Casado Hernández, Imilla, Mora González, Néstor, Ferrer Carmenates, Gretty, Fernández Torres, Sandra, & Pino Blanco, Daily. (2016). Citotoxicidad in vitro y potencialidades de los compuestos quinoides como agentes antitumorales. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(1) Recuperado en 21 de junio de 2022, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892016000100004&lng=es&tln=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892016000100004&lng=es&tln=es)
50. Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, 1–18. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
51. Martínez Salazar, M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 152-166. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752009000200016&Ing=es&nrm=iso&tlnh=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752009000200016&Ing=es&nrm=iso&tlnh=es)
52. Vicencio, J., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo A., Tasdemir, E., Morselli, E., Younes, A., Maiuri, M., Lavandro, S., Kroemer, G. 2008. Senescence, Apoptosis or Autophagy? *Gerontology* 54: 92-99
53. Dimri, G., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. y Campisi, J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9363-9367.

54. Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35 (4): 495-516
55. Zhivotovsky, B. y Orrenius, S. 2001. Current Concepts in Cell Death. En: Wiley, J. & Sons (eds). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: Wiley InterScience. 18.1.1- 18.1.18.
56. Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., et al. (2015). Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int J Mol Sci*, 16, 193-217.
57. Vaquero-Raya, E. C., Molero-Richard, X., (2005). Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿Una posible diana terapéutica? *Gastroenterología y Hepatología*, 28(8), 473-484.  
<http://doi.org/10.1157/13078997>
58. Carvajal Carvajal, C. (2020). ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO: FORMACIÓN, FUNCION Y ESTRÉS OXIDATIVO. *Medicina Legal De Costa Rica*, 36(1). Recuperado a partir de [//www.binasss.sa.cr/ojssalud/index.php/mlcr/article/view/116](http://www.binasss.sa.cr/ojssalud/index.php/mlcr/article/view/116)
59. Lozada S, García L. Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Rev Asociación Colombiana de Dermatología*. 2009; 17: 172 – 179
60. Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in Biology and Medicine*. Tercera edición. Oxford, New York, 2000
61. Halliwell B. Free radical, antioxidants and human disease, curiosity, cause, or consequence?. *Lancet* 1994; 344: 721 – 724
62. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J*. 1973; 134: 707- 716.
63. Green M, Hill H. *Methods in Enzymology*, 1984; 105: 3 – 9.
64. Días J, Serrano E, Acosta F, et al. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. *Clin Chem*. 1998; 44(10): 2215 – 2217
65. Boveris A. *Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues*. Buenos Aires (Argentina). 1998; 58: 350- 356.

66. Juárez-Moreno, K., Gonzalez, E. B., Girón-Vazquez, N., Chávez-Santoscoy, R. A., Mota-Morales, J. D., Perez-Mozqueda, L. L., Garcia-Garcia, M. R., Pestryakov, A., & Bogdanchikova, N. (2017). Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Human and Experimental Toxicology*, 36(9),931-948.  
<http://doi.org/10.1177/0960327116675206>
67. Ruiz-Ruiz, B., Arellano-García, M. E., Radilla-Chávez, P., Salas-Vargas, D. S., Toledano-Magaña, Y., Casillas-Figueroa, F., Luna Vazquez-Gomez, R., Pestryakov, A., García-Ramos, J. C., & Bogdanchikova, N. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. *ACS Omega*, 5(21), 12005–12015. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00149>
68. Gurunathan, S., Han, J. W., Dayem, A. A., Eppakayala, V., Park, J. H., Cho, S. G., Lee, K. J., & KIM, J. H. (2013). Green synthesis of anisotropic silver nanoparticles and its potential cytotoxicity in human breast cancer cells (MCF-7). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19(5), 1600-1605. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.01.029>
69. Ullah, I., Khalil, A. T., Ali, M., Iqbal, J., Ali, W., & Alarifi, S. (2020). Green-Synthesized Silver Nanoparticles Induces Apoptotic Cell Death in MCF-7 Breast Cancer Cells by Generating Reactive Oxygen Species and Activating Caspase 3 and 9 Enzyme Activities. 2020
70. Policastro, L. (2002). Participación de las especies reactivas de oxígeno y del nitrógeno en la transformación celular y en la modulación de la radiosensibilidad. Biblioteca digital FCEN Universidad de Buenos Aires.
71. Martínez-Torres, Ana & Uscanga, Ashanti & Rodríguez-Padilla, Cristina. (2016). Actividad citotóxica in vitro frente a células tumorales. 10.3926/oms.318.
72. Cruz-Ramírez, O., Valenzuela-Salas, L. M., Blanco-Salazar, A., Rodríguez-Arena, J. A., Mier-Maldonado, P. A., García-Ramos, J. C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., & Toledano-Magaña, Y. (2021). Antitumor activity against human colorectal adenocarcinoma of silver nanoparticles:

Influence of [Ag]/[PVP] ratio. *Pharmaceutics*, 13(7).

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071000>

73. Kumar, P., Yuvakkumar, R., Vijayakumar, S., & Vaseeharan, B. (2018). Cytotoxicity of phloroglucinol engineered silver (AG) nanoparticles against MCF-7 breast cancer cell lines. *Materials Chemistry and Physics*, 220 (May), 40-408. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.08.074>
74. Blanco-Salazar. (2022). Actividad antiproliferativa y citotóxica inducida por nanopartículas de plata en modelos in vitro de leucemia. Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias, UABC.