



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



Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

**Evaluación citotóxica y genotóxica de nanopartículas de plata para la
inhibición de células tumorales**

Presenta:

Nayeli Guadalupe Girón Vázquez

Director de tesis

Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Miembros del comité

Dra. Graciela Guerra Rivas

Dra. Tatiana Olivares Bañuelos

Dr. Dante Magdaleno

Dr. Rubén Villarreal Sánchez

Ensenada, Baja California. Junio de 2019.

Resumen de la tesis que presenta el alumno Nayeli Guadalupe Girón Vázquez como requisito para la obtención del grado de Doctor en Ciencias del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias en Ingeniería en el área de Bioingeniería.

Evaluación citotóxica y genotóxica de nanopartículas de plata para la inhibición de células tumorales

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se origina por alteraciones o mutaciones en protooncogenes y genes supresores de tumores, favoreciendo la división celular, el desarrollo de vascularización, la migración celular y evitando la apoptosis.

Los tratamientos utilizados contra el cáncer son de tipo integral y multidisciplinario, en donde se utiliza la cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia endocrina y la terapia con anticuerpos monoclonales. Sin embargo, este tipo de terapias tienen una efectividad limitada en función del tipo de tumor, el grado de desarrollo, localización del tumor, resistencia al tratamiento, además de provocar efectos secundarios.

En la actualidad, se busca desarrollar y aplicar nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento que sean más efectivos, menos costosos y que contribuyan a la identificación y eliminación de neoplasias. En este sentido, la nanotecnología proporciona herramientas para la entrega de fármacos y el diagnóstico mediante nanopartículas (NPs) debido a sus múltiples propiedades fisicoquímicas.

Existen distintos tipos de nanomateriales que están siendo desarrollados como tratamiento o como agentes diagnósticos, sin embargo, son de particular interés las nanopartículas de oro y las nanopartículas de plata para su uso en terapias antineoplásicas, ya que actualmente se usan en el diagnóstico médico y por sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antivirales, respectivamente.

Recientemente, las nanopartículas de plata se han propuesto como agentes terapéuticos contra el cáncer, por lo que en el presente trabajo se muestran los efectos citotóxicos y genotóxicos de nanopartículas de plata, en líneas celulares tumorales de mama, melanoma, pulmón y glioma, como potenciales agentes antitumorales. Los resultados muestran cambios en morfología, actividad antitumoral dosis dependiente y muerte celular por apoptosis. Por otra parte, se presenta la síntesis y funcionalización de nanoestrellas de oro como posibles sustratos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Resumen aprobado por



Dra. Claudia Mariana. Gomez Gutierrez.
Director de tesis

Palabras clave: nanopartículas de plata, nanoestrellas de oro, cáncer, citotoxicidad, diagnóstico

Dedicatoria

Le dedico este trabajo

A Dios, a mi familia, y a mis guías espirituales, porque han estado siempre para mí, por todo su amor, comprensión y cariño. Todo este trabajo es para ustedes.

El desarrollo y culminación del doctorado me ha costado mucho esfuerzo, cansancio, desvelos, muy malas experiencias, sangre, y una profunda desmoralización y decepción, pero también me ha traído crecimiento personal y enseñanzas que no olvidaré y que pondré en práctica.

Y, podrá decirse que todo lo anterior es normal, que es práctica corriente, pero no debería de ser así. Hay muchas cosas que no se deben de hacer porque no son correctas, porque no son éticas ni morales ni profesionales, porque no se pueden justificar ni aceptar y es urgente y necesario que se cambien. No debemos ni tenemos que normalizar lo que es inaceptable.

Finalmente y después de todo, puedo decir terminé, se acabó, y agradezco infinitamente a Dios por ello.

*“Yo te amo, Señor, Tú eres mi fuerza,
mi roca, mi fortaleza, mi libertador,
mi Dios, mi roca donde yo me refugio,
mi escudo protector, mi salvación,
mi asilo. ¡Alabado sea Dios!
Yo le invoco y salgo victorioso
de mis enemigos...”*

Salmo 18

Agradecimientos

Agradezco, en primer lugar, a Dios, por otorgarme la vida, por permitir que finalizará el doctorado y el presente trabajo, a pesar de todo y de todos. Este trabajo me ha traído muchas cosas negativas, pero Dios siempre ha estado conmigo y siempre lo estará. Le agradezco porque me brinda nuevas oportunidades cada día. Señor, Dios, aumenta mi esperanza y mi fe.

Agradezco a mi familia, siempre han estado para mí, en especial a mi mamá y mis hermanas. Gracias por estar conmigo en los momentos más oscuros y difíciles durante el desarrollo de este trabajo, en especial el último año. Dios los bendiga siempre.

Un agradecimiento muy especial al MC Dario y a la madre MC Odilia, han sido un gran apoyo para mí, en especial el último año de trabajo. Su apoyo y guía espiritual me han ayudado justo cuando estaba en una de las cosas más oscuras y profundas que una persona podría pasar en su vida. Gracias y Dios los bendiga siempre.

Agradezco a Duilio Valdespino Padilla, por su amor, apoyo y comprensión, en especial el último año del doctorado, Dios te bendiga.

Agradezco a la Dra. Evarista Arellano Garcia, Dios la bendiga por brindarme su apoyo y por abrirme las puertas de su casa, siempre le estaré agradecida.

Agradezco a la Dra. Yanis Toledano, el Dr. Juan Carlos García y el Dr. Roberto Vázquez, por sus aportaciones, sus enseñanzas y sus pláticas.

También agradezco a la Dra. Nina Bogdanchikova, que donó las nanopartículas de plata Argovit para el desarrollo parcial de este trabajo y por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Agradezco al departamento de bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM Campus Ensenada, por prestar las instalaciones y por lo aprendido durante los primeros tres años del doctorado.

Agradezco al director de tesis, la Dra. Claudia Gómez y al comité tutorial, la Dra. Graciela Guerra, la Dra. Tatiana Olivares, el Dr. Dante Magdaleno y el Dr. Rubén Villarreal por el interés mostrado en mi trabajo, las correcciones y sugerencias recibidas.

Finalmente, quiero agradecer al CONACYT, por la beca brindada durante el desarrollo del doctorado.

Índice

Resumen	1
Dedicatoria	2
Agradecimientos.....	3
Índice de figuras.....	6
I. Introducción.....	9
II. Justificación.....	14
III. Hipótesis	16
IV. Objetivo general	16
IV.1 Objetivos Específicos	16
V. Metodología General	17
V.1. Reactivos.....	17
V.2. Cultivo celular	17
V.3. Preparación de nanopartículas de plata.....	18
VI. Cáncer de Mama	19
VI.1 Metodología	31
VI.1.1. Ensayos de viabilidad por MTT en la línea celular de cáncer de mama humano triple negativo MDA-MB-231 con nanopartículas de plata.....	31
VI. 2. Resultados	33
VI.3. Discusión y conclusiones	34
VII. Cáncer de piel: Melanoma.....	40
VII.1. Metodología	52
VII.1.2. Ensayos de viabilidad por MTT en la línea celular B16-F10 de melanoma de ratón expuestas a nanopartículas de plata y cisplatino.....	52
VII. 2. Resultados	54
VII.3. Discusión y conclusiones	57
VIII. Cáncer de pulmón.....	61
VIII.1. Metodología	69
VIII.1.1. Ensayos de viabilidad por MTT en la línea celular de cáncer pulmón humano A549 con nanopartículas de plata y quimioterapéuticos.....	69
VIII.1.2. Determinación de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	71

VIII.1.3. <i>Determinación del tipo de muerte celular</i>	72
VIII.2. Resultados	75
VIII.3. Discusión y conclusiones	81
IX. Cáncer de células nerviosas	86
IX.1. Metodología	88
IX.1.1. <i>Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata</i>	88
IX.1.2. <i>Determinación de plata mediante horno de flama</i>	89
IX.1.3. <i>Ensayos de viabilidad por MTT en la línea celular C6 de glioma de rata, con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes</i>	90
IX.1.4. <i>Peroxidación de lípidos</i>	92
IX.1.5. <i>Actividad total de glutatión</i>	92
IX.1.6. <i>Extracción de DNA</i>	92
IX.2. Resultados	93
IX.3. Discusión y conclusiones	101
X. Nanopartículas de oro	107
X.1. Metodología	113
X.1.2. <i>Síntesis de nanoestrellas de oro</i>	113
X.1.2.1. <i>Funcionalización de nanoestrellas de oro con 4-aminotiofenol</i>	114
X.1.2.2. <i>Caracterización de nanoestrellas de oro</i>	115
X.1.2.3. <i>Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)</i>	116
X.1.2.4. <i>Espectroscopía Raman-SERS</i>	116
X.1.2.5. <i>Ensayos de citotoxicidad de nanoestrellas de oro por ensayos colorimétricos (MTT)</i>	117
X.1.2.6. <i>Ensayos de viabilidad por MTT en la línea celular de cáncer de mama humano triple negativo MDA-MB-231 con nanopartículas de oro</i>	118
X.2. Resultados	121
X.3. Discusión y conclusiones	124
XI. Referencias	129

Índice de figuras

Figura 1. Viabilidad celular por MTT en la línea celular MDA-MB-231 con nanopartículas de plata Argovit con 2.5, 3, 3.25, 3.5, 4, 4.25, 4.5 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	33
Figura 2. Viabilidad celular por MTT en la línea celular MDA-MB-231 con el fármaco Tamoxifen..	34
Figura 3. Viabilidad celular por MTT en la línea celular B16-F10 de melanoma de ratón, con nanopartículas de plata Argovit..	55
Figura 4. Viabilidad celular por MTT en la línea celular B16-F10 de melanoma de ratón, con el fármaco Cisplatino..	55
Figura 5. Microscopia invertida de contraste de fase de células B16HF10 con nanopartículas de plata.....	56
Figura 6. Viabilidad celular por MTT en la línea celular A549 de cáncer de pulmón, con nanopartículas de plata Argovit (2, 2.25, 2.5, 3 y 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).....	75
Figura 7. Viabilidad celular por MTT en la línea celular A549 de cáncer de pulmón, con el fármaco paclitaxel (0.0128, 0.0256, 0.0512, 10.6 y 21.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$).....	76
Figura 8. Viabilidad celular por MTT en la línea celular A549 de cáncer de pulmón, con el fármaco Docetaxel (10.09, 20.1, 40.3, 60.5 y 80.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$).	76
Figura 9. Microscopia invertida de contraste de fase (objetivo 10X) de las células A549 con nanopartículas de plata (2, 2.25, 2.5, 3 y 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), docetaxel (0.09, 20.1, 40.3, 60.5 y 80.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y paclitaxel (0.0128, 0.0256, 0.0512, 10.6 y 21.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$).	77
Figura 10. Citometría de flujo para la producción de ROS en células A549 con nanopartículas de plata Argovit (2, 2.25, 2.5, 3 y 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) después de un periodo de incubación de 24 horas. S.....	78
Figura 11. Citometría de flujo para la producción de ROS en células A549 con Paclitaxel (0.0032, 0.0064, 0.0128, 0.0256 y 0.0512 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) después de un periodo de incubación de 24 horas.	78
Figura 13. Citometría de flujo de células A549 con nanopartículas de plata Argovit para la determinación del tipo de muerte celular, después de un periodo de incubación de 24 horas con 2, 2.25, 2.5, 3 y 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con nanopartículas de plata..	79

Figura 12. Citometria de flujo para la producción de ROS en células A549 con Docetaxel (10.09, 20.1, 40.3, 60.5 y 80.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) después de un periodo de incubación de 24 horas.	79
Figura 14. Citometria de flujo de células A549 con paclitaxel para la determinación del tipo de muerte celular, después de un periodo de incubación de 24 horas con 0.00332, 0.0064, 0.0128, 0.0256 y 0.0512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de paclitaxel.....	80
Figura 15 Citometria de flujo de células A549 con docetaxel para la determinación del tipo de muerte celular, después de un periodo de incubación de 24 horas con 10.09, 20.1, 40.3, 60.5 y 80.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de docetaxel.	80
Figura 16. Microscopia electrónica de transmisión de nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes.....	93
Figura 17. Viabilidad celular por MTT en la línea celular C6 de glioma de rata con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, muestra M1. sintetizadas por métodos verdes.....	95
Figura 18. Viabilidad celular por MTT en la línea celular C6 de glioma de rata con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, muestra M2.....	95
Figura 19. Viabilidad celular por MTT en la línea celular C6 de glioma de rata con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, muestra M3.....	96
Figura 20. Peroxidación de lípidos en células C6 con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, muestra M1. Las muestras fueron incubadas durante un periodo de 24 horas con 0.16, 0.06, 0.062, 0.095 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LC30, Lc50, Lc70 y LC80, respectivamente).....	97
Figura 21. Peroxidación de lípidos en células C6 con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, muestra M2.....	9898
Figura 22. Peroxidación de lípidos en células C6 con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, muestra M3.....	99
Figura 23. . Actividad total del glutatión en células C6 de glioma de rata, después de un periodo de tratamiento de 24 horas con concentraciones concentraciones de nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes	100
Figura 24. . Extracción de DNA en gel de electroforesis de células C6 de glioma de rata, después de un periodo de tratamiento de 24 horas, con concentraciones de las nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes.....	101
Figura 25. Viabilidad celular por MTT en la línea celular MCF7 de cáncer de mama, después de un periodo de incubación de 24 horas con nanoestrellas de oro funcionalizadas con ácido fólico (StarAu-FA), con concentraciones de 0.0001 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	121

Figura 26. Viabilidad celular por MTT en la línea celular MCF7 de cáncer de mama, después de un periodo de incubación de 24 horas con nanoestrellas de oro funcionalizadas con ácido fólico (StarAu-FA), con concentraciones de 0.0001 a 10 $\mu\text{g/mL}$	121
Figura 27. Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) para nanoestrellas de oro funcionalizadas con 4-aminotiofenol.....	122
Figura 28. Espectroscopía Raman-SERS para nanoestrellas de oro funcionalizadas con 4-aminotiofenol. Se observa la concordancia de vibración de 4-aminotiofenol (4-ATP) y su unión a un sustrato de oro (nanoestrellas de oro-4-aminotiofenol).	122
Figura 29. Microscopia de Transmisión Electrónica de nanoestrellas de oro “bare” (StarAu-Bare). Se observan nanoestrellas de oro sin funcionalizar de un tamaño aproximado de 800 nm de diametro.....	123
Figura 30. Microscopia de Transmisión Electrónica de nanoestrellas de oro funcionalizadas con ácido fólico (StarAu-FA). Se observan nanoestrellas de oro funcionalizadas con 4-aminotiofenol, con un tamaño aproximado de 800 nm de diametro.....	123

I. Introducción

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se origina por alteraciones o mutaciones en protooncogenes y genes supresores de tumores. Las mutaciones son clonadas selectivamente para favorecer la división celular descontrolada, inhibición de la supresión de tumores, bloqueo de la apoptosis, desarrollo de vascularización, ausencia de reconocimiento por el sistema inmune y migración celular (Pérez-Herrero & Fernandez-Medarde, 2015).

En países desarrollados el cáncer es la primera causa de muerte por enfermedades crónicas no transmisibles, mientras que en los países en vías de desarrollo se encuentra dentro de las tres principales causas de muerte. De acuerdo a los datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud, se prevé que la incidencia de casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 27 millones en las próximas dos décadas (WHO, 2008; 2014).

Los tratamientos disponibles para el cáncer incluyen procedimientos quirúrgicos, en donde el o los tumores se remueven de manera física; o la radioterapia, que utiliza partículas altamente energizadas para destruir o dañar a las células malignas (OMS, 2008). Este tipo de terapias funcionan en un pequeño porcentaje de cáncer no metastásico. Mientras que para estados más avanzados de cáncer la quimioterapia se utiliza como primera opción (Pérez-Herrero & Fernandez-Medarde, 2015).

Los fármacos quimioterapéuticos son compuestos que fomentan la inhibición de la proliferación de células tumorales, no obstante, este tipo de tratamiento también inhibe el crecimiento de células normales y que son de rápido crecimiento, como células

foliculares o del tracto gastrointestinal, en las que se pueden observar los efectos secundarios (Dai *et al.*, 2017).

Entre los casos más clásicos de la falta de eficiencia en los tratamientos quimioterapéuticos se puede mencionar la conversión metabólica del fármacos y factores fisiológicos como la formación irregular de vasculatura, una alta tasa de presión en el fluido intersticial y una densa matriz extracelular, así como mecanismos de resistencia a fármacos antineoplásicos, que de manera conjunta imposibilitan la eficiencia en su totalidad del tratamiento (Dai *et al.*, 2017)

Debido a los efectos secundarios de la quimioterapia, se ha planteado como tratamiento alternativo el estudio de las rutas de señalización, que están involucradas en el control de la proliferación celular, lo que permitiría utilizar fármacos o moléculas que de manera específica, inhiban o bloqueen estas rutas y/o proteínas tumorales que se encuentren sobre expresadas o mutadas en este tipo de células (Dai *et al.*, 2017).

La idea de la terapia dirigida es bloquear las señales que contribuyen al crecimiento de las células malignas y su división incontrolada, provocando su muerte mediante la inducción de la apoptosis, estimulando el sistema inmune, o entregando de manera específica los agentes quimioterapéuticos en las células cancerosas, minimizando la muerte de células normales y evitando los efectos secundarios (Dai *et al.*,2017).

Las terapias dirigidas pueden tener éxito desde enfoques directos que alteran las rutas de señalización mediante anticuerpos monoclonales o pequeñas moléculas inhibitorias, o por enfoques indirectos usando moléculas blanco, que están sobre expresadas o exclusivamente expresadas en la superficie de las células tumorales, para enviar

moléculas citotóxicas como agentes quimioterapéuticos, toxinas, citosinas o radionúclidos que pueden conjugarse con anticuerpos monoclonales o péptidos ligandos, como nanoacarreadores, para evitar la poca especificidad de la quimioterapia tradicional (Pérez-Herrero & Fernandez-Medarde, 2015).

Las terapias dirigidas actuales, utilizan anticuerpos monoclonales y pequeñas moléculas inhibitorias debido a su alta especificidad. En el caso de los anticuerpos monoclonales, estos pueden ser diseñados para unirse a proteínas específicas en las células cancerosas, de manera que el sistema inmune puede reconocerlas y matarlas. También son usados o seleccionados por la habilidad de unirse a los receptores de factores de crecimiento que se encuentran sobre expresados en las células tumorales, de manera que al unirse al receptor bloquean los sitios de unión de los factores de crecimiento, parando las señales de proliferación. Por otra parte, el uso de las pequeñas moléculas inhibitorias se debe a su habilidad de bloquear rutas de señalización involucradas en la proliferación anormal, eventos antiapoptóticos y angiogénicos que se producen en las células cancerosas, como lo es la inhibición de las rutas de tirosina-quinasa, inhibición del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, HER1/2), etc. (Pérez-Herrero & Fernandez-Medarde, 2015).

Otra estrategia por la que se ha optado para el tratamiento del cáncer es la combinación de terapias, ya que cada una tiene diferentes o múltiples mecanismos y sitios de acción, de manera que su uso en conjunto aumenta la sensibilidad al tratamiento.

Se han utilizado combinaciones de diversas moléculas, proteínas o inhibidores de rutas de señalización conjugadas con fármacos antineoplásicos, conduciendo a la acumulación selectiva del tratamiento en las células tumorales. Actualmente, existen numerosos tratamientos de terapia dirigida combinada que se encuentran bajo diversas etapas clínicas de investigación, no obstante, presentan algunos detalles importantes que son considerados para su aprobación, como lo son la corta vida media que poseen, su estabilidad y los efectos adversos que ocasionan (Pérez-Herrero & Fernandez-Medarde, 2015; Dai *et al.*, 2017).

En este sentido, la terapia dirigida y sus combinaciones presentan algunas consideraciones que deben de tomarse en cuenta, como: a) la toxicidad acumulada que pueda tolerar el paciente, b) la baja solubilidad y biodisponibilidad del ingrediente farmacológicamente activo, c) la rápida eliminación o la corta vida media del ingrediente activo durante el tratamiento, d) la diferencia en la farmacocinética de los agentes antitumorales que imposibilitan una tasa ideal estequiométrica en el sitio de acción, e) la baja selectividad de ambos agentes, provocando altos niveles de toxicidad y f) la inherente complejidad biológica y dinámica de los tumores que frecuentemente comprometen la terapia antitumoral (Dai *et al.*, 2017).

A pesar de los tratamientos dirigidos y sus combinaciones, las terapias que se utilizan en el tratamiento del cáncer son las mismas, no importando el tipo de cáncer. Y, aunque este tipo de terapias funcionan bien en un gran porcentaje, su efectividad está limitada en función del estado, grado y clasificación del tejido canceroso, por lo que, al ser una enfermedad bastante compleja, la eficiencia de una o varias terapias conjugadas puede ser insuficiente en la práctica clínica (Dai *et al.*, 2017). Además,

factores como la citotoxicidad de los fármacos o de las moléculas utilizadas, la resistencia a los fármacos, el tiempo de respuesta y la falta de efectividad siguen siendo un reto.

En respuesta a las limitantes de las terapias dirigidas, existen otras alternativas novedosas para el tratamiento del cáncer como lo son la hipertermia, fototerapia, el uso de láseres, trasplantes de células madre o el uso de nanopartículas para destruir células cancerígenas (Orentas *et al.*, 2008, citado en Marques *et al.*, 2014). Esta última es de especial interés, ya que su funcionamiento consiste en la entrega localizada de fármacos antineoplásicos (cisplatino, mitomicina C, etiodol, entre otros) para el tratamiento de diversos tipos de cáncer mediante su liberación controlada.

La liberación controlada de fármacos se basa en el diseño y aplicación de polímeros, cerámicas y nanomateriales, biocompatibles o biodegradables que puedan llegar al tejido diana y liberar el fármaco, con el fin de evitar los efectos secundarios de los tratamientos convencionales.

La posible aplicación de nanomateriales para el tratamiento del cáncer podría suponer un cambio en los procedimientos habituales para controlar y/o eliminar neoplasias, ya que es posible dirigirlos a determinados tipos de células y tejidos, con el fin de liberar de manera localizada fármacos antineoplásicos, disminuyendo los efectos secundarios en los pacientes. Sin embargo, se requieren más estudios comparativos entre distintos tipos de tejidos cancerosos, distintos tipos de nanomateriales, tipos de fármacos, así como el estudio de los efectos en la expresión genética, con el objetivo de encontrar

una nueva estrategia que pueda contribuir a resolver este tipo de problemas en el área de la salud.

II. Justificación

El cáncer representa un problema de salud pública al que se destina una gran cantidad de dinero en el tratamiento y el diagnóstico, que en ocasiones es tardío o se requiere mucho tiempo. Una estrategia para tratar de solucionar este tipo de problemas es la aplicación de la nanomedicina, que involucra el uso de terapias que incluyen las nanopartículas y ensamblajes a nanoescala, permitiendo la entrega dirigida de fármacos en sitios específicos del tejido tumoral, utilizando nanomateriales basados en metales, liposomas, dendrímeros, micelas y algunos otros polímeros biodegradables

Estos nanomateriales pueden ser diseñados para entregar distintos tipos de fármacos de manera específica, a diferencia de los fármacos antineoplásicos que son inyectados vía intravenosa y que son distribuidos de manera sistémica.

Los nanomateriales, tienen como ventaja, que pueden aumentar la solubilidad del fármaco, potenciando la biodisponibilidad, la solubilidad, y el tiempo de retención de los medicamentos. Además, se puede funcionalizar su superficie para aumentar su especificidad, tienen una buena tasa de degradación o de eliminación, y permiten la liberación controlada del fármaco, por lo que los sistemas de entrega de fármacos con nanomateriales pueden reemplazar el uso de la quimioterapia tradicional y sus efectos secundarios.

Actualmente, se están empezando a utilizar sistemas de entrega de fármacos nanomicelares denominados dendrímeros anfifílicos (capaces de combinar la estabilidad y fuerza mecánica de los dendrímeros poliméricos con la formación de micelas de lípidos), polímeros biodegradables como el quitosan, el ácido poli láctico-coglicólico (PLGA), el polietilenglicol (PEG) y diversos nanomateriales metálicos para el tratamiento y diagnóstico del cáncer.

Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas que representa el uso de estos nanomateriales dirigidos y funcionalizados con fármacos antineoplásicos, es necesario estudiar de manera previa las interacciones celulares existentes entre el nanomaterial y las células cancerosas tanto a nivel celular como molecular, con el objetivo de desarrollar algún tratamiento o método de diagnosis más rápido, eficaz, menos costoso, menos invasivo y con nulos o pocos efectos secundarios.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene el propósito de evaluar la disminución de la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama, pulmón, melanoma y glioma expuestas a nanomateriales, como alternativa al tratamiento convencional de estos tipos de neoplasias, ya que son algunos de los tipos de cáncer más frecuentes y representativos en nuestro país y en el mundo.

III. Hipótesis

Los nanomateriales sintetizados vía química y biológica generan efectos citotóxicos en líneas celulares tumorales.

IV. Objetivo general

Evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de nanopartículas en distintas líneas celulares tumorales.

IV.1 Objetivos Específicos

1. Evaluar la citotoxicidad de nanopartículas de plata Argovit, en líneas celulares de cáncer de mama, melanoma y pulmón.
2. Evaluar la citotoxicidad de nanopartículas de plata biosintéticas, en células tumorales de glioma.
3. Cuantificar la peroxidación de lípidos en células provenientes de líneas células tumorales.
4. Medir la actividad de glutatión en células tumorales expuestas a nanopartículas de plata.
5. Sintetizar y funcionalizar nanomateriales basados en oro como posible plataforma para el diagnóstico y tratamiento del cáncer.

V. Metodología General

V.1. Reactivos

El medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), la L-Glutamina (1%), el bicarbonato de sodio (2 g/L), la tripsina-EDTA, azul de tripán y la insulina recombinante humana (0.01 mg/mL) fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich® (St. Louis Missouri, USA), el Suero Fetal Bovino fueron adquiridos, la solución de antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomina) al 1% fue adquirido en Sigma. Los reactivos como el cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) y el fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄) para preparar solución buffer de fosfatos, fueron comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis Missouri, USA). El reactivo para la reacción colorimétrica para MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), el Dimetil Sulfóxido (DMSO) y el isopropanol absoluto fueron comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis Missouri, USA).

V.2. Cultivo celular

Las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Se mantuvieron en cultivo en una incubadora bajo una atmosfera de 5 % de CO₂ a una temperatura de 37 °C.

V.3. Preparación de nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata Argovit fueron donadas por la Dra. Nina Bogdanchikova. Las nanopartículas de plata Argovit en su estado físico elemental se encuentran en una suspensión de tipo coloidal, de la cual está formada por nanopartículas de plata dispersas, con una concentración de 12 $\mu\text{g/mL}$. Poseen una cubierta polimérica de Polivinilpirrolidona (PVP) en una concentración de 188 $\mu\text{g/mL}$ y se encuentran disueltas en agua destilada. Las nanopartículas de plata fueron caracterizadas mediante Uv-Vis, TEM (Microscopía electrónica de transmisión), ATR-FTIR y DLS. Poseen un diámetro promedio de 35 ± 15 nm, con un potencial Z de -15 mV y un radio hidrodinámico de 70 nm, previamente analizado (Juárez-Moreno *et al.*,2017). La solución stock de nanopartículas de plata se mantuvo a 4 C en refrigeración.

Las suspensiones de NPAg se prepararon el mismo día de la aplicación de tratamientos, a partir de la concentración inicial de la solución Stock. Se usó como solvente agua destilada estéril.

VI. Cáncer de Mama

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer más comunes que afecta a 1.3 millones de mujeres en el mundo (Yuan *et al.*,2016; Lam, Jiménez & Boven *et al.*,2013) y se clasifica en función de características histopatológicas basadas en la expresión de receptores de estrógeno (ER), de receptor de progesterona (PR) y la amplificación del oncogen HER2/neu. La clasificación se reagrupa en subtipos basados en la caracterización molecular, en los cuales se distingue el cáncer de mama luminal A (generalmente positivos a ER y de bajo grado) y luminal B (positivos para ER pero de alto grado), tipo basal (el cual corresponde generalmente a triples negativos), positivo a HER2 y bajo en Claudina. Mediante esta clasificación e identificación se obtiene información acerca del pronóstico, así como de las posibles opciones de tratamientos (Redig *et al.*, 2014; Nounou *et al.*, 2015; Lam, Jiménez & Boven *et al.*,2013).

Los métodos de detección incluyen la mamografía con una sensibilidad del 71 al 96% y está recomendada de manera rutinaria, así como para pacientes con historial familiar de cáncer de mama. También está la ultrasonografía aunque no sea muy sensible; la resonancia magnética con un 90 a 100% de sensibilidad (no obstante, es muy cara) y en algunos casos es necesario realizar análisis moleculares para mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 (Mincey & Pérez, 2004). Actualmente, existen diversos métodos de detección comerciales, como el Oncotype Dx assay para 21 genes y el Mammaprint assay para 70 genes, que han sido probados de forma clínica en los últimos 10 años (Redig *et al.*, 2014).

Los tratamientos disponibles para el cáncer de mama incluyen la cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, así como la inmunoterapia y terapia dirigida y en algunos casos la mastectomía, ya que puede reducir el riesgo de cáncer de mama en un 90%; sin embargo, estas estrategias son efectivas en relación al grado de desarrollo del tumor, además, el tiempo de respuesta al tratamiento es lento hasta presentarse efectos, lo que puede generar resistencia a fármacos además de generar efectos secundarios (Yuan *et al.*,2017; Mincey *et al.*,2004).

Una de las primeras opciones para el tratamiento del cáncer de mama es la terapia hormonal o endocrina en donde se utilizan moduladores selectivos de la expresión del receptor de estrógeno (ER, por sus siglas en inglés) como el tamoxifen y el Fulvestrant, ya que bloquean la unión entre el estrógeno y su receptor y promueven la interferencia en la síntesis de ER. También se utilizan inhibidores de aromatasa como el Letrozole, Anastrozole, Exemestrone, que inhiben la síntesis de estrógeno. No obstante, una de las opciones ampliamente utilizada es la aplicación de tamoxifen, ya que es el único agente que se ha aprobado para disminuir el cáncer de mama y este se aplica en pacientes que expresan receptores de estrógeno (ER, por sus siglas en inglés) y/o receptores de progesterona (Liedtke & Kiesel, 2012; Tang *et al.*, 2016).

Por otra parte, la quimioterapia sigue siendo el tratamiento de preferencia para el cáncer de mama y para muchos otros tipos de cáncer, puede ser usada como monoterapia o en combinación con la cirugía y puede actuar antes (neoadyuvante) o después (adyuvante), para ayudar a reducir el tamaño del tumor. Las quimioterapias son tratamientos sistémicos no selectivos, que en altas concentraciones se acumulan en los tumores para prevenir, parar o destruir células cancerosas. No obstante, este

tipo de tratamiento también actúa en células normales y frecuentemente resulta en un rápido desarrollo de resistencia a fármacos antineoplásicos mediante transportadores de multiresistencia a drogas (MDR), por lo que existe un esfuerzo por desarrollar nuevos tratamientos que sean biocompatibles y menos costosos (Gurunathan *et al.*,2013; Yuan *et al.*,2016; Olov, Bagheri-Khoulenjani & Mirzadeh, 2018)

De entre los agentes quimioterapéuticos disponibles, se pueden diferenciar el grupo de las antraciclinas y los taxanos. Las antraciclinas, como la doxorubicina y epirubicina son la primera opción de tratamiento para el cáncer de mama y su modo de acción es mediante el intercalamiento entre los pares de bases de DNA/RNA, previniendo la replicación por inhibición de la topoisomerasa. Por otra parte, los taxanos como el paclitaxel y el docetaxel, actúan por disrupción de la función de los microtúbulos e inhibición del proceso de división celular. Y, a pesar de su uso, todos estos fármacos son poco solubles en agua y con poca biodisponibilidad además de generar diversos efectos adversos (Olov, Bagheri-Khoulenjani & Mirzadeh, 2018).

El uso de los quimioterapéuticos se aplica en el caso del cáncer de mama triple negativo, ya que estos no tienen receptores para hormonas o su expresión es muy baja, por lo que tienen el peor pronóstico ya que son tipos de cáncer agresivos. En estos casos, se utiliza la monoquimioterapia o poliquimioterapia con taxanos y antraciclinas. No obstante, se genera resistencia y efectos secundarios (Tang *et al.*, 2016), por lo que se opta por combinación de terapias.

Por otra parte, aunque determinados subtipos de cáncer de mama se pueden beneficiar con la quimioterapia, la terapia hormonal o ambos, no es suficiente para

otros tipos de cáncer como es el caso del tipo luminal o algunos otros de alto riesgo. Sin embargo, de manera generalizada, los tratamientos pueden ser efectivos solo en etapas tempranas (Prat *et al.*, 2015).

Otra estrategia de tratamiento del cáncer de mama ha sido el uso de la terapia génica, ya que puede potenciar de manera directa otros tratamientos debido a que generan cambios en los procesos de reparación, señales de transducción o control del ciclo celular, además de que presentan ventajas como la reducción de los efectos secundarios de la quimioterapia. Para este tipo de tratamiento se ha usado DNA de doble cadena o cadena sencilla y RNA antisentido, entre otros. (Olov, Bagheri-Khoulenjani & Mirzadeh, 2018).

También existen las terapias dirigidas mediante el uso de agentes biológicos, como los anticuerpos monoclonales y moléculas inhibidoras, ya que reducen la toxicidad porque son tratamientos sitio-específicos y se usan como forma alternativa a la resistencia de la terapia endocrina con letrozol, lapatinib, exemestán, everolimus y tamoxifen. Estos se unen a diversas moléculas para inhibir el crecimiento tumoral. Para los anticuerpos monoclonales se incluyen el Trastuzumab, Bevacizumab, Cetuximab que actúan contra HER2, VEGFR y EGRF, respectivamente, para detener el ciclo celular. Otros tratamientos sitio-específicos, son las pequeñas moléculas inhibidoras del receptor tirosina quinasa, como el lapatinib, que puede detener la fosforilación. Pero todos estos tratamientos presentan efectos secundarios y bajas tasas de respuesta debido a su remoción por el sistema circulatorio o por activación de resistencia (Olov, Bagheri-Khoulenjani & Mirzadeh, 2018; Tang *et al.*, 2016).

Los anticuerpos monoclonales como el Trastuzumab, un anticuerpo humanizado contra el oncogen HER2/neu y el Pertuzumab (anticuerpo monoclonal contra la dimerización del dominio del receptor de HER2), parecen funcionar, pero es necesario que se realice más investigación para determinar cuál combinación de estos agentes es la mejor para cada paciente sobre todo teniendo en cuenta los efectos adversos que se pueden presentar (Liedtke & Kiesel, 2012).

En el caso de los triples negativos, que tienen el peor pronóstico, se deben de desarrollar y optimizar las terapias para estos tipos de pacientes. En este sentido se han utilizado inhibidores de PARP (Poli-A-Ribosa-Polimerasa) como el Olaparib, un importante mecanismo de reparación de DNA en las células cancerosas y como el Bevacizumab (Liedtke & Kiesel, 2012).

Además de la terapia dirigida, existe el uso de la inmunoterapia o el uso del sistema inmune para combatir el cáncer.

La respuesta inmune específica contra el cáncer inicia cuando se reconoce de manera eficiente la expresión anormal de proteínas en células tumorales. Las estrategias de la inmunoterapia se han centrado en el diseño, desarrollo y aplicación de anticuerpos monoclonales inhibidores de puntos de control del sistema inmune, que sirven para modular la inmunidad preexistente en el cáncer, a través de un balance entre la activación inmune y su supresión (McArthur & Page, 2016). Esto se lleva a cabo mediante vacunas tumorales, virus intratumorales oncolíticos, activación de células T, linfocitos infiltrantes en el tumor y anticuerpos monoclonales (Sánchez *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2017).

En relación con lo anterior, las vacunas contra el cáncer están diseñadas para producir una respuesta inmune directa contra antígenos expresados en las células tumorales, de manera que se puede cebar el sistema inmune contra este tipo de antígenos. Las vacunas contra el cáncer pueden ser mono o polivalentes (que proveen de una fuente exógena de antígenos tumorales para aumentar la respuesta inmune contra células tumorales), pueden también contener células tumorales modificadas provenientes del paciente o células presentadoras de antígenos. Las vacunas tumorales que se han desarrollado han sido contra HER2 y MUC1, contra p53, survivina, entre otras; una de las más estudiadas es la vacuna contra HER2, llamada E75 o Neli pepimut-S (NeuVax) que estimula la respuesta de los CD8+ citotóxicos contra HER2. Por otra parte, las vacunas con antígenos se han centrado en MUC1, de las cuales, la más estudiada es el carbohidrato Sialil-Tn, epítipo de MUC1 llamada Theratope. De entre otras vacunas se pueden mencionar, DRibbles (UbiVac), GVax, vacunas de células dendríticas y vacunas adyuvantes como el MG-CSF, o sustancias químicas como imiquimod, saponinas, citosinas inmunoestimuladoras e inhibidoras, así como virus oncolíticos e interferones (Sánchez *et al.*,2016).

En el caso de la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales, se encuentran monoterapias con anticuerpo anti-HER2, anti PD-1/L1 y, anti-CTLA-4, enfocados principalmente al cáncer de mama triple negativo. También están disponibles combinaciones de ellos, de las cuales se pueden mencionar Margetuximab, MCLA-128, ZW-25, SYD 985, DS-8201; inhibidores de tirosina quinasa como neratinib, tucatinib, poziotinib, pyrotinib; y enfoques inmunes como atezolizumab, Pembrolizumab; inhibidores de CDK 4/6 como Palbociclib, Abemaciclib, Ribociclib; inhibidores de PI3K

como Alpelisib, Copanlisib, Taselisib e inhibidores de 1 secretasa gama GSI1 (Escriva-de-Romaní *et al.*,2018; Sánchez, *et al.*,2016; Yuan, Peng & Gurunathan, 2017; Nounou *et al.*,2015).

Por último, se ha optado por la combinación de tratamientos que atacan diferentes sitios de acción, conduciendo al aumento de la selectividad, función sinérgica y aumentando la eficiencia del tratamiento. No obstante, se deben de tener en cuenta las combinaciones posibles y su toxicidad, así como el tipo de cáncer que se está tratando (Olov, Bagheri-Khoulenjani & Mirzadeh, 2016).

La inmunoterapia es una de las estrategias más prometedoras para el tratamiento contra el cáncer de mama. No obstante, siguen en estudio, por lo que está siendo revisadas en ensayos clínicos, así como su combinación con terapias convencionales, ya que si bien funcionan en ensayos clínicos, siguen generando diversos efectos adversos y/o se puede adquirir resistencia al tratamiento, por lo que se deben de probar y mejorar, en especial cuando se quieran incorporar agentes citotóxicos, estrategias locales e inhibición por bloqueos duales (Escriva-de-Romaní *et al.*,2018;Sanchez, Page & McArthur *et al.*,2016).

En respuesta a los efectos secundarios producidos por la inmunoterapia, se ha optado por la entrega sitio-específica del tratamiento mediante el uso de nanomateriales y/o que su combinación con las terapias disponibles prevenga la metástasis, la resistencia y los efectos adversos provocados por los tratamientos convencionales (Azizi *et al.*, 2017).

Los nanomateriales, debido a sus propiedades físico-químicas y su pequeño tamaño, pueden ser usados como nanoacarreadores para la entrega sitio-específica y controlada de fármacos, aumentando la especificidad, la acumulación y la retención en el sitio deseado. Ya sea por entrega pasiva o activa, las nanopartículas mejoran el tiempo de circulación de los fármacos conjugados o atrapados en ellas (Nounou *et al.*, 2015).

En principio, los nanoacarreadores para aplicaciones clínicas en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, necesitan tener características multifuncionales y ajustables que incluyan el control de la química superficial, estabilidad en ambientes líquidos contra la aglomeración y corrosión y poca toxicidad (Nima *et al.*, 2017).

Varios tipos de nanoacarreadores se han propuesto para el tratamiento del cáncer de mama, estos nanomateriales pueden ser de tipo polimérico, liposomas, micelas, virus, dendrímeros, nanotubos de carbón, sílice, cerámicas y nanopartículas metálicas (Talluri *et al.*, 2016; Olov, Bagheri-Khoulenjani & Mirzadeh, 2018; Nima *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2013; Nounou *et al.*, 2015).

La entrega de fármacos mediante el uso de nanopartículas presenta varias ventajas, como lo es su fácil fabricación y modificación de su superficie. Las nanopartículas se pueden sintetizar por varios métodos y se pueden obtener diferentes tamaños, formas, tipos de funcionalización (estos se pueden funcionalizar en su superficie con algunas moléculas o ligandos como anticuerpos, péptidos, aptámeros y carbohidratos) y estar hechos de diferentes tipos de materiales. Su uso para la entrega de fármacos ocurre a través de la bioconjugación mediante un enlace covalente estable entre las dos

moléculas, que tiene como característica ser biológicamente escindible y unido al menos a una biomolécula, teniendo como objetivo aumentar la estabilidad, protegiendo al fármaco de la proteólisis (Nounou *et al.*,2015).

La versatilidad que poseen los nanomateriales permite utilizarlos para solubilizar, encapsular y dirigir fármacos. Otra de las ventajas de algunos nanomateriales, es la biocompatibilidad y biodegradabilidad que presentan, diferentes tasas de carga de fármaco y perfil de liberación, así como la nula o baja toxicidad (Olov, Bagheri-Khoulenjani & Mirzadeh, 2018; Talluri *et al.*, 2015; Sharma *et al.*,2013).

Se han utilizado liposomas, nanopartículas lípidas sólidas, acarreadores lipídicos nanoestructurados e híbridos poliméricos en formulaciones con carboplatino y doxorubicina contra líneas celulares de cáncer de mama, incluso conjugándolos con anticuerpos monoclonales como el trastuzumab; de igual manera se ha probado la encapsulación y entrega de tamoxifen, gemcitabine y siRNA, camptotecina, paclitaxel, quercetina, curcumina (Talluri *et al.*,2015).

Actualmente, existen nanopartículas comerciales que se aplican en la terapia contra el cáncer, como el Abraxane, que es una nanopartícula de albúmina cargada con paclitaxel que permite de manera pasiva ir contra las células tumorales, dirigiendo el paclitaxel al receptor de albúmina en la célula tumoral, permitiendo una mayor selectividad del fármaco. Y, también se encuentra el Doxil, que es un liposoma que tiene doxorubicina encapsulada; y otros sistemas de entrega que incluyen la conjugación de tamoxifen y trastuzumab que están unidos a un anticuerpo, un receptor o ligando contra el cáncer de mama; TNF- α con IL-1 para el cáncer de mama; también

nanopartículas de oro, plata, cobre, níquel, aluminio, zinc, calcio, platino, paladio o hierro con al menos un péptido que pueden ser usados para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama (Nounou et al., 2015).

También se han fabricado nanopartículas con polímeros sintéticos como el HPMA, PGA, PEG; dendrímeros como PAMAM; y liposomas de fosfatidilcolina y colesterol; nanotubos de carbón de pared sencilla y doble; y nanorods de oro con o sin recubierta y de óxido de zinc, que han sido conjugados con ácido fólico, doxorubicina y siRNA para detener la proliferación celular, incrementar la cantidad de fármaco en el sitio, aumentar la biodisponibilidad y reducir la toxicidad (Sharma *et al.*, 2013). No obstante, muchas de estas formulaciones se encuentran en etapas clínicas, por lo que se debe de hacer un esfuerzo para mejorarlos y aplicarlos (Sharma *et al.*, 2013).

Algunos otros nanomateriales que se han utilizado han sido nanopartículas de oro debido a la biocompatibilidad que presentan, se han empleado en resonancia magnética y en sistemas de entrega para doxorubicina y siRNA, también han sido conjugadas con anticuerpos anti-EpCAM contra células de cáncer de mama MCF7 resistentes a doxorubicina resultando ser más efectivas en dosis mucho más bajas que las aplicadas en monoterapia aplicando solo doxorubicina (Nima et al., 2017; Olov, Bagheri-Khoulenjani & Mirzadeh, 2018).

Por otra parte, también se han hecho ensayos con nanopartículas de plata debido a sus múltiples propiedades fisicoquímicas y su amplio uso en el área médica, especialmente en su posible uso como tratamiento contra el cáncer. Por ejemplo, se han hecho estudios con nanopartículas de albúmina cubiertas con nanopartículas de

plata contra el cáncer de mama (MCF7, MDA-MB-231, MCF-10A) y en células blancas normales, mostrando que tienen mejores efectos inhibitorios y de apoptosis en células MCF7 y MDA-MB-231 en comparación con células normales y que los efectos son dosis-tiempo dependientes (Azizi *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2015).

Así mismo, se han realizado estudios con nanopartículas multimodales conjugando nanopartículas de plata, oro y aptámeros para terapia fototérmica y, nanopartículas de plata conjugadas con polímeros y grafeno para la entrega de doxorubicina, mostrando buenos resultados en terapia fotoquimioterma en modelos *in vivo* (Wei, Liuya *et al.*, 2015; Nounou *et al.*, 2015). Otros conjugados incluyen PLGA-PEGilado y con folato, nanomicelas de 17-N-alil-amino-17-demetoxy geldanamicina para el cáncer de mama, nanopartículas para la entrega con acción estímulo-respuesta como conjugados de biopolímeros con radionúclidos, agentes quimioterapéuticos; también se han usado polímeros termosensitivos, bioconjugados de PEG/PLGA con miRNA y siRNA para la entrega de doxorubicina; complejos de aptámeros anti-MUC1 PEGilados y cargados con doxorubicina, aptámeros con PLGA-lecitina-PEG y paclitaxel, aptámeros conjugados con sílice mesoporosa y carbón contra HER2 para terapia quimio-foto térmica, así como el uso de otros tipo de nanopartículas inorgánicas como sílica mesoporosa, óxido de hierro superparamagnético, fosfosilicato de calcio, oro y otros para formular bioconjugados (Nounou *et al.*, 2015).

También se han probado sus efectos citotóxicos y pro-apoptóticos en células Jurkat, K562, A549, HC157, leucemia y cáncer de piel (Wei *et al.*, 2015; Venugopal *et al.*, 2017). Además, se ha reportado que las nanopartículas de plata pueden modular respuestas celulares diversas. Por ejemplo, inhiben el factor de crecimiento vascular

endotelial (VEGF) mediante el bloqueo de la ruta PI3k/Akt, evitando la formación de nuevos vasos sanguíneos en modelos *in vivo*. Además, se ha reportado que activan las caspasas involucradas en los procesos apoptóticos (Wei *et al.*, 2015).

A pesar de los efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos de las nanopartículas de plata, se han realizado estudios donde se demuestra que inducen daño al DNA, aberraciones cromosomales y estrés oxidativo, entre otros. Sin embargo, las investigaciones son diversas y los resultados son contradictorios, por lo que la percepción negativa de la toxicidad de las nanopartículas de plata se puede reorientar para formular nuevos tratamientos altamente específicos contra el cáncer de mama (Wei *et al.*, 2015).

De manera general, los tratamientos con nanopartículas sugieren que son bien tolerados y que tienen un rango amplio de aplicación en el caso del cáncer. Sin embargo, para poder llevar de manera exitosa los nano-acarreadores a la clínica, es necesario controlar la calidad del producto, costos de producción, la estabilidad, la cinética de liberación, así como tener un completo entendimiento de los mecanismos de control, distribución, el nivel de toxicidad y los posibles efectos secundarios que se presenten (Talluri *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2015). Lo anterior, debido a que en algunos casos la mejora en la absorción no justifica los grandes costos y la alta complejidad del sistema de acarreo (Nounou *et al.*, 2015).

VI.1 Metodología

VI.1.1. Ensayos de viabilidad por MTT en la línea celular de cáncer de mama humano triple negativo MDA-MB-231 con nanopartículas de plata.

Se cultivaron las células MDA-MB-231 en medio DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino, en cajas Petri para cultivo celular de 100 mm (Nunc Cell Petri Dishes, Thermo Scientific®), con una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C, con 1×10^6 células aproximadamente por placa. Posteriormente, las células se separaron mediante disgregación enzimática con Tripsina-EDTA. Fueron recuperadas y centrifugadas a 1,200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 5 mL de medio DMEM (dulbecco modified Eagles minimal essential médium) con %10 de suero fetal bovino. Posteriormente, se realizó un ensayo de exclusión con el colorante azul de tripán para la estimación del número de células viables mediante conteo con la cámara de Neubauer.

Una vez determinada la cantidad de células viables en la muestra, se colocaron 10,000 células viables por pozo en placas múltiples de 96 pocillos (Nunc MicroWell-96, Thermo Scientific®), en un volumen final de 100 µL de medio DMEM suplementado, por pozo. Y, posteriormente se incubaron a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ por un periodo de 24 horas.

Al terminar las 24 horas, se aplicaron los diversos tratamientos con nanopartículas de plata (2.5, 3, 3.25, 3.5, 4, 4.25, 4.5 y 5µg/mL), así como el quimioterapéutico de primera línea tamoxifen (7.43, 8.17, 9.28, 10, 10.77, 11.1 y 13 µg/mL), por separado. Se utilizaron como controles: dimetil sulfoxido (como control total de muerte celular) y medio DMEM suplementado al 10% suero fetal bovino (como control total de células vivas), en un volumen total de 100µL por pozo, respectivamente. Una vez aplicado el tratamiento, se incubaron las placas bajo una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C por un periodo de 24 horas. Al terminar el proceso de incubación, las placas fueron decantadas y lavadas con un buffer de fosfatos (PBS 1X, estéril), aplicando 100 µL por pozo, por tres veces. Posteriormente, se colocaron 5 µL de reactivo MTT y 45 µL de medio DMEM sin suplementar, por pozo y, se incubó por 4 horas en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

Al terminar el proceso de incubación, se agregaron 100 µL de isopropanol absoluto por pozo y se disolvieron los cristales de formazán. Las placas se dejaron incubando a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad y, posteriormente se procedió a la lectura de las placas mediante espectrofotómetro para placas multi-pocillo, a una longitud de onda de 570 nm para los cristales de formazán y 690 nm para el contraste con el medio.

La viabilidad celular se determinó mediante las siguientes fórmulas:

Ec. 1

$$Abs_{ensayo} = Abs_{570nm} - Abs_{690nm}$$

Ec. 2

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{promedio de las restas de abs del compuesto}}{\text{promedio de las restas de abs del control}} \times 100$$

Los datos fueron analizados en el programa GraphPad Prism 7.0 y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Dunn de comparaciones múltiples.

VI. 2. Resultados

Los resultados muestran una $IC_{50} = 4.687 \mu\text{g/mL}$, con una $R^2 = 0.107$, para las nanopartículas de plata.

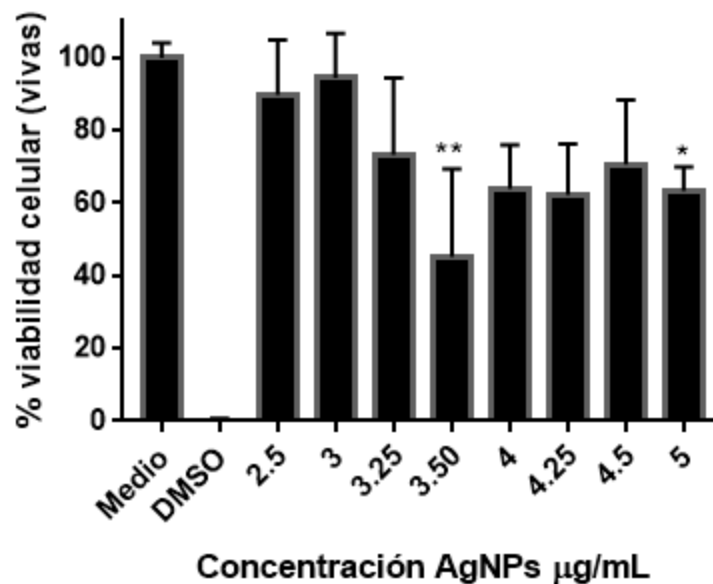


Figura 1. Viabilidad celular por MTT en la línea celular MDA-MB-231 con nanopartículas de plata Argovit con 2.5, 3, 3.25, 3.5, 4, 4.25, 4.5 y 5 $\mu\text{g/mL}$. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunn's de comparaciones múltiples, $\alpha = 0.05$ y * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$.

Para el fármaco tamoxifen se presenta una $IC_{50} = 10.68 \mu\text{g/mL}$, con una $R^2 = 0.94$, para las nanopartículas de plata.

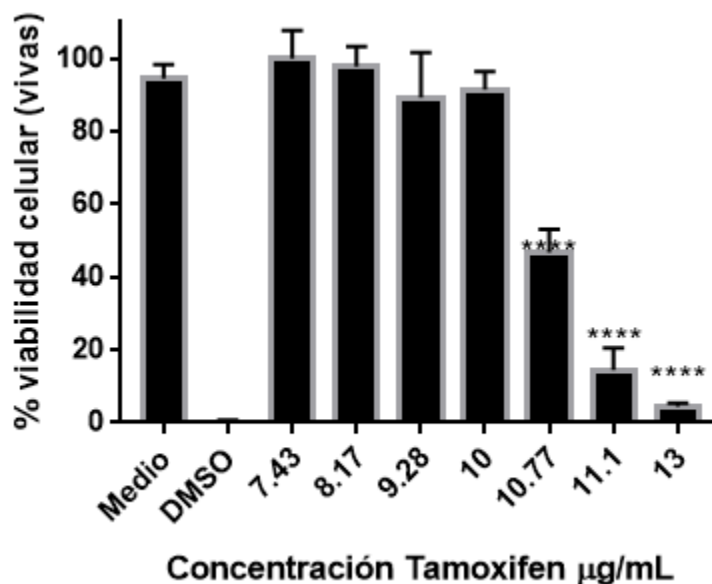


Figura 2. Viabilidad celular por MTT en la línea celular MDA-MB-231 con el fármaco Tamoxifen. Se utilizaron 7.43, 8.17, 9.28, 10, 10.77, 11.1 y 13 $\mu\text{g/mL}$. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunnet's de comparaciones múltiples, $\alpha = 0.05$ y **** $p \leq 0.0001$.

VI.3. Discusión y conclusiones

Los nanomateriales poseen un gran potencial en diversas aplicaciones en el área biomédica, en especial las nanopartículas de tipo metálicas. Entre los diferentes tipos de nanomateriales, las nanopartículas de plata tienen propiedades atractivas que incluyen actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica y más recientemente

anticancerígena.

En este trabajo se encontró que las nanopartículas de plata Argovit poseen actividad anticancerígena en células MDA-MB-231 de cáncer de mama y, además, presentan mejor actividad inhibitoria que el Tamoxifen, fármaco antineoplásico utilizado en el tratamiento del cáncer de mama.

La actividad que presenten las nanopartículas depende de las propiedades físicas que posean, como la forma y el tamaño, ya que éstas afecta el rendimiento, afectan la capacidad de internalización en células y tejidos y se relacionan directamente con los efectos citotóxicos que generen. Se ha reportado que nanopartículas de menos de 50 nm de diámetro se acumulan más fácilmente en los tumores, por lo que es un parámetro deseable para considerar durante la síntesis del nanomaterial (Malik *et al.*, 2018).

Las nanopartículas de plata Argovit son esféricas, están cubiertas por polivinilpirrolidona y tienen un tamaño de 35 nm de diámetro. Como se ha presentado en este trabajo, poseen actividad citotóxica en células de cáncer de mama triple negativo, uno de los tipos de cáncer de mama más agresivos y con pobre pronóstico de supervivencia. Los resultados han mostrado que la IC_{50} es de 4.687 $\mu\text{g/mL}$ y se presentan efectos dosis dependientes.

Los efectos inhibitorios de las nanopartículas de plata también han sido reportados con anterioridad, en donde nanopartículas de 4 nm de diámetro tienen una IC_{50} de 24.16 $\mu\text{g/mL}$ y 23.19 $\mu\text{g/mL}$ para las células MCF7 y MDA-MB-231. Donde también se ha

reportado que, si son recubiertas con productos polímeros biocompatibles, aumenta la citotoxicidad en líneas celulares tumorales en comparación con líneas celulares no tumorogénicas (Casañas Pimentel *et al.*, 2016). Resultados similares fueron obtenidos por Azizi *et al.* (2016) donde sugieren que hay mayor citotoxicidad en células tumorales MCF7 y MDA-MB231 con respecto a células no tumorigénicas, cuando se aplican diferentes dosis de nanopartículas de plata de menos de 10 nm de diámetro. Además, sugiere que, si las nanopartículas son funcionalizadas o recubiertas, es posible disminuir la concentración utilizada y aumentar la citotoxicidad en células tumorales de cáncer de mama.

Otros efectos reportados de las nanopartículas de plata son la disminución de la adhesión y proliferación celular y, generando un incremento en la apoptosis además de aumentar o reprimir la expresión de diversos genes y proteínas relacionados con la proliferación celular, angiogénesis y metástasis (Rodríguez-Razon *et al.*, 2018).

La citotoxicidad de las nanopartículas de plata también sugiere que es un fenómeno de dosis y tiempo dependencia, según estudios realizados en células SKBR3 y 8701-BC de cáncer de mama. Además, se presentan otros efectos como activación de muerte celular por apoptosis, ampollas en la membrana celular, cromatina condensada, pérdida de la integridad de la membrana celular y núcleo condensado (Buttacavoli *et al.*, 2018).

Estudios realizados con nanopartículas de plata a partir de biosíntesis, también han mostrado los mismos efectos citotóxicos que las nanopartículas sintetizadas por métodos químicos o físicos. Se han utilizado extractos naturales a partir de los cuales

se han producido nanopartículas de plata biocompatibles, con buena actividad citotóxica en diversas células tumorales y, con los mismos efectos de dosis-tiempo dependencia (Mathur *et al.*, 2017; Majeed *et al.*, 2019; Bello *et al.*, 2017; Heidari *et al.*, 2018).

Los efectos *in vitro* provocados por las nanopartículas de plata parecen ser más prometedores en comparación con la actividad de los fármacos antineoplásicos, ya que tienen mejores resultados inhibiendo células tumorales. Comúnmente, fármacos como la doxorubicina, paclitaxel y el tamoxifen son utilizados como tratamiento contra el cáncer de mama, en especial el tamoxifen, ya que es el fármaco de primera línea en el tratamiento de esta enfermedad. Nuestros resultados muestran una IC₅₀ de 10.68 µg/mL para el Tamoxifen, y que la respuesta citotóxica es dosis dependiente. Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados de inhibición al utilizar las nanopartículas de plata en las células tumorales. Datos similares se obtuvieron con doxorubicina y paclitaxel (Bello *et al.*, 2017).

Los resultados de la actividad antitumorogénica de las nanopartículas de plata, ya sea solas, bioconjugadas o biosintetizadas, indican que podrían ser buenas candidatas como futura terapia contra el cáncer, ya que solo son necesarias bajas concentraciones para obtener inhibición celular. No obstante, el mecanismo de acción de las nanopartículas de plata y su toxicidad *in vitro* e *in vivo* sigue siendo poco claro, por lo que existe preocupación acerca de la seguridad de su uso (Malik & Murkejee, 2018).

De manera general, la idea más aceptada es que las nanopartículas pueden entrar en la célula, ya sea en su forma nativa o funcionalizados y que, debido a la liberación de

iones plata, se genera estrés oxidativo por la producción de ROS, se altera el balance de la función mitocondrial, causan alteraciones al DNA y el ciclo celular y generan muerte celular por apoptosis (Malik & Murkeje 2018; Azizi *et al.*, 2017).

Además, las nanopartículas pueden interactúan con los grupos tiol de diversas enzimas y proteínas y también tienen interacciones con el DNA, lo que produce alteraciones en las funciones normales de las células, ya sea por la unión de las nanopartículas a diversos compuestos o por el bloqueo de la síntesis de proteínas (Bello *et al.*, 2017; Malik *et al.*, 2018). Sin embargo, la mayoría de las nanopartículas genera grandes cantidades de oxígeno y parecen actuar principalmente mediante la generación de ROS (Malik *et al.*, 2018).

Los iones de plata liberados por las nanopartículas indican que son más tóxicos que las formas neutras de plata, cuando estos han sido aplicados en diversos modelos murinos y líneas celulares tumorales, produciendo daños en la estructura y permeabilidad de la membrana celular generando apoptosis y diversos efectos adversos en sistema circulatorio, respiratorio, nervioso y hepático (Malik *et al.*, 2018). Sin embargo, los efectos inhibitorios las convierten en una opción terapéutica, ya que no solo presentan actividad anticancerígena, sino también son empleadas como agentes antimicrobianos y antifúngicos como respuesta a la crisis de producción de nuevos fármacos y las diversas resistencias microbianas.

Algunas de las nuevas propuestas es la combinación de nanopartículas y fármacos para aumentar la especificidad y la efectividad del tratamiento, ya que el éxito de los tratamientos existentes depende del tipo y desarrollo del tumor (Malik *et al.*, 2018). Se

sabe que las nanopartículas pequeñas, de menos de 50 nm, se infiltran y acumular en los tumores, esto abre la posibilidad de llegar a zonas más profundas del tejido, donde en ocasiones los tratamientos normales no pueden llegar (Malik *et al.*, 2018).

Otras propuestas incluyen la funcionalización con ligandos específicos que pueden ser reconocidos por los receptores celulares de las células tumorales, para aumentar la disponibilidad del fármaco, la especificidad y el éxito del tratamiento, con el fin de disminuir los efectos secundarios que se presentan de manera sistémica (Azizi *et al.*,2017; Sadat *et al.*,2017). Y, la biosíntesis de nanopartículas de plata a partir de extractos de plantas, ya que los compuestos presentes pueden aumentar la actividad citotóxica de las nanopartículas de plata (Heidari *et al.*, 2018).

Conjuntamente, los efectos tóxicos de las nanopartículas de plata se relacionan directamente con las propiedades fisicoquímicas que posean. La toxicidad que pueden generar es afectada por factores como el tamaño, la forma, la química superficial, la cristalinidad, los agentes estabilizantes, la fuerza iónica, el pH, la presencia de ligandos, cationes divalentes, entre otros (Mathur *et al.*,2017). Por lo que se pueden aprovechar y moldear estas propiedades en el proceso de síntesis, con el fin de encontrar el umbral óptimo de seguridad con el objetivo de generar tratamientos altamente específicos y efectivos contra el cáncer de mama.

Nuestros resultados muestran que las nanopartículas de plata Argovit tienen efectos citotóxicos dosis-dependiente en células de cáncer de mama MDA-MB-231, mostrando una disminución en concentración y efectividad en comparación con el fármaco tamoxifen.

VII. Cáncer de piel: Melanoma

El cáncer de piel es uno de los tipos de cáncer que frecuentemente se diagnostica, y del cual se puede clasificar en dos tipos principales, el cáncer piel no melanocítico y el melanoma de piel (Badge *et al.*, 2018).

El melanoma de piel es el tipo de cáncer más agresivo, generando el 75% de muertes relacionadas por esta enfermedad, y aumentando su incidencia alrededor del mundo (Olszanski, 2014). Se considera una enfermedad multifactorial con una relación a susceptibilidad genética y exposición ambiental (Rastrelli *et al.*, 2014; Berrocal *et al.*, 2014; Homet & Ribas, 2014). Algunos factores importantes para poder llegar a desarrollar melanoma como lo son el número de nuevos melanocíticos, historial familiar y susceptibilidad genética. Además, ciertos fenotipos como el cabello rojo, piel clara, numerosas pecas, ojos claros y la sensibilidad a la luz incrementan el riesgo para desarrollar melanoma en un 50% (Rastrelli *et al.*, 2014; Berrocal *et al.*, 2014).

Se han identificado varias mutaciones puntuales que contribuyen a la incidencia y progresión del melanoma. En el 50% de los casos de melanoma presentan mutaciones en el oncogen BRAF, NRAS, MEK1, también en Ras y Braf, que son proteínas que regulan la proliferación celular y la supervivencia, principalmente a través de la activación de la vía de la proteína quinasa Mitógeno-Activada (MAPK) o activación por mutación de RTK (receptores de tirosina quinasa), conduciendo a una excesiva proliferación celular a través de la activación de ERK1/2. Por lo anterior, MAPK y los

inhibidores de BRAF y MEK son de especial interés en el desarrollo de terapias contra el melanoma (Michielin & Hoeller, 2015; Abildgaard & Guldborg, 2015).

Los subtipos histológicos consisten en el melanoma superficial disperso (60%), melanoma nodular (5-16%), melanoma lentigo maligna (5-13%) y melanoma acral lentiginoso (5%). También existen otras formas raras como el melanoma de células de balón, melanoma mixoide, melanoma osteogénico, rabdoide (Rastrelli *et al.*, 2014; Berrocal *et al.*, 2014).

La detección del melanoma está dada en un 50% por la autoexploración basado en el método ABCDE (acrónimo para la Asimetría, Irregularidad del Borde, Color variación, Diámetro >6 mm y la Evolución). También se usa el método de Menzies, los siete puntos de Argenziano y análisis de patrón para la examinación física, así como la microscopía de epiluminiscencia y/o biopsias del Nódulo Linfático Centinela o Citología por Aspiración con Aguja Fina), también se usa la tomografía computarizada y la resonancia magnética infrarroja. Otros factores por considerar son el espesor de Breslow para tumor, el nivel de Clark, fases de crecimiento, ulceración, índice mitótico, satelitosis, inmunohistoquímica, factores moleculares (Berrocal *et al.*, 2014; Rastrelli *et al.*, 2014).

Los tratamientos disponibles para el melanoma han tenido poco progreso proporcionando un pobre pronóstico a los pacientes y opciones limitadas de tratamiento. Las opciones incluyen la cirugía, crioterapia y radiación, que funciona en pacientes con melanoma localizado, no obstante, el desarrollo de metástasis imposibilita su remoción y tratamiento (Maverakis *et al.*, 2015).

La estrategia central para el tratamiento del melanoma avanzado es el uso de la quimioterapia (Michielin & Hoeller, 2015). La quimioterapia sistémica se utiliza con dacarbazina, hidroxiurea, temozolomida, nitrosoureas, taxanos, altas dosis de citosinas (interleucina 2, interleucina-12), interferones o conjugaciones de cisplatino/vinblastina/dacarbazina/tamoxifen, o poliquimioterapia con carboplatino/paclitaxel, cisplatino/vincristina/dacarbazina, bleomicina/vincristina/lomustin/dacarbazina, que han sido las opciones de tratamiento aprobadas por la FDA en USA. Sin embargo, estos agentes no han demostrado una mejora en la expectativa de vida, ya que tienen pobre penetración, se genera resistencia y hay efectos adversos y toxicidad, por lo que nuevas estrategias están continuamente desarrollándose o aplicándose para mejorar la expectativa de vida y la efectividad del tratamiento (Olszanski, 2014; Michielin & Hoeller, 2015; Dummer *et al.*, 2015).

Una de las estrategias para el tratamiento del melanoma ha sido el uso de la inmunoterapia, basado en enfoques específicos/no específicos y activos/adoptivos. Las terapias activas están basadas en una respuesta inmune endógena mientras que las adoptivas usan componentes inmunes que son desarrollados *ex vivo*. El enfoque no específico, activo incluye infusiones con citocinas como IFN- γ o IL-2 (aunque sea muy tóxica la IL-2). Por otra parte, la terapia celular adoptiva o la infiltración de grandes números de linfocitos autólogos tumor-infiltrantes, que inducen la regresión del tumor, pero su uso es limitado por el costo y el tiempo de duración. Otras estrategias activas inmunes incluyen la vacunación con células tumorales irradiadas o con células dendríticas cargadas de antígenos asociados a tumores con el objetivo de cebar el

sistema inmune para destruir las células tumorales y, más recientemente el uso de anticuerpos monoclonales específicos para receptores de células T que regulan la respuesta inmune (Michielin & Hoeller, 2015).

Otros tratamientos incluyen vacunas contra el cáncer que promuevan la activación del sistema inmune para reconocer y destruir las células tumorales. Para este tipo de tratamiento se utilizan péptidos derivados de antígenos de melanoma como el MART-1, Melan-A, gp100 y vacunas con virus oncolíticos (Maverakis *et al.*, 2015).

No obstante, estos tratamientos siguen siendo poco efectivos en el pronóstico del cáncer de piel. Por lo anterior, otro eje central de la terapia dirigida y la inmunoterapia para el tratamiento del cáncer ha sido el desarrollo de anticuerpos monoclonales que inhiban puntos de control del sistema inmune así como el desarrollo de pequeñas moléculas quinasas inhibitorias.

Antes de 2011, la cirugía paliativa y/o la radioterapia, la quimioterapia sistémica (dacarbazina, otemustin, temozolomida), y/o la inmunoterapia con interleucina 2 eran las únicas opciones terapéuticas para pacientes con metástasis o melanoma no operable. Sin embargo, después de 2011, ocho fármacos (Ipilimumab, vemurafenib, dabrafenib, trametinib, cometinib, pembrolizumab, nivolumab, talimogen laherparepvec) han recibido aprobación del FDA para el tratamiento del melanoma metastásico o avanzado, incluyendo una combinación de regímenes de inhibidores de puntos de revisión del sistema inmune y quinasas de bajo peso molecular (de Golian *et al.*, 2016; Michielin & Hoeller, 2015; Dummer *et al.*, 2015).

Los inhibidores de puntos de control del sistema inmune utilizan una amplitud y calidad de la respuesta de las células T contra células cancerosas, regulado por un balance entre señales co-estimuladoras y co-inhibidoras como puntos clave dentro de la cascada inmune y son muy importantes para mantener la auto-tolerancia y prevenir el daño a los tejidos normales durante una respuesta inmune. Este tipo de tratamientos ofrecen una serie de ventajas como una mayor duración de la respuesta inmunitaria y menos susceptibilidad a la resistencia que la quimioterapia y otras terapias dirigidas (Michielin & Hoeller, 2015).

Para ello se han enfocado en el uso del antígeno-4 de los linfocitos T-citotóxicos (CTLA-4, por sus siglas en inglés) y la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1, por sus siglas en inglés) que son receptores inhibidores de puntos de control que están expresados en células T, y que inhiben la actividad de las células T al unirse con sus respectivos ligandos (B7.1/B7.2 para CTLA-4 y PD-L1/PD-L2 para PD-1) (Michielin & Hoeller, 2015; Maverakis *et al.*, 2015).

PD-1 es un inhibidor del receptor de células T, es decir, detiene la función de las células T, mandando señales de modulación a través de la unión con su ligando PD-L1 o PD-L2, fomentando con ello la producción de señales inhibitorias en células T y reduciendo la producción de citoquinas, por lo que suprime la proliferación de células T que matan a las células presentadoras de antígenos (tumoraes). En el caso del cáncer, las células tumorales producen una mayor cantidad de receptores PD-L1 para escapar del efecto de las células T. Por consiguiente, los anticuerpos anti-PD1, anti-PD-L1, anti-PD-L2 bloquean la unión de PD-1 con sus respectivos ligandos, de manera que se estimula la respuesta inmune antitumoral y tienen como ventaja que no dependen de la

composición genética del tumor o la presencia de mutaciones específicas para ser efectivas. Un ejemplo de este tipo de anticuerpo es nivolumab, con el que se han obtenido buenas respuestas antitumorales y de larga duración, así como son pembrolizumab, atezolizumab, avelumab (Dummer *et al.*, 2015; Homet & Ribas, 2014; Michielin & Hoeller, 2015; Olszanski, 2014; Berrocal *et al.*, 2014).

Otros tipos de anticuerpos bloquean el antígeno-4 de linfocitos T-citotóxicos (CTLA-4), de manera que regulan negativamente la actividad de las células T, controlando la duración y la intensidad de la respuesta inmune y previniendo autoinmunidad contra antígenos propios por inducción de tolerancia inmune (Olszanski, 2014; Berrocal *et al.*, 2014). El uso de anticuerpos anti-CTLA-4 permite que se activen las células T mediante el restablecimiento de la unión co-estimuladora de CD28 a B7 por la interacción crítica entre la célula T y la célula presentadora de antígeno. Esta interacción restituye la proliferación de células T y mejora la inmunidad mediada por las células T, potenciando la capacidad del paciente para aumentar la respuesta inmune antitumoral (Olszanski, 2014; Berrocal *et al.*, 2014). Un ejemplo de este tipo de anticuerpos son el Ipilimumab y el Tremelimumab (Callahan *et al.*, 2011).

Por otra parte, se han identificado varias mutaciones puntuales que contribuyen a la incidencia y progresión del melanoma. El 50% de las mutaciones corresponden al gen BRAF (por sustitución de la valina por ácido glutámico: V600E, o lisina: V600K, en el codón 600) y algunas otras en NRAS. RAS y BRAF son proteínas que regulan la proliferación celular y la supervivencia, principalmente a través de la activación de la ruta Proteína Quinasa Mitógeno-Activada (MAPK). Por lo que MAPK y los inhibidores

de BRAF y MEK son de especial interés en el desarrollo de terapias contra el melanoma (Michielin & Hoeller, 2015).

En este sentido, se han desarrollado las pequeñas moléculas inhibidoras de tirosina quinasa para inhibir los procesos de proliferación celular. Este tipo de moléculas están diseñadas en relación a mutaciones particulares en esta enzima en melanoma. Por ejemplo, se encuentra el vemurafenib y dabrafenib que son fármacos orales que inhiben la proteína oncogénica BRAF (una serina/treonina quinasa que activa la ruta de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos, MAPK, y que está activada en el 50% de los casos de melanoma) y que se usan en casos de melanoma avanzado y/o cuando no es posible remover el tumor. Estos inhibidores evitan la evasión de la senescencia y apoptosis, proliferación, angiogénesis, invasión de tejidos, evasión del sistema inmune y metástasis. Por otra parte, se encuentra el trametinib, un compuesto químico que es efectivo para el melanoma metastásico, actuando por la inhibición de MEK, el único sustrato conocido de BRAF, lo cual conduce a la disminución de la señalización y proliferación de las células de cáncer (Olszanski, 2014; Berrocal *et al.*, 2014; Michielin & Hoeller, 2015). No obstante, este tipo de inhibidores para que sean eficaces necesitan la presencia de mutaciones en la enzima para tener actividad sobre ella (Berrocal *et al.*, 2014; Michielin & Hoeller, 2015).

Finalmente, se encuentran las terapias combinadas con anti-CTLA-4, anti-PD1, anti-PD-L1/2 y las pequeñas moléculas inhibidoras de tirosina quinasa. Ya sea solos o combinados, estos inhibidores tienen una alta tasa de respuesta favorable al tratamiento y la duración de la respuesta es mayor, de manera que se muestran

prometedores en las primeras etapas de ensayos clínicos en comparación con los tratamientos convencionales.

A pesar de que se están desarrollando muchos nuevos tratamientos para el cáncer de piel, éstos siguen presentando diversas desventajas que limitan su efectividad como lo son el tipo de tumor en el que se pueden utilizar, el requerimiento de la presencia de mutaciones particulares para tener efectos clínicos sobre las enzimas, el desarrollo de resistencia al tratamiento, la imposibilidad de poder combinar algunos tratamientos (por ejemplo, el ipilimumab con vemurafenib), no haber recibido terapia inhibidora previa, los altos costos del tratamiento, la poca efectividad en casos particulares, así como la toxicidad y los múltiples efectos adversos que se presentan en los pacientes como lo son fotosensibilidad, diarrea, vómito, náusea, reacciones inflamatorias diversas, excesiva actividad inmune con afecciones en el sistema gastrointestinal, piel, hígado, sistema nervioso y endocrino, desarrollo de carcinomas de células escamosas y necrosis epidérmica tóxica, entre otros efectos que pueden llegar a comprometer la vida del paciente (Olszanski, 2014; Berrocal *et al.*, 2014; Homet & Ribas, 2014; Dummer *et al.*, 2015; de Golian *et al.*, 2016).

Todas estas limitantes pueden contribuir a la interrupción del tratamiento y por lo tanto de su efectividad, por lo que, para tratar de disminuir estas deficiencias se ha optado por identificar el tipo de mutación presente para determinar el tratamiento más efectivo, así como las posibles combinaciones de fármacos que puedan ser tolerables y seguras (Olszanski, 2014; Homet & Ribas, 2014; Dummer *et al.*, 2015).

Actualmente, el panorama de tratamiento y expectativa de supervivencia para el cáncer de piel sigue estando limitado por los tratamientos disponibles y su efectividad, por lo que algunas de las estrategias más novedosas contra el cáncer de piel es el uso de nanomateriales para la entrega de fármacos antineoplásicos que puedan ser administrados de manera específica en las células tumorales.

Los nanomateriales tienen propiedades fisicoquímicas, mecánicas, electrónicas, catalíticas, ópticas y térmicas que no están presentes en los materiales en bulto y que pueden ser aprovechadas para el tratamiento del cáncer de piel (Jha *et al.*, 2017). Se han propuesto sistemas de nanoacarreadores ultraflexibles y ultradeformables, que consisten en vesículas de membranas fluidas y que son capaces de penetrar la piel y que son usados para la entrega tópica de antioxidantes para la quimio-prevención, actuando sobre la expresión de inhibidores del ciclo celular como p21, reprimiendo la expresión de ciclinas, survivina, bcl-2, bax o induciendo la liberación de pro-caspasas, citocromo c de la mitocondria o PARP, además de contribuir a la disminución del daño al DNA, metástasis, inflamación de la piel, inmunosupresión, supervivencia celular e incremento de apoptosis (Bagde, Mondal, & Singh, 2018).

Recientemente se han desarrollado vesículas lipídicas para la terapia del cáncer de piel, como los transetosomas, que son vesículas lipídicas hechas de transfersomas y etosomas. Los transfersomas son nanovesículas elásticas compuestas principalmente por fosfolípidos y agentes surfactantes, mientras que los etosomas contienen fosfolípidos, agentes surfactantes, agua y etanol. Los transetosomas son nanovesículas que pueden penetrar en la piel por la generación de un gradiente osmótico debido a la evaporación de agua mientras se aplica en la piel, no obstante, el

mecanismo no es totalmente entendido, pero se sabe que la combinación de los fosfolípidos y el etanol conduce a una penetración más profunda en la piel (Bagde, *et al.*, 2018).

También se encuentran las microemulsiones, que están compuestas con una mezcla de agua, aceite y anfífilos que forman una solución estable de pequeñas gotas con una gran capacidad de solubilización para moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas. Este tipo de sistemas son fáciles de fabricar y han sido usados en aplicaciones farmacéuticas de tipo tópico para la entrega de terapéuticos (Bagde, *et al.*, 2018); y las nanoemulsiones para la entrega tópica de quimioterapéuticos (Bagde, *et al.*, 2018); la síntesis de nanopartículas poliméricas y suspensiones de nanocápsulas para uso tópico, en el cual se han utilizado para la entrega de tópica de fármacos (Bagde, *et al.*, 2018); e híbridos inorgánicas (Moldovan *et al.*, 2017).

Igualmente, se han utilizado nanopartículas de sílica mesoporosa, debido a la porosidad que poseen, un tamaño de poro ajustable, gran área superficial y la gran capacidad de carga de fármaco (Bagde, *et al.*, 2018).

De igual forma, se han utilizado nanopartículas de metales nobles debido a su biocompatibilidad y sus aplicaciones médicas y farmacológicas. En especial, se ha resaltado el interés del uso de las nanopartículas de plata para el tratamiento del cáncer de piel, ya que diversas investigaciones han reportado las propiedades antibacterianas, antiangiogénicas, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes y antitumorales de las nanopartículas de plata (Moldovan *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2015; Mathur *et al.*, 2017).

Por ejemplo, se han utilizado nanopartículas de plata para potenciar los efectos antiinflamatorios mediante la modulación de la secreción de citosinas pro-inflamatorias, provocando arresto del ciclo celular y expresando genes de reparación de nucleótidos por escisión (NER) en presencia de DNA dañado, en células HaCaT que fueron expuestas a rayos UVB; mostrando que no se genera toxicidad y que son útiles en la reparación de heridas en la piel (Bagde, *et al.*, 2018; Moldovan *et al.*, 2017; Arora *et al.*, 2015).

Otros estudios realizados con nanopartículas de plata en células HFB16 de melanoma de ratón y en células normales MRC-5, han demostrado su actividad antioxidante y anticancerígena mediante la activación de caspasas, arresto del ciclo celular y muerte por apoptosis, sin afectar en gran medida células normales y células rojas. Por lo anterior, podrían ser usadas en pequeñas dosis de manera directa o en combinación con otros vehículos para reducir su toxicidad e incrementar su efecto en las células tumorales (Jha *et al.*, 2017).

Aunque se ha documentado la capacidad de las nanopartículas de plata para provocar citotoxicidad en células tumorales, a través de varios mecanismos, también se ha demostrado que pueden ser potentes sensibilizadores para la quimioterapia y radioterapia y muestran una actividad antitumoral significativa en diferentes modelos animales. Estudios realizados por Jun Li *et al.* (2015), mostraron que las nanopartículas de plata inducen efectos cito-protectores contra la autofagia, promoviendo significativamente la actividad antitumoral mediante la disminución de la viabilidad celular de manera dosis-dependiente. Además, inhibe el crecimiento tumoral en modelos *in vivo* C57 con células B16 de melanoma de ratón (Li *et al.*, 2015).

Del mismo modo, en otros estudios *in vivo* se han mostrado efectos antitumorales cuando se aplican nanopartículas de plata, sin obtener efectos adversos, demostrando su efectividad para debilitar el crecimiento de tumor, reduciendo el volumen y el peso tumoral (Sierra-Rivera *et al.*, 2013).

Por otra parte, diversos estudios realizados con nanopartículas de plata obtenidos de extractos de plantas indican que producen ROS por estrés oxidativo, activan caspasas, generan cambios morfológicos, disminuyen el crecimiento celular y la apoptosis en células MCF7, células L929 y HCT15 (Mathur *et al.*, 2017).

Diferentes reportes indican que las nanopartículas de plata son citotóxicas y genotóxicas, induciendo desnaturalización de proteínas, arresto del ciclo celular, generación de aberraciones cromosomales, producción de especies reactivas de oxígeno, inducción de apoptosis y necrosis, peroxidación de lípidos, desestabilización de la membrana celular, inflamación y causan varios grados de alteración en la piel. No obstante, el tipo de síntesis, así como la forma, el tamaño, el tipo de agente estabilizante y su funcionalización están estrechamente relacionados con este tipo de efectos.

A pesar de todas las limitantes que presentan las nanopartículas de plata, las propiedades antitumorales que presentan son muy prometedoras, por lo que se debe de enfatizar la búsqueda de alternativas de síntesis, recubrimiento y funcionalización, que permitan reducir la toxicidad de las nanopartículas de plata para su uso terapéutico y que sirvan para la entrega sitio-específica de fármacos antineoplásicos para el cáncer de piel.

VII.1. Metodología

VII.1.2. Ensayos de viabilidad por MTT en la línea celular B16-F10 de melanoma de ratón expuestas a nanopartículas de plata y cisplatino

Se cultivaron las células B16-F10 en medio DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino, en cajas Petri para cultivo celular de 100 mm (Nunc Cell Petri Dishes, Thermo Scientific®), con una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C, con aproximadamente 1 x 10⁶ células por placa.

Posteriormente, las células se separaron mediante disgregación enzimática con tripsina-EDTA. Fueron recuperadas y centrifugadas a 1,200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se suspendió el pellet celular en 5 mL de medio DMEM (dulbecco modified Eagles minimal essential médium) con %10 de suero fetal bovino. Posteriormente, se realizó un ensayo de exclusión con el colorante azul de tripán para la estimación del número de células viables mediante conteo con la cámara de Neubauer.

Una vez determinada la cantidad de células viables en la muestra, se colocaron 10,000 células viables por pozo en placas múltiples de 96 pocillos (Nunc MicroWell-96, Thermo Scientific®), en un volumen final de 100 µL de medio DMEM suplementado, por pozo. Y, posteriormente se incubaron a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ por un periodo de 24 horas.

Al terminar las 24 horas, se aplicaron las diversas concentraciones de nanopartículas de plata, basado en la concentración de plata metálica en la solución stock (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 2.75, 3.5, 3.75, 4, 4.5 y 5 $\mu\text{g/mL}$) y los respectivos controles con dimetil sulfóxido como control total de muerte celular y medio DMEM suplementado al 10% suero fetal bovino como control total de células vivas, en un volumen total de 100 μL por pozo, respectivamente.

Por otra parte, se aplicaron diferentes concentraciones de cisplatino (2.5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$) y dacarbazina (250, 500, 650, 800, 950 y 1000 $\mu\text{g/mL}$).

Una vez aplicado el tratamiento, se incubaron las placas en una atmósfera de 5% de CO_2 a 37 $^{\circ}\text{C}$, por un periodo de 24 horas, para los tratamientos con nanopartículas de plata y cisplatino, respectivamente.

Al terminar el proceso de incubación, las placas fueron decantadas y lavadas con un buffer de fosfatos, aplicando 100 μL por pozo, por tres veces. Consecutivamente se colocaron 5 μL de reactivo MTT y 45 μL de medio DMEM sin suplementar, por pozo y, se incubaron por 4 horas en una atmósfera de 5% de CO_2 a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Al terminar el proceso de incubación, se agregaron 100 μL de isopropanol absoluto por pozo y se procedió a disolver los cristales de formazán. Las placas se dejaron incubando a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad y, posteriormente se procedió a la lectura de las placas mediante espectrofotómetro para placas de multi-

pocillo (poner marca y modelo) a una longitud de onda de 570 nm para los cristales de formazán y 690 nm para el contraste con el medio.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de viabilidad por MTT con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (0.5, 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 $\mu\text{g/mL}$) por un periodo de 24 horas de exposición.

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de morfología simple, mediante microscopía invertida con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (1.5, 2.5 y 4.5 $\mu\text{g/mL}$) en cajas Petri de 50 mm para cultivo celular (Nunc Cell Petri Dishes, Thermo Scientific®), con aproximadamente 100,000 células por caja.

Para determinar la viabilidad celular después del tratamiento con nanopartículas de plata y cisplatino, se realizó la resta de las absorbancias obtenidas a 570 y 690 nm, se promediaron los resultados y se determinó el porcentaje de viabilidad celular mediante las ecuaciones mencionadas en el apartado VI.1.1.

VII. 2. Resultados

Se muestran la viabilidad celular por el ensayo MTT, para las células B16-F10 de melanoma de ratón, con un IC_{50} de 2.52 $\mu\text{g/mL}$ y con un $R^2= 0.65$

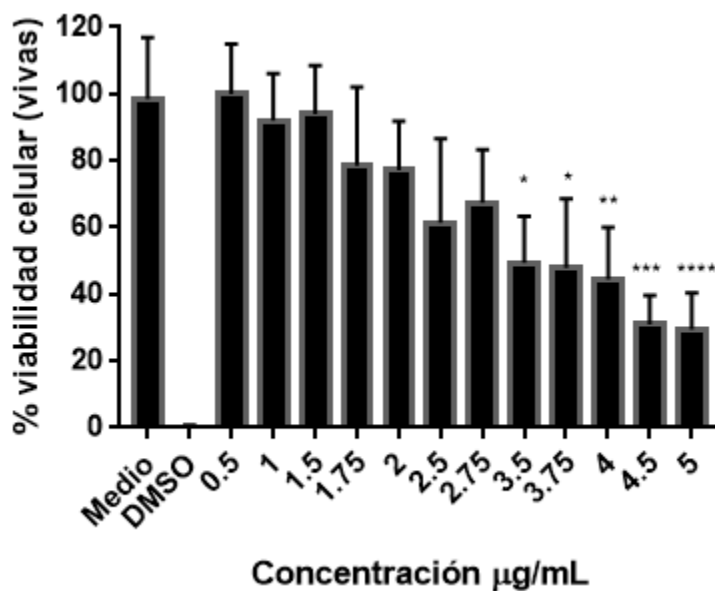


Figura 3. Viabilidad celular por MTT en la línea celular B16-F10 de melanoma de ratón, con nanopartículas de plata Argovit. Se usaron 0.5, 1, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 2.75, 3.5, 3.75, 4, 4.5 y 5 µg/mL de nanopartículas de plata con un periodo de incubación de 24 horas. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunn's de comparaciones múltiples. $\alpha=0.05$, * $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$, **** $p\leq 0.0001$.

Se muestra la viabilidad celular por el ensayo MTT, para las células B16-F10 de melanoma de ratón, con un IC₅₀ de 17.03 µg/mL y con un R²= 0.061, para el fármaco Cisplatino.

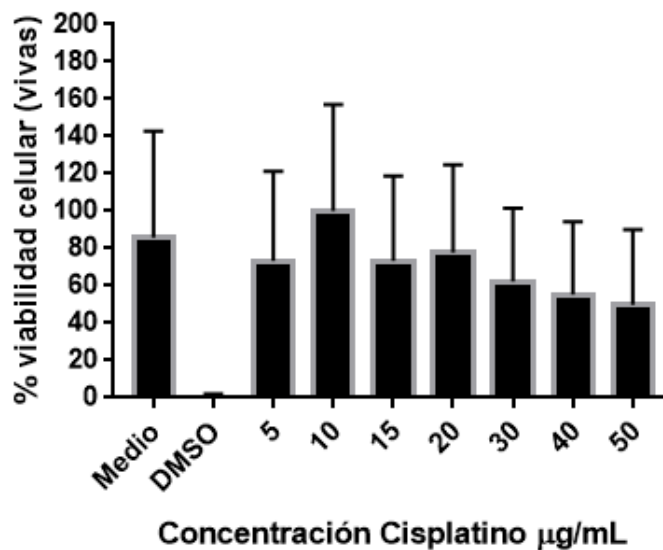


Figura 4. Viabilidad celular por MTT en la línea celular B16-F10 de melanoma de ratón, con el fármaco Cisplatino. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunnet's de comparaciones múltiples. $\alpha=0.05$, $p>0.05$.

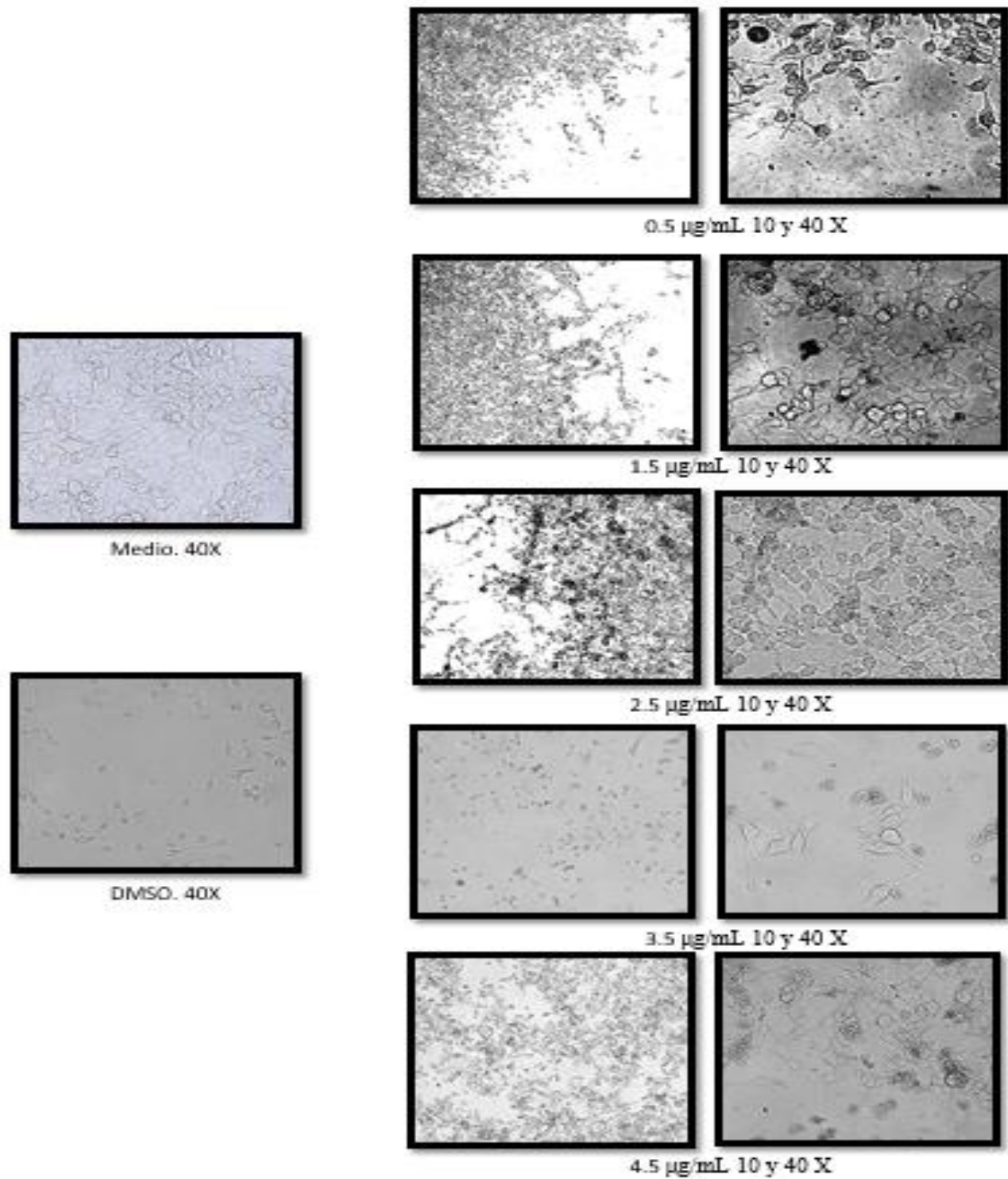


Figura 5. Microscopia invertida de contraste de fase de células B16HF10 con nanopartículas de plata. Se observan cambios de morfología de células B16HF10 con nanopartículas de plata (0.5, 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 µg/mL) después de 24 horas de incubación, con 10 y 40 magnificaciones, respectivamente.

VII.3. Discusión y conclusiones

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, contribuye a proteger el cuerpo de agentes externos como cambios de temperatura, agentes infecciosos, radiación, entre otros.

Durante las últimas décadas, se ha incrementado los casos de cáncer de piel, el cual es uno de los tipos de cáncer más comunes entre la población. Las terapias disponibles consisten, al igual que en otros tipos de cáncer, en quimioterapia, tratamientos tópicos, inmunoterapia y la terapia dirigida. Sin embargo, el melanoma es uno de los tipos de cáncer de piel más agresivos, con una tasa de crecimiento rápida y una alta tendencia a la metástasis, además de un pobre pronóstico de sobrevivencia (Simões, *et al.*, 2015).

Actualmente, con la ayuda de la nanotecnología se buscan nuevas estrategias para tratar esta enfermedad, aumentar el éxito de tratamiento y aumentar la expectativa de vida de los pacientes.

Se sabe que las nanopartículas de plata, en dosis bajas tienen buenos efectos microbicidas y con mínimos efectos secundarios, además de tener propiedades antiangiogénicas, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes y antitumorales (Moldovan *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2015; Mathur *et al.*, 2017).

Nuestros resultados sugieren las nanopartículas de plata Argovit, contribuyen a la inhibición de la viabilidad celular en células tumorales B16HF10 de melanoma de ratón con una IC₅₀ de 2.52 µg/mL.

Se ha demostrado que las nanopartículas de plata tienen efectos inhibitorios similares en células B164A5 y B16Ova, con una IC₅₀ de 7.63 µg/mL y 2.18 µg/mL, para cada línea celular, respectivamente. También se probaron nanopartículas de plata recubiertas y funcionalizadas con Betulin, que al igual que las primeras nanopartículas, presentaron efectos inhibitorios. Sin embargo, las nanopartículas funcionalizadas, generaron menos toxicidad en células normales; los experimentos *in vivo* han mostrado que tienen efecto antitumoral (Danciu *et al.*, 2019).

En células A375 se han probado conjugados de nanopartículas de plata, ácido mercaptosuccinico y fotosensibilizadores basados en porfirina para terapia fotodinámica, demostrando que a concentraciones de 5 µM no se presentan efectos tóxicos, proporcionando una buena herramienta de imagen y biosensado, ya que el conjugado posee buena estabilidad en comparación de cada compuesto por separado (Mahajan *et al.*, 2019).

Resultados similares de disminución de viabilidad celular se han encontrado a partir de nanopartículas de plata sintetizadas con *Curcubita maxima*, *Moringa oleífera* y *Acorus calamus*. Las nanopartículas de entre 30-70 nm de diámetro tuvieron un IC₅₀ de 82.39 ± 3.1, 83.57 ± 3.9 y 78.58 ± 2.7 µg/ml, respectivamente. Los resultados de viabilidad, mostraron actividad dosis-dependiente con actividad anticancerígena en células A431 (Nayak *et al.*, 2015).

El mismo efecto de dosis-dependencia se presentó en las células A431 al utilizar nanopartículas sintetizadas a partir de plantas, las investigaciones sugieren que los extractos naturales tienen moléculas bioactivas que se unen a la superficie de las

nanopartículas, pudiendo poseer actividad antitumoral o aumentando el de las nanopartículas de plata y que, la actividad biológica o la toxicidad que generen dependerá del tipo de extracto utilizado (Saber *et al.*, 2018).

Nuestros resultados apuntan a que el efecto citotóxicos de las nanopartículas de plata Argovit, provocan inhibición celular en términos de dosis-dependencia.

También se han probado los efectos de las nanopartículas de plata estabilizadas con colágeno. Los resultados mostraron que en células tumorales humanas MV3, el compuesto genero necrosis y apoptosis en comparación con células normales; en ensayos in vivo mostraron que este tipo de nanopartículas pueden ser efectivas para prevenir la formación de edema, debido a la capacidad de penetración que poseen (Cardoso *et al.*, 2017).

Debido a la actividad citotóxica que generan las nanopartículas de plata en células tumorales, también es necesario contrastar los resultados en células normales. Los efectos citotóxicos han sido probados en queratinocitos normales humanos (NHEK), proponiendo que las nanopartículas de plata de 15 nm provocan disminución de la viabilidad celular así como del metabolismo y el potencial proliferativo y de migración de las células; en exposiciones prolongadas genera daño al DNA y se activan caspasas. Por otra parte, si tienen un diámetro de 10-50 nm poseen efectos protectores contra radiación UVB, apoptosis y mutación (Niska *et al.*, 2018).

Sin embargo, otras corrientes sugieren que las nanopartículas de plata de menos de 20 nm son seguras ya que tienen mínima penetración en la piel, por lo que son poco toxicas y que pueden contribuir a sacar heridas en menor tiempo que otros compuestos

usados, sin embargo, su uso y la exposición prologada debe de ser estudiados a profundidad a manera de asegurar que no se presenten efectos adversos (Prow *et al.*, 2011).

Actualmente, se apuesta por la liberación de fármacos de forma controlada vía transdérmica. Este tipo de tratamiento con nanopartículas se busca que las rutas de penetración de los tratamientos estén en función de la estructura de la piel (intercelular, transcelular, folicular), así como un diseño estratégico de forma, tamaño, carga superficial, pH, estabilidad y tipo de nanoacarreador. Lo anterior permitiría una mayor liberación de fármaco, mayor penetración y la posibilidad de encapsular compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos, contribuyendo también a encontrar nuevos tratamientos no invasivos (Carter *et al.*, 2019; Mota *et al.*, 2019).

Las terapias transdérmicas con nanopartículas parecen ser prometedoras, no solo para el melanoma, sino para otros tipos de enfermedades de la piel, ya que se pueden aprovechar las propiedades físico químicas de las formulaciones para evitar efectos secundarios como la toxicidad sistémica, la inactivación de los fármacos en el tracto gastrointestinal y la invasividad (Carter *et al.*, 2019, 2019; Mota *et al.*, 2019).

Nuestros resultados muestran actividad antitumoral en células de melanoma de ratón, en rangos de concentración similares a los reportados en otras investigaciones (Danciu *et al.*, 2019; Mahajan *et al.*, 2019) y muy por debajo de otras (Nayak *et al.*, 2015). No obstante, es necesario realizar evaluaciones más profundas sobre la mejor vía de administración, el tiempo de exposición, así como asegurar la mejor ruta de síntesis y

funcionalización, para que tipo de tecnologías sean seguras y efectivas para su uso terapéuticos en humanos.

VIII. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte alrededor del mundo. De los diferentes tipos de cáncer pulmonares, se distinguen el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés), este último constituye el 85 al 90% de los casos y es el tipo más común de muerte por este tipo de cáncer (Mackay, *et al.*, 2016; Marrone *et al.*, 2016).

El NSCLC se encuentra en el tejido periférico y es más fácil detectarlo, mientras que el SCLC esta localizado usualmente en las vías aéreas grandes como los bronquios primarios y secundarios y es un tumor agresivo por la tasa de crecimiento rápida y metástasis; además, es difícil detectarlo en etapas tempranas (Nanavaty *et al.*, 2014), por lo que los efectos se observan en estados avanzados y etapas en las que los tratamientos pueden llegar a ser poco efectivos.

El tratamiento para el cáncer de pulmón (NSCLC) está basado en la histología, características moleculares y el grado de desarrollo (Marrone *et al.*, 2016) y se usa la cirugía, radiación y quimioterapia así como las terapias dirigidas y la inmunoterapia.

Debido a que el NSCLC se detecta en estados muy avanzados y sin posibilidad de remoción del tumor, se usa la quimioterapia basada en platino, en especial regímenes con cisplatino y carboplatino o sus combinaciones, como también el uso del uracil y el tagafur (pro-drogas del 5-fluoracilo), regímenes de tratamientos combinados de cisplatino/paclitaxel y carboplatino/paclitaxel, cisplatino/docetaxel, cisplatino/gemcitabina, así como docetaxel y pemetrexed. No obstante, en cáncer de pulmón avanzado y en general, la eficacia de la quimioterapia es limitada, la toxicidad generada es significativa, no existe evidencia de ventajas en términos de supervivencia (la media de supervivencia es de 8 a 12 meses), y su desempeño en los pacientes ha cuestionado su efectividad en pacientes con cáncer de pulmón avanzado (Mackay, *et al.*, 2016).

Por otra parte, la terapia dirigida para el tratamiento del cáncer de pulmón está centrada en el uso de agentes con blancos específicos, como inhibidores de EGFR y VEGF, mediante el uso de inhibidores de tirosina quinasa, ya que tienen un bajo perfil de toxicidad y son agentes para la evaluación y mantenimiento de la terapia (Mackay, *et al.*, 2016). No obstante, este tipo de terapias se recomiendan para ciertos tipos de mutaciones oncogénicas que incluyen mutaciones particulares en EGFR (en especial T790M), translocaciones en anaplásico linfoma quinasa (ALK) y translocaciones en ROS1 o mutaciones en Ter, Rox y Braf, que corresponden al 20-25 % de los pacientes (tumores), y en el 80% restante no funciona este tipo de tratamiento y/o los tumores son inoperables por lo que se usa la quimioterapia como tratamiento de primera línea (Ramamurthy, Godwin, & Borghaei, 2017; Marrone *et al.*, 2016; Mackay, Wenzel & Mileskin, 2016).

Debido a la baja eficiencia de los tratamientos disponibles para el cáncer de pulmón, se ha tomado un enfoque en la búsqueda de nuevos tratamientos basados en inmunoterapia, que utiliza puntos de control del sistema inmune, que son clave para el reconocimiento de las células tumorales y su muerte.

En el caso de los tratamientos con inmunoterapia, se han probado el uso de vacunas, activación de células dendríticas y el uso de citosinas inmunoestimuladoras como el interferón y la interleucina 2. No obstante, no han tenido éxito o solo funcionan en etapas clínicas tempranas. El fallo de este tipo de terapias fue debido a que se pensaba que el cáncer de pulmón no era inmunogénico ya que se presentaba poca respuesta de las terapias (Monteiro *et al.*, 2016; Marrone *et al.*, 2016). Sin embargo, actualmente se conoce más sobre el microambiente tumoral y la capacidad de las células tumorales para evitar su reconocimiento por el sistema inmune (Marrone *et al.*, 2016).

La evasión del sistema inmune en el cáncer de pulmón ocurre a través del sistema inmune innato y adaptativo, mediante la inhibición de la presentación de antígenos, el reclutamiento de células inmunosupresoras, producción de citosinas alteradas, interleucinas, prostaglandinas e inhibición de la inmunidad antitumoral. Además, logra inhibir el complejo mayor de histocompatibilidad 1, incrementar el reclutamiento de células inmunosupresoras conduciendo a la inhibición de las células T y las natural killer y activar resistencia en puntos de control del sistema inmune (Marrone *et al.*, 2016).

En pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), la expresión de CTLA-4 está incrementada en células T, conduciendo a una supresión y disminución de las actividades de las células T-citotóxicas, al igual que PD-1, molécula que está sobreexpresada en células T-citotóxicas y asociada a un pobre pronóstico. En relación con lo anterior, como estrategia de la inmunoterapia se han desarrollado inhibidores del sistema de control inmune como anticuerpos anti-CTLA-4 (ipilimumab, tremelimumab), anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) y para su ligando, anti-PD-L1/L2 (atelizumab, durvalizumab, avelumab) (Marrone *et al.*, 2016; Monteiro *et al.*, 2016; Ramamurthy, Godwin, & Borghaei, 2017).

CTLA-4 y PD-1 son proteínas inhibitoras del sistema de control inmune que previenen el efecto citotóxico desenfrenado. CTLA-4 está presente en células T reguladoras y células T de memoria donde compiten con CD28 por ligandos CD80 y CD86. Su acción inmunosupresora ocurre 24-48 horas después de la presentación del antígeno, activando las células T de memoria. Este receptor está también expresado en células T reguladoras donde su activación potencia su actividad inmunosupresora. PD-1 está expresado en células T y B activadas y natural killer y conduce a su inhibición o apoptosis cuando se unen a ligandos como PD-L1, el cual está expresado en células T reguladoras, células tumorales y de estroma y PD-L2. Lleva a cabo su función restrictiva reprimiendo la cascada inmune, limitando las células T efectoras activadas cuando entran en contacto con el antígeno. PD-L1 como CD28 y CTLA-4, también pueden interactuar con CD80, inhibiendo la activación de las células T (Monteiro *et al.*, 2016).

Los anticuerpos monoclonales anti-PD-1, como el nivolumab, pembrolizumab y atezolizumab, durvalumab y avelumab, han sido probados en varios tipos de cáncer de pulmón de manera eficiente y han tenido mejores respuestas que fármacos antineoplásicos basados en platino y fármacos como el docetaxel (Marrone *et al.*,2016). Por otra parte, también se han probado los anticuerpos anti-CTLA-4 como el ipilimumab y el tremelimumab, obteniendo buenos resultados para el tratamiento del cáncer de pulmón.

Además, se ha probado la combinación de varios anticuerpos monoclonales como Nivolumab + ipilimumab, Pembrolizumab + ipilimumab, Atezolizumab + Ipilimumab, así como su combinación con la quimioterapia, como estrategia para la mejora de resultados en el tratamiento contra el cáncer de pulmón, de manera que puedan actuar de manera sinergia mejorando su efectividad.

Sin embargo, el uso de estos anticuerpos monoclonales, solos, combinados y/o conjugados con la quimioterapia presentan varias limitantes que se deben de considerar, como lo son la generación de efectos secundarios que incluyen la fatiga, pérdida de apetito y diarrea, problemas en la piel, gastrointestinales y pulmonares, prurito y neumonía, toxicidad asociada, o la imposibilidad de combinar varios anticuerpos monoclonales ya que se ha reportado que si se bloquea un punto de control del sistema inmune, las células T son capaces de incrementar la expresión de las células desbloqueadas, limitando la eficacia inmunitaria del tratamiento, así como el tipo de tumor en que se pueden aplicar estas terapias (Monteiro *et al.*, 2016; Marrone *et al.*, 2016).

Algunos de estos anticuerpos han sido aprobados por la FDA para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón en etapas de investigación clínica y, aunque los resultados parecen prometedores, éstos solo están disponibles para determinados tipos de cáncer. En este sentido, otros aspectos importantes a considerar son las características del tumor que pueden ser bastante heterogéneas, la validez del tejido así como los tiempos de respuesta del estudio (Marrone *et al.*, 2016; Monteiro *et al.*, 2016).

Los avances en el tratamiento, incluyendo la cirugía, la quimioterapia, las terapias dirigidas y la inmunoterapia han aportado pequeñas mejoras a la tasa de supervivencia de pacientes diagnosticados con tumores de pulmón; sin embargo, no es suficiente, por lo que actualmente se buscan nuevas terapias para el tratamiento de esta enfermedad.

Una estrategia novedosa para el cáncer de pulmón es el uso de la nanotecnología para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, ya que las nanopartículas poseen múltiples propiedades fisicoquímicas que los hacen ideales para la entrega sitio-específica de fármaco, aumentando de la especificidad, la acumulación y la retención en el sitio deseado. Ya sea por entrega pasiva o activa, las nanopartículas mejoran el tiempo de circulación de los fármacos conjugados o atrapados en ellas (Nounou *et al.*, 2015).

Varios tipos de nanomateriales se han propuesto para el tratamiento del cáncer como lo son nanopartículas de tipo polimérico, liposomas, micelas, virus, dendrímeros, nanotubos de carbón, sílice, cerámicas y nanopartículas metálicas (Talluri *et al.*, 2016; Olov, Bagheri-Khoulenjani, & Mirzadeh, 2018; Nima *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2013; Nounou *et al.*, 2015; H.-Y. Lee, Mohammed, & Nasreen, 2016) ya sea que encapsulen

fármacos, formen complejos o se carguen en la superficie (H.-Y. Lee, Mohammed, & Nasreen, 2016) o para la entrega de DNA, DNA plasmídico, RNA mensajero, RNA pequeño de interferencia, microRNA (H.-Y. Lee, Mohammed, & Nasreen, 2016).

Se han utilizado polímeros sintéticos o naturales para la administración de fármacos dirigidos a tumores. Las nanopartículas poliméricas se han utilizado ampliamente para la administración en aerosol de fármacos antineoplásicos, genes o sus combinaciones como tratamiento para el cáncer de pulmón (Abdelaziz *et al.*, 2018; Mangal *et al.*, 2017).

También existen terapias para la entrega de fármacos con nanopartículas inorgánicas pero estas tienen limitaciones debido a su toxicidad en los pulmones. No obstante, los efectos tóxicos pueden ser controlados por el tiempo de exposición, tamaño y concentración del metal inhalable (Abdelaziz *et al.*, 2018).

De entre todos los nanomateriales inorgánicos existentes, las nanopartículas de plata han cobrado importancia debido a que poseen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anti-angiogénicas, antiinflamatorias y han sido usadas ampliamente en el área médica y más recientemente se han propuesto como agentes antitumorales (McGillicuddy *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Chugh *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2018).

No obstante, hay estudios que demuestran que las nanopartículas de plata pueden inducir estrés oxidativo, citotoxicidad, disminución de la viabilidad celular y genotoxicidad en células tumorales de pulmón (A549) y en células BEAS-2B; y que la

toxicidad presentada se encuentra asociada a la liberación de iones de plata, el tamaño de la partícula y la cubierta (Gliga *et al.*, 2014; Foldbjerg *et al.*, 2011; Arumai Selvan *et al.*, 2018).

Algunos estudios también han demostrado el potencial anti-carcinogénico de las nanopartículas de plata en células A549 de cáncer de pulmón, mediante el aumento de la expresión de proteínas apoptóticas como caspasas 3, 8 y 9, p53 y BAX y reprimiendo la expresión de Bcl-2 que es una proteína antiapoptótica; y sin mostrar efectos citotóxicos en células normales (Bethu *et al.*, 2018).

También se ha demostrado que las nanopartículas de plata generan una respuesta hormética adaptativa (transhormesis) en células A549 de cáncer de pulmón, ya que un pretratamiento con bajas concentraciones puede proteger de la toxicidad generada a altas concentraciones de nanopartículas de plata, esto puede involucrar cambios en la expresión de genes y proteínas relacionados con la apoptosis y la proliferación celular así como diferentes patrones de la defensa antioxidante. Lo que podría suponerse, es que en el caso de terapias combinadas con nanopartículas de plata, éstas podrían inducir la protección contra la dosis tóxica de la otra sustancia química que se está administrando (Stijns *et al.*, 2017; Brzóška *et al.*, 2015; Blanco *et al.*, 2016).

A pesar de todo, se deben de considerar y mejorar aspectos como la estabilidad del nanomaterial, la biodistribución y farmacocinética y disminuir la potencial toxicidad de los nanomateriales para la entrega de fármacos. También debe contemplarse el tipo de fabricación, el tamaño, cubierta, el tipo de línea celular, el tipo de medio de cultivo, así como una amplia caracterización del material para mejorar. Además, deben tomarse en

cuenta las mejores vías de administración y mejorar el tiempo de circulación, la sensibilidad a estímulos y visualización del nanomaterial (Youngren *et al.*, 2017).

Otros estudios demuestran que las nanopartículas de plata no generan, por si solas, daño al DNA, ni significativa producción de ROS (Ahmed El-Hussein & M. R. Hamblin, 2017). Finalmente, puede decirse que en general, no existe un acuerdo general sobre la toxicidad *in vitro* de los AgNPs (Gigla *et al.*, 2014).

VIII.1. Metodología

VIII.1.1. Ensayos de viabilidad por MTT en la línea celular de cáncer pulmón humano A549 con nanopartículas de plata y quimioterapéuticos.

Se cultivaron las células A549 en medio DMEM (dulbecco modified Eagles minimal essential médium) suplementado al 10% con suero fetal bovino, en cajas Petri para cultivo celular de 100 mm (Nunc Cell Petri Dishes, Thermo Scientific®), con una atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, con aproximadamente 1 x 10⁶ células por placa.

Posteriormente, las células se separaron mediante disgregación enzimática con Tripsina-EDTA. Fueron recuperadas y centrifugadas a 1,200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 5 mL de medio DMEM %10 suero fetal bovino. Posteriormente, se realizó un ensayo de exclusión con el

colorante azul de tripán para la estimación del número de células viables mediante conteo con la cámara de Neubauer.

Una vez determinada la cantidad de células viables en la muestra, se colocaron 10,000 células viables por pozo en placas múltiples de 96 pocillos (Nunc MicroWell-96, Thermo Scientific®), en un volumen final de 100 μL de medio DMEM suplementado, por pozo. Y, posteriormente se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ con una atmosfera de 5% de CO_2 por un periodo de 24 horas.

Al terminar las 24 horas, se aplicaron los diversos tratamientos con nanopartículas de plata (2, 2.25, 2.5, 3 y 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), diferentes concentraciones de fármacos quimioterapéuticos de primera línea paclitaxel (3.75, 7.5, 15, 30 y 60 nM) y docetaxel (12.5, 25, 50, 75 y 100 μM), por separado. Se usaron como controles, el dimetil sulfóxido como control total de muerte celular y medio DMEM suplementado al 10% suero fetal bovino como control total de células vivas, en un volumen total de 100 μL por pozo, respectivamente.

Una vez aplicado el tratamiento, se incubaron las placas bajo una atmosfera de 5% de CO_2 a 37 $^{\circ}\text{C}$, por un periodo de 24 horas. Al terminar el proceso de incubación, las placas fueron decantadas y lavadas con un buffer de fosfatos (PBS 1X, estéril), aplicando 100 μL por pozo, por tres veces. Al terminar, se colocaron en cada pozo 5 μL de reactivo MTT y 45 μL de medio DMEM sin suplementar, y se incubó por 4 horas en una atmosfera de 5% de CO_2 a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Al terminar el proceso de incubación, se agregaron 100 μL de isopropanol absoluto por pozo y se disolvieron los cristales de formazán. Las placas se dejaron incubando a

temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad y, posteriormente se procedió a la lectura de las placas mediante espectrofotómetro para placas de múltiples pocillos (poner marca y modelo) a una longitud de onda de 570 nm para los cristales de formazán y 690 nm para el contraste con el medio.

Además, se realizaron ensayos de morfología sencilla, mediante microscopia invertida con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (2, 2.25, 2.5, 3 y 3.5 $\mu\text{g/mL}$), diferentes concentraciones de fármacos quimioterapéuticos de primera línea paclitaxel (0.0128, 0.0256, 0.0512, 10.6 y 21.3 $\mu\text{g/mL}$) y docetaxel (10.09, 20.1, 40.3, 60.5 y 80.7 $\mu\text{g/mL}$), por separado y con un tiempo de exposición de 24 horas. Los ensayos se llevaron a cabo en cajas Petri de 50 mm para cultivo celular (Nunc Cell Petri Dishes, Thermo Scientific®), con aproximadamente 100,000 células por caja.

Para determinar la viabilidad celular después del tratamiento con nanopartículas de plata, paclitaxel y docetaxel, se realizó la resta de las absorbancias obtenidas a 570 y 690 nm, se promediaron los resultados y se determinó el porcentaje de viabilidad celular mediante las ecuaciones mencionadas en el apartado VI.1.1.

VIII.1.2. Determinación de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La determinación de la producción de especies reactivas se llevó a cabo mediante citometría de flujo con el kit ROS intracelular de Sigma-Aldrich. Se sembraron las células A549 en cajas Petri para cultivo celular de 50 mm (Nunc Cell Petri Dishes, Thermo Scientific®), con aproximadamente 100,000 células por pozo en

un volumen final de 5 mL de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células fueron incubadas bajo una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas. Se utilizaron 3 cajas por tratamiento.

Posteriormente, se removió el sobrenadante y se aplicaron las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (2, 2.25, 2.5, 3 y 3.5 µg/mL), diferentes concentraciones de fármacos quimioterapéuticos de primera línea paclitaxel (0.0128, 0.0256, 0.0512, 10.6 y 21.3 µg/mL) y docetaxel (10.09, 20.1, 40.3, 60.5 y 80.7 µg/mL), por separado, en un volumen final de 5 mL de medio DMEM suplementado al 10% de suero fetal bovino. Las células fueron incubadas bajo una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas. Se utilizaron 3 cajas por tratamiento.

Al término del periodo de exposición, se separaron las células del sustrato mediante pipeteo, se recuperó el sobrenadante con las células suspendidas y se colocaron en tubos estériles de 1.5 mL para microcentrífuga.

Para la determinación de producción de especies reactivas de oxígeno, se utilizó el kit YO-PRO-1 (Thermo Scientific®). La fluorescencia fue detectada a 235 nm, 33 nm y 400 nm. Los datos se analizaron con el software Attune NxT (Life Technologies).

VIII.1.3. Determinación del tipo de muerte celular

La determinación del tipo de muerte celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo con el kit Yo-PRO-1 de Thermo Scientific®.

Se sembraron las células A549 en cajas Petri para cultivo celular de 50 mm (Nunc Cell Petri Dishes, Thermo Scientific®), con aproximadamente 100,000 células por pozo en un volumen final de 5 mL de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células fueron incubadas bajo una atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas. Se utilizaron 3 cajas por tratamiento.

Posteriormente, se removió el sobrenadante y se aplicaron las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (2, 2.25, 2.5, 3 y 3.5 µg/mL), diferentes concentraciones de fármacos quimioterapéuticos de primera línea paclitaxel (0.0128, 0.0256, 0.0512, 10.6 y 21.3 µg/mL) y docetaxel (10.09, 20.1, 40.3, 60.5 y 80.7 µg/mL), por separado, en un volumen final de 5 mL de medio DMEM suplementado al 10% de suero fetal bovino. . Las células fueron incubadas bajo una atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas. Se utilizaron 3 cajas por tratamiento.

Al término del periodo de exposición, se removió el sobrenadante y se centrifugó en tubos estériles de 15 mL, a 1,200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron removidas del sustrato utilizado 1 mL de tripsina-EDTA por 3 minutos a 37 °C. Se bloqueó la acción de la tripsina mediante la adición de 2 mL medio DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino. Las células fueron centrifugadas en tubos estériles de 15 mL, a 1,200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

El sobrenadante de ambas centrifugaciones fue removido, se recuperó el botón celular y se realizaron 3 lavados con buffer de fosfatos (PBS 1X) estéril, aplicando 2 mL de

buffer y centrifugando a 1,200 rpm por 5 minutos y removiendo el sobrenadante, cada vez.

Una vez limpio el botón celular, se recuperó y se colocó en tubos estériles de 1.5 mL para la determinación del tipo de muerte celular mediante citometría de flujo. Para la determinación del tipo de muerte celular se utilizó el kit YO-PRO-1 (Thermo Scientific®). La fluorescencia fue detectada a 235 nm, 33 nm y 400 nm. Los datos se analizaron con el software Attune NxT (Life Technologies).

VIII.2. Resultados

En la figura se muestran la viabilidad celular por el ensayo MTT, para las células A549 de cáncer de pulmón, con un IC_{50} de 2.12 $\mu\text{g/mL}$ y con un $R^2= 0.95$ para las nanopartículas de plata Argovit.

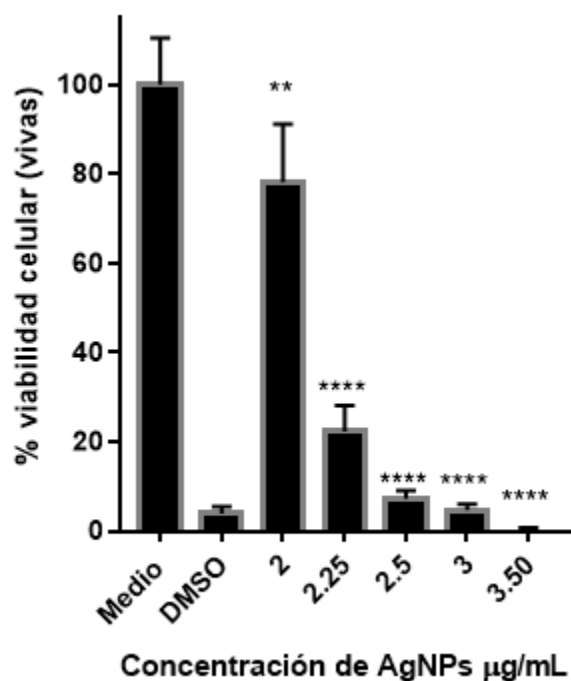


Figura 6. Viabilidad celular por MTT en la línea celular A549 de cáncer de pulmón, con nanopartículas de plata Argovit (2, 2.25, 2.5, 3 y 3.5 $\mu\text{g/mL}$). Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunnet's de comparaciones múltiples, $\alpha=0.05$ y ** $p\leq 0.01$, **** $p\leq 0.0001$.

Para la línea celular A549 con el fármaco Paclitaxel, el IC_{50} es de 0.0572 $\mu\text{g/mL}$ con una $R^2=0.122$.

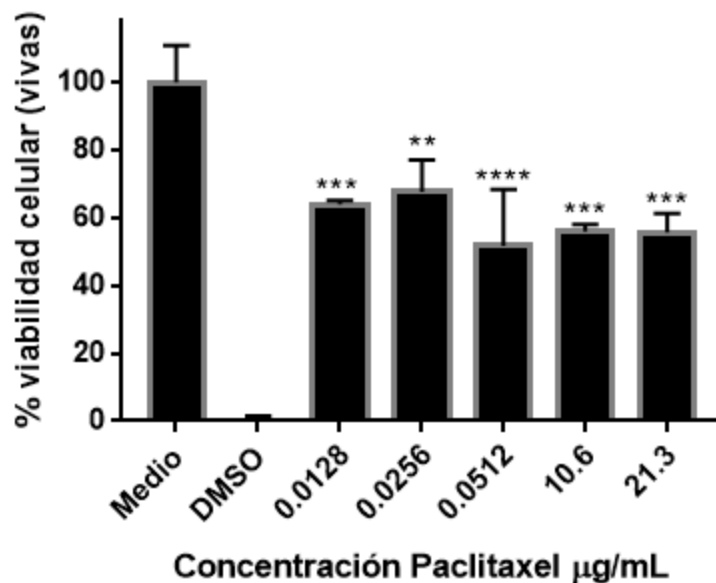


Figura 7. Viabilidad celular por MTT en la línea celular A549 de cáncer de pulmón, con el fármaco paclitaxel (0.0128, 0.0256, 0.0512, 10.6 y 21.3 µg/mL). Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunnet's de comparaciones múltiples, $\alpha=0.05$, *** $p\leq 0.001$, **** $p\leq 0.0001$.

Los resultados muestran una IC₅₀ de 2.06 µg/mL con una R² de 0.31 para el fármaco Docetaxel.

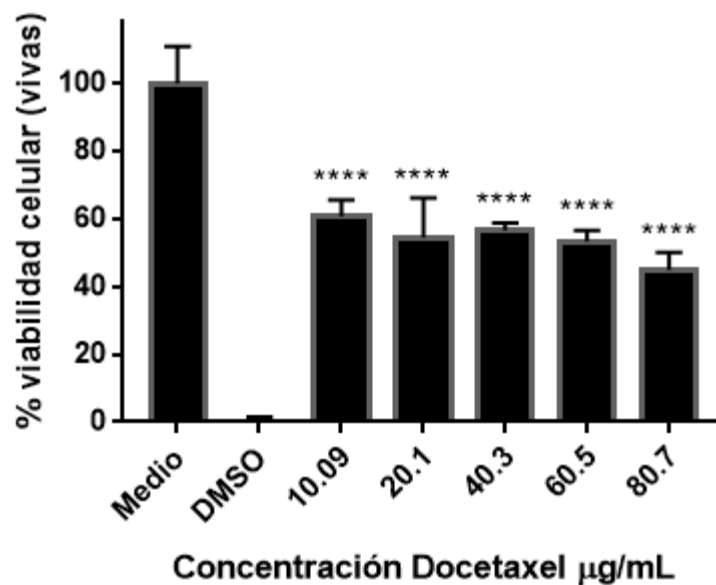


Figura 8. Viabilidad celular por MTT en la línea celular A549 de cáncer de pulmón, con el fármaco Docetaxel (10.09, 20.1, 40.3, 60.5 y 80.7 µg/mL). Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunnet's de comparaciones múltiples. $\alpha=0.05$, **** $p\leq 0.0001$.

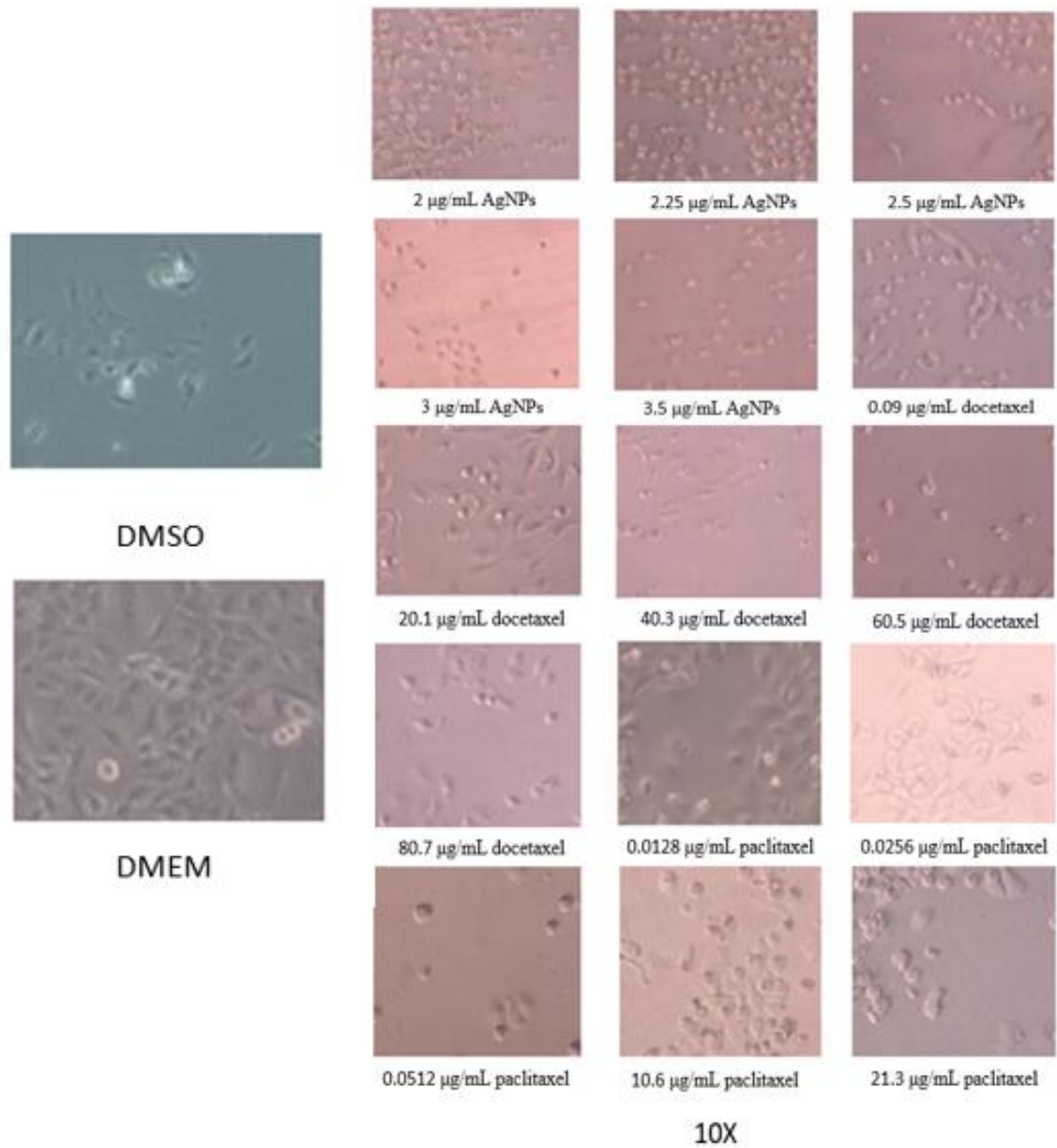


Figura 9. Microscopía invertida de contraste de fase de las células A549 con nanopartículas de plata (2, 2.25, 2.5, 3 y 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), docetaxel (0.09, 20.1, 40.3, 60.5 y 80.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y paclitaxel (0.0128, 0.0256, 0.0512, 10.6 y 21.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se aprecian cambios de morfología después de un periodo de incubación de 24 horas. Magnificado 10 veces.

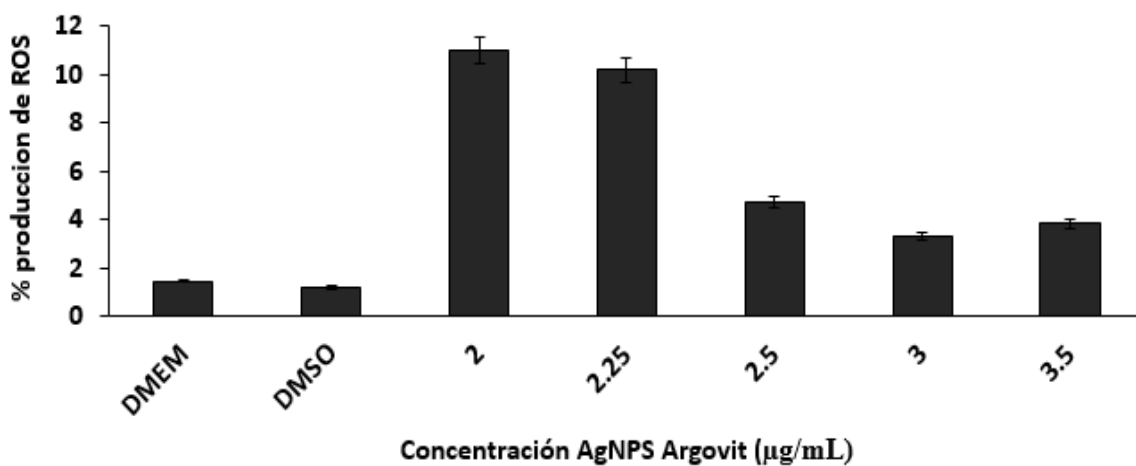


Figura 100. Citometria de flujo para la producción de ROS en células A549 con nanoparticulas de plata Argovit (2, 2.25, 2.5, 3 y 3.5 µg/mL) después de un periodo de incubación de 24 horas. Se observa aumento de ROS en relación a las muestras control.

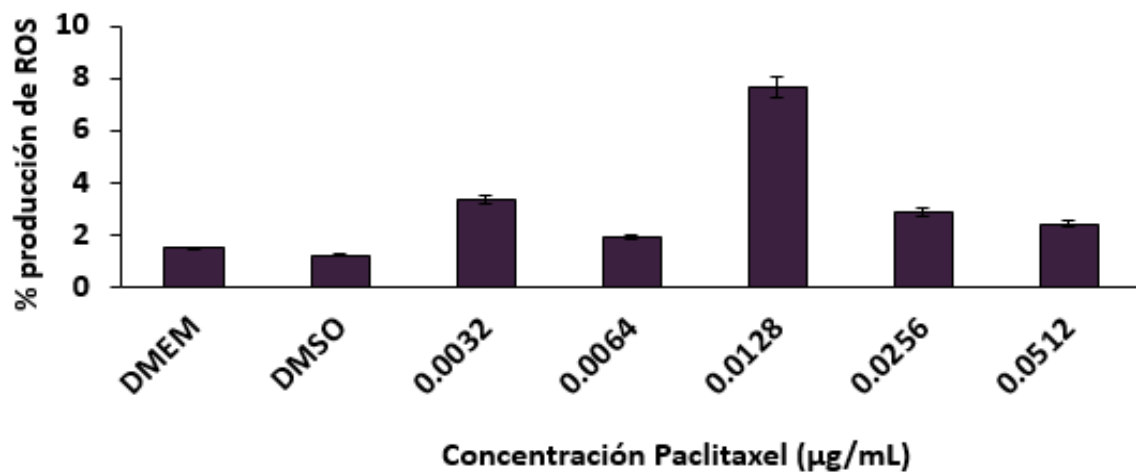


Figura 11. Citometria de flujo para la producción de ROS en células A549 con Paclitaxel (0.0032, 0.0064, 0.0128, 0.0256 y 0.0512 µg/mL) después de un periodo de incubación de 24 horas. Se observa aumento de ROS en relación a las muestras control.

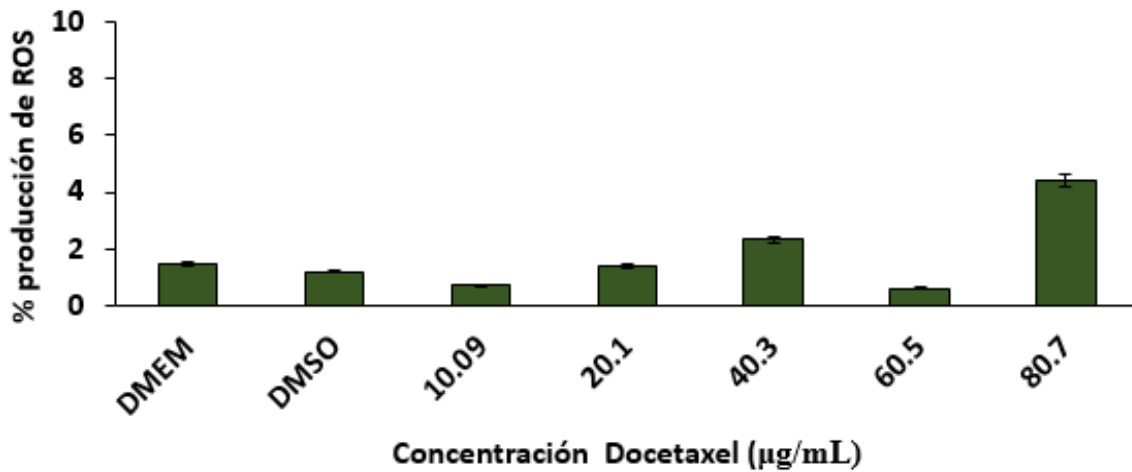


Figura 12. Citometría de flujo para la producción de ROS en células A549 con Docetaxel (10.09, 20.1, 40.3, 60.5 y 80.7 µg/mL) después de un periodo de incubación de 24 horas. Se observa aumento de ROS en la concentración más alta (80.7 µg/mL) en contraste con las muestras control.

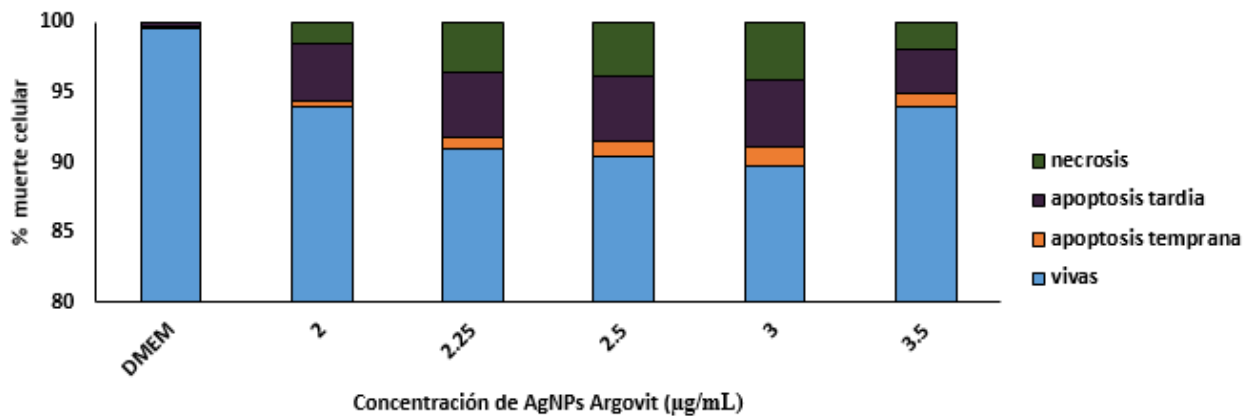


Figura 113. Citometría de flujo de células A549 con nanopartículas de plata Argovit para la determinación del tipo de muerte celular, después de un periodo de incubación de 24 horas con 2, 2.25, 2.5, 3 y 3.5 µg/mL con nanopartículas de plata. Se observa un incremento de muerte celular por apoptosis temprana, tardía y necrosis.

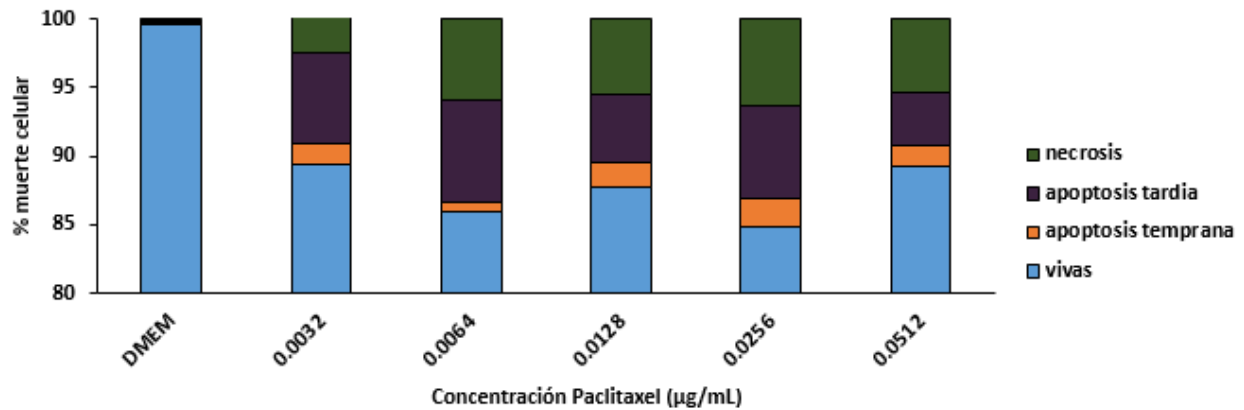


Figura 12. Citometria de flujo de células A549 con paclitaxel para la determinación del tipo de muerte celular, después de un periodo de incubación de 24 horas con 0.0032, 0.0064, 0.0128, 0.0256 y 0.0512 µg/mL de paclitaxel. Se observa un incremento de muerte celular por apoptosis temprana, tardía y necrosis.

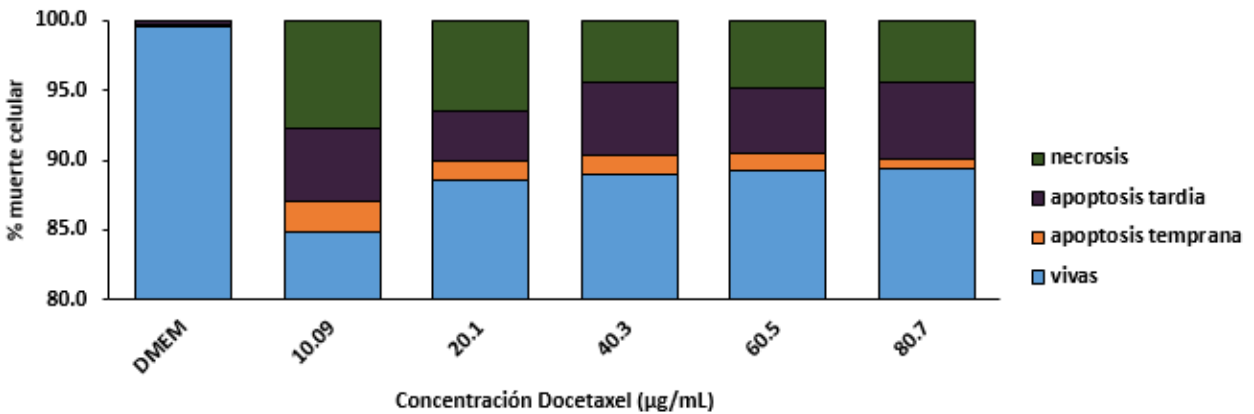


Figura 13 Citometria de flujo de células A549 con docetaxel para la determinación del tipo de muerte celular, después de un periodo de incubación de 24 horas con 10.09, 20.1, 40.3, 60.5 y 80.7 µg/mL de docetaxel. Se observa un incremento de muerte celular por apoptosis tardía y necrosis.

VIII.3. Discusión y conclusiones

El cáncer de pulmón es una enfermedad de múltiples etiologías que resultan en la transformación de las células epiteliales del pulmón. Cambios genéticos, epigenéticos y ambientales contribuyen al desarrollo y a la heterogeneidad del tumor, lo que puede llegar a complicar el diagnóstico, tratamiento y el pronóstico de esperanza de vida.

Los tratamientos para el cáncer de pulmón consisten en la cirugía, radioterapia, quimioterapia y la terapia biológica, sin embargo, el éxito de estas estrategias depende del desarrollo y estadio del tumor. Por otra parte, se presentan efectos adversos durante y después de la administración del tratamiento. Debido a lo anterior, la nanotecnología puede proveer una alternativa para el cáncer de pulmón y otras enfermedades.

Uno de los ejes de innovación de la nanotecnología se ha centrado en el desarrollo de nanopartículas de naturaleza orgánica e inorgánica que pueden ser usados y funcionalizados para la entrega de fármacos y para el diagnóstico de enfermedades. Existen diversos tipos de sistemas diseñados para este propósito, debido a que los nanomateriales poseen diversas propiedades físico químicas moldeables como son el tamaño, la forma, la carga superficial, porosidad, la funcionalización, entre otros, que son esenciales para su efecto *in vitro* e *in vivo* (Cryer & Thorley, 2019).

Las nanopartículas metálicas, en particular las nanopartículas de plata, además de las poseer propiedades antibacterianos, antifúngicos, antivirales, anti-angiogénico,

antiinflamatorios, se han propuesto como agentes antitumorales (McGillicuddy et al., 2017; Zhang et al., 2016; Li et al., 2017; Chugh et al., 2018; Khan et al., 2018).

Nuestros resultados sobre la citotoxicidad de las nanopartículas de plata Argovit, como agentes antitumorales en células A549 de carcinoma pulmonar humano, muestran que poseen buenas propiedades inhibitorias, con un IC50 de 2.12 µg/mL, similar al fármaco Paclitaxel, utilizado como agente terapéutico en el tratamiento del cáncer de pulmón. Mientras que para el Docetaxel, las concentraciones inhibitorias fueron más altas en comparación con las nanopartículas de plata y el Paclitaxel. Estos resultados indican que las nanopartículas de plata tienen mejor efecto antitumoral que los algunos de los quimioterapéuticos usados comúnmente en esta enfermedad.

Resultados similares indican que en células H1299 con un IC50 de 5.33 µg/mL, las nanopartículas de plata de 20 nm de diámetro, presentan mejores efectos inhibitorios que en otras células. Los datos también señalan que existe una respuesta estimuladora pro-apoptótica dosis-dependiente, genera cambios en la actividad transcripcional de NF-kB, disminución de bcl-2 e incremento en la caspasa-3; los análisis in vivo mostraron que las nanopartículas de plata tienen efectos ralentizadores del crecimiento tumoral la evidencia sugiere que las nanopartículas de plata tienen potencial para ser usados en conjunto con la quimioterapia y la prevención en etapas tempranas del cáncer (He et al., 2016).

También se han reportado efectos citotóxicos en células A549 a concentraciones de 5 µg/mL (Annu et al., 2018). Mientras que con extractos de *Momordica charanti* se han obtenido nanopartículas de plata esféricas, de 13 nm de diámetro, las cuales mostraron

actividad citotóxica dosis-dependiente en células A549 y HOP-62. Se observaron cambios en morfología, como células aglomeradas, compresión y pérdida de la adherencia; estos resultados indican que tienen potencial como agente terapéutico (Jha & Shimpi, 2018).

En células normales, las nanopartículas de plata biosintetizadas a partir de extractos de plantas, no se observa toxicidad significativa. La toxicidad generada es aparentemente selectiva de las nanopartículas de plata sintetizadas con extractos naturales en contraste con los métodos químicos. No obstante, los efectos citotóxicos en células tumorales son mayores cuando se aplican nanopartículas sintetizadas químicamente (Yeasmin *et al.*, 2017; Kummara *et al.*, 2016).

Por otra parte, nosotros investigamos la producción de especies reactivas de oxígeno por exposición a nanopartículas de plata Argovit, Paclitaxel y Docetaxel. Los resultados mostraron que hay una elevada producción de ROS en las concentraciones utilizadas de nanopartículas de plata, en especial en la concentración correspondiente al IC₅₀ y sus extremos más cercanos y con respecto al control.

En el caso del paclitaxel se observa el mismo comportamiento observado en los tratamientos con nanopartículas de plata, mientras que para el docetaxel el incremento en la producción de ROS se denota en la concentración más alta utilizada.

Este fenómeno es similar a lo reportado en otras investigaciones, donde los niveles de ROS de incrementaron después de aplicar nanopartículas de plata, sintetizadas por vía química o biológica. Además, de inhibir la síntesis de DNA, disminuye la migración celular, inducen apoptosis vía cascada p38 MAPK p53-mitocondria-caspasa 3,

inhibición completa del ciclo celular y apoptosis (Castro-Aceituno *et al.*, 2016; Yeasmin *et al.*, 2017; Kummara *et al.*, 2016).

Por otra parte, también se analizó la vía de muerte preferencial al aplicar nanopartículas de plata, paclitaxel y docetaxel en células A549. Los resultados muestran que el tipo de muerte generado por las nanopartículas de plata es por vía apoptótica, al igual que los fármacos utilizados. Esto es concordante con otros estudios realizados para elucidar el tipo de muerte celular inducido por este tipo de nanopartículas (He *et al.*, 2016; Jha & Shimpi, 2018; Castro-Aceituno *et al.*, 2016; Yeasmin *et al.*, 2017).

Los presentes estudios demuestran que las nanopartículas de plata Argovit tienen efectos antitumorales en células A549 de carcinoma de pulmón. Similares a los efectos reportados en la literatura. Los efectos inhibitorios están asociados a la producción de ROS, generando estrés oxidativo y activando vías pro-apoptóticas en células tumorales, como vía preferencial de muerte celular.

La evidencia sugiere que las nanopartículas de plata generan citotoxicidad principalmente por estrés oxidativo y generación de ROS, sin embargo, en algunos estudios las nanopartículas de plata, en especial las sintetizadas a partir de compuestos biológicos, hacen mención a una toxicidad más ligera que las nanopartículas sintetizadas químicamente y que podrían actuar como antioxidantes durante su aplicación, esto podría suponer un reto en la fabricación y aplicaciones de nanopartículas biosintetizadas para no dañar tejidos normales (Yeasmin *et al.*, 2017; Kummara *et al.*, 2016).

Por otra parte, el uso de las nanopartículas puede contribuir al desarrollo y optimización de biosensores, para que se ha demostrado que son muy sensitivos, estables y selectivos. Los biosensores basados en nanopartículas son efectivos ya que proporcionan parámetros del tumor como lo son el tamaño, la masa, el grado de expresión y la irrigación sanguínea. Estos biosensores electroquímicos y ópticos se pueden conjugar con técnicas como el SERS, que permite la amplificación de la señal de detección por arriba de 10^{15} órdenes de magnitud para diversos analitos, además de ser una técnica ultrasensible y no destructiva (Yang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018).

El desarrollo y moldeabilidad de la síntesis de nanopartículas, así como la adaptación de las técnicas de detección, permitirían el tamizaje, diagnóstico y tratamiento del cáncer de una manera más rápida y eficiente. Y, aunque se tienen buenos resultados, se deben de mejorar los modelos preclínicos y clínicos y también adaptarse a las prácticas de manufactura (Cryer & Thorley, 2019).

Mientras que la combinación de nanopartículas de plata y otras técnicas de tratamiento como el ultrasonido o la radioterapia, son útiles para el tratamiento selectivo de células neoplásicas sin destruir tejido normal (Zhang & Xiao, 2018).

Nuestra investigación demuestra que las nanopartículas de plata Argovit son citotóxicas en células A549, debido a la generación de estrés oxidativo, y muerte celular por apoptosis.

IX. Cáncer de células nerviosas

El glioma es uno de los tipos de cáncer más común del sistema nervioso central, es altamente invasivo, difícil de remover completamente, susceptibilidad a la recaída, pobre pronóstico y alta mortalidad. Los tratamientos para este tipo de cáncer están basados en la combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia (Özdemir *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2017, Liang *et al.*, 2018). Sin embargo, los efectos secundarios de la quimioterapia son diversos, la efectividad del tratamiento puede ser pobre y, en general, la tasa de supervivencia es baja.

En respuesta a las limitantes de los tratamientos, existen nuevas alternativas de tratamiento como la hipertermia, fototerapia, terapia dirigida, inmunoterapia, láseres o el uso de nanopartículas para destruir células cancerígenas (Rimas & Hodge, 2008; Marques *et al.*, 2014; Silbergeld *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017, Ying *et al.*, 2017; Keyvan *et al.*, 2018). Esta última es de especial interés, ya que su funcionamiento consiste en la unión del nanomaterial al sitio específico, ya sea de manera individual o conjugada, para la entrega de fármacos antineoplásicos.

La versatilidad que poseen los materiales nanoestructurados permite que se puedan utilizar para solubilizar, encapsular y dirigir fármacos. Algunas otras ventajas que presentan los nanomateriales es la biocompatibilidad y biodegradabilidad, diferentes tasas de carga de fármaco y perfil de liberación, nula o baja toxicidad (Olov *et al.*, 2018; Talluri *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2013; Jha *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2018, Jia *et al.*, 2017).

De entre todos los tipos de nanopartículas existentes, han cobrado importancia las nanopartículas de metales nobles debido a su biocompatibilidad y sus aplicaciones médicas y farmacológicas. En especial, ha resaltado el interés del uso de las nanopartículas de plata para el tratamiento del cáncer, ya que diversas investigaciones han reportado las propiedades antibacterianas, antiangiogénicas, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes y más recientemente, se han propuesto como agentes antitumorales (Moldovan *et al.*, 2017; He *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Mathur *et al.*, 2017; McGillicuddy *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017; Chugh *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2018).

Algunos otros estudios muestran que las nanopartículas de plata producen ROS por estrés oxidativo, activación de caspasas, generan cambios morfológicos, disminución del crecimiento celular y apoptosis en diversas líneas celulares tumorales (Mathur *et al.*, 2017). No obstante, el tipo de síntesis, así como la forma, el tamaño, el tipo de agente estabilizante y su funcionalización están estrechamente relacionados con los efectos citotóxicos y genotóxicos.

En respuesta a la toxicidad de las nanopartículas de plata, se ha optado por métodos de síntesis verde para su producción. La síntesis verde consiste en la reducción de iones metálicos a nanopartículas, utilizando microorganismos o extractos de plantas. Las ventajas del método de síntesis verde, es que en general, es más fácil, rápido, menos costoso, son fácilmente escalables, tienen gran rendimiento, no requiere alta temperatura, presión o energía y/o sustancias tóxicas para la producción de nanomateriales, además de ser amigable con el ambiente y no tóxico (Tippayawat *et al.*, 2016; Ali *et al.*, 2016; Kummara *et al.*, 2016).

Comparativamente, los métodos de síntesis verde con extractos de plantas han mostrado mayor habilidad para la conversión de iones a nanopartículas que los generados por microorganismos. Otra ventaja, es que debido a que los extractos de planta poseen diversos componentes biológicamente activos como péptidos cíclicos, polisacáridos, proteínas, aminoácidos, ácido sórbico, ácido cítrico, eufol, limonoides polihidroxiados, ácido ascórbico, ácido retinoico, taninos, enzimas, ácido elágico y gálico, entre otros; que desempeñan un papel muy importante en la reducción y estabilización de los iones metálicos a nanopartículas (Arumai *et al.*, 2018; Baghayeri *et al.*, 2018; Tippayawat *et al.*, 2016). Además, el uso de extractos de plantas para la síntesis de nanomateriales genera nanopartículas con forma, tamaño y morfología bien definida, así como alta estabilidad, en comparación con las síntesis fisicoquímicas (Kummara *et al.*, 2016; Ghoshal *et al.*, 2017).

Conforme a lo anterior, en el presente estudio se evaluó la citotoxicidad y genotoxicidad de nanopartículas de plata por síntesis verde, de manera que inhiba la proliferación de células tumorales.

IX.1. Metodología

IX.1.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata

Se obtuvieron pequeños trozos de semillas de aguacate (*Persea americana*) y se realizó el pelado y secado durante 12 horas. Los trozos secos fueron molidos hasta obtener un polvo fino. Para obtener el extracto acuoso, se utilizaron 0.25, 0.5 y 2 g (M,

M2 y M3) del polvo de semilla, posteriormente, se agregaron 50 mL de agua destilada a cada una de las muestras y, se agito por una hora a temperatura ambiente y una hora a 65 °C. Finalmente, cada de uno de los extractos se filtraron para el proceso de síntesis.

La síntesis de nanoparticulas de plata se llevó a cabo en agitación constante y a temperatura ambiente. Se agregaron 5 mL de nitrato de plata 0.01M, 2.5 mL de hidróxido de amonio y 42.5 mL del extracto correspondiente (M1, M2 y M3) y se agitó por 5 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, se realizó la caracterización de las nanopartículas de plata mediante microscopía electrónica de transmisión.

IX.1.2.Determinación de plata mediante horno de flama

Se realizó la determinación de plata mediante el uso de horno de flama con un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito y corrector de fondo Zeeman, Modelo AA280Z de la compañía Agilent Technologies. Se procesaron tres replicas por separado para cada una de las muestras a analizar (M1, M2 y M3).

En una plancha con calentamiento, se colocaron vasos de precipitado de 20 mL, se tomaron 50 µL de cada muestra y se colocaron 200 µL de ácido nítrico concentrado, se dejó hasta que terminara la reacción; el resultante se recuperó y se colocó en tubos limpios de 1.5 mL para microcentrífuga. Para llevar a cabo la medición de plata presente en las muestras, se llevó el volumen final a 2 mL con agua destilada y se procesó en un horno de flama. Los datos obtenidos proporcionan un R^2 de 0.99.

IX.1.3. Ensayos de viabilidad por MTT en la línea celular C6 de glioma de rata, con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes

Se cultivaron las células C6 de glioma de rata en medio DMEM (dulbecco modified eagles minimal essential médium) suplementado al 2.5% con suero fetal bovino, en cajas Petri para cultivo celular de 100 mm (Nunc Cell Petri Dishes, Thermo Scientific®), con una atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, con aproximadamente 1 x 10⁶ células por placa.

Posteriormente, las células se separaron mediante disgregación enzimática con tripsina-EDTA. Fueron recuperadas y centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 5 mL de medio DMEM %10 suero fetal bovino. Posteriormente, se realizó un ensayo de exclusión con el colorante azul de tripán para la estimación del número de células viables mediante conteo con la cámara de Neubauer.

Una vez determinada la cantidad de células viables en la muestra, se colocaron aproximadamente 10,000 células viables por pozo en placas múltiples de 96 pocillos (Nunc MicroWell-96, Thermo Scientific®), en un volumen final de 100 µL de medio

DMEM suplementado, por pozo. Y, posteriormente se incubaron a 37 °C con una atmosfera de 5% de CO₂ por un periodo de 24 horas.

Al terminar las 24 horas, se aplicaron los diversos tratamientos con plata sintetizadas por métodos verdes, realizando diluciones en órdenes de magnitud para las tres muestras, respectivamente. Y, se utilizaron como controles el dimetil sulfóxido como control total de muerte celular y medio DMEM suplementado al 10% suero fetal bovino como control total de células vivas, en un volumen total de 100µL por pozo, respectivamente.

Una vez aplicado el tratamiento, se incubaron las placas bajo una atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, por un periodo de 24 horas.

Al terminar el proceso de incubación, las placas fueron decantadas y lavadas con un buffer de fosfatos (PBS 1X, estéril), aplicando 100 µL por pozo, por tres veces. Y, posteriormente, se colocaron 5 µL de reactivo MTT y 45 µL de medio DMEM sin suplementar, por pozo y, se incubó por 4 horas en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

Al terminar el proceso de incubación, se agregaron 100 µL de isopropanol absoluto por pozo y se disolvieron los cristales de formazán. Las placas se dejaron incubando a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad, posteriormente, se procedió a la lectura de las placas mediante espectrofotómetro para placas multipozo, a una longitud

de onda de 570 nm para los cristales de formazán y 690 nm para el contraste con el medio.

La viabilidad celular se determinó de la misma forma en que se menciona en el apartado VI.1.1.

IX.1.4. Peroxidación de lípidos

El ensayo de peroxidación de lípidos se llevó a cabo con el Lipid Peroxidation (MDA) colorimetric/Fluoremetric kit (Biovision®), con aproximadamente 1×10^6 por muestra, cada muestra se realizó por triplicado y se leyó la absorbancia a 532 nm.

IX.1.5. Actividad total de glutatión

La actividad total del glutatión fue medida mediante el GSH/GSSH Assay Kit (Abnova®). Se utilizaron aproximadamente 1×10^6 células para cada muestra con sus respectivos triplicados. Las muestras se leyeron a los 0 y 10 minutos a 412 nm.

IX.1.6. Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó mediante el método de extracción con Fenol: Cloroformo (Green & Sambrook, 2017). Cada muestra se preparó por triplicado,

posteriormente, se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1.2% por 1 hora a 80V.

IX.2. Resultados

IX.2.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata

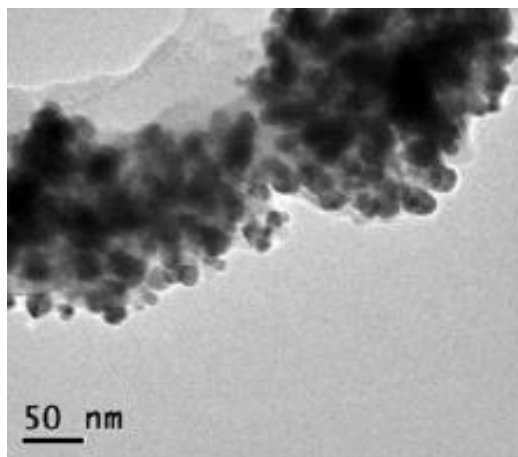


Figura 14. Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes.

IX.2.2. Concentración de plata

De acuerdo los resultados obtenidos de las mediciones de plata para cada una de las muestras, se concluye que existe plata presente en el medio de cultivo, el buffer de fosfatos, los extractos de semilla de aguacate, y de manera correspondiente, a la síntesis de nanopartículas de plata (columna A). La cantidad de plata final, proveniente de las nanopartículas, se muestra en la columna B (tabla I).

Tabla I. Concentración de plata presente en el medio de cultivo, PBS, extracto de semilla de aguacate y nanopartículas de plata.

	µg/mL	
	A	B
DMEM (Medio de cultivo)	1.6765	-
PBS (Buffer de fosfatos)	6.151531	-
0.25g Extracto	0.071636	-
0.5g Extracto	0.148068	-
1g Extracto	0.511427	-
1.5g Extracto	1.659797	-
2g Extracto	0.089706	-
0.25g AgNPs en extracto	6.08723	6.015594
0.5g AgNPs en extracto	334.2648	334.1167
1g AgNPs en extracto	766.204	765.6926
1.5g AgNPs en extracto	2168.57	2166.91
2g AgNPs en extracto	823.3692	823.2795

IX.2.3. Viabilidad por MTT en la línea celular C6 de glioma de rata, con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes

Los resultados muestran una IC₅₀ de 0.0601 µg/mL y una R² de 0.546 para las nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, para la muestra M1.

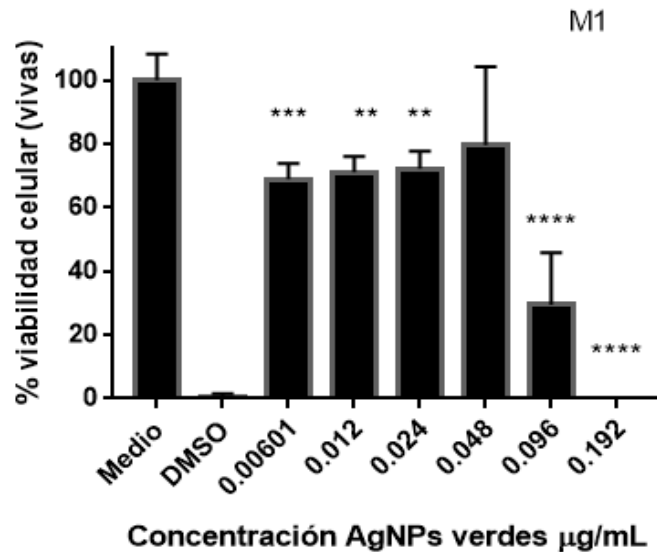


Figura 15. Viabilidad celular por MTT en la línea celular C6 de glioma de rata con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, muestra M1. Se observan cambios en la viabilidad celular después de un periodo de incubación de 24 horas con 0.00601, 0.012, 0.024, 0.048, 0.096 y 0.192 µg/mL de nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunn's de comparaciones múltiples, $\alpha=0.05$ y un valor de ** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$, **** $p\leq 0.0001$.

Para la muestra M2 el IC50 es de 3.45 µg/mL con una R² de 0.98.

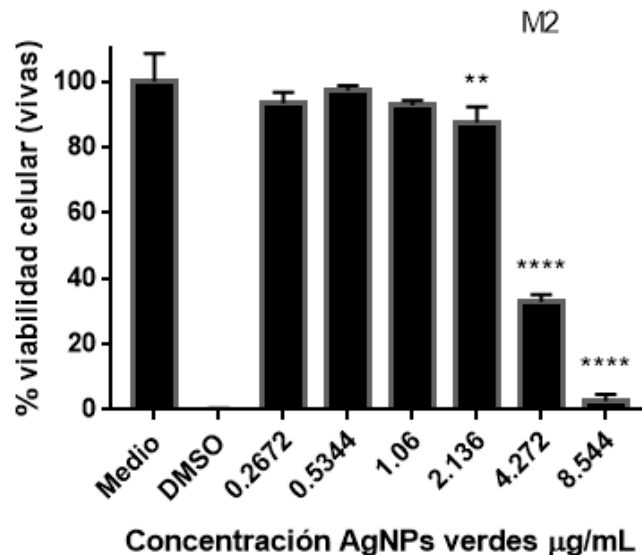


Figura 16. Viabilidad celular por MTT en la línea celular C6 de glioma de rata con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, muestra M2. Se observan cambios en la viabilidad celular después de un periodo de incubación de 24 horas con 0.2672, 0.5344, 1.06, 2.136, 4.272 y 8.544 µg/mL de nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunn's de comparaciones múltiples, $\alpha=0.05$, y un valor de ** $p\leq 0.01$, **** $p\leq 0.0001$.

Los resultados muestran una IC_{50} de 15.96 $\mu\text{g/mL}$ y una R^2 de 0.86 para las nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, para la muestra M3.

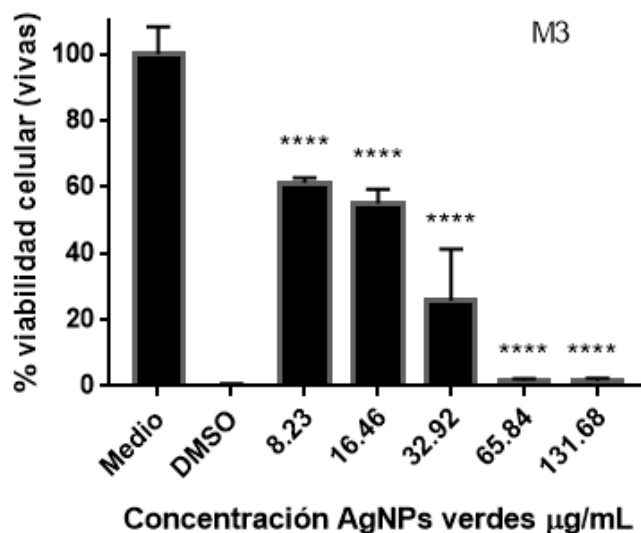


Figura 17. Viabilidad celular por MTT en la línea celular C6 de glioma de rata con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, muestra M3. Se observan cambios en la viabilidad celular después de un periodo de incubación de 24 horas con 8.23, 16.46, 32.92, 65.84 y 131.68 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunnett's de comparaciones múltiples, $\alpha=0.05$, y un valor de **** $p \leq 0.0001$.

IX.2.1. Peroxidación de Lípidos

Los resultados muestran la peroxidación de lípidos para la muestra M1 y una R^2 de 0.5174 para las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de semilla de aguacate, para la muestra M1.

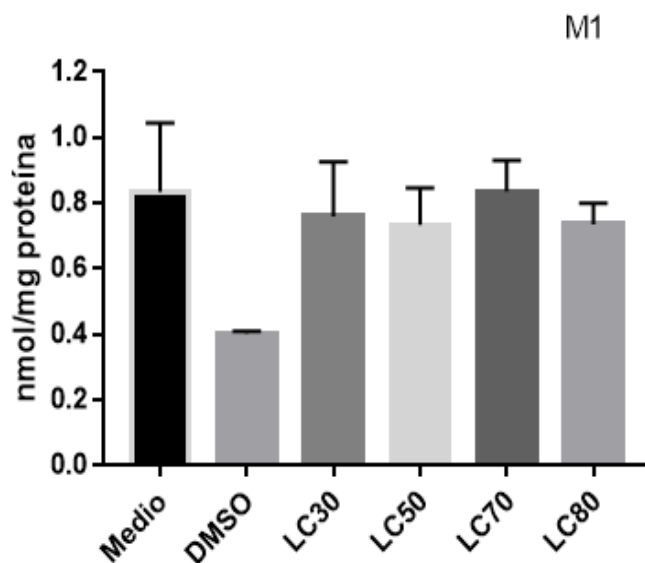


Figura 18. Peroxidación de lípidos en células C6 con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, muestra M1. Las muestras fueron incubadas durante un periodo de 24 horas con 0.16, 0.06, 0.062, 0.095 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LC30, Lc50, Lc70 y LC80, respectivamente). Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunn's de comparaciones múltiples, $\alpha=0.05$ y $p>0.05$.

Peroxidación de lípidos para la muestra M2 y una R^2 de 0.5598 para las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de semilla de aguacate.

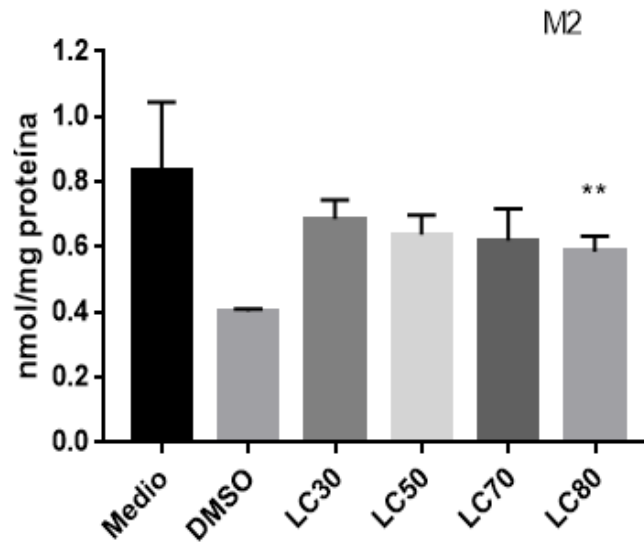


Figura 19. Peroxidación de lípidos en células C6 con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, muestra M2. Las muestras fueron incubadas durante un periodo de 24 horas con 1.80, 3.45, 5.46 y 7.63 $\mu\text{g/mL}$ (LC30, LC50, LC70 y LC80, respectivamente). Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunn's de comparaciones múltiples, $\alpha=0.05$ y $**p\leq 0.01$.

Peroxidación de lípidos para la muestra M3 y una R^2 de 0.5866 para las nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de semilla de aguacate.

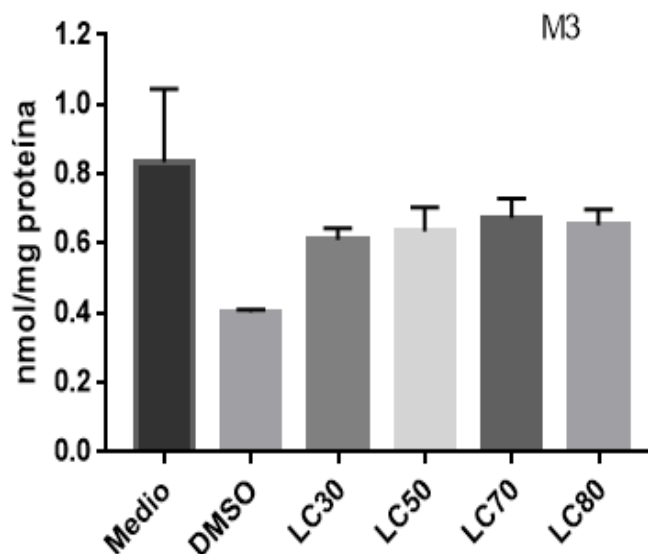


Figura 20. Peroxidación de lípidos en células C6 con nanopartículas de plata sintetizadas por métodos verdes, muestra M3. Las muestras fueron incubadas durante un periodo de 24 horas con 8.83, 17.51, 26.08 y 36.18 $\mu\text{g/mL}$ (LC30, LC50, LC70 y LC80, respectivamente). Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunn's de comparaciones múltiples, $\alpha=0.05$ y un valor de $p>0.05$.

IX.2.2. Actividad total de glutatión

Los resultados de la actividad de glutatión muestran una R^2 de 0.38 y se muestran a continuación.

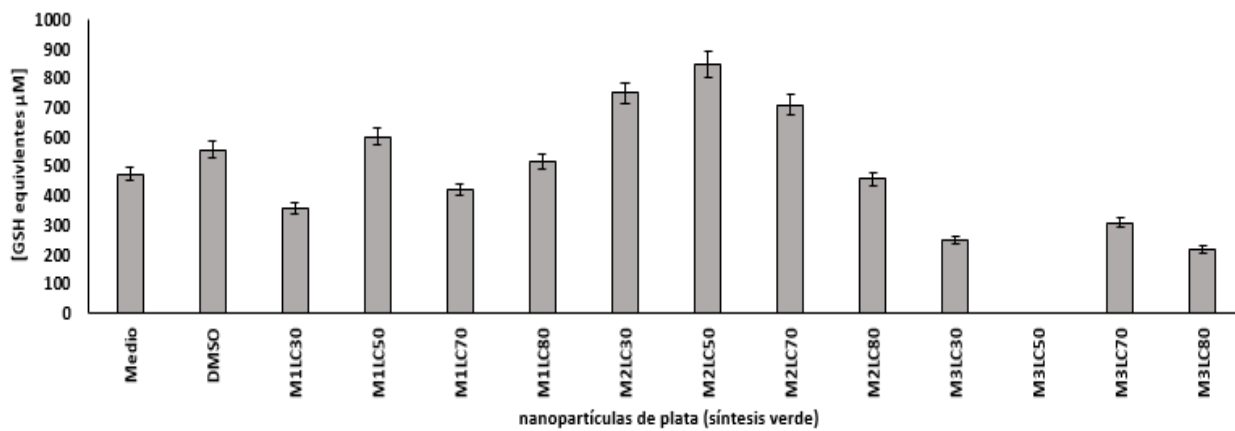


Figura 21. . Actividad total del glutati3n en c3lulas C6 de glioma de rata, despu3s de un periodo de tratamiento de 24 horas con concentraciones concentraciones de nanopartculas de plata sintetizadas por m3todos verdes de la muestra M1, 0.16, 0.06, 0.062, 0.095 $\mu\text{g}/\text{mL}$; M2, 1.80, 3.45, 5.46 y 7.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y M3, 8.83, 17.51, 26.08 y 36.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$, correspondientes al LC30, LC50, LC70 y LC80, respectivamente.

IX.2. 3. Extracci3n DNA

Cada tratamiento se realiz3 por triplicado, los resultados de la extracci3n de DNA de las muestras M1, M2 y M3 se muestran a continuaci3n.

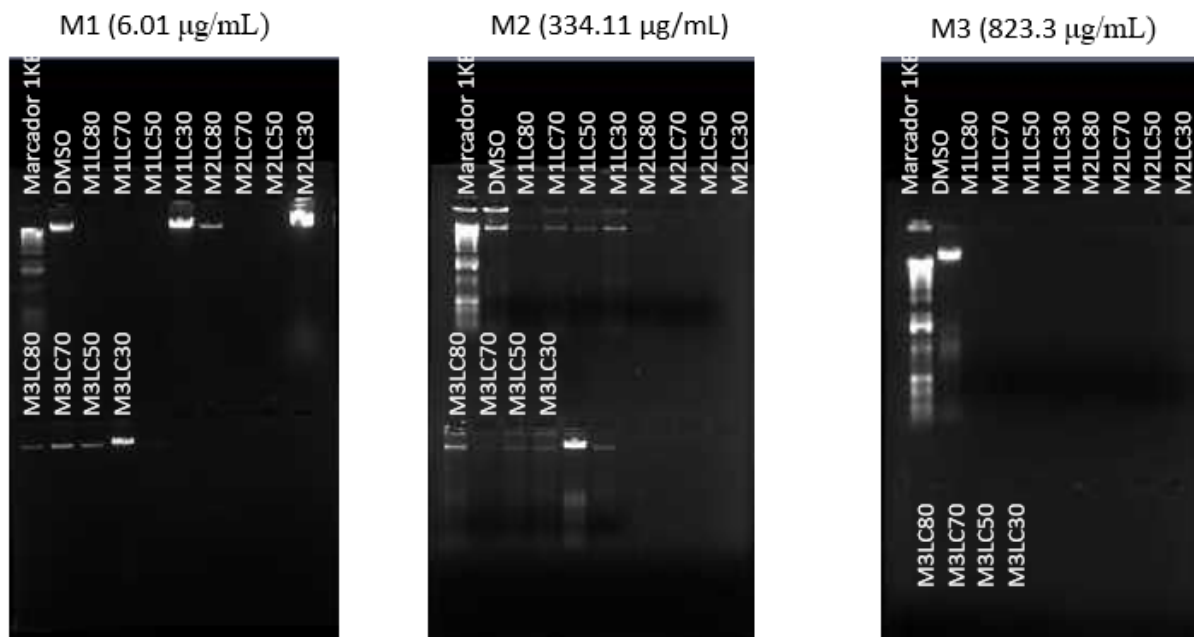


Figura 22. . Extracción de DNA en gel de electroforesis de células C6 de glioma de rata, después de un periodo de tratamiento de 24 horas, con concentraciones de las nanoparticulas de plata sintetizadas por métodos verdes de la muestra M1, 0.16, 0.06, 0.062, 0.095 $\mu\text{g}/\text{mL}$; M2, 1.80, 3.45, 5.46 y 7.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y M3, 8.83, 17.51, 26.08 y 36.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$, correspondientes al LC30, LC50, LC70 y LC80, respectivamente.

IX.3. Discusión y conclusiones

Los gliomas son tumores heterogéneos del sistema nervioso central, siendo el glioblastoma el más común y más maligno tipo de glioma. Este tipo de cáncer es particularmente difícil de tratar debido a la penetración de las células en tejidos adyacentes, evitando la posibilidad de remover el tumor del cerebro (Pinel *et al.*, 2019).

Los tratamientos para este tipo de cáncer consisten en la combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, se presentan efectos secundarios diversos, poca efectividad del tratamiento y, en general, la tasa de supervivencia es baja. (Özdemir *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2018).

Este tipo de tumor es difícil de tratar, ya que no es posible incrementar las dosis de fármacos debido a la toxicidad que se presenta en este tipo de tejido (Pinel *et al.*, 2019). Por otra parte, también se debe considerar la barrera hematoencefálica, que es altamente selectiva en relación con la permeabilidad, y que impide que atraviesen fármacos al cerebro y, aunque esta barrera puede sufrir alteraciones provocadas por el glioblastoma, no necesariamente significa que pierda la función de impedir el paso de fármacos (Ganipineni *et al.*, 2018).

En respuesta a las limitantes de los tratamientos, existen nuevas alternativas de tratamiento como el uso de nanomateriales, ya que de manera individual o funcionalizados pueden contribuir a inhibir la proliferación de células tumorales.

De entre todos los tipos de nanopartículas existentes, las nanopartículas de plata parecen ser una estrategia prometedora para el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer, debido a la actividad antitumoral, antiinflamatoria y antioxidante que presentan (Zhang *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2018; Chugh *et al.*, 2018).

No obstante, estudios muestran que las nanopartículas de plata son citotóxicas, producen ROS por estrés oxidativo, generan activación de caspasas y cambios morfológicos, disminución del crecimiento celular y apoptosis en diversas líneas celulares tumorales (Mathur *et al.*, 2017). Sin embargo, el tipo de síntesis, así como

propiedades físico químicas como la forma, el tamaño, el tipo de agente estabilizante y su funcionalización están estrechamente relacionados con los efectos citotóxicos y genotóxicos.

En respuesta a la citotoxicidad se han propuesto métodos de síntesis biológicos, en los cuales se reducen los iones metálicos a nanopartículas, mediante el uso de microorganismos o extractos de plantas. Las ventajas de estos métodos, es que las nanopartículas son más fáciles de sintetizar, mas, menos costoso, no requiere de sistemas sofisticados ni sustancias toxicas para la síntesis y lo más importante, que sean menos citotóxicos que los métodos químicos (Annu *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2016; Kummara *et al.*, 2016).

En este trabajo se sintetizaron nanopartículas de plata a partir de extractos de semilla de aguacate (*Persea americana*), de los cuales se obtuvieron tres lotes de nanopartículas esféricas de 50 nm de diámetro con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (M1=6.01µg/mL, M2=334.11 µg/mL y M3=823.3 µg/mL) a partir de diferentes cantidades de extracto.

Los resultados de esta investigación muestran que es posible sintetizar nanopartículas de plata a partir de extracto de semilla de aguacate, con posible actividad antitumoral en células C6 de glioma de rata. Las concentraciones inhibitorias medias fueron de 0.0601, 3.45 y 15.96 µg/mL, para M1, M2 y M3, respectivamente. Estos datos sugieren que las nanopartículas del lote M1 tienen mejor efecto antitumoral que M2 y M3, este fenómeno podría estar relacionado con una menor cantidad inicial de plata (6.01 µg/mL), lo que permitiría una mejor dispersión en la solución acuosa, permitiendo que

no se aglomeren las nanopartículas y por consecuencia se alteren los efectos citotóxicos.

Efectos similares se reportaron en células U251-MB y T98G con 10 µg/mL de nanopartículas de plata. Sin embargo, se obtuvieron respuestas horméticas a dosis más bajas (5 µg/mL). Esta respuesta se asocia a la presencia de MuD, una proteína anti-apoptótica, que si es suprimida, las células mueren después de ser expuestas a nanopartículas de plata, lo que podría ser explorado como estrategia para la terapia de tumores cerebrales (Choi *et al.*, 2018)

Otras investigaciones han aplicado infrarrojo cercano a nanopartículas de plata funcionalizadas con péptidos capaces de reconocer células de glioblastoma, de manera que puedan destruir las células mediante la generación de calor (Gonçalves *et al.*, 2017).

Algunos otros han utilizado SERS con nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo anti-EGF, con aplicación de ultrasonido transcraneal, permitiendo desestabilizar la barrera hematoencefálica de manera momentánea y no intrusiva para que las nanopartículas de oro pudieran estar en los márgenes del tumor (Diaz *et al.*, 2014; Karim *et al.*, 2016).

Los nanopartículas como nanoacarreadores se espera que no sean tóxicos, que sean biodegradables y biocompatibles, que no produzcan respuesta inmune, que sean selectivos y que protejan al fármaco a liberar. Los nanoacarreadores pueden servir como oportunidad terapéutica o participar de manera sinérgica con los fármacos radiosensibilizadores, como las nanopartículas de plata. Este efecto sensibilizante se

relaciona con la liberación de iones de plata (Ag^+), que tienen la capacidad de capturar electrones y así como funcionar agentes oxidantes, incrementando la producción de ROS e interactuar con los sistemas de reparación del DNA, lo que podría mejorar los resultados de la radioterapia (Karim *et al.*, 2016; Sehedic *et al.*, 2015).

Además de las nanopartículas de plata, también se apuesta a tratamientos con nanomateriales basados en oro, platino, hafnio, hierro, bismuto, tierras raras entre otros, en conjunto con rayos X y braquiterapia, ablación laser donde se ha reportado la sensibilización de células tumorales de manera exitosa, ya que se aprovecha la capacidad de internalización de las nanopartículas para destruir las células tumorales mediante estas técnicas (Pinel *et al.*, 2019).

La peroxidación de lípidos proporciona información acerca de la capacidad de una sustancia de producir estrés oxidativo y como respuesta ocurre la degradación de lípidos. Nosotros investigamos la peroxidación de lípidos en células C6 con los tres diferentes lotes de nanopartículas de plata biosintetizadas. Los datos indican que tanto en la muestra M1 y M3 no existen diferencias significativas de peroxidación de lípidos con respecto al control. Sin embargo, se observa que en la muestra M2 en especial la LC80 presenta diferencias significativas en contraste con el control, esto puede ser provocado por la concentración de nanopartículas de plata y la viabilidad celular asociada a este parámetro.

No obstante, en investigaciones in vivo han reportado que al utilizar nanopartículas de plata se incrementa la peroxidación de lípidos y la apoptosis. Con efectos de engrosamiento en las meninges, eritrocitos extravasados, hemorragia en el córtex del

cerebro e hinchazón neuronal. Esto podría relacionarse con el tipo de ensayo realizado, las concentraciones y el tipo de extracto usado y los compuestos unidos a la superficie de las nanopartículas (Lebda *et al.*, 2018; Hadrup *et al.*, 2012).

Por otra parte, también evaluamos la actividad total del glutatión, un tripéptido que es clave en el proceso antioxidante para proteger las células de daños por especies reactivas de oxígeno. Los resultados indican que existe un incremento, de manera general, en la actividad antioxidante del glutatión para las muestras M1 y M2, mientras que en la muestra M3 se observa la disminución de la actividad antioxidante. Estos datos podrían representar la acción antioxidante y reguladora del glutatión en las células y, podría relacionarse con la concentración de las muestras, ya que en comparación con la muestra M3, M1 y M2 tiene menor concentración de nanopartículas de plata, lo que permitiría activar procesos antioxidantes como se ha propuesto en otros estudios (Yeasmin *et al.*, 2017; Kummara *et al.*, 2016)

Resultados similares se obtuvieron al experimentos in vivo, donde disminución del nivel del GSH, asumiendo que los iones de plata liberados tienen afinidad por los grupos tiol, estos reaccionan con las proteínas que tienen azufre, incluyendo el glutatión y otros antioxidantes (Lebda *et al.*, 2018).

Los efectos en el DNA de las células C6, se probaron mediante extracción de DNA genómico, los datos indican que, de manera general, hay presencia de material genético en las concentraciones más bajas de M1 y M2, sin aparente fragmentación, no así para la muestra M3, en comparación con las células sin tratamiento. No obstante,

es necesario realizar análisis más profundos para determinar si existe daño en el material genético de las células expuestas a nanopartículas de plata.

El presente estudio muestra los efectos anti proliferativos, de las nanopartículas de plata biosintetizadas a partir de extracto de semilla de aguacate y su potencial aplicación para el tratamiento del glioblastoma.

X. Nanopartículas de oro

Los nanomateriales basados en oro pueden ser sintetizados por métodos químicos como la reducción de sales de oro y por métodos de sol-gel; métodos físicos como la ablación láser y por métodos biológicos en donde se utilizan organismos o extractos de ellos para la producción de nanopartículas (Alaqd, 2016). Por cualquiera de estos métodos se pueden obtener diversos tamaños y formas, de entre los que destacan formas esféricas, en clusters, cúbicas, ramificadas, núcleo/coraza, nanorods (en forma de barra), alambres o en forma de estrella (Alaqad, 2016), que son aprovechados para diversos usos (Govindaraju & Yun, 2018; Wozniak *et al.*, 2017).

Las nanopartículas de oro han sido ampliamente usadas en biotecnología y el área biomédica debido a su biocompatibilidad, buenas propiedades ópticas, gran área superficial, alta conductividad, baja o nula toxicidad (Fu & Ke, 2016) y por la facilidad de modificar su superficie además para la entrega sitio dirigida de fármacos (Alaqad &

Saleh, 2016; Cai *et al.*, 2015; Cheng-Teng *et al.*, 2010; Pooja *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2015). Las modificaciones de su superficie pueden ocurrir mediante la conjugación directa involucrando puentes de oro-azufre o enlaces de nitrógeno, ligandos de límite (capping), interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrogeno para ligarlas con iones metálicos, polímeros, carbohidratos, aminoácidos, compuestos orgánicos, péptidos y oligonucleótidos, favoreciendo la interacción y la internalización de estas nanopartículas en las células (Alaqad & Saleh, 2016; Govindaraju & Yun, 2018).

El incremento de la interacción de las nanopartículas de oro con las células, permite aumentar la permeabilidad y la retención de este tipo de nanomateriales en células tumorales, de manera que se puedan utilizar como vehículos para la entrega dirigida y específica de fármacos antineoplásicos y/o como sistemas de detección.

Debido a sus múltiples propiedades y la fácil producción y modificación de su superficie, las nanopartículas se han utilizado para el censado molecular, análisis clínicos, genómica, inmunología, contra infecciones bacterianas, entrega de péptidos, DNA, pequeños RNA de interferencia y antígenos, terapia génica e imagen in vivo, resonancia magnética, ultrasonido, terapia fotodinámica y fototérmica y como sistemas de entrega de fármacos, (Dykman & Khlebtsov, 2016; Alaqad & Saleh, 2016).

Los sistemas de entrega de fármacos dependientes de nanopartículas de oro, son usados para dirigirse de manera específica a los tumores cuando la terapia convencional no es muy efectiva. Por otra parte, las nanopartículas de oro son capaces de convertir la energía foto térmica (la conversión de luz en calor) por lo que esta

característica en particular puede ser usada para controlar la liberación del fármaco o provocar la muerte de las células tumorales por aumento localizado de la temperatura (Govindaraju & Yun, 2018).

De entre todas las formas de nanopartículas de oro que se pueden sintetizar, han cobrado importancia en los últimos años las nanoestrellas de oro, debido a sus propiedades ópticas excepcionales y a la alta eficiencia en terapia fototérmica contra el cáncer y su uso en Surface Enhanced Raman Scattering, (SERS, por sus siglas en inglés) (Kumar-Krishnan *et al.*, 2015), ya que entre sus aplicaciones se pueden destacar la identificación molecular, biosensores, biociencias, entre otros (Uetsuki *et al.*, 2010).

Las nanoestrellas de oro, al poseer múltiples extensiones agudas generan un efecto “pararrayos” que realza dramáticamente el campo electromagnético local que puede llegar a ser 100 veces más potente que el de las nanoesferas de oro de tamaño similar (Liu *et al.*, 2015; Shan *et al.*, 2017; Bassi *et al.*, 2018). Las propiedades plasmónicas de las nanoestrellas de oro pueden ser modificadas para empatar con las frecuencias del láser para la imagen y terapia mediante el control de su geometría en el proceso de síntesis (Liu *et al.*, 2015; Shan *et al.*, 2017).

El efecto del SERS toma ventaja en el campo electromagnético local que ocurre cuando la luz irradia nanoestructuras metálicas, resultando en un método sensitivo y específico para diversos analitos. Tiene como ventajas la alta sensibilidad, resolución espacial y una capacidad múltiple de detección con tal solo una molécula (Liu *et al.*, 2015).

El efecto primario del SERS surge de la resonancia del campo electromagnético local cuando la luz irradia la superficie de la nanoestructura metálica y/o de las moléculas que están muy próximas a ella. Cuando la superficie de la nanopartícula es irradiada por un campo electromagnético, los electrones oscilantes (plasmón de superficie) producen un campo eléctrico secundario que se suma al campo electromagnético externo, resultando en una resonancia del plasmón de superficie. El segundo campo electromagnético es típicamente concentrado en la rugosidad de la superficie metálica nanoestructurada por lo que el efecto resultante de detección puede ser de hasta 10^8 veces más potente, y de 10^{15} veces más potente en “puntos calientes” donde las mejoras del campo electromagnético de múltiples nanopartículas plasmónicas se superponen en espacios pequeños. (Liu *et al.*, 2015; Bassi *et al.*, 2018).

Entre las nano plataformas, las nanoestrellas de oro son particularmente indicadas para el sistema de detección son SERS por sus propiedades del plasmón que pueden ser ajustadas cambiando la longitud y arquitectura de los brazos que actúan como pararrayos y aumentan este efecto debido a la gran intensidad del campo eléctrico en estas zonas y así se pueden colocar fácilmente donde se desee en la región del infrarrojo cercano, en la denominada ventana biológica, en la que los tejidos son transparentes. Es decir, el uso de las nanoestrellas de oro y, en general, las nanopartículas de oro ramificadas son de gran utilidad en la medicina, ya que se puedan aplicar como núcleos eficientes tanto para la obtención de imágenes basadas en SERS como para terapia contra el cáncer (Liu *et al.*, 2015; Bassi *et al.*, 2018).

Para obtener un robusto y eficiente etiquetador sers-raman los componentes deben ser cuidadosamente escogidos. Primero, el metal noble debe de garantizar un fuerte factor

de mejora para la señal, el segundo componente es un reportador de Raman el cual debería unirse estrictamente a la superficie del nanomaterial para prevenir su desunión. El tercer componente es una capa biocompatible que proteja la nanopartícula metálica y el reportero Raman, que debe de unirse firmemente a la superficie metálica y por último, se necesita un fragmento del sitio de interés, que sea capaz de unirse específicamente al blanco celular que se desea revelar (Bassi *et al.*, 2018).

Debido a sus características favorables y moldeables de las nanopartículas de oro, se ha propuesto usarlas como agentes de entrega de fármacos. Se han utilizado en diversas líneas celulares de cáncer como 4T1, HSC-3, HeLa, HepG2 utilizando nanopartículas de oro como sistemas de terapia fototérmica y para incrementar la eficiencia en el tratamiento. Por otra parte, se han utilizado nanopartículas de oro funcionalizadas con PLGA, PEG, ácido fólico y diferentes péptidos, así como fármacos como doxorubicina, epirubicina, paclitaxel, en distintas líneas celulares de tumor cerebral, cáncer de mama, KB, HeLa, OV167, GP-38, entre otras, para incrementar la eficacia de la entrega específica del fármacos como, así como su liberación controlada *in vitro* e *in vivo*, (Govindaraju & Yun, 2018; Bassi *et al.*, 2018).

Actualmente se busca desarrollar y aplicar nuevos tipos de tratamientos para el cáncer que sean más efectivos y menos costosos que contribuyan a la eliminación del tejido tumoral y a su identificación. En este sentido, se espera que la nanotecnología mejore la entrega de fármacos mediante nanoacarreadores, incrementando la eficacia y disminuyendo los efectos negativos de los fármacos antineoplásicos (Wicki *et al.*, 2015).

Son de particular interés el uso de nanomateriales inorgánicos basados en oro, ya que actualmente se usan en el diagnóstico médico y entrega dirigida de fármacos en algunos tipos de neoplasias, debido a que poseen propiedades ópticas y electrónicas únicas, fácil método de síntesis, posibilidad de modificar su forma y superficie, un gran relación de superficie/volumen, baja o nula citotoxicidad, biocompatibilidad, estabilidad, y alto coeficiente de extinción en comparación con colorantes orgánicos; por lo que pueden ser utilizadas en ensayos colorimétricos para detectar diferentes moléculas, además de poder funcionalizarlas para la entrega sitio dirigida de fármacos (Cai *et al.*, 2015; Cheng-Teng *et al.*, 2010; Arora *et al.*, 2009; Arora *et al.*, 2012; Wicki *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2013; El-Hussein *et al.*, 2015; Pooja *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2015; El-Hussein *et al.*, 2015; Torabi *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2010).

De entre todas las formas de nanopartículas de oro que se pueden sintetizar, han cobrado importancia en los últimos años las nanoestrellas de oro, debido a su alta eficiencia en terapia fototérmica contra el cáncer y en Surface Enhanced Raman Scattering, (SERS, por sus siglas en inglés) (Kumar-Krishnan *et al.*, 2015), ya que entre sus aplicaciones se pueden destacar su uso en identificación molecular, sensores, biociencias, entre otros (Uetsuki *et al.*, 2010).

X.1. Metodología

X.1.2. Síntesis de nanoestrellas de oro

La síntesis de nanoestrellas de oro se realizó según el protocolo de Kumar-Krishnan et al. (2015), el cual está basado en síntesis de nanomateriales en soluciones DES (Deep Eutectic Solvents, por sus siglas en inglés), que es un nuevo método de síntesis verde en soluciones no acuosas y que se pueden usar en sustitución de líquidos iónicos. Además, este tipo de soluciones para síntesis no presentan toxicidad, son biodegradables y son de bajo costo, y se puede controlar la forma y tamaño de las nanopartículas que se desean sintetizar.

En el presente trabajo se preparó la solución de DES mediante la adición de cloruro de colina y urea en una proporción de 2:1 molar, se mezcló y se colocó en el horno a 120 °C por 48 horas hasta que estuvieran en estado líquido los dos reactivos y se reservó la mezcla hasta su uso. Se pesó la sal de oro $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y se agregó la solución de DES en un 97% en peso; se agregó un 3% en peso de HCl 0.5 M. Se pesó ácido ascórbico (según la proporción 1 g de DES por 2.03 mg de ácido ascórbico) y se agregó el 97% en peso de la solución de DES y un 3% en peso de HCl 0.5 M.

Los matraces se colocaron en baño maría a 60°C con agitación, hasta que se disolvieran los reactivos. Una vez disueltos, se procedió a agregar la solución de ácido ascórbico a la solución con la sal de oro. Inmediatamente, comenzó la reacción de

síntesis. El tratamiento se prolongó hasta 3 horas a 60 °C, manteniéndose en agitación. Una vez terminada la síntesis, la solución se dejó reposar durante dos días con nanoestrellas de oro y se precipitaron con una solución 1:1 de Metanol: Acetona. Se removió el sobrenadante y se volvió a precipitar con Metanol: Acetona tres veces más, dejando en reposo las nanopartículas por dos días, entre cada lavado y precipitación. Finalmente, se lavaron las nanopartículas con agua destilada ultrapura, se dejaron sedimentar y se liofilizaron para su posterior análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), FTIR, RAMAN y ensayos de toxicidad mediante la prueba de viabilidad por MTT.

El proceso de síntesis se realizó 7 veces, hasta obtener las nanoestrellas de oro “desnudas” y funcionalizadas con 4-aminotiofenol.

X.1.2.1. Funcionalización de nanoestrellas de oro con 4-aminotiofenol

Una vez terminada la reacción de síntesis de nanoestrellas de oro a 60 °C con agitación, se procedió a su funcionalización con 4-aminotiofenol (4-ATP). El uso del 4-ATP para la funcionalización de las nanoestrellas de oro es para añadir un grupo tiol a las NPs de tal forma que posteriormente pueda ser utilizado para unirlos a diferentes ligandos biológicos de tipo proteico.

Para la adición de 4-ATP a las nanoestrellas de oro, es necesario calcular la proporción de la cantidad de sal de oro pesada y la cantidad de nanopartículas sintetizadas, con el

objetivo de determinar la cantidad de 4-ATP que se debe agregar a las nanopartículas de oro para su funcionalización. Una vez calculada la cantidad de 4-ATP, éste se disolvió en etanol absoluto y se adicionó al matraz que contenía las nanopartículas de oro. Se dejó en baño maría a 60 °C con agitación por una hora. Al término de la funcionalización, se procedió a dejar en reposo por 2 días. Posteriormente, se realizó la precipitación de las nanoestrellas de oro, mediante la adición (en volumen equivalente de la reacción de síntesis) de Metanol: Acetona 1:1, dejando en reposo por un día, entre cada lavado y precipitación.

Finalmente, las nanopartículas se lavaron y precipitaron con agua destilada ultrapura, se congelaron a -80°C y se liofilizaron para su posterior caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM), FTIR y ensayos de citotoxicidad mediante la prueba de viabilidad por MTT.

X.1.2.2. Caracterización de nanoestrellas de oro

Para determinar la morfología de las diferentes nanopartículas de oro sintetizadas, se realizó un análisis por microscopía electrónica de transmisión, TEM, por sus siglas en inglés. De esta manera, se pudo determinar la morfología de las NPs obtenidas en cada una de las síntesis mencionadas.

Para el caso de la síntesis 6 y 7, se realizó TEM a las nanoestrellas de oro “desnudas” y funcionalizadas con 4-ATP para determinar la forma y el tamaño.

X.1.2.3. Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Cuando la radiación infrarroja pasa a través de una muestra, algo de la radiación es absorbida por la muestra y pasa a través de ella (es transmitida). Resultando en señales que son detectadas en un espectro y que representan una “huella digital” de la muestra que se está analizando. Especialmente, para la detección de bandas de grupos funcionales de diferentes sustancias, lo que permite poder identificarlas.

En este caso, se utilizó el FTIR para la identificación de la unión del 4-ATP con las nanoestrellas de oro. El espectro correspondiente a las nanoestrellas funcionalizadas con 4-ATP y el espectro correspondiente al 4-ATP, mientras que se aprecia el traslape de ambos espectros para la identificación de los grupos funcionales correspondientes.

X.1.2.4. Espectroscopía Raman-SERS

La dispersión Raman junto con la absorción infrarrojo, es utilizada para obtener información acerca de la estructura y propiedades de moléculas desde sus vibraciones transicionales. La espectroscopía Raman es una técnica de caracterización para propiedades ópticas, químicas, y electrónicas de la muestra (más que el Infrarrojo), ya que variando algunos grados, la dispersión Raman es sensitiva a todos los estados electrónicos excitados de la molécula en estudio, permitiendo obtener detalles intrínsecos de la muestra.

Respecto a lo anterior y debido a que la señal de unión entre el 4-ATP y las nanoestrellas de oro fue débil de detectar mediante FTIR, se procedió a realizar un espectro Raman a la muestra, con el fin de detectar la presencia de la unión del 4-ATP a las nanoestrellas de oro. Esta técnica permite detectar el patrón de vibración Raman para el 4-ATP y para las nanoestrellas de oro funcionalizadas con 4-ATP (línea azul), en el que se aprecia la unión de los mismos alrededor de los 1100 y los 1580 cm^{-1} , tomando como referencia lo reportado por Uetsuki *et al.*,(2010).

X.1.2.5. Ensayos de citotoxicidad de nanoestrellas de oro por ensayos colorimétricos (MTT)

Las pruebas para medir la viabilidad y proliferación celular están basados en numerosos ensayos *in vitro* en poblaciones celulares en respuesta a diversos factores externos. La reducción de las sales de tetrazolio (MTT) es ampliamente aceptada para determinar la proliferación celular. El reactivo (MTT) es una sal de color amarillo, la cual es reducida por células metabólicamente activas, en parte por la acción de las enzimas deshidrogenasas en la mitocondria. El resultado de la reacción intracelular es la formación de sales de formazán, de color violeta, que pueden ser solubilizadas y cuantificadas por métodos espectrofotométricos (ATCC, 2011).

En este caso, se utilizó el método de viabilidad por MTT para determinar la viabilidad y proliferación celular en dos líneas de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231. La línea

celular MCF7, se caracteriza porque es uno de los tipos celulares de cáncer más frecuentes y es totalmente dependiente del tratamiento con hormonas, como el tamoxifen. Por otra parte, la línea MDA-MB-231 se deriva de un tejido metastásico conocido como cáncer triple negativo, que al carecer de receptores de estrógeno lo hace más resistente a los tratamientos hormonales. Por esta razón, en este trabajo elegimos estas dos líneas celulares, con el propósito de tener representatividad de los tipos de cáncer más frecuentes (MCF7) y con menor respuesta al tratamiento antineoplásico convencional (MDA-MB-231).

Se evaluó el efecto citotóxico de diferentes concentraciones de nanoestrellas de oro en ambas líneas celulares.

X.1.2.6. Ensayos de viabilidad por MTT en la línea celular de cáncer de mama humano triple negativo MDA-MB-231 con nanopartículas de oro

Se cultivaron las células MDA-MB-231 en medio DMEM (dulbecco modified Eagles minimal essential médium) suplementado al 10% con suero fetal bovino, en cajas Petri para cultivo celular de 100 mm (Nunc Cell Petri Dishes, Thermo Scientific®), con una atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, con un aproximado de 1 x 10⁶ células por placa.

Posteriormente, las células se separaron mediante disgregación enzimática con tripsina-EDTA. Fueron recuperadas y centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se removió el sobrenadante y se suspendió el botón celular en 5 mL de medio DMEM 10 % suero fetal bovino. Posteriormente, se realizó un ensayo de exclusión con el colorante azul de tripán para la estimación del número de células viables mediante conteo con la cámara de Neubauer.

Una vez determinada la cantidad de células viables en la muestra, se colocaron aproximadamente 10,000 células viables por pozo en placas múltiples de 96 pocillos (Nunc MicroWell-96, Thermo Scientific®), en un volumen final de 100 μ L de medio DMEM suplementado, por pozo. Y, posteriormente se incubaron a 37 C con una atmosfera de 5% de CO₂ por un periodo de 24 horas.

Al terminar las 24 horas, se aplicaron los diversos tratamientos con nanopartículas de oro y nanopartículas de oro funcionalizadas con 4-aminotiofenol (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 μ g/mL), respectivamente. Y, se utilizaron como controles el dimetil sulfóxido como control total de muerte celular y medio DMEM suplementado al 10% suero fetal bovino como control total de células vivas, en un volumen total de 100 μ L por pozo, respectivamente.

Una vez aplicado el tratamiento, se incubaron las placas bajo una atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C, por un periodo de 24 horas. Al terminar el proceso de incubación, las placas fueron decantadas y lavadas con un buffer de fosfatos (PBS 1X, estéril), aplicando 100 μ L por pozo, por tres veces. Y, posteriormente, se colocaron 5 μ L de

reactivo MTT y 45 μ L de medio DMEM sin suplementar, por pozo y, se incubó por 4 horas en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

Al terminar el proceso de incubación, se agregaron 100 μ L de isopropanol absoluto por pozo y se disolvieron los cristales de formazán. Las placas se dejaron incubando a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad y, posteriormente se procedió a la lectura de las placas mediante espectrofotómetro para placas multi-pocillo, a una longitud de onda de 570 nm para los cristales de formazán y 690 nm para el contraste con el medio.

Para determinar la viabilidad celular después del tratamiento con nanopartículas de oro, se realizó la resta de las absorbancias obtenidas a 570 y 690 nm, se promediaron los resultados y se determinó el porcentaje de viabilidad celular utilizando la ecuación 1 y 2 mencionadas en el apartado VI.1.1.

X.2. Resultados

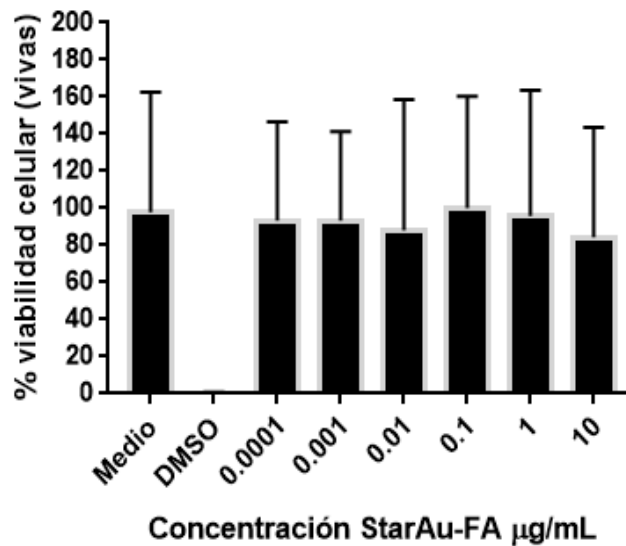


Figura 23. Viabilidad celular por MTT en la línea celular MCF7 de cáncer de mama, después de un periodo de incubación de 24 horas con nanoestrellas de oro funcionalizadas con ácido fólico (StarAu-FA), con concentraciones de 0.0001 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunn's de comparaciones múltiples, $\alpha=0.05$ y $p>0.05$.

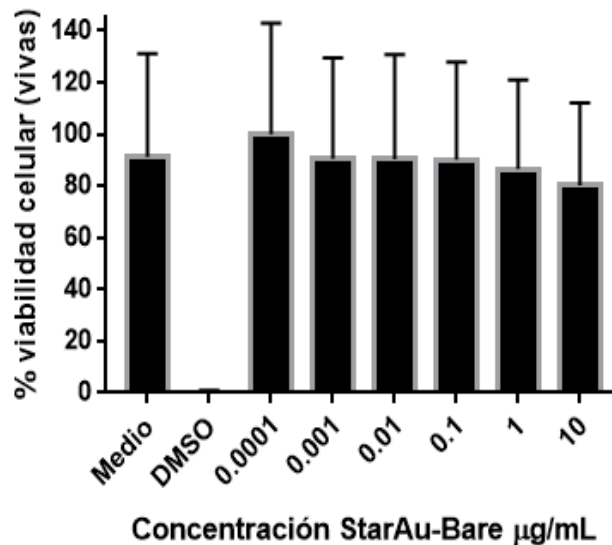


Figura 24. Viabilidad celular por MTT en la línea celular MCF7 de cáncer de mama, después de un periodo de incubación de 24 horas con nanoestrellas de oro funcionalizadas con ácido fólico (StarAu-FA), con concentraciones de 0.0001 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graphpad Prism 7, con un ANOVA no paramétrico y una prueba de Dunn's de comparaciones múltiples, $\alpha=0.05$ y $p>0.05$.

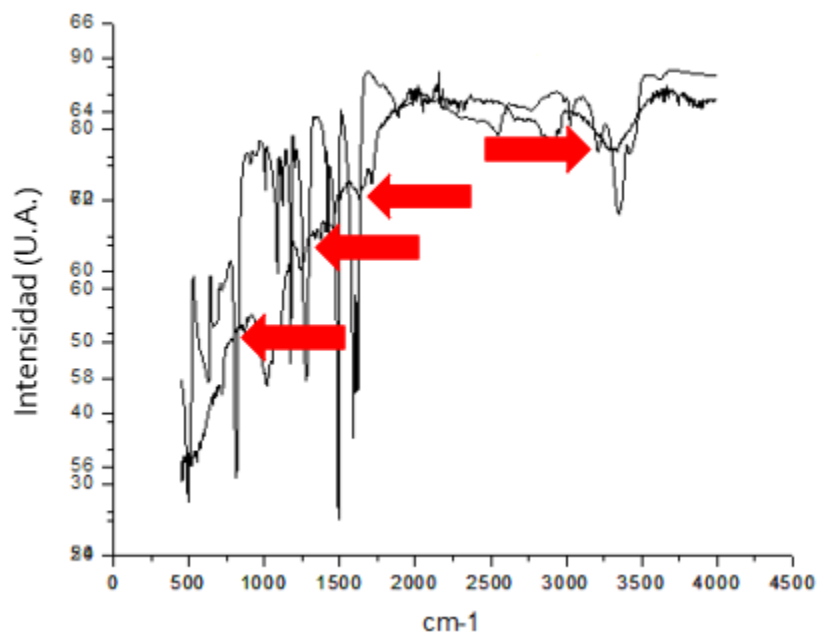


Figura 25. Espectroscopía Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) para nanoestrellas de oro funcionalizadas con 4-aminotiofenol.

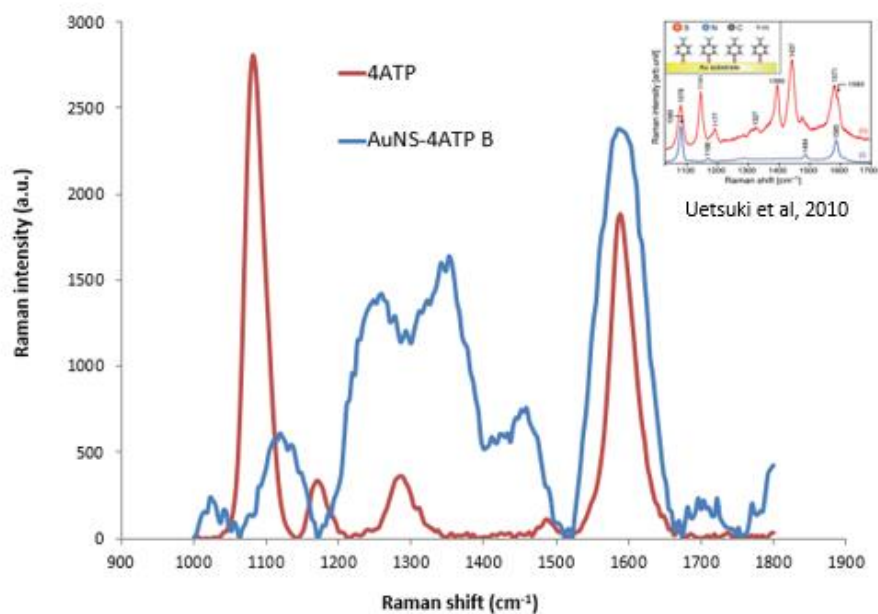


Figura 26 Espectroscopía Raman-SERS para nanoestrellas de oro funcionalizadas con 4-aminotiofenol. Se observa la concordancia de vibración de 4-aminotiofenol (4-ATP) y su unión a un sustrato de oro (nanoestrellas de oro-4-aminotiofenol), en 1141 y 1585.

X.1.3. Caracterización por TEM de StarAu-Bare

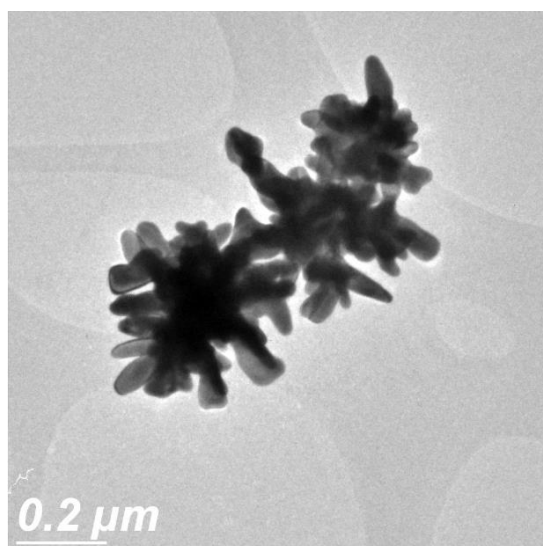


Figura 27 Microscopía de Electrónica de Transmisión de nanoestrellas de oro "bare" (StarAu-Bare). Se observan nanoestrellas de oro sin funcionalizar de un tamaño aproximado de 800 nm de diámetro.

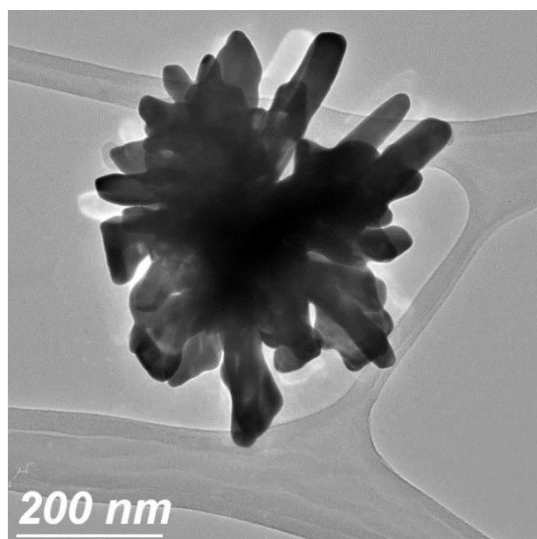


Figura 28 Microscopía de Electrónica de Transmisión de nanoestrellas de oro funcionalizadas con ácido fólico (StarAu-FA). Se observan nanoestrellas de oro funcionalizadas con 4-aminotiofenol, con un tamaño aproximado de 800 nm de diámetro.

X.3. Discusión y conclusiones

Las nanopartículas de oro han sido ampliamente usadas en la biotecnología y en el área biomédica debido a su biocompatibilidad, buenas propiedades ópticas, gran área superficial, alta conductividad, baja o nula toxicidad y por la facilidad de modificar su superficie, lo que las hace deseables para la entrega sitio dirigida de fármacos y para el diagnóstico de enfermedades (Fu & Ke, 2016; Alaqad & Saleh, 2016; Cai *et al.*, 2015; Cheng-Teng *et al.*, 2010; Pooja *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2015).

En el presente trabajo se desarrolla la síntesis de nanopartículas de oro en forma de estrella y se evalúan sus efectos citotóxicos, así como la funcionalización con ácido fólico y 4-aminotiofenol para aumentar la unión de las nanopartículas a las células y, como posible plataforma para el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos y detección mediante el uso de SERS (Surface Enhanced Raman Scattering).

Debido a las múltiples propiedades de las nanopartículas de oro se han propuesto para el censo molecular, análisis clínicos, genómica, inmunología, contra infecciones bacterianas, entrega de péptidos, DNA, pequeños RNA de interferencia y antígenos, terapia génica e imagen *in vivo*, resonancia magnética, ultrasonido, terapia fotodinámica y fototérmica y como sistemas de entrega de fármacos cuando los tratamientos convencionales no funcionan (Dykman & Khlebtsov, 2016; Alaqad & Saleh, 2016; Govindaraju & Yun, 2018).

Para lograr que estos nanomateriales lleguen hasta las células diana, son unidos con ligandos de alta afinidad sobre su superficie. Algunos de los ligandos que se han

utilizado son el ácido fólico, carbohidratos, proteínas, péptidos, proteínas, anticuerpos, aptámeros y oligonucleótidos (Wicki *et al.*, 2015).

En nuestro trabajo se sintetizaron nanoestrellas de oro y se funcionalizaron con ácido fólico para dirigir su unión hacia los receptores de folatos en la superficie de las células MCF7, ya que son receptores que se encuentran sobre expresados y que pueden servir como vía de acceso para la internalización de las nanopartículas.

Las nanopartículas de oro, tienen ventajas sobre otros nanomateriales debido a la resonancia del plasmón superficial y las propiedades ópticas que presentan, lo que las hace ideales para la obtención de imágenes in vivo así como para la terapia fototérmica, tomografía computarizada de rayos X, tomografía/imagen foto acústica y SERS, tomografía de emisión de positrones (Kesharwani *et al.*, 2019; Borran *et al.*, 2018).

El uso de SERS con nanopartículas de oro tiene ventajas respecto a los métodos tradicionales de imagen, debido a que se presenta una alta sensibilidad, el sistema es estable y selectivo y posee una alta especificidad. La que se señal que se emite puede aumentar la señal Raman de una molécula hasta 10 órdenes de magnitud, por lo que este sistema de detección es ultrasensitivo incluso si son niveles de concentración de analitos muy bajos (10^{-15} M); además proporciona información sobre la estructura y la unión química de los compuestos unidos. No obstante, tiene algunas desventajas como la pobre penetración en profundidad con respecto a la dispersión de la luz en imágenes de muestras in vivo. Otra desventaja es que existe falta de información sobre la toxicidad in vivo a largo plazo y la seguridad de nanopartículas de oro en la clínica

también es cuestionable (Wu *et al.*, 2019). Sin embargo, el uso de SERS con nanopartículas de oro tiene ventajas debido a la alta sensibilidad y especificidad en la señal detectada (Li *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

Otras técnicas como la terapia fototérmica con nanopartículas de oro, permite la oscilación de los electrones en el plasmón superficial, lo cual convierten la luz en calor. Algunos estudios han funcionalizado las nanopartículas de oro con distintos polímeros biocompatibles y con moléculas como el ácido fólico, obteniendo buenos resultados en pruebas clínicas (Kesharwani *et al.*, 2019).

Experimentos realizados en células B16F10, MCF-7, A549 y HNGC-2 han mostrado que las nanopartículas de oro son biocompatibles y no presentan citotoxicidad. Sin embargo, al conjugarlas con doxetaxel generan inhibición, esto indica que son un buen vehículo para la entrega de fármacos (Patra *et al.*, 2015).

Nuestros resultados respecto a ensayos in vitro con nanoestrellas de oro “bare” y funcionalizadas con ácido fólico y el 4-aminotiofenol como linker, indican que no presentan efectos citotóxicos en células MCF7 de cáncer de mama. Lo anterior sugiere que pueden ser usados como plataformas para la entrega de fármacos y como sistema de detección para el cáncer mediante el uso de SERS. Por otra parte, la señal obtenida en SERS indica la presencia del ácido fólico y la unión con el 4-aminotiofenol, y que es podría ser posible su uso como nanoacarreadores.

Algunos otros análisis con nanopartículas de oro han mostrado diferencias entre pacientes con cáncer y pacientes sanos, manifestando diferencias significativas en la intensidad de las señales obtenidas. Los niveles de biomarcadores detectados se

correlacionan con la histología y desarrollo del tumor, el tamaño, la masa y el grado de expresión, contribuyendo a la detección de cáncer de pulmón, ovario, cérvico-uterino y otros tipos de cáncer (Gao *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019). Encontrar estas diferencias es posible debido a las vibraciones específicas de las moléculas presentes en las muestras, lo que sugiere que el uso de nanopartículas de oro en conjunto con técnicas de microscopia de súper resolución y técnicas como el SERS puedan ser útiles para el diagnóstico del cáncer y otras enfermedades (Wu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018)

Por otra parte, uno de los concernientes en torno al uso de los nanomateriales es la toxicidad a largo plazo. En el caso de las nanopartículas de oro, esto puede ser descartado, debido a su biocompatibilidad y la falta de especificidad, sin embargo, se pueden modificar sus propiedades en el proceso de síntesis (Yang *et al.*, 2019). Esto concuerda con nuestros resultados, ya que la fabricación y la funcionalización, no mostraron efectos citotóxicos en las células.

Los resultados de nuestra investigación arrojan que es posible la síntesis de nanoestrellas de oro mediante el uso de reactivos no tóxicos, como alternativa a los procesos de síntesis en los cuales los agentes reductores residuales generan citotoxicidad. No obstante, las nanopartículas obtenidas son bastante grandes, alrededor de 800 nm de diámetro. Por lo que probablemente no sería posible su uso para la entrega de fármacos. A pesar de ello, es posible mejorar y controlar el proceso de síntesis para obtener un tamaño y propiedades deseadas.

Otro aspecto importante que considerar en la síntesis y el uso de las nanoestrellas de oro es el proceso de eliminación ya que se ha demostrado que nanopartículas muy pequeñas son eliminadas en poco tiempo incluso antes de la terapia, principalmente por vía renal. Por otra parte, si tienen un tamaño más grande, tienen una mejor resolución en diagnóstico por imagen, tienen mejor habilidad de absorción y alta eficiencia fototérmica porque necesitan menos energía para matar un tumor, por lo que es necesario que la síntesis genere nanopartículas del tamaño deseado según las necesidades y las propiedades que se buscan (Yang *et al.*, 2019; Borran *et al.*, 2018).

En el presente trabajo se sintetizaron nanoestrellas de oro funcionalizadas con ácido fólico y 4-aminotiofenol, mostrando buena señal de detección por espectroscopia Raman-SERS, con biocompatibilidad y libre de agentes reductores citotóxicos. Este tipo de síntesis y técnicas de detección generan una ventana de oportunidad para hacer más eficiente el sistema de entrega de fármacos sitio-dirigido, así como su potencial uso como arreglos para la detección de diversos biomarcadores para el cáncer.

XI. Referencias

- Abdelaziz, H. M., Gaber, M., Abd-Elwakil, M. M., Mabrouk, M. T., Elgohary, M. M., Kamel, N. M., ... Elzoghby, A. O. (2018). Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates. *Journal of Controlled Release*, 269(October 2017), 374–392. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.036>
- Abildgaard, C., & Guldborg, P. (2015). Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. *Trends in Molecular Medicine*, 21(3), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.007>
- Alaqad, K., & Saleh, T. A. (2016). Gold and Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Characterization Routes and Applications towards Drugs. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 6(4), 1–10. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000384>
- Ali, Z. A., Yahya, R., Sekaran, S. D., & Puteh, R. (2016). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Apple Extract and Its Antibacterial Properties, 2016.
- Amanda J. Redig, S. S. M. (2013). Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis, 274(2), 113–126. <https://doi.org/10.1111/joim.12084>.Breast
- Annu, Ahmed, S., Kaur, G., Sharma, P., Singh, S., & Ikram, S. (2018). Evaluation of the antioxidant, antibacterial and anticancer (lung cancer cell line A549) activity of: Punica granatum mediated silver nanoparticles. *Toxicology Research*, 7(5), 923–930. <https://doi.org/10.1039/c8tx00103k>
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M., & Paknikar, K. M. (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236(3), 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.02.020>
- Arora, Sumit, Rajwade, J. M., & Paknikar, K. M. (2012). Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(2), 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.010>
- Arora, Sumit, Tyagi, N., Bhardwaj, A., Rusu, L., Palanki, R., Vig, K., ... Singh, S. (2015). Silver nanoparticles protect human keratinocytes against UVB radiation-induced DNA damage and apoptosis: potential for prevention of skin carcinogenesis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(5), 1265–1275. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.02.024>
- Arumai Selvan, D., Mahendiran, D., Senthil Kumar, R., & Kalilur Rahiman, A. (2018). Garlic, green tea and turmeric extracts-mediated green synthesis of silver nanoparticles: Phytochemical, antioxidant and in vitro cytotoxicity studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180(2017), 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.02.014>
- Ascenso, A., Raposo, S., Batista, C., Cardoso, P., Mendes, T., Praça, F. G., ... Simões, S. (2015). Development, characterization, and skin delivery studies of related

ultradeformable vesicles: Transfersomes, ethosomes, and transethosomes. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 5837–5851. <https://doi.org/10.2147/IJN.S86186>

- AshaRani, P., Sethu, S., Lim, H., Balaji, G., Valiyaveetil, S., & Hande, M. P. (2012). Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. *Genome Integrity*, 3(1), 2. <https://doi.org/10.1186/2041-9414-3-2>
- Azizi, M., Ghourchian, H., Yazdian, F., Bagherifam, S., Bekhradnia, S., & Nyström, B. (2017). Anti-cancerous effect of albumin coated silver nanoparticles on MDA-MB 231 human breast cancer cell line. *Scientific Reports*, 7(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05461-3>
- Bagde, A., Mondal, A., & Singh, M. (2018). Drug delivery strategies for chemoprevention of UVB-induced skin cancer: A review. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 34(1), 60–68. <https://doi.org/10.1111/phpp.12368>
- Bassi, B. (2018). Tailored coating of gold nanostars: a rational approach to a prototype of theranostic device based on SERS and photothermal effects at ultralow irradiance, 0–4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1088/1478-3975/aa9768>
- Bello, B. A., Khan, S. A., Khan, J. A., Syed, F. Q., Mirza, M. B., Shah, L., & Khan, S. B. (2017). Anticancer, antibacterial and pollutant degradation potential of silver nanoparticles from *Hyphaene thebaica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490(3), 889–894. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.136>
- Berrocal, A., Cabañas, L., Espinosa, E., Fernández-de-Misa, R., Martín-Algarra, S., Martínez-Cedres, J. C., ... Rodríguez-Peralto, J. L. (2014). Melanoma: Diagnosis, Staging, and Treatment. Consensus group recommendations. *Advances in Therapy*, 31(9), 945–960. <https://doi.org/10.1007/s12325-014-0148-2>
- Bethu, M. S., Netala, V. R., Domdi, L., Tartte, V., & Janapala, V. R. (2018). Potential anticancer activity of biogenic silver nanoparticles using leaf extract of *Rhynchosia suaveolens*: an insight into the mechanism. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 1401(January). <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1414824>
- Blanco, J., Lafuente, D., Gómez, M., García, T., Domingo, J. L., & Sánchez, D. J. (2017). Polyvinyl pyrrolidone-coated silver nanoparticles in a human lung cancer cells: time- and dose-dependent influence over p53 and caspase-3 protein expression and epigenetic effects. *Archives of Toxicology*, 91(2), 651–666. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1773-0>
- Borran, A. A., Aghanejad, A., Farajollahi, A., Barar, J., & Omid, Y. (2018). Gold nanoparticles for radiosensitizing and imaging of cancer cells. *Radiation Physics and Chemistry*, 152(July), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2018.08.010>

- Brz??ska, K., M??czy??ska-Wielgosz, S., St??pkowski, T. M., & Kruszewski, M. (2015). Adaptation of HepG2 cells to silver nanoparticles-induced stress is based on the pro-proliferative and anti-apoptotic changes in gene expression. *Mutagenesis*, *30*(3), 431–439. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev001>
- Buttacavoli, M., Albanese, N. N., Di Cara, G., Alduina, R., Faleri, C., Gallo, M., ... Cancemi, P. (2018). Anticancer activity of biogenerated silver nanoparticles: an integrated proteomic investigation. *Oncotarget*, *9*(11), 9685–9705. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23859>
- Cai, L., Chen, Z.-Z., Chen, M.-Y., Tang, H.-W., & Pang, D.-W. (2013). MUC-1 aptamer-conjugated dye-doped silica nanoparticles for MCF-7 cells detection. *Biomaterials*, *34*(2), 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.084>
- Cai, Y., Cao, C., He, X., Yang, C., Tian, L., Zhu, R., & Pan, Y. (2015). Enhanced magnetic resonance imaging and staining of cancer cells using ferrimagnetic H-ferritin nanoparticles with increasing core size. *International Journal of Nanomedicine*, *10*, 2619–2634. <https://doi.org/10.2147/IJN.S80025>
- Cardoso, V. S., de Carvalho Filgueiras, M., Dutra, Y. M., Teles, R. H. G., de Araújo, A. R., Primo, F. L., ... dos Santos, J. R. (2017). Collagen-based silver nanoparticles: Study on cell viability, skin permeation, and swelling inhibition. *Materials Science and Engineering C*, *74*, 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.025>
- Carter, P., Narasimhan, B., & Wang, Q. (2019). Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. *International Journal of Pharmaceutics*, *555*(November 2018), 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.032>
- Castro-Aceituno, V., Ahn, S., Simu, S. Y., Singh, P., Mathiyalagan, R., Lee, H. A., & Yang, D. C. (2016). Anticancer activity of silver nanoparticles from Panax ginseng fresh leaves in human cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *84*, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.016>
- Chen, X., Zhang, Y., Tang, C., Tian, C., Sun, Q., Su, Z., ... Zhang, C. (2017). Co-delivery of paclitaxel and anti-survivin siRNA via redox-sensitive oligopeptide liposomes for the synergistic treatment of breast cancer and metastasis. *International Journal of Pharmaceutics*, *529*(1–2), 102–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.071>
- Choi, J. H., Min, W. K., Gopal, J., Lee, Y. M., Muthu, M., Chun, S., & Oh, J. W. (2018). Silver nanoparticle-induced hormesis of astrogloma cells: A Mu-2-related death-inducing protein-orchestrated modus operandi. *International Journal of Biological Macromolecules*, *117*, 1147–1156. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.234>
- Chugh, H., Sood, D., Chandra, I., Tomar, V., Dhawan, G., & Chandra, R. (2018). Role of gold and silver nanoparticles in cancer nano-medicine. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *0*(0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1449118>

- Cryer, A. M., & Thorley, A. J. (2019). Nanotechnology in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, *198*, 189–205. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.010>
- Dai, W., Wang, X., Song, G., Liu, T., He, B., Zhang, H., ... Zhang, Q. (2017). Combination antitumor therapy with targeted dual-nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *115*, 23–45. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.03.001>
- Danciu, C., Pinzaru, I., Coricovac, D., Andrica, F., Sizemore, I., Dehelean, C., ... Radeke, H. (2019). Betulin silver nanoparticles qualify as efficient antimelanoma agents in in vitro and in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *134*(November 2018), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.11.006>
- de Golian, E., Kwong, B. Y., Swetter, S. M., & Pugliese, S. B. (2016). Cutaneous Complications of Targeted Melanoma Therapy. *Current Treatment Options in Oncology*, *17*(11). <https://doi.org/10.1007/s11864-016-0434-0>
- Diaz, R. J., McVeigh, P. Z., O'Reilly, M. A., Burrell, K., Bebenek, M., Smith, C., ... Rutka, J. T. (2014). Focused ultrasound delivery of Raman nanoparticles across the blood-brain barrier: Potential for targeting experimental brain tumors. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *10*(5), e1075–e1087. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.12.006>
- Dummer, R., Schadendorf, D., Ascierto, P. A., Larkin, J., Lebbé, C., & Hauschild, A. (2015). Integrating first-line treatment options into clinical practice: What's new in advanced melanoma? *Melanoma Research*, *25*(6), 461–469. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000200>
- Dykman, L. A., Staroverov, S. A., Fomin, A. S., Khanadeev, V. A., Khlebtsov, B. N., & Bogatyrev, V. A. (2018). Gold nanoparticles as an adjuvant: Influence of size, shape, and technique of combination with CpG on antibody production. *International Immunopharmacology*, *54*(November 2017), 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.008>
- El-Hussein, A., & Hamblin, M. R. (2017). ROS generation and DNA damage with photo-inactivation mediated by silver nanoparticles in lung cancer cell line. *IET Nanobiotechnology*, *11*(2), 173–178. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0083>
- Escrivá-de-Romaní, S., Arumí, M., Bellet, M., & Saura, C. (2018). HER2-positive breast cancer: Current and new therapeutic strategies. *The Breast*, *39*, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2018.03.006>
- Foldbjerg, R., Dang, D. A., & Autrup, H. (2011). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology*, *85*(7), 743–750. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0545-5>
- Ganipineni, L. P., Danhier, F., & Prétat, V. (2018). Drug delivery challenges and future of chemotherapeutic nanomedicine for glioblastoma treatment. *Journal of Controlled*

Release, 281(March), 42–57. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.008>

- Gao, W., Wang, W., Yao, S., Wu, S., Zhang, H., Zhang, J., ... Zhao, J. (2017). Highly sensitive detection of multiple tumor markers for lung cancer using gold nanoparticle probes and microarrays. *Analytica Chimica Acta*, 958, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.12.016>
- Ghoshal, G. (2017). Nanomedicine & Nanotechnology Rapid Green Synthesis of Silver Nanoparticles (AgNPs) Using (Prunus persica) Plants extract: Exploring its Antimicrobial and Catalytic Activities, 8(4). <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000452>
- Gluga, A. R., Skoglund, S., Odnevall Wallinder, I., Fadeel, B., & Karlsson, H. L. (2014). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: The role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-11>
- Gonçalves, D. P. N., Rodriguez, R. D., Kurth, T., Bray, L. J., Binner, M., Jungnickel, C., ... Werner, C. (2017). Enhanced targeting of invasive glioblastoma cells by peptide-functionalized gold nanorods in hydrogel-based 3D cultures. *Acta Biomaterialia*, 58, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.05.054>
- Gupta, U., Sharma, S., Khan, I., Gothwal, A., Sharma, A. K., Singh, Y., ... Kumar, V. (2017). Enhanced apoptotic and anticancer potential of paclitaxel loaded biodegradable nanoparticles based on chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 810–819. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.030>
- Gurunathan, S., Jeong, J. K., Han, J. W., Zhang, X. F., Park, J. H., & Kim, J. H. (2015). Multidimensional effects of biologically synthesized silver nanoparticles in Helicobacter pylori, Helicobacter felis, and human lung (L132) and lung carcinoma A549 cells. *Nanoscale Research Letters*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0747-0>
- Hadrup, N., Loeschner, K., Mortensen, A., Sharma, A. K., Qvortrup, K., Larsen, E. H., & Lam, H. R. (2012). The similar neurotoxic effects of nanoparticulate and ionic silver in vivo and in vitro. *Neurotoxicology*, 33(3), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.04.008>
- Han, X., Li, H., Zhang, Y., Qin, J., Yang, Q., Wang, L., ... Xia, C. (2017). Brain lipid-binding protein promotes proliferation and modulates cell cycle in C6 rat glioma cells. *International Journal of Oncology*, 51(5), 1439–1448. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4132>
- He, Y., Du, Z., Ma, S., Liu, Y., Li, D., Huang, H., ... Zheng, X. (2016). Effects of green-synthesized silver nanoparticles on lung cancer cells in vitro and grown as xenograft tumors in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 1879–1887. <https://doi.org/10.2147/IJN.S103695>
- Heidari, Z., Salehzadeh, A., Sadat Shandiz, S. A., & Tajdoost, S. (2018). Anti-cancer

- and anti-oxidant properties of ethanolic leaf extract of *Thymus vulgaris* and its bio-functionalized silver nanoparticles. 3 *Biotech*, 8(3), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1199-x>
- Helen J. Mackay, MD, Lari Wenzel, PhD, and Linda Mileschkin, M. (2016). HHS Public Access. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2015, 42–50. <https://doi.org/10.14694/EdBook>
- Homet, B., & Ribas, A. (2014). New drug targets in metastatic melanoma. *The Journal of Pathology*, 232(2), 134–141. <https://doi.org/10.1002/path.4259>
- Jha, D., Thiruveedula, P. K., Pathak, R., Kumar, B., Gautam, H. K., Agnihotri, S., ... Kumar, P. (2017). Multifunctional biosynthesized silver nanoparticles exhibiting excellent antimicrobial potential against multi-drug resistant microbes along with remarkable anticancerous properties. *Materials Science and Engineering C*, 80, 659–669. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.011>
- Jha, M., & Shimpi, N. G. (2018). Green synthesis of zero valent colloidal nanosilver targeting A549 lung cancer cell: In vitro cytotoxicity. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.12.001>
- Kao, H.-W., Lin, Y.-Y., Chen, C.-C., Chi, K.-H., Tien, D.-C., Hsia, C.-C., ... Wang, H.-E. (2013). Evaluation of EGFR-targeted radioimmuno-gold-nanoparticles as a theranostic agent in a tumor animal model. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23, 3180–3185. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.04.002>
- Karim, R., Palazzo, C., Evrard, B., & Piel, G. (2016). Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art. *Journal of Controlled Release*, 227, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.026>
- Kesharwani, P., Choudhury, H., Meher, J. G., Pandey, M., & Gorain, B. (2019). Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as promising nanocarriers for anticancer therapeutics and imaging. *Progress in Materials Science*, 103(March), 484–508. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2019.03.003>
- Keyvan Rad, J., Reza Mahdavian, A., Khoei, S., & Shirvalilou, S. (2018). Enhanced photogeneration of reactive oxygen species and targeted photothermal therapy of C6 glioma brain cancer cells by folate-conjugated gold-photoactive polymer nanoparticles. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b05252>
- Khan, S. U., Saleh, A., Wahab, A., & Khan, W. U. (2018). Nanosilver : new ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold, 733–762. <https://doi.org/10.2147/IJN.S153167>
- Kong RM, Zhang XB, Chen Z, T. W. (2011). Aptamer-asssembled nanomaterials for biosensing and biomedical applications. *Nano, Micro, Small*, (7), 2428–2436.
- Kumar-Krishnan, S., Prokhorov, E., Arias de Fuentes, O., Ramírez, M., Bogdanchikova, N., Sanchez, I. C., ... Luna-Bárcenas, G. (2015). Temperature-induced Au

- nanostructure synthesis in a nonaqueous deep-eutectic solvent for high performance electrocatalysis. *J. Mater. Chem. A*, 3(31), 15869–15875. <https://doi.org/10.1039/C5TA02606G>
- Kummara, S., Patil, M. B., & Uriah, T. (2016). Synthesis, characterization, biocompatible and anticancer activity of green and chemically synthesized silver nanoparticles – A comparative study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.003>
- L., F., & H.-T., K. (2016). Nanomaterials incorporated ultrasound contrast agents for cancer theranostics. *Cancer Biology and Medicine*, 13(3), 313–324. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0065>
- Lam, S. W., Jimenez, C. R., & Boven, E. (2014). Breast cancer classification by proteomic technologies: Current state of knowledge. *Cancer Treatment Reviews*, 40(1), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.06.006>
- Lebda, M. A., Sadek, K. M., Tohamy, H. G., Abouzed, T. K., Shukry, M., Umezawa, M., & El-Sayed, Y. S. (2018). Potential role of α -lipoic acid and Ginkgo biloba against silver nanoparticles-induced neuronal apoptosis and blood-brain barrier impairments in rats. *Life Sciences*, 212(September), 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.011>
- Lee, H.-Y., Mohammed, K. A., & Nasreen, N. (2016). Nanoparticle-based targeted gene therapy for lung cancer. *American Journal of Cancer Research*, 6(5), 1118–1134. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27294004> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4889725>
- Lee, J. H., Yigit, M. V, Mazumdar, D., & Lu, Y. (2010). Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 592–605. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.003>
- Lee, Y. S., Kim, D. W., Lee, Y. H., Oh, J. H., Yoon, S., Choi, M. S., ... Song, C. W. (2011). Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKC ζ -dependent signaling in A549 lung cells. *Archives of Toxicology*, 85(12), 1529–1540. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0714-1>
- Li, J., Wang, Y., Liang, R., An, X., Wang, K., Shen, G., ... Tao, J. (2015). Recent advances in targeted nanoparticles drug delivery to melanoma. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(3), 769–794. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.11.006>
- Li, Yan, Qin, T., Ingle, T., Yan, J., He, W., Yin, J. J., & Chen, T. (2017). Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Archives of Toxicology*, 91(1), 509–519. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1730-y>
- Li, Yangyang, Wei, Q., Ma, F., Li, X., Liu, F., & Zhou, M. (2018). Surface-enhanced Raman nanoparticles for tumor theranostics applications. *Acta Pharmaceutica*

Sinica B, 8(3), 349–359. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.03.007>

- Liang, C., Sun, W., He, H., Zhang, B., Ling, C., Wang, B., ... Guo, Y. (2018). Antitumor effect of a new nano-vector with miRNA-135a on malignant glioma. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 209–220. <https://doi.org/10.2147/IJN.S148142>
- Liang, P., Shi, H., Zhu, W., Gui, Q., Xu, Y., Meng, J., ... Chen, H. (2017). Silver nanoparticles enhance the sensitivity of temozolomide on human glioma cells. *Oncotarget*, 8(5), 7533–7539. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13503>
- Liedtke, C., & Kiesel, L. (2012). Breast cancer molecular subtypes - Modern therapeutic concepts for targeted therapy of a heterogeneous entity. *Maturitas*, 73(4), 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2012.08.006>
- Liu, Y., Yuan, H., Kersey, F. R., Register, J. K., Parrott, M. C., & Vo-Dinh, T. (2015). Plasmonic gold nanostars for Multi-Modality sensing and diagnostics. *Sensors (Switzerland)*, 15(2), 3706–3720. <https://doi.org/10.3390/s150203706>
- Mahajan, P. G., Dige, N. C., Vanjare, B. D., Eo, S. H., Seo, S. Y., Kim, S. J., ... Lee, K. H. (2019). A potential mediator for photodynamic therapy based on silver nanoparticles functionalized with porphyrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 377(January), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.03.034>
- Majeed, S., Bakhtiar, N. F. B., Danish, M., Mohamad Ibrahim, M. N., & Hashim, R. (2019). Green approach for the biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial and antitumor effect against osteoblast MG-63 and breast MCF-7 cancer cell lines. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 12(December 2018), 100138. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100138>
- Malik, P., & Mukherjee, T. K. (2018). Recent advances in gold and silver nanoparticle based therapies for lung and breast cancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 553(1–2), 483–509. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.048>
- Mangal, S., Gao, W., Li, T., & Zhou, Q. T. (2017). Pulmonary delivery of nanoparticle chemotherapy for the treatment of lung cancers: Challenges and opportunities. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(6), 782–797. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.34>
- Marques, Catarina Jose MF, Ferreira Ecaterina, Andronescu Ficai, Denisa Sonmez, Maria Ficai, A. (2014). Multifunctional materials for bone cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 2713–2725. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S55943>
- Mathur, P., Jha, S., Ramteke, S., & Jain, N. K. (2017). Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 0(0), 1–12. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1414825>
- Maverakis, E., Cornelius, L. A., Bowen, G. M., Phan, T., Patel, F. B., Fitzmaurice, S., ... Patel, F. (2015). Metastatic melanoma – A review of current and future treatment

options. *Acta Dermato-Venereologica*, 95(5), 516–524.
<https://doi.org/10.2340/00015555-2035>

- McArthur, H. L., & Page, D. B. (2016). Immunotherapy for the treatment of breast cancer: checkpoint blockade, cancer vaccines, and future directions in combination immunotherapy. *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O*, 14(11), 922–933. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27930644>
- McGillicuddy, E., Murray, I., Kavanagh, S., Morrison, L., Fogarty, A., Cormican, M., ... Morris, D. (2017). Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of the Total Environment*, 575, 231–246.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>
- Meng, H.-M., Fu, T., Zhang, X.-B., & Tan, W. (2015). Cell-SELEX-based aptamer-conjugated nanomaterials for cancer diagnosis and therapy. *National Science Review*, 2, 71–84. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwv001>
- Michielin, O., & Hoeller, C. (2015). Gaining momentum: New options and opportunities for the treatment of advanced melanoma. *Cancer Treatment Reviews*, 41(8), 660–670. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.05.012>
- Mincey, B. A., & Perez, E. A. (2004). Advances in Screening, Diagnosis, and Treatment of Breast Cancer. *Mayo Clinic Proceedings*, 79(6), 810–816.
<https://doi.org/10.4065/79.6.810>
- Moldovan, B., David, L., Vulcu, A., Olenic, L., Perde-Schrepler, M., Fischer-Fodor, E., ... Filip, G. A. (2017). In vitro and in vivo anti-inflammatory properties of green synthesized silver nanoparticles using *Viburnum opulus* L. fruits extract. *Materials Science and Engineering C*, 79, 720–727.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.122>
- Monteiro, I.-P., Califano, R., Mountzios, G., & de Mello, R. A. (2016). Immunotherapy with checkpoint inhibitors for lung cancer: novel agents, biomarkers and paradigms. *Future Oncology*, 12(4), 551–564. <https://doi.org/10.2217/fon.15.309>
- Mota, A. H., Rijo, P., Molpeceres, J., & Reis, C. P. (2017). Broad overview of engineering of functional nanosystems for skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(2), 710–728. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.078>
- Nayak, D., Pradhan, S., Ashe, S., Rauta, P. R., & Nayak, B. (2015). Biologically synthesised silver nanoparticles from three diverse family of plant extracts and their anticancer activity against epidermoid A431 carcinoma. *Journal of Colloid and Interface Science*, 457, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.07.012>
- Ng, C.-T., Li, J. J., Bay, B.-H., & Yung, L.-Y. L. (2010). Current Studies into the Genotoxic Effects of Nanomaterials. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 1–12.
<https://doi.org/10.4061/2010/947859>
- Nima, Z. A., Alwbari, A. M., Dantuluri, V., Hamzah, R. N., Sra, N., Motwani, P., ... Biris,

- A. S. (2017). Targeting nano drug delivery to cancer cells using tunable, multi-layer, silver-decorated gold nanorods. *Journal of Applied Toxicology*, 37(12), 1370–1378. <https://doi.org/10.1002/jat.3495>
- Niska, K., Zielinska, E., Radomski, M. W., & Inkielewicz-Stepniak, I. (2018). Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells. *Chemico-Biological Interactions*, 295, 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.018>
- Nounou, M. I., ElAmrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S., & Syed-Sha-Qhattal, H. (2015). Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 9(Suppl 2), 17–34. <https://doi.org/10.4137/BCBCR.S29420>
- Olov, N., Bagheri-Khoulenjani, S., & Mirzadeh, H. (2018). Combinational drug delivery using nanocarriers for breast cancer treatments: A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36410>
- Olszanski, A. J. (2014). Current and Future Roles of Targeted Therapy and Immunotherapy in Advanced Melanoma. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 20(4), 346–356. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2014.20.4.346>
- Palam, I. E., Arcadio, V., Amone, S. D., Biasiucci, M., Gigli, G., & Cortese, B. (2017). Therapeutic PCL scaffold for reparation of resected osteosarcoma defect, (September), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12824-3>
- Patra, S., Mukherjee, S., Barui, A. K., Ganguly, A., Sreedhar, B., & Patra, C. R. (2015). Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. *Materials Science and Engineering C*, 53, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.048>
- Pimentel, R. G. C., Robles Botero, V., Martínez, E. S. M., Gómez García, C., & Hinestroza, J. P. (2016). Soybean agglutinin-conjugated silver nanoparticles nanocarriers in the treatment of breast cancer cells. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(3), 218–234. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1116892>
- Pinel, S., Thomas, N., Boura, C., & Barberi-Heyob, M. (2019). Approaches to physical stimulation of metallic nanoparticles for glioblastoma treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 138, 344–357. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.013>
- Pooja, D., Panyaram, S., Kulhari, H., Reddy, B., Rachamalla, S. S., & Sistla, R. (2015). Biocompatible Drug Delivery Carrier. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.022>
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., ... Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*, 24, S26–S35. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.008>

- Prow, T. W., Grice, J. E., Lin, L. L., Faye, R., Butler, M., Becker, W., ... Roberts, M. S. (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), 470–491. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.012>
- Ramamurthy, C., Godwin, J. L., & Borghaei, H. (2017). Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: What Line of Therapy and How to Choose? *Current Treatment Options in Oncology*, 18(6). <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0476-y>
- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C. R., & Alaibac, M. (2014). Melanoma : Epidemiology , Risk Factors , Pathogenesis , Diagnosis and Classification. *In Vivo (Athens, Greece)*, 1012(6), 1005–1011. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25398793>
- Rimas Orentas, James W. Hodge, B. D. J. (2008). Cancer Vaccines and Tumor Immunity Cancer Vaccines and Tumor. In *Cancer Vaccines and Tumor Immunity Cancer Vaccines and Tumor*. <https://doi.org/10.1002/9780470170113.fmatter>
- Rodríguez-Razón, C. M., Yañez-Sánchez, I., Ramos-Santillan, V. O., Velásquez-Ordóñez, C., Gutiérrez-Rubio, S. A., García-García, M. R., ... García-Iglesias, T. (2018). Adhesion, proliferation, and apoptosis in different molecular portraits of breast cancer treated with silver nanoparticles and its pathway-network analysis. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 1081–1095. <https://doi.org/10.2147/IJN.S152237>
- Saber, M. M., Mirtajani, S. B., & Karimzadeh, K. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using *Trapa natans* extract and their anticancer activity against A431 human skin cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47(August), 375–379. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.08.004>
- Sanchez, K., Page, D., & McArthur, H. L. (2016). Immunotherapy in breast cancer: An overview of modern checkpoint blockade strategies and vaccines. *Current Problems in Cancer*, 40(2–4), 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2016.09.009>
- Séhédic, D., Cikankowitz, A., Hindré, F., Davodeau, F., & Garcion, E. (2015). Nanomedicine to overcome radioresistance in glioblastoma stem-like cells and surviving clones. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(4), 236–252. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.02.002>
- Shan, F., Zhang, X.-Y., Fu, X.-C., Zhang, L.-J., Su, D., Wang, S.-J., ... Zhang, T. (2017). Investigation of simultaneously existed Raman scattering enhancement and inhibiting fluorescence using surface modified gold nanostars as SERS probes. *Scientific Reports*, 7(1), 6813. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07311-8>
- Sierra Rivera, C. A., Franco Molina, M. A., Mendoza Gamboa, E., Zapata Benavides, P., Tamez Guerra, R. S., & Rodriacute guez Padilla, C. (2013). Potential of colloidal or silver nanoparticles to reduce the growth of B16F10 melanoma tumors. *African Journal of Microbiology Research*, 7(22), 2745–2750. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1968>

- Silbergeld, D., Suryadevara, C. M., Verla, T., Sanchez-Perez, L., Reap, E. A., Choi, B. D., ... Sampson -, J. H. (2015). Immunotherapy for malignant glioma. *Surg Neurol Int.*, 6(Suppl 1), S68–S77. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.151341>
- Simões, M. C. F., Sousa, J. J. S., & Pais, A. A. C. C. (2015). Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Letters*, 357(1), 8–42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.001>
- Singh, A. K., Pandey, A., Tewari, M., Kumar, R., Sharma, A., Pandey, H. P., & Shukla, H. S. (2013). Prospects of nano-material in breast cancer management. *Pathology and Oncology Research*, 19(2), 155–165. <https://doi.org/10.1007/s12253-013-9609-1>
- Sthijns, M. M. J. P. E., Thongkam, W., Albrecht, C., Hellack, B., Bast, A., Haenen, G. R. M. M., & Schins, R. P. F. (2017). Silver nanoparticles induce hormesis in A549 human epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 40, 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.010>
- Talluri, S. V., Kuppusamy, G., Karri, V. V. S. R., Tummala, S., & Madhunapantula, S. R. V. (2016). Lipid-based nanocarriers for breast cancer treatment – comprehensive review. *Drug Delivery*, 23(4), 1291–1305. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1092183>
- Tang, Y., Wang, Y., Kiani, M. F., & Wang, B. (2016). *Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer*. *Clinical Breast Cancer*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.05.012>
- Tippayawat, P., Phromviyo, N., & Boueroy, P. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity, 1–15. <https://doi.org/10.7717/peerj.2589>
- Torabi, S.-F., & Lu, Y. (2014). Functional DNA nanomaterials for sensing and imaging in living cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 28, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.011>
- Uetsuki, K., Verma, P., Yano, T., Saito, Y., Ichimura, T., & Kawata, S. (2010). Experimental Identification of Chemical Effects in Surface Enhanced Raman Scattering of 4-Aminothiophenol †. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(16), 7515–7520. <https://doi.org/10.1021/jp9114805>
- Venugopal, K., Rather, H. A., Rajagopal, K., Shanthi, M. P., Sheriff, K., Illiyas, M., ... Maaza, M. (2017). Synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) for anticancer activities (MCF 7 breast and A549 lung cell lines) of the crude extract of *Syzygium aromaticum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 167, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.013>
- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., & Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, 20(5), 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.014>

- Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., & Huwyler, J. (2015). Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release*, *200*, 138–157. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>
- Wu, Y., Ali, M. R. K., Chen, K., Fang, N., & El-Sayed, M. A. (2019). Gold nanoparticles in biological optical imaging. *Nano Today*, *24*, 120–140. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2018.12.006>
- Xu, Z. P., Zeng, Q. H., Lu, G. Q., & Yu, A. B. (2006). Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science*, *61*(3), 1027–1040. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.06.019>
- Yang, G., Xiao, Z., Tang, C., Deng, Y., Huang, H., & He, Z. (2019). Recent advances in biosensor for detection of lung cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*, 111416. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111416>
- Yang, W., Liang, H., Ma, S., Wang, D., & Huang, J. (2019). Gold nanoparticle based photothermal therapy: Development and application for effective cancer treatment. *Sustainable Materials and Technologies*, *22*, e00109. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2019.e00109>
- Yeasmin, S., Datta, H. K., Chaudhuri, S., Malik, D., & Bandyopadhyay, A. (2017). In-vitro anti-cancer activity of shape controlled silver nanoparticles (AgNPs) in various organ specific cell lines. *Journal of Molecular Liquids*, *242*, 757–766. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.047>
- Ying, X., Wang, Y., Xu, H., Li, X., Yan, H., Tang, H., ... Li, Y. (2017). The construction of the multifunctional targeting ursolic acids liposomes and its apoptosis effects to C6 glioma stem cells. *Oncotarget*, *8*(38), 64129–64142. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19784>
- Youngren-ortiz, S. R., & Bpharm, M. B. C. (2017). The Daniel K . Inouye College of Pharmacy Scripts Targeted Nanocarrier Based Systems for the Treatment of Lung Cancer, *76*(11), 318–325.
- Yuan, Y.-G., Peng, Q.-L., & Gurunathan, S. (2017). Silver nanoparticles enhance the apoptotic potential of gemcitabine in human ovarian cancer cells: combination therapy for effective cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 12*, 6487–6502. <https://doi.org/10.2147/IJN.S135482>
- Yuan, Y., Cai, T., Xia, X., Zhang, R., Chiba, P., & Cai, Y. (2016). Nanoparticle delivery of anticancer drugs overcomes multidrug resistance in breast cancer. *Drug Delivery*, *23*(9), 3350–3357. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1178825>
- Zhang, K., Liu, X., Man, B., Yang, C., Zhang, C., Liu, M., ... Chen, C. (2018). Label-free and stable serum analysis based on Ag-NPs/PSi surface-enhanced Raman scattering for noninvasive lung cancer detection. *Biomedical Optics Express*, *9*(9), 4345. <https://doi.org/10.1364/boe.9.004345>

- Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>
- Zhang, X., & Xiao, C. (2018). Biofabrication of silver nanoparticles and their combined effect with low intensity ultrasound for treatment of lung cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 181(February), 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.03.004>
- Zhao, B., Zhang, W., Yu, D., Xu, J., & Wei, Y. (2017). Adoptive immunotherapy shows encouraging benefit on non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 8(68), 113105–113119. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19373>