

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTÓXICA INDUCIDA  
POR NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MODELOS IN VITRO DE  
LEUCEMIA**

T E S I S

que presenta para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS

**LNT. ALBERTO BLANCO SALAZAR**

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA

CODIRECTOR DE TESIS:  
DR. JUAN CARLOS GARCÍA RAMOS

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA

## ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTÓXICA INDUCIDA POR NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MODELOS IN VITRO DE LEUCEMIA

T E S I S

que presenta para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS

**LNT. ALBERTO BLANCO SALAZAR**

Aprobado por:



---

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



---

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



---

SINODAL  
DR. LUIS JESÚS VILLARREAL GÓMEZ  
Miembro del Comité



---

SINODAL  
DRA. MARÍA EVARISTA ARELLANO  
GARCÍA  
Miembro del Comité

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

**ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTÓXICA INDUCIDA POR NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MODELOS IN VITRO DE LEUCEMIA.**

Resumen aprobado por:



---

DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA  
Directora de tesis

**CUERPO DEL RESUMEN**

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y la incidencia en México es cada vez más alta. En nuestro país, el cáncer infantil y juvenil representa la segunda causa de muerte en menores de 17 años, donde la leucemia corresponde a la mitad de estos casos. Las terapias actuales son cada vez menos efectivas debido a la resistencia que han generado las células transformadas, además de que los efectos secundarios de estos medicamentos van en aumento. El desarrollo de nuevos tratamientos que permitan combatir esta enfermedad sin comprometer la salud del paciente ha sido posible gracias al auge de la nanotecnología. Las nanopartículas de plata (AgNPs) han sido ampliamente reportadas como potenciales agentes anticancerígenos; sin embargo, el estudio profundo de sus efectos tanto en las células leucémicas como en las células sanas del organismo es aún necesario para continuar con su direccionamiento como alternativa terapéutica para combatir a esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue el evaluar la respuesta biológica *in vitro* de cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* en células de leucemia linfocítica humana *Jurkat* y murina *L1210*, para determinar su potencial como alternativas terapéuticas para el tratamiento de leucemia. Se comparó la actividad antiproliferativa de las AgNPs con el potencial citotóxico en cultivos primarios de bazo y médula de ratones BALB/c, así como en linfocitos de sangre periférica humana. Tanto en las líneas celulares de leucemia como en las células de cultivos

sanos se comparó la respuesta biológica de las AgNPs con AgNO<sub>3</sub> y el fármaco de primera elección, Imatinib. Los resultados mostraron que las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* tuvieron mayor actividad antileucémica con 5.5 mM de plata metálica en células *Jurkat* y *L1210*, siendo estas últimas más sensibles en viabilidad celular. Por su parte el AgNO<sub>3</sub> e Imatinib, mostraron valores de IC<sub>50</sub> más bajos que aquellos identificados para las AgNPs, siendo al menos 2 órdenes de magnitud más potentes que las formulaciones de *Argovit* en ambos modelos de células de leucemia linfocítica. Sin embargo, AgNO<sub>3</sub> e Imatinib también fueron al menos 717 y 262 veces más potentes que las formulaciones de *Argovit* para eliminar linfocitos de cultivos primarios sanos murinos y humanos, respectivamente, siendo que las AgNPs no condujeron a una disminución de viabilidad celular superior al 15% en linfocitos sanos. En conjunto, estos resultados muestran la selectividad citotóxica de las formulaciones de AgNPs *Argovit* en modelos linfocíticos tanto humanos como murinos, sentando los estudios preliminares para establecerlas como una alternativa de tratamiento de la leucemia.

Palabras clave: Leucemia, AgNPs, actividad antiproliferativa, citotoxicidad.

**ABSTRACT** of the thesis, presented by **ALBERTO BLANCO SALAZAR**, in order to obtain the **MASTER of SCIENCE**. Ensenada, Baja California, México. June 2022.

**ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY AND CYTOTOXICITY INDUCED BY SILVER NANOPARTICLES ON LEUKEMIA IN VITRO MODELS.**

Approved by:



---

DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA  
Thesis Advisor

**ABSTRACT BODY**

Cancer is one of the leading causes of death worldwide and there's increasing incidence in Mexico. In our country, childhood and juvenile cancer represents the second cause of death in children under 17 years, where leukemia represents half of these cases. Current therapies are not effective due to resistance generated by the transformed cells, in addition to side effects caused by these drugs. The development of new treatments that make it possible to combat this disease without compromising the patient's health has been possible thanks to the rise of nanotechnology. Silver nanoparticles (AgNPs) have been widely reported as potential anticancer agents; however, the in-depth study of its effects on both leukemia and healthy cells is still necessary. The objective of this work was to evaluate the *in vitro* biological response of five *Argovit* AgNPs formulations in human *Jurkat* and murine *L1210* lymphocytic leukemia cells, to determine their potential as therapeutic alternatives for the treatment of leukemia. The antiproliferative activity of AgNPs was compared with the cytotoxic potential in primary cultures of spleen and bone marrow from BALB/c mice, as well as in human peripheral blood lymphocytes. In both cell models (transformed and normal cells), biological response of AgNPs was compared with AgNO<sub>3</sub> and the drug of first choice, Imatinib. The results showed that the five *Argovit* AgNPs formulations had greater antileukemic activity with 5.5 mM of metallic silver in *Jurkat* and *L1210* cells, the latter

being more sensitive in cellular viability. On the other hand, AgNO<sub>3</sub> and Imatinib showed lower IC<sub>50</sub> values than those identified for AgNPs, being at least 2 orders of magnitude more potent than *Argovit* formulations in both values of lymphocytic leukemia cells. However, AgNO<sub>3</sub> and Imatinib were also at least 717 and 262 times more potent than *Argovit* formulations killing lymphocytes from healthy human and murine primary cultures, respectively, with AgNPs not leading to a greater decrease than 15% in cell viability in healthy lymphocytes. Together, these results show the cytotoxic selectivity of *Argovit* AgNPs formulations in both human and murine lymphocytic models, establishing preliminary studies to consider them as an alternative treatment for leukemia.

Keywords: Leukemia, AgNPs, antiproliferative activity, cytotoxicity.

*“One, remember to look up at the stars and not down at your feet.  
Two, never give up work. Work gives you meaning  
and purpose, and life is empty without it.  
Three, if you are lucky enough to find love,  
remember it is there and don't throw it away.”*

Stephen Hawking

## **DEDICATORIA**

A mi hermano, Luis Adrián Blanco Salazar, quien siempre me ha acompañado incondicionalmente. Por enseñarme el valor de la familia, la importancia de la tolerancia y a nunca dejar de ser tú mismo. Por seguirme enseñando a ser mejor persona aún en tu ausencia.

A mi familia en CDMX:

A mi padre, Alberto Blanco Ochoa, por ser mi guía, por tus incontables consejos y por nunca dejar de velar por mí. Por enseñarme a continuar sin importar las circunstancias, por siempre mostrarme el camino y por enseñarme a crecer a pesar de la distancia.

A mi hermana mayor, María José Blanco Salazar, por tu compañía, por ser mi ejemplo y por tu empeño en cumplir tus metas. Por enseñarme a esforzarme para mejorar cada día, por demostrarme lo que significa la perseverancia, la constancia y el trabajo duro.

A mi hermana menor, Fátima Blanco Salazar, por tu apoyo, por ser mi confidente y por todas tus travesuras. Por enseñarme a sonreír a pesar de las adversidades, por demostrarme cómo superarlas y ser quien me hace reír de mis propias adversidades.

A mi familia en Ensenada:

A mi tutora, Yanis Toledano Magaña, por ser mi madre académica. Por enseñarme a hacer las cosas por los motivos correctos, por mostrarme el valor de la soledad y a buscar mi felicidad como una prioridad.

A mi cotutor, Juan Carlos García Ramos, por ser mi padre académico. Por enseñarme la importancia de equivocarme, el alcance de enseñar a los demás y a probar métodos diferentes para obtener resultados diferentes.

A mi amigo, Jesús Gabriel González Vega, por tus entrañables aventuras, por las anécdotas y experiencias vividas, por siempre escucharme y ser un verdadero amigo. Por enseñarme que la mejor inversión es trabajar en ti mismo.

A mi amigo, José Antonio Rodríguez Arenas, por formar parte del binomio maravilla, por ser mi compañero de desvelos y de ideas geniales. Por enseñarme a no preocuparme si algo no puede resolverse y a siempre defender mis ideales.

A mi amiga, Marylin Gil Martínez, por convertirte en un gran apoyo, por tus palabras y por siempre escucharme. Por enseñarme a hacerme valer y demostrar que todo es posible sin importar las adversidades.

A mi amigo, Felipe David Angeles Figueroa, por convertirte en mis manos en el laboratorio, por siempre buscar hacer las cosas bien y hacer lo correcto, por ser un excelente padawan y amigo. Por recordarme cómo era al iniciar en el laboratorio.

A mi amigo, Salvador Enrique Meneses Sagrero, por tus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio, por continuar dándonos clases a pesar de la distancia. Por hacerme ver cuánto he crecido.

A mi amigo, Brando Bringas Burgos, por tus palabras de aliento, por ser una imagen de lo que representa el futuro y demostrar que siempre hay algo que aprender de los demás. Por enseñarme el valor de la asertividad.

A mi profesora y sinodal, María Evarista Arellano García, por ser mi abuela académica, por tus experiencias y aportaciones en mi formación. Por enseñarme la importancia de simplificar los conceptos y enfocar los esfuerzos.

A todos quienes de alguna forma contribuyeron a mi formación profesional y personal.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al programa de posgrado MyDCI en Facultad de Ciencias, UABC

Al CONACyT (CVU 875372)

A mi directora de tesis, Dra. Yanis Toledano Magaña.

A mi codirector de tesis, Dr. Juan Carlos García Ramos.

A mis sinodales:

Dra. María Evarista Arellano García

Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez

Dra. Laura Susana Acosta Torres

Al Laboratorio de Nanomedicina y Nanotoxicología de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California y a sus miembros.

Al Laboratorio de Química Medicinal de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California y a sus miembros.

A Felipe David Ángeles Figueroa, por su ayuda en la obtención de resultados de microscopía de fluorescencia.

A la Red Internacional de Bionanotecnología con impacto en biomedicina, alimentación y bioseguridad del CONACyT y a sus miembros.

A mi familia y amigos, en Ensenada y en CDMX.

A todos quienes de alguna forma contribuyeron a mi formación profesional y personal.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
1.1 Cáncer	2
1.2 Leucemia	2
1.3 Tratamiento	3
<b>2. Justificación</b>	<b>5</b>
<b>3. Antecedentes</b>	<b>6</b>
3.1 Actividad antiproliferativa de AgNPs	6
3.2 Actividad antileucémica de AgNPs	6
<b>4. Marco teórico</b>	<b>8</b>
4.1 Cultivo celular	8
4.1.1 Líneas celulares	9
4.1.2 Cultivos primarios	9
4.2 Actividad antiproliferativa	9
4.3 Citotoxicidad	9
4.4 Determinación de viabilidad celular	9
4.4.1 Conteos celulares para determinar la viabilidad celular	10
4.4.2 Citometría de flujo	11
4.5 Concentración inhibitoria media (IC <sub>50</sub> )	12
4.6 Índice de selectividad	13
4.7 Potencia farmacológica	13
4.8 Estrés oxidativo	13
<b>5. Hipótesis</b>	<b>14</b>
<b>6. Objetivos</b>	<b>15</b>
6.1 Objetivo general	15
6.2 Objetivos específicos	15
<b>7. Metodología</b>	<b>16</b>
7.1 Formulaciones de AgNPs	16
7.2 Líneas celulares de leucemia linfocítica humana ( <i>Jurkat</i> ) y murina ( <i>L1210</i> )	16
7.2.1 Proliferación de líneas celulares de leucemia	16
7.2.2 Mantenimiento de cultivo de líneas celulares de leucemia	18
7.2.3 Pase de cultivo de líneas celulares de leucemia	23
7.3 Cultivos primarios de linfocitos humanos de sangre periférica	23
7.3.1 Extracción de sangre periférica humana por venopunción	18
7.3.2 Gradiente de ficoll para aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	19
7.3.3 Cultivo de linfocitos de sangre periférica humana	20

7.4 Cultivos primarios de ratones BALB/c	20
7.4.1 Disección de ratones BALB/c	20
7.4.2 Obtención y cultivo de células primarias de ratones BALB/c	20
7.5 Ensayo de actividad antiproliferativa en líneas celulares de leucemia	21
7.6 Ensayo de citotoxicidad en cultivos primarios de tejidos sanos	21
7.7 Determinación de viabilidad celular	22
7.7.1 Conteo en cámara de Neubauer con microscopio óptico	22
7.7.2 Conteo con contador celular automatizado <i>Corning CytoSMART</i>	23
7.7.3 Conteo con citómetro de flujo	23
7.8 Ensayo de producción de ROS mitocondriales por microscopía de fluorescencia	23
7.9 Procesamiento de imágenes de microscopía de fluorescencia	24
7.10 Análisis estadístico	24
7.11 Estimación de IC <sub>50</sub>	24
7.12 Análisis de potencia	25
7.13 Estimación del índice de selectividad y ventana de seguridad <i>in vitro</i>	25
<b>8. Resultados</b>	<b>27</b>
8.1 Actividad antiproliferativa en células <i>Jurkat</i>	27
8.2 Efecto citotóxico en linfocitos de sangre periférica humana	29
8.3 Análisis de potencia en los modelos linfocíticos humanos	31
8.4 Análisis del índice de selectividad y ventana de seguridad <i>in vitro</i> en los modelos linfocíticos humanos	37
8.5 Actividad antiproliferativa en células <i>LI210</i>	39
8.6 Efecto citotóxico en linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c	41
8.7 Análisis de potencia en los modelos linfocíticos murinos	44
8.8 Análisis del índice de selectividad y ventana de seguridad <i>in vitro</i> en los modelos linfocíticos murinos	49
8.9 Efecto citotóxico en monocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c	50
8.10 Análisis de potencia comparando con monocitos murinos	52
8.11 Análisis del índice de selectividad y ventana de seguridad <i>in vitro</i> comparando con monocitos murinos	56
8.12 Cuantificación de ROS mitocondriales en células <i>Jurkat</i>	57
8.13 Cuantificación de ROS mitocondriales en células <i>LI210</i>	59
<b>9. Discusión</b>	<b>62</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>66</b>

<b>Bibliografía</b>	<b>69</b>
<b>Apéndice</b>	<b>74</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1. Cámara de Neubauer o hematocitómetro.	10
2. Sistemas de fluidos, óptico y electrónico que componen un citómetro de flujo.	12
3. Viabilidad celular de la línea celular de leucemia linfocítica humana <i>Jurkat</i> después de 24 horas de tratamiento con las formulaciones de Argovit.	28
4. Viabilidad celular de cultivos primarios de linfocitos humanos después de 24 horas de tratamiento con las formulaciones de Argovit.	30
5. Comparación de los valores de IC <sub>50</sub> de la línea celular de leucemia linfocítica humana <i>Jurkat</i> y linfocitos de sangre periférica humana.	34
6. Comparación de la actividad antiproliferativa en leucemia linfocítica humana <i>Jurkat</i> de las formulaciones de Argovit en comparación con AgNO <sub>3</sub> e Imatinib.	36
7. Viabilidad celular de la línea celular de leucemia linfocítica murina <i>L1210</i> después de 24 horas de tratamiento con las formulaciones de Argovit.	40
8. Viabilidad celular de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con las formulaciones de Argovit.	43
9. Comparación de los valores de IC <sub>50</sub> de la línea celular de leucemia linfocítica murina <i>L1210</i> y cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratones BALB/c.	46
10. Comparación de la actividad antiproliferativa en leucemia linfocítica murina <i>L1210</i> de las formulaciones de Argovit en comparación con AgNO <sub>3</sub> e Imatinib.	48
11. Viabilidad celular de cultivos primarios de monocitos de bazo de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con las formulaciones de Argovit.	51
12. Comparación de los valores de IC <sub>50</sub> de la línea celular de leucemia linfocítica murina <i>L1210</i> y cultivos primarios de monocitos de bazo de ratones BALB/c.	54
13. Comparación de la actividad citotóxica en monocitos de cultivos primarios de ratones BALB/c de las formulaciones de Argovit en comparación con AgNO <sub>3</sub> e Imatinib.	55
14. Generación de ión superóxido en células de leucemia linfocítica humana <i>Jurkat</i> con la formulación AgNP4 de Argovit.	58
15. Generación de ión superóxido en células de leucemia linfocítica murina <i>L1210</i> con la formulación AgNP4 de Argovit.	61

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
1. Propiedades fisicoquímicas de las cinco formulaciones de AgNPs Argovit evalaudas en este trabajo.	17
2. Valores de IC <sub>50</sub> de las cinco formulaciones de AgNPs Argovit evalaudas en este trabajo.	33
3. Valores de potencia de las cinco formulaciones de AgNPs Argovit en células humanas evaluadas en este trabajo.	35
4. Valores de índice de selectividad e intervalos de ventana de seguridad <i>in vitro</i> de las cinco formulaciones de AgNPs Argovit determinadas en este trabajo.	38
5. Valores de óptica de las cinco formulaciones de AgNPs Argovit en células murinas evaluadas en este trabajo.	47

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Cáncer**

El cáncer es un término que se refiere al grupo de enfermedades que se caracterizan por el incremento descontrolado de células anormales en un organismo, que a través de diferentes mecanismos pueden invadir zonas adyacentes del cuerpo y esparcirse a otros órganos (Padillas-Raygiza, 2020) Actualmente, el cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial y afecta tanto a países desarrollados como a aquellos en vías de desarrollo. Corresponde a la segunda causa de muerte a nivel global, que de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) en 2018 cobró la vida de un estimado de 9.6 millones de personas, una de cada seis de las muertes que ocurrieron en ese año (Mohar-betancourt, 2017); (González-León, 2010); (World Health Organization, 2019).

En Latinoamérica se espera que la incidencia del cáncer se incremente hasta 1.7 millones de personas y que duplique su tasa de mortalidad para 2030, demostrando que el impacto futuro de esta enfermedad puede tener consecuencias devastadoras para los sistemas de salud de los países en desarrollo. Actualmente, en México los principales problemas de salud están relacionados con las enfermedades crónico-degenerativas (Mohar-betancourt, 2017); (González-León, 2010). De acuerdo con la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC, por sus siglas en inglés) el cáncer es la tercera principal causa de muerte, con más de 128,000 nuevos casos detectados anualmente en nuestro país. Si se alcanzan las proyecciones realizadas por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), entre el 2020 y 2030 se incrementará de forma alarmante el total de las personas que pueden desarrollar esta enfermedad (González-León, 2010).

## **1.2 Leucemia**

La leucemia es un término que se refiere al grupo de cánceres de células sanguíneas que se caracterizan por el incremento desproporcionado de leucocitos inmaduros en la médula. Dichas células anormales predominan por encima del resto de las células

hematopoyéticas normales impidiendo o nulificando su desarrollo (National Cancer Institute, 2020); (Santoyo-Sánchez, 2016); (Leukemia and lymphoma Society, 2020). De acuerdo con el Observatorio Global de Cáncer (GCO, por sus siglas en inglés), en 2018 la leucemia se ubicó entre los principales tipos de cáncer a escala global, con más de 437,000 nuevos casos detectados y 309,000 defunciones. De entre estos casos, la principal incidencia es de leucemia infantil, que representa la tercera parte de los cánceres pediátricos en el mundo. En México, el cáncer infantil representa la segunda causa de muerte de niños y jóvenes de entre 4 y 15 años. Se estima que anualmente se presentan entre 5 y 6 mil casos nuevos de cáncer en menores de 18 años, de los cuáles la leucemia representa el 50 por ciento (The Global Cancer Observatory, 2019); (MD Anderson Cancer Center, 2020); (Rivera-Luna, 2012); (Secretaría de Salud, 2019).

### **1.3 Tratamiento**

El tratamiento de una gran variedad de tipos de cánceres, incluida la leucemia, está basado en agentes quimioterapéuticos que son utilizados por sí solos o en combinación con radioterapia, inmunoterapia, cirugías o trasplantes. Sin embargo, casi todos los medicamentos que han resultado efectivos tienen el potencial de inducir efectos secundarios en los pacientes incluso a dosis menores a las requeridas con fines terapéuticos. Los agentes anti leucémicos pueden producir efectos en los periodos inmediatos posteriores a la toma del tratamiento o generar efectos que causen daños irreversibles y a largo plazo. Esto incrementa la morbilidad y mortalidad en pacientes que siguen este tipo de terapias (Rodríguez-Enríquez et al., 2009)

Por otro lado, la resistencia que han desarrollado las células anormales a los medicamentos de primera elección contra el cáncer es una de las principales causas del fallo en el tratamiento de muchos pacientes. Este problema no solo incrementa la recurrencia de la enfermedad, sino que es la principal causa de una gran cantidad de muertes entre los pacientes. De este modo, la toxicidad de los tratamientos, así como la resistencia a los mismos persisten como las principales limitantes para la terapia contra el cáncer (Vasan et al., 2019).

Esto resalta la importancia de la búsqueda de nuevas alternativas que resulten más específicas, permitiendo combatir a la enfermedad al eliminar las células anormales, pero distinguiendo de aquellas células sanas, y que a su vez elimine el riesgo de generación de resistencia por parte de las células cancerígenas. En este contexto, el auge de la nanotecnología ha permitido el desarrollo de la terapia dirigida de forma efectiva contra el cáncer, a través de innovadoras propuestas que disminuyen el riesgo del paciente y aumentan sus probabilidades de cura (Awasthi et al., 2018). De este modo, la nanotecnología tiene el potencial de generar agentes terapéuticos completamente nuevos y altamente efectivos que permitan combatir a la enfermedad sin disminuir la calidad de vida de los pacientes enfermos (Miranda et al., 2022).

## 2. JUSTIFICACIÓN

En México, la leucemia representa el 50% de las muertes por cáncer en menores de 18 años. Los tratamientos existentes para inhibir la proliferación de células anormales de leucemia no son del todo efectivos debido, principalmente, a la resistencia que este tipo de cáncer ha desarrollado. Adicionalmente, las terapias actuales tienen el inconveniente de inducir efectos secundarios debido a la alta toxicidad de los agentes quimioterapéuticos. De allí la importancia de evaluar nuevas alternativas de terapia para combatir este tipo de cáncer. Las nanopartículas de plata han sido ampliamente descritas por sus propiedades como agentes anticancerígenos. Sin embargo, para poder definir su potencial aplicación biomédica, es necesario estudiar a fondo su respuesta biológica para determinar sus posibles efectos adversos y poder describir los mecanismos de su funcionamiento.

La elección de los modelos *in vitro* para determinar la respuesta biológica inducida por la exposición a nanopartículas de plata es esencial para determinar la potencial aplicación de nanopartículas en el tratamiento de leucemias. En este sentido, la evaluación de la actividad antiproliferativa en líneas celulares de leucemia linfocítica de diferentes organismos, permitirá brindar un punto de comparación entre la respuesta obtenida en células leucémicas de ratón y de humano, además de formar parte de los estudios preliminares necesarios para sentar las bases que permitan definir la aplicabilidad de las nanopartículas de plata como terapia para esta enfermedad.

Del mismo modo, la elección del modelo de cultivos primarios para comparar los efectos adversos de las nanopartículas de plata en médula de ratones BALB/c y células mononucleares de sangre periférica humana, genera un punto de partida en la estandarización de evaluaciones de este tipo de tratamientos, permitiendo establecer una conexión entre la viabilidad del uso de cultivos primarios murinos para predecir el efecto citotóxico en células humanas y los parámetros necesarios para el desarrollo de los modelos murinos *in vivo*.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Actividad antiproliferativa de AgNPs**

La literatura ha reportado la actividad antiproliferativa de las nanopartículas de plata contra muchos tipos de líneas celulares de cáncer, incluida la leucemia. Recientemente, las nanopartículas de plata han mostrado actividad anticancerígena contra líneas celulares y asilados clínicos de pacientes con leucemia, identificando que la respuesta citotóxica a este tipo de terapia es dependiente del tamaño de las nanopartículas y de la concentración evaluada (Ávalos et al., 2015).

Todos los reportes sugieren que el principal mecanismo por el cual las nanopartículas de plata consiguen la inhibición del crecimiento de células anormales es el estrés oxidativo, en el cual la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la liberación de iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) juegan un papel fundamental en la inducción de los efectos citotóxicos observados (Ávalos et al., 2015; Wu et al., 2019). Sin embargo, se ha demostrado que los altos niveles de especies reactivas de oxígeno pueden perturbar el equilibrio redox intracelular e inducir un microambiente oxidante que conduce a efectos biológicos adversos. Por ejemplo, Jing y colaboradores reportaron que la generación de especies reactivas de oxígeno por parte de las nanopartículas de plata en conjunto con la disminución de los niveles de antioxidantes como el glutatión provocaron daños a los componentes celulares de células hepáticas de humano (Piao et al., 2011).

#### **3.2 Actividad antileucémica de AgNPs**

Rujanapun y colaboradores, evidenciaron que las nanopartículas de plata se distinguen por su actividad selectiva entre líneas celulares de leucemia y cultivos primarios de células hematopoyéticas humanas sanas. Estos resultados demuestran susceptibilidades diferenciales entre diferentes tipos celulares, lo que induce efectos que son específicos

(Rujanapun et al., 2015). Se demostró que las células mononucleares de sangre periférica humana presentan respuestas biológicas dependientes del tipo celular ya que, a diferencia de los linfocitos, los monocitos y macrófagos pueden acumular nanopartículas. Greulich y su equipo sugieren que la cantidad de plata intracelular desencadena la activación de las células fagocíticas a través de la liberación de iones de plata y la posterior generación de especies reactivas de oxígeno (Greulich et al., 2011).

La liberación de iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) y la elevada generación de especies reactivas de oxígeno suelen desencadenar daños en el material genético de las células, con indicadores genotóxicos como las aberraciones cromosómicas o la formación de micronúcleos. Sin embargo, nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) no indujeron daños cromosómicos ni formación de micronúcleos en ninguna de las dosis o tiempos probados por Nymark y su equipo en líneas celulares de TK6. Se sugiere que el recubrimiento protege a las células de interactuar con las nanopartículas lo que evita el daño genotóxico (Nymark et al., 2013).

## **4. MARCO TEÓRICO**

### **4.1 Cultivo celular**

El cultivo celular hace referencia a los métodos de laboratorio que permiten la proliferación, crecimiento y mantenimiento de células en condiciones fisiológicas para aplicaciones experimentales. El cultivo celular permite la generación de sistemas modelo para el estudio de biología celular, replicación de mecanismos de enfermedades o investigación de toxicidad de nuevos compuestos farmacológicos, brindando la posibilidad de manipular genes, componentes celulares y rutas moleculares. Estas ventajas del cultivo celular han permitido aplicarlas como herramientas para mejorar la evaluación de la eficacia de compuestos químicos, cosméticos y fármacos, para evaluar su citotoxicidad en tipos de células específicos. Las condiciones de cultivo celular varían ampliamente de acuerdo con el tipo de célula o aplicación específica; sin embargo, el entorno en general en el que se desarrollan consta del medio que suministra los nutrientes esenciales (aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, minerales), factores de crecimiento y un entorno fisicoquímico regulado (pH, temperatura, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>). Algunas células dependen del anclaje en la caja de cultivo, por lo que son cultivadas en un sustrato como un cultivo adherente o en monocapa, mientras que otras pueden cultivarse y crecer flotando en el medio como un cultivo en suspensión. De acuerdo con el origen de las células empleadas y la aplicación para la cual son destinadas, los cultivos se dividen en líneas celulares y cultivos primarios.

#### **4.1.1 Líneas celulares**

Las líneas celulares son poblaciones celulares inmortalizadas que derivan del subcultivo de una población de células primarias. En general tienen una vida útil limitada, por lo que no proliferan de forma indefinida. Sin embargo, debido a que son células transformadas poseen una mutación que les permite continuar dividiéndose, evitando la senescencia celular. Poseen una tasa de crecimiento rápido y condiciones estables para su mantenimiento, lo que les permite desarrollarse con facilidad en condiciones de esterilidad. Su subcultivo excesivo da como resultado un grado de uniformidad anómalo en el genotipo y fenotipo de la población celular que pueden divergir de aquellos fisiológicos.

#### **4.1.2 Cultivos primarios**

Los cultivos primarios son poblaciones celulares que fueron aisladas directamente del tejido de un organismo vivo, conservando las características morfológicas, fisiológicas y funcionales de su tejido de origen. Por esta razón, proporcionan excelentes sistemas modelo para estudiar la fisiología y bioquímica de las células, así como los efectos de fármacos y compuestos, pues proporcionan resultados más relevantes que las líneas celulares.

#### **4.2 Actividad antiproliferativa**

La proliferación celular se define como la tasa de crecimiento celular, que se mide como el número de células en un cultivo en función del tiempo. El ensayo de actividad antiproliferativa evalúa la viabilidad y supervivencia celular a través del recuento de células posterior a un plazo de tiempo definido.

#### **4.3 Citotoxicidad**

La citotoxicidad es el grado en que una sustancia puede causar daño a una célula. Una sustancia o proceso que causa daño o muerte celular se denomina citotóxico. Los ensayos de citotoxicidad miden la capacidad de los compuestos citotóxicos para causar muerte celular, generalmente determinando el número de células viables que prevalecen después de un periodo de incubación definido. La viabilidad de una población celular es una medida que permite estimar el daño de un compuesto. Los ensayos de viabilidad están diseñados para evaluar el estado físico y metabólico de la célula para determinar el impacto del compuesto evaluado. Los ensayos de citotoxicidad se utilizan ampliamente en la investigación del desarrollo de fármacos como un punto crítico al evaluar el efecto de los compuestos.

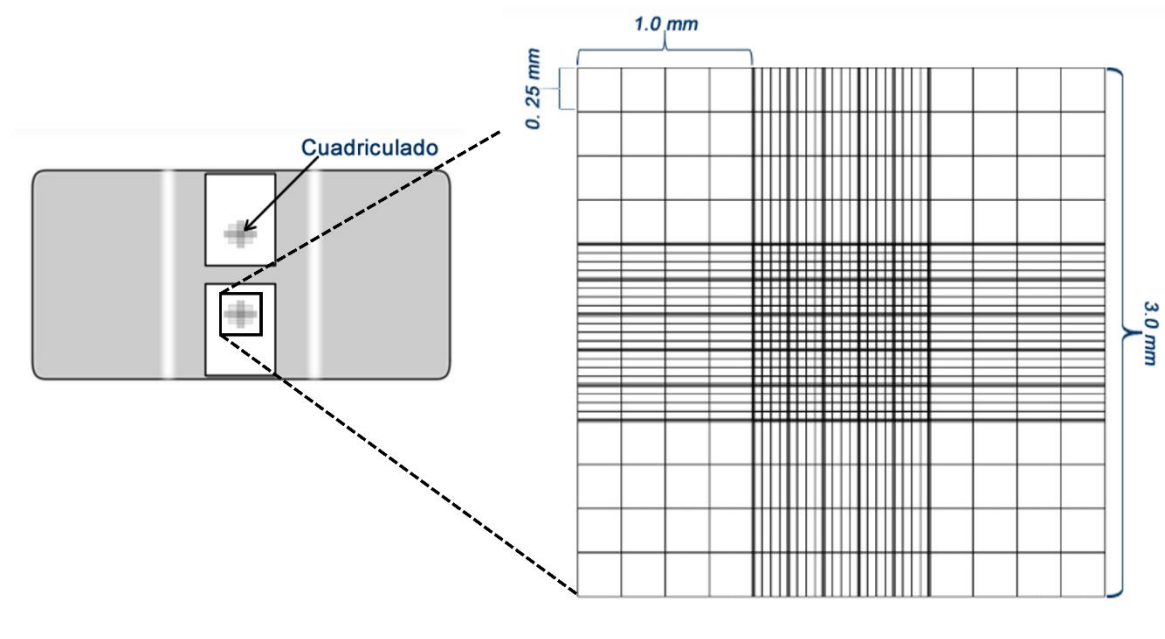
#### **4.4 Determinación de viabilidad celular**

Uno de los enfoques más comunes para evaluar la viabilidad celular y los efectos citotóxicos es determinar la integridad de la membrana celular. Los compuestos que tienen efectos citotóxicos frecuentemente dañan la integridad de las membranas celulares. En ese sentido, existen colorantes que permiten distinguir entre células viables sin daños y aquellas que han

sufrido alteraciones en la membrana, que comprometen su viabilidad. Entre ellos, el azul tripano y el yoduro de propidio generalmente no puede ingresar al interior de las células sanas; sin embargo, cruzan fácilmente las membranas de células dañadas y tiñen los componentes celulares.

#### 4.4.1 Conteos celulares para determinar la viabilidad celular

El conteo de células es útil para evaluar la tasa de supervivencia o crecimiento de una población celular. Dado que las células son cultivadas comúnmente en cientos de miles, el número de células se cuenta en un volumen pequeño que se extrapola al volumen celular completo. Para ello, se utiliza una cámara de recuento celular conocido como cámara de Neubauer o, también llamada, hematocitómetro. Es un dispositivo de precisión hecho de vidrio dividido en tres secciones con cuadrículas finas (**Figura 1**) que permiten el conteo celular bajo el microscopio óptico.



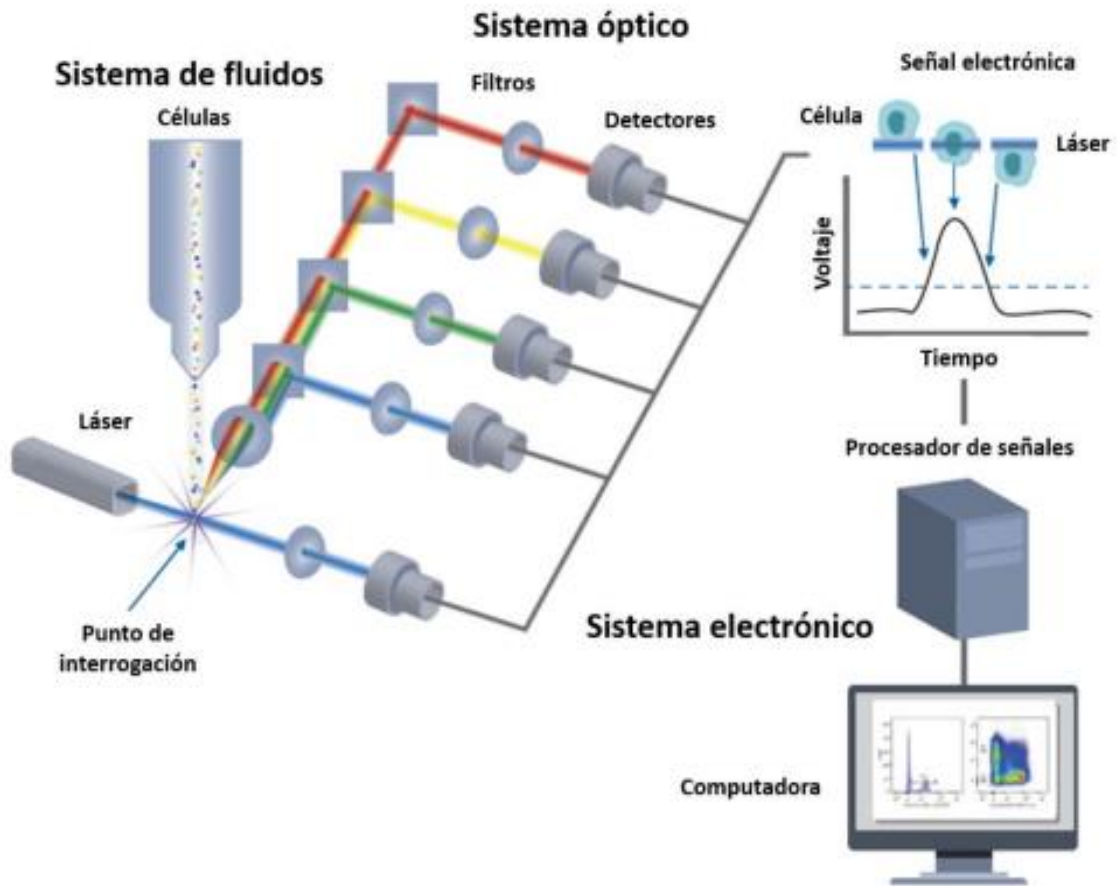
**Figura 1.** Cámara de Neubauer o hematocitómetro. Dispositivo utilizado para el recuento celular bajo el microscopio óptico. Cuenta con una zona cuadriculada que permite la determinación y conteo de un volumen pequeño de células.

En los últimos años, el recuento celular automatizado se ha convertido en una alternativa atractiva al recuento celular manual basado en hematocitómetros, que ofrece resultados más fiables en una fracción del tiempo necesario para el recuento manual.

#### **4.4.2 Citometría de flujo**

La citometría de flujo es una tecnología que analiza rápidamente células o partículas individuales a medida que pasan por uno o varios láseres mientras están suspendidas en una solución salina tamponada. Cada partícula se analiza para determinar la dispersión de la luz visible y uno o varios parámetros de fluorescencia. La dispersión de la luz visible se mide en dos direcciones diferentes, la dirección hacia adelante (dispersión frontal o FSC) que puede indicar el tamaño relativo y a  $90^\circ$  (dispersión lateral o SSC) que indica granularidad.

Los citómetros de flujo tradicionales constan de tres sistemas: fluídica, óptica y electrónica (Figura 2). El sistema fluídico de un citómetro de flujo es responsable de transportar la muestra desde el tubo de muestra hasta la celda de flujo. Una vez que atraviesa la celda de flujo y pasa el láser, la muestra se clasifica o se transporta a la basura. Por su parte, los componentes del sistema óptico incluyen fuentes de luz de excitación, lentes y filtros utilizados para recolectar y mover la luz alrededor del instrumento y el sistema de detección que genera la fotocorriente. Finalmente, la electrónica es el cerebro del citómetro de flujo. Aquí, la fotocorriente del detector se digitaliza y procesa para guardarla para su posterior análisis.



**Figura 2.** Sistema de fluidos, óptico y electrónico que componen un citómetro de flujo y que permiten el análisis de células y partículas individuales en la medición de tamaño y granularidad.

#### 4.5 Concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>)

La concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) es la medida más utilizada para determinar la concentración necesaria para inhibir la viabilidad de un microorganismo o célula, por ejemplo, conducir a la reducción de viabilidad celular a la mitad. La mayoría de los enfoques para determinar la IC<sub>50</sub> de un compuesto farmacológico se basan en ensayos de citotoxicidad a través de la determinación de la viabilidad celular. Una de las principales limitaciones es que los resultados pueden depender de la línea celular experimental utilizada y es posible que no diferencien la capacidad de un compuesto para inhibir interacciones específicas en poblaciones celulares diferentes.

## **4.6 Índice de selectividad (IS)**

El índice de selectividad (IS) se refiere a la relación entre la concentración tóxica de una muestra y su concentración bioactiva efectiva. El fármaco ideal debería tener una concentración tóxica relativamente alta pero con una concentración activa muy baja. Para evaluar cualquier actividad anticancerígena de una muestra, debe determinarse su citotoxicidad frente a líneas celulares no malignas para calcular el valor del índice de selectividad.

## **4.7 Potencia**

La potencia describe la relación entre la dosis del fármaco y la magnitud del efecto, refiriéndose a la cantidad de droga necesaria para producir un efecto específico. La alta potencia induce un fuerte efecto con una dosis baja de fármaco.

## **4.9 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es un fenómeno causado por un desequilibrio entre la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células y tejidos y la capacidad de un sistema biológico para desintoxicar estos productos reactivos mediante sus defensas antioxidantes. Las ROS pueden desempeñar varias funciones fisiológicas y normalmente son generadas como subproductos del metabolismo celular. Sin embargo, los factores estresantes ambientales y los xenobióticos contribuyen a aumentar en gran medida la producción de ROS, lo que provoca el desequilibrio que conduce al daño celular y tisular. El superóxido producido en las mitocondrias es generado por la fuga de electrones del sistema de transferencia de electrones, que se encuentra en la membrana interna de las mitocondrias. Estos electrones luego son capturados por el oxígeno molecular y se convierten en superóxido.

## **5. HIPÓTESIS**

El efecto antiproliferativo inducido por las formulaciones de AgNPs *Argovit* en líneas celulares de leucemia linfocítica humana *Jurkat* y murina *L1210* está mediado por estrés oxidante.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta biológica *in vitro* de cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* para determinar su potencial como alternativas terapéuticas para el tratamiento de leucemia.

### 6.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto antiproliferativo de las formulaciones de AgNPs evaluando su actividad biológica en líneas celulares de leucemia de modelos humano y murino para comparar los efectos entre ambas.
- Evaluar el efecto en la viabilidad celular de los cultivos primarios de tejidos sanos utilizando los modelos de BALB/c y sangre periférica humana para determinar si existen efectos secundarios inducidos por la exposición a las diferentes concentraciones de las AgNPs.
- Estimar la IC<sub>50</sub> de las cinco formulaciones de AgNPs para comparar la potencia de cada una de ellas en los diferentes modelos evaluados.
- Determinar el índice de selectividad y la ventana de seguridad *in vitro* de las AgNPs para estimar la toxicidad en modelos más complejos.
- Cuantificar la producción de especies reactivas de oxígeno para determinar si existe un desequilibrio intracelular y caracterizar la respuesta biológica de las formulaciones de *Argovit*.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Formulaciones de AgNPs

Las AgNPs fueron producidas por el Dr. Vasily Burmistrov en el Centro de Investigación y Desarrollo Vector-Vita Ltd ubicado en Novosibirsk, Rusia, y fueron donadas por la Dra. Nina Bogdanchikova del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la UNAM. Las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs *Argovit* evaluadas en este trabajo se muestran en la **Tabla 1**. Se evaluaron cuatro concentraciones de las cinco formulaciones, correspondientes a 5.5, 55.6, 556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica.

### 7.2 Líneas celulares de leucemia linfocítica humana (*Jurkat*) y murina (*L1210*)

Con el propósito de estudiar y comparar el efecto antiproliferativo de las AgNPs *Argovit* en un modelo de leucemia linfocítica humana y murina, en este trabajo se utilizaron las líneas celulares *Jurkat* y *L1210*, respectivamente, que fueron adquiridas de la ATCC®. Ambas líneas celulares poseen una morfología linfoblástica con propiedades de cultivo en suspensión.

#### 7.2.1 Proliferación de líneas celulares de leucemia

Las células de las líneas celulares de leucemia linfocítica *Jurkat* y *L1210* se cultivaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Brevemente, se sembraron en cajas Petri con medio RPMI-1640 suplementado al 10% (v/v) con Suero Fetal Bovino (FBS, por sus siglas en inglés) y 0.1% (v/v) de antibiótico/antimicótico. Una vez cultivadas se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 95%.

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas de las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* evaluadas en este trabajo. Adaptada de (Cruz-Ramírez et al., 2021).

<b>Propiedad</b>	<b>AgNP1</b>	<b>AgNP2</b>	<b>AgNP3</b>	<b>AgNP4</b>	<b>AgNP5</b>
Diámetro promedio de núcleos metálicos (nm)	16.4 ± 8.0	25.4 ± 13.2	19.0 ± 9.3	16.4 ± 8.1	30.6 ± 23.2
Distribución de tamaño en TEM (nm)	5-40	5-60	5-40	5-40	5-80
Tipo de PVP	K-15*	K-17*	K-17*	K-30*	12.6 kDa
Diámetro hidrodinámico (nm)	448.7	90.4	43.8	483.2	121.1
Índice de polidispersidad (PDI)	0.813	0.270	0.433	0.555	0.280
Potencial zeta (ζ)	-0.872	-4.56	-5.13	-.0464	-1.46
Resonancia de plasmón de superficie (λ)	415	402, 444	042	406, 549	429
Plata metálica (% w/w)	1.14 ± 0.02	1.32 ± 0.05	1.26 ± 0.03	1.19 ± 0.01	1.31 ± 0.01
PVP (% w/w)	19.62 ± 0.30	24.49 ± 0.70	24.43 ± 0.20	20.92 ± 0.42	21.67 ± 0.50
H <sub>2</sub> O (% w/w)	79.24 ± 0.45	74.25 ± 0.60	75.74 ± 0.25	77.89 ± 0.80	77.02 ± 0.40
Morfología	Esférica	Esférica	Mayormente esférica	Mayormente esférica	Esférica

\*K-15: 8,000-12,000 kDa; K-17: 10,000-16,000 kDa; K-30: 45,000-58,000 kDa.

### **7.2.2 Mantenimiento de cultivo de líneas celulares de leucemia**

Las células se observaron diariamente en un microscopio invertido Zeiss AxioVert.A1 para verificar la confluencia celular y garantizar la esterilidad del cultivo. Se realizaron cambios de medio cada 72 horas siguiendo las recomendaciones de la ATCC para cultivos en suspensión. Brevemente, se recuperó la suspensión celular de las cajas Petri y se centrifugó a 2200 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular obtenido se sembró en medio RPMI-1640 fresco, suplementado al 10% (v/v) con FBS y 0.1% (v/v) de antibiótico/antimicótico. Se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 95%.

### **7.2.3 Pase de cultivo de líneas celulares de leucemia**

Los pases celulares se realizaron al alcanzar el 80% de confluencia en la caja de cultivo. Para ello se recuperó la suspensión celular de las cajas de cultivo, se separó en dos tubos de fondo cónico en partes iguales y se centrifugó a 2200 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular obtenido en cada tubo se sembró en una caja Petri independiente con medio RPMI-1640 fresco, suplementado al 10% (v/v) con FBS y 0.1% (v/v) de antibiótico/antimicótico. Las dos cajas de cultivo resultantes se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 95%.

## **7.3 Cultivos primarios de linfocitos humanos de sangre periférica**

Para conocer el efecto de las formulaciones de AgNPs *Argovit* en células sanas de cultivos primarios de humano, se aislaron linfocitos de muestras de sangre periférica obtenida por venopunción de un donador sano de 23 años de edad, previo consentimiento.

### **7.3.1 Extracción de sangre periférica humana por venopunción**

Se extrajeron 24 ml de sangre del donador por venopunción utilizando tubos vacutainer con EDTA como agente anticoagulante. Para ello, se aplicó un torniquete en el

brazo del donador, aproximadamente 3-4” sobre el sitio de la punción con la aguja y se limpió la zona con una torunda humedecida en alcohol. Se ensambló la aguja de vacutainer en la camisa adaptadora de seguridad y se introdujo en la vena en un ángulo aproximado de 30° respecto a la piel con el bisel apuntando hacia arriba. Se coloca el tubo vacutainer en la parte interna del adaptador, se presiona hasta romper el vacío de los tubos y, cuando se ha obtenido suficiente sangre se cambia por un tubo vacutainer nuevo. Una vez que se ha obtenido toda la sangre, se retira el torniquete para extraer la aguja del antebrazo. Para asegurar una correcta homogenización del anticoagulante de los tubos vacutainer con la sangre se agitó el tubo de 8 a 10 veces.

### **7.3.2 Gradiente de ficoll para aislamiento de células mononucleares de sangre periférica**

Primero, los tubos con sangre periférica obtenida por venopunción se juntaron en un tubo de fondo cónico de 50 ml y se diluyó con solución salina fisiológica 1:1 (v/v). Posteriormente, se agregan cuidadosamente 3 ml de ficoll al fondo de un tubo cónico para centrifugación de 15 ml, prestando especial atención en no dejar residuos en las paredes (el ficoll debe estar a una temperatura de entre 18-20°C). Se agregan lentamente 6 ml de la sangre previamente diluida sujetando el tubo en diagonal y verificando que la sangre se deslice por la pared del tubo para no mezclarse con el ficoll en el fondo del tubo. Se centrifuga a 400 G durante 40 minutos, utilizando el valor mínimo de aceleración y desaceleración en la centrífuga para evitar la mezcla de la sangre con el ficoll. Transcurrido el tiempo de centrifugado, en un tubo se colectan aproximadamente 2/3 de la capa de suero autólogo (aproximadamente 2 ml), hasta que la capa que contiene los leucocitos esté al alcance. Posteriormente, con una micropipeta se aspiran los linfocitos y monocitos aglomerados flotando sobre el ficoll, tratando de tomar tan poco de este como sea posible. Las células recuperadas se lavaron dos veces en solución salina fisiológica estéril (SSF) a 2200 rpm durante 10 minutos.

### **7.3.3 Cultivo de linfocitos de sangre periférica humana**

Las células mononucleares de sangre periférica humana aisladas con el gradiente de densidad por centrifugación se resuspenden en una placa Petri con medio RPMI-1640 suplementado al 10% (v/v) con suero autólogo y 0.1% (v/v) de antibiótico. Se incuban por 2 horas a 37°C, 70% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>. Posterior al tiempo de incubación, los linfocitos (células no adherentes) se toman del sobrenadante y se separan de los monocitos (células adherentes) para su cultivo independiente.

## **7.4 Cultivos primarios de ratones BALB/c**

Con el propósito de comparar el efecto inducido por las cinco formulaciones de AgNPs en células sanas de cultivos primarios de ratón, se aislaron células de médula y bazo de ratones BALB/c. Se utilizaron ratones macho, de 4 a 6 semanas de edad, mantenidos con agua y comida *ad libitum* en el bioterio de la Universidad Autónoma de Baja California, Unidad Valle de las Palmas. Se siguieron los procedimientos dictados por la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado y uso de animales de laboratorio. El protocolo fue sometido y aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Baja California con número de expediente 001/2019.

### **7.4.1 Disección de ratones BALB/c**

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente, diseccionados en un ambiente estéril. Se perfundieron y extrajeron el bazo y fémur de los ratones, y fueron colocados en cajas Petri independientes con solución salina fisiológica estéril (SSF).

### **7.4.2 Obtención y cultivo de células primarias de ratones BALB/c**

Se establecieron cultivos primarios de bazo y médula ósea. Para el primero, se disgregó mecánicamente el tejido obtenido, se lavó con solución salina fisiológica estéril y se sembró en cajas Petri con medio RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de Suero Fetal

Bovino (FBS, por sus siglas en inglés) y 0.1% (v/v) de antibiótico/antimicótico. Para el segundo, con una gasa estéril se retiró el músculo de los fémures y se partió por la mitad el hueso. Con una jeringa de insulina se hizo pasar solución salina fisiológica estéril a través del orificio de los huesos. La médula ósea obtenida del interior de los fémures se lavó con solución salina fisiológica estéril y se sembró en cajas Petri con medio RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de Suero Fetal Bovino (FBS, por sus siglas en inglés) y 0.1% (v/v) de antibiótico/antimicótico. Los cultivos se incubaron 2 horas a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad del 90%.

## **7.5 Ensayo de actividad antiproliferativa en líneas celulares de leucemia**

Para la evaluación de la actividad antiproliferativa de las formulaciones de *Argovit* en células de leucemia linfocítica humana, se sembraron 20,000 células de la línea celular *Jurkat* en placas de 96 pozos y se añadieron 10 µl de cada suspensión de AgNPs para alcanzar las concentraciones finales de 5.5, 55.6, 556 µM y 5.5 mM, en un volumen final de 200 µl. Las células se expusieron a las concentraciones de AgNPs durante incubación a 37°C por 24 horas, en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad del 90%. Se utilizó medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de FBS como control negativo e Imatinib como control positivo, para el cual se añadieron 10 µl de este para alcanzar las concentraciones finales de 0.2, 2, 20 y 200 µM en un volumen final de 200 µl. Se comparó con los efectos de AgNO<sub>3</sub> evaluando las mismas concentraciones de plata metálica que las AgNPs. Esto se realizó en tres ensayos independientes por triplicado. El mismo procedimiento fue realizado utilizando células *L1210* para determinar la evaluación de la actividad antiproliferativa en células de leucemia linfocítica murina.

## **7.6 Ensayo de citotoxicidad en cultivos primarios de tejidos sanos**

Para determinar el efecto citotóxico de las AgNPs en células sanas de cultivos primarios, se sembraron entre 50,000 y 100,000 células en placas de 96 pozos y se añadieron 10 µl de cada suspensión de AgNPs para alcanzar las concentraciones finales de 5.5, 55.6, 556 µM y 5.5 mM, en un volumen final de 200 µl. Las células se expusieron a las

concentraciones de AgNPs durante incubación a 37°C por 24 horas, en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad del 90%. Se utilizó medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de FBS como control negativo e Imatinib como control positivo, para el cual se añadieron 10 µl de este para alcanzar las concentraciones finales de 0.2, 2, 20 y 200 µM en un volumen final de 200 µl. Se comparó con los efectos de AgNO<sub>3</sub> evaluando las mismas concentraciones de plata metálica que las AgNPs. Esto se realizó en tres ensayos independientes por triplicado. Esto se realizó para las células obtenidas de cultivos primarios de bazo y médula de ratones BALB/c sanos, así como para los linfocitos obtenidos de sangre periférica humana.

## **7.7 Determinación de viabilidad celular**

Transcurrido el tiempo de incubación en los ensayos de actividad antiproliferativa y de citotoxicidad, se agregaron 4 µl de azul tripano y 20 µl de formaldehído al 37% a cada pozo de las placas de 96. El número de células viables en cada pozo se determinó por medio de conteos manuales y automatizados.

### **7.7.1 Conteo en cámara de Neubauer con microscopio óptico**

Se determinó la viabilidad celular de los cultivos por la prueba de exclusión vital con azul tripano, a través del conteo de células en cámara de Neubauer bajo un microscopio óptico recto *AmScope B120c*. Para ello se resuspendió cada pozo de la placa y se cargaron 10 µl de la suspensión celular en la cámara de Neubauer para su lectura. Se determinó el porcentaje de viabilidad celular en función de la cantidad de células sin tinción contadas al microscopio, utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \left( \frac{\text{Número de células viables por pozo}}{\text{Promedio de células viables control negativo}} \right) * (100)$$

### **7.7.2 Conteo con contador celular automatizado Corning *CytoSMART***

Se utilizó un contador automatizado Corning *CytoSMART* para corroborar la viabilidad celular de los cultivos. Para ello se resuspendió cada pozo y se cargaron 10  $\mu$ l de la suspensión celular en la cámara de prueba para su lectura. Se ajustó el enfoque del equipo hasta que las células se apreciaban de forma clara y nítida en la interfaz de usuario. Se ajustaron los conteos arrojados por el contador celular para considerar los cuerpos identificados con diámetros entre 4 y 20  $\mu$ m. La cifra final arrojado por el equipo representa el conteo promedio de tres micrografías por pozo evaluado, ajustando el valor al volumen final del pozo en la placa de cultivo.

### **7.7.3 Conteo con citómetro de flujo**

Las células de los ensayos de cultivos primarios de bazo y médula de ratones BALB/c se contaron por citometría de flujo utilizando un *Attune NxT Flow Cytometer* tomando como referencia el tamaño y granularidad de los controles negativos. Se analizaron entre 10,000 y 100,000 eventos para el procesamiento de datos.

## **7.8 Ensayo de producción de ROS mitocondriales por microscopía de fluorescencia**

Se determinó la generación de superóxido mitocondrial inducida por las formulaciones de *Argovit* en las células *Jurkat* y *L1210* a través de microscopía de fluorescencia, utilizando el indicador rojo MitoSOX de *Invitrogen*®. Brevemente, se preparó una solución madre del reactivo MitoSOX a una concentración de 5 mM disolviendo los 50  $\mu$ g del contenido del vial con 13  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO). La solución madre fue posteriormente diluida hasta alcanzar una concentración 43  $\mu$ M en la solución de trabajo. Se sembraron 100,000 células en placas de 96 pozos y se añadieron 10  $\mu$ l de suspensión de las AgNPs *Argovit* en un volumen final de 200  $\mu$ l. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad del 90%. Al finalizar el tiempo de incubación, se añadieron 2  $\mu$ l de la solución de trabajo con el indicador rojo MitoSOX a cada uno de los pozos y se incubaron las placas a 37°C durante 10 minutos.

Las muestras se analizaron en un microscopio invertido *Zeiss AxioVert.A1* obteniendo seis micrografías de diferentes campos de cada pozo de la placa, tres de ellas expuestas a un láser de 580 nm de una fuente *Colibri.2 Zeiss* acoplada al microscopio, y tres de ellas del campo correspondiente sin exposición a la fuente de fluorescencia. Se utilizó un control negativo de medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de FBS y un control positivo con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3% (v/v). Se comparó la generación de superóxido mitocondrial inducida por las AgNPs en comparación con el  $AgNO_3$ , por lo que un estímulo de este fue incluido en la placa de cultivo.

## **7.9 Procesamiento de imágenes de microscopía de fluorescencia**

El procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas por microscopía fluorescencia se realizó utilizando el software *Zeiss ZEN 2 Blue Edition*, donde se modificaron el tiempo de exposición y la intensidad de los canales de colores para mejorar la nitidez de las micrografías.

## **7.10 Análisis estadístico**

El análisis de los datos se realizó utilizando el software *GraphPad Prism* (v.9). La distribución normal de los datos se determinó mediante una prueba D'Agostino-Pearson. Posteriormente, se calcularon los promedios y desviaciones estándar de los resultados obtenidos de la actividad antiproliferativa y citotóxica de las AgNPs *Argovit*. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y pruebas *post-hoc* de Tukey para determinar diferencias significativas entre concentraciones y las formulaciones de *Argovit*, así como para el  $AgNO_3$ . Un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## **7.11 Cálculo de $IC_{50}$**

Para determinar los valores de  $IC_{50}$  se utilizó el software *GraphPad Prism* (v.9). Brevemente, se graficaron los porcentajes de muerte celular respecto al logaritmo de la concentración encontrados previamente para cada una de las formulaciones de AgNPs

*Argovit*, AgNO<sub>3</sub> e Imatinib evaluadas en este trabajo. Posteriormente se analizaron los valores aplicando un ajuste de sigmoide asimétrica de cinco parámetros, que arrojó el valor del logaritmo del IC<sub>50</sub> de acuerdo con el cultivo analizado. Este procedimiento se realizó para cada uno de los ensayos independientes.

## 7.12 Análisis de potencia

Utilizando los valores de IC<sub>50</sub> determinados previamente, se analizó la potencia de las AgNPs *Argovit* en relación con el efecto identificado para AgNO<sub>3</sub> e Imatinib en cada uno de los cultivos de leucemia linfocítica humana y murina evaluados en este trabajo mediante la siguiente expresión:

$$\text{Potencia } A \text{ respecto a } B = \left( \frac{IC_{50} A}{IC_{50} B} \right)$$

donde A representa al tratamiento con las diferentes formulaciones de *Argovit* y B el tratamiento con el AgNO<sub>3</sub> o el Imatinib. Del mismo modo, se analizó la potencia de las AgNPs *Argovit* en relación con el efecto identificado para AgNO<sub>3</sub> e Imatinib en cada uno de los cultivos sanos evaluados en este trabajo.

## 7.13 Estimación del índice de selectividad y ventana de seguridad *in vitro*

Utilizando los valores de IC<sub>50</sub> determinados previamente, se determinó el valor del índice de selectividad para el modelo humano y murino, considerando los grupos de células humanas *Jurkat* y linfocitos de sangre periférica humana, y de células murinas *L1210* con linfocitos y monocitos de bazo de ratones BALB/c, respectivamente. Para ello se utilizó la siguiente expresión:

$$\text{Índice de Selectividad (IS)} = \left( \frac{IC_{50} \text{ células sanas}}{IC_{50} \text{ células de cáncer}} \right)$$

Por último, se determinó el intervalo que corresponde a la ventana de seguridad *in vitro* para cada uno de los grupos de células humanas y murinas descritos en la estimación del índice de selectividad. Para ello se utilizó la siguiente expresión:

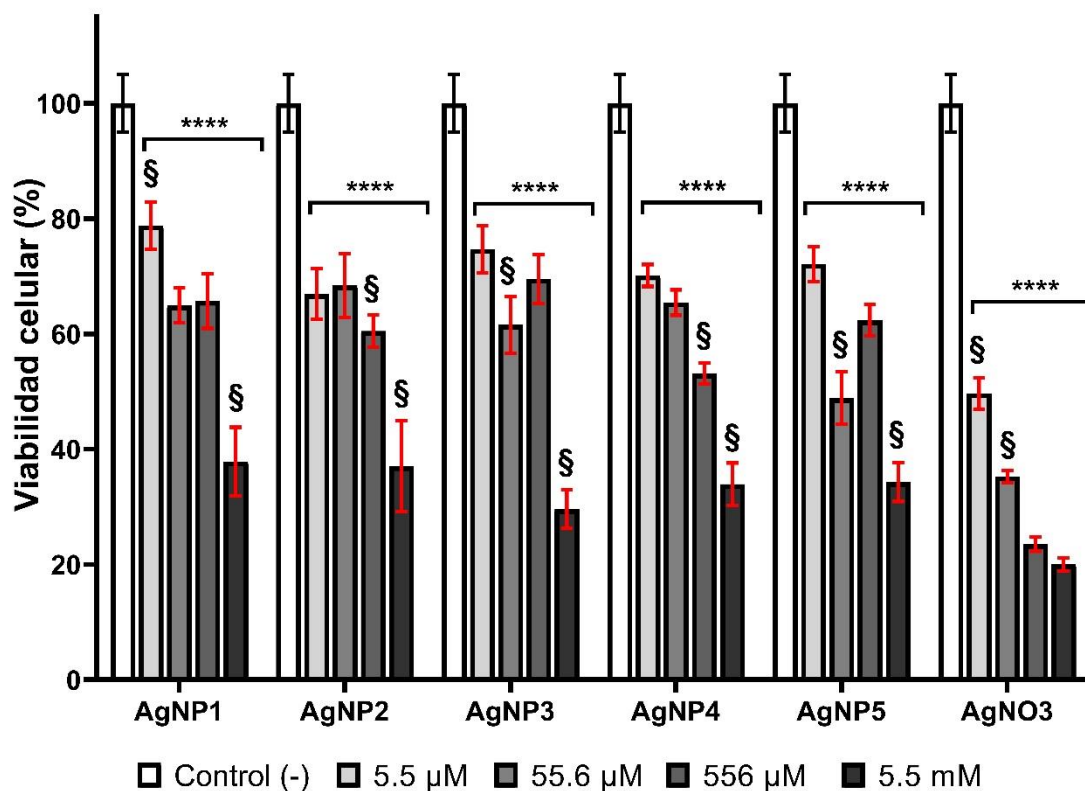
$$\textit{Ventana de seguridad in vitro} = [IC_{50} \textit{ células sanas} - IC_{50} \textit{ células de cáncer}]$$

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Actividad antiproliferativa en células *Jurkat*

El efecto antiproliferativo de las formulaciones de AgNPs *Argovit* se evaluó en células de leucemia linfocítica humana *Jurkat* mediante la prueba de exclusión vital de azul tripano tras 24 horas de exposición a 5.5, 55.6, 556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica de las AgNPs. Los porcentajes de viabilidad celular obtenidos de las cuatro concentraciones evaluadas de las formulaciones de AgNPs *Argovit* y  $\text{AgNO}_3$  se graficaron en comparación con el control sin tratamiento (**Figura 3**). El análisis de varianza mostró que el efecto inducido por la exposición a las diferentes formulaciones de *Argovit* y  $\text{AgNO}_3$  es significativamente diferente respecto al control negativo. Además, la prueba *post-hoc* de Tukey indica que para la totalidad de las formulaciones de *Argovit*, el efecto inducido para la máxima concentración evaluada (correspondiente a 5.5 mM de plata metálica) es significativamente diferente en comparación con el resto de las concentraciones (5.5, 55.6 y 556  $\mu\text{M}$ ). Este efecto resultó ser distinto para las concentraciones más elevadas de  $\text{AgNO}_3$  (556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM) que, a pesar de mostrar una mayor disminución en la viabilidad celular, no presentan diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, fueron las concentraciones de 5.5 y 55.6  $\mu\text{M}$  aquellas que mostraron ser significativamente diferentes.

Adicionalmente, se graficaron de forma independiente los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en cada una de las concentraciones de plata metálica evaluadas en células *Jurkat* (**Figura A1**, página 74). Se identificó que, en todos los casos el tratamiento con  $\text{AgNO}_3$  induce una mayor disminución de la viabilidad celular y por lo tanto muestra diferencias estadísticamente significativas en comparación con las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit*. Más aún, se encontró que es posible distinguir resultados significativamente diferentes entre algunas de las formulaciones *Argovit* que comparten propiedades fisicoquímicas similares. Ejemplo de ello, las formulaciones AgNP1 y AgNP4, que de acuerdo con la **Tabla 1** su única diferencia radica en el tipo de PVP utilizado en su recubrimiento, tienen una respuesta en viabilidad celular significativamente diferente en 55.6 y 556  $\mu\text{M}$  (**Figura A1B** y **A1C**, página 74).

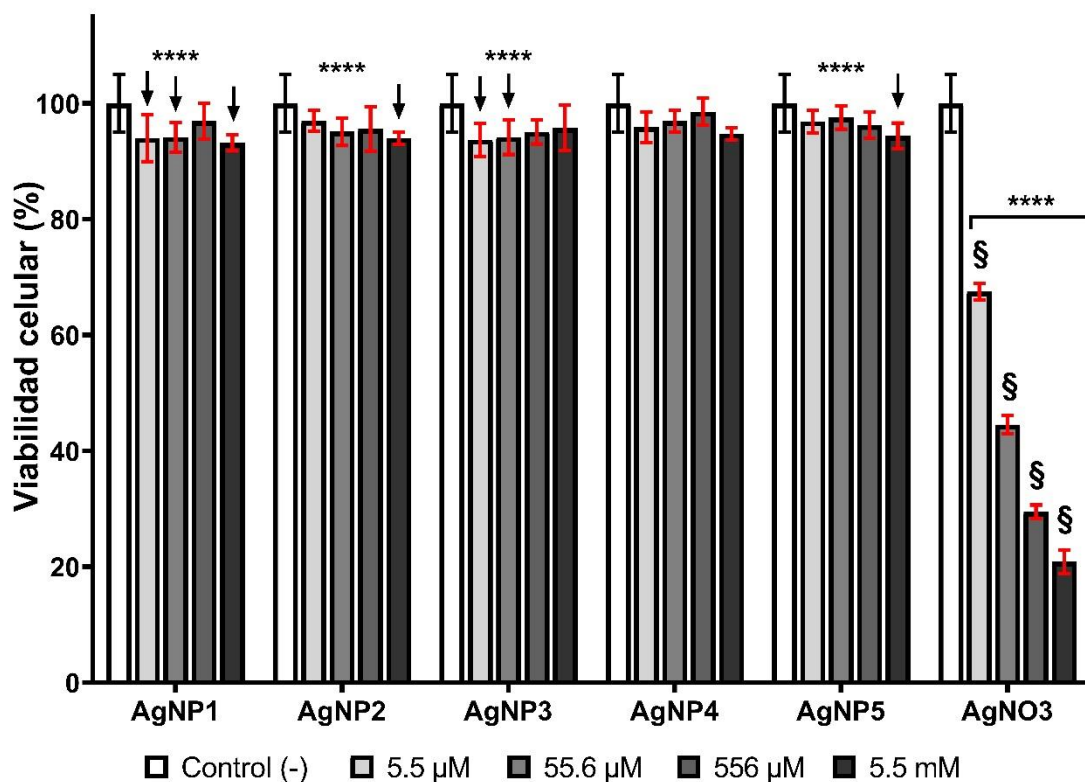


**Figura 3.** Viabilidad celular de la línea celular de leucemia linfocítica humana *Jurkat* después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556  $\mu$ M y 5.5 mM de plata metálica) de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. \* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre las concentraciones de una misma formulación de AgNP.

## 8.2 Efecto citotóxico en linfocitos de sangre periférica humana

El efecto citotóxico de las formulaciones de AgNPs *Argovit* se evaluó en linfocitos humanos aislados de sangre periférica mediante la prueba de exclusión vital de azul tripano tras 24 horas de exposición a 5.5, 55.6, 556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica de las AgNPs. Los porcentajes de viabilidad celular obtenidos de las cuatro concentraciones evaluadas de las formulaciones de AgNPs *Argovit* y  $\text{AgNO}_3$  se graficaron en comparación con el control sin tratamiento (**Figura 4**). El análisis de varianza mostró que el efecto inducido por la exposición a las diferentes formulaciones de *Argovit* es significativamente diferente respecto al control negativo en sólo algunas de las concentraciones evaluadas. De hecho, la prueba *post-hoc* de Tukey indica una frecuencia muy baja de variabilidad del efecto en la viabilidad celular entre las formulaciones de *Argovit* y el control sin tratamiento. Para la formulación AgNP4, por ejemplo, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas y el control negativo. Diferente a lo identificado para las células de leucemia linfocítica humana *Jurkat*, las formulaciones de AgNPs *Argovit* no inducen una disminución de la viabilidad celular superior al 15% en linfocitos de sangre periférica humana, lo que demuestra la baja citotoxicidad de estas AgNPs en modelos celulares sanos. Por el contrario, el  $\text{AgNO}_3$  presentó un efecto citotóxico elevado desde la concentración más baja (5.5  $\mu\text{M}$ ), resultando tres de las concentraciones evaluadas (55.6, 556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica) con valores por debajo del 50% de viabilidad celular. La prueba *post-hoc* de Tukey evidenció que todas las concentraciones evaluadas fueron significativamente diferentes.

Del mismo modo, se graficaron de forma independiente los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en cada una de las concentraciones de plata metálica evaluadas en linfocitos primarios de humano (**Figura A2**, página 75). Se identificó que, en todos los casos el tratamiento con  $\text{AgNO}_3$  induce una mayor disminución de la viabilidad celular y por lo tanto muestra diferencias estadísticamente significativas en comparación con las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit*. Nuevamente fue posible distinguir resultados significativamente diferentes entre las formulaciones AgNP1 y AgNP4, a 5.5, 55.6  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM (**Figura A2A, A2B y A2D**, página 75).



**Figura 4.** Viabilidad celular de cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica humana después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556  $\mu$ M y 5.5 mM de plata metálica) de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. ↓\* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre las concentraciones de una misma formulación de AgNP.

### 8.3 Análisis de potencia en los modelos linfocíticos humanos

Con los resultados obtenidos de la actividad antiproliferativa de las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* en leucemia linfocítica humana *Jurkat* y su efecto citotóxico evaluado en linfocitos de sangre periférica humana, se determinaron las concentraciones del IC<sub>50</sub> para comparar con aquellas correspondientes al AgNO<sub>3</sub> e Imatinib (**Tabla 2**). Los porcentajes de muerte celular obtenidos se graficaron con respecto al logaritmo de las cuatro concentraciones evaluadas aplicando un ajuste sigmoïdal y se trazaron en comparación con la curva de respuesta identificada para Imatinib y AgNO<sub>3</sub>. Esto se realizó tanto para la estimación del IC<sub>50</sub> en células *Jurkat* como en linfocitos humanos, respectivamente (**Figura A3 y A4**, páginas 76 y 77). En la **Figura 5** se comparan los valores estimados de IC<sub>50</sub> de las formulaciones de AgNPs *Argovit* en células de leucemia linfocítica humana y linfocitos de sangre periférica humana, respectivamente. Se puede observar como la totalidad de los IC<sub>50</sub> de las formulaciones de *Argovit* se sitúan por encima de los valores de IC<sub>50</sub> identificados para AgNO<sub>3</sub> e Imatinib. Sin embargo, pese a que estos últimos presentan una mayor potencia en actividad antiproliferativa, inducen un efecto citotóxico que conduce a la muerte celular de las células sanas a bajas concentraciones. Por lo tanto, también presentan una alta potencia en linfocitos humanos no transformados. Contrario a esto, las AgNPs no produjeron efectos citotóxicos en células sanas aún en la máxima concentración evaluada, correspondiente a 5.5 mM de plata metálica (línea roja marcada en la **Figura 5**), que origina una disminución menor al 15% de la viabilidad celular en linfocitos humanos. Por esta razón, no fue posible determinar el valor del IC<sub>50</sub> de estas formulaciones.

En la **Tabla 3** se muestran los valores de potencia estimados para las formulaciones de *Argovit* respecto a AgNO<sub>3</sub> e Imatinib. La AgNP1 es aproximadamente 1568 veces menos potente que AgNO<sub>3</sub> y 354 veces menos potente que Imatinib para inhibir el 50% de la proliferación de células *Jurkat*. La AgNP4 es aproximadamente 267 veces menos potente que AgNO<sub>3</sub> y 60 veces menos potente que Imatinib para eliminar el 50% de células de leucemia linfocítica humana. Sin embargo, el AgNO<sub>3</sub> e Imatinib son al menos 716 y 262 veces más potentes que las formulaciones de *Argovit* eliminando el 50% de linfocitos de sangre periférica humana sanos, respectivamente. Por su parte, el AgNO<sub>3</sub> en comparación

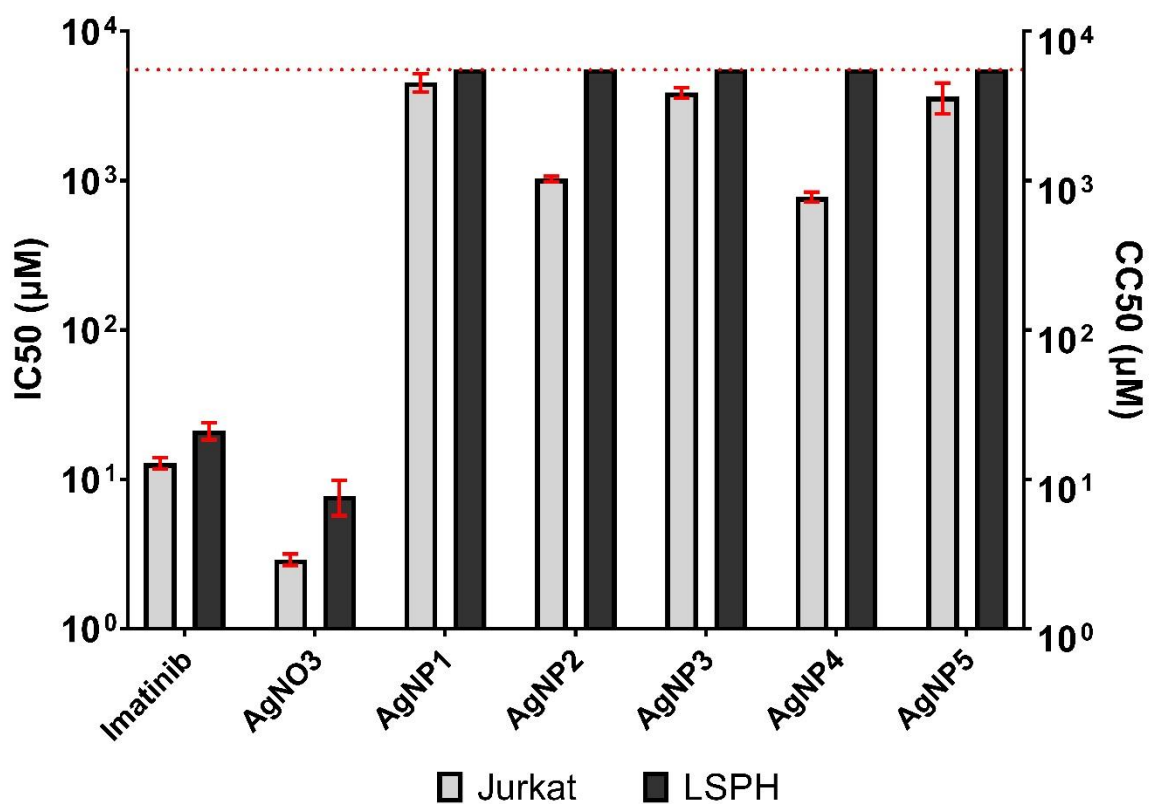
con Imatinib es aproximadamente 4 veces más potente para inhibir el 50% de células *Jurkat* y 3 veces más potente matando el 50% de linfocitos no transformados, posicionándolo como el estímulo más potente de esta evaluación. En la **Figura 6**, se muestra de mejor manera la comparación de la actividad antiproliferativa en células de leucemia linfocítica humana de las formulaciones de Argovit AgNP1 y AgNP4 en comparación con la actividad antiproliferativa de AgNO<sub>3</sub> e Imatinib. Es apreciable el comportamiento casi lineal que se identificó para el AgNO<sub>3</sub>, quien además presentó una mayor potencia. Del mismo modo, se observan las curvas de las formulaciones AgNP1 y AgNP4 de *Argovit*, que presentan un crecimiento más suave en la muerte celular de células *Jurkat* respecto al Imatinib, que además sitúa su intersección con el IC<sub>50</sub> varios ordenes de magnitud por debajo de las de las AgNPs.

**Tabla 2.** Valores de IC<sub>50</sub> de las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* evaluadas en este trabajo.

Estímulo	IC <sub>50</sub> células de cáncer		IC <sub>50</sub> células sanas				
	Humano	Murino	Humano	Murino			
	Jurkat	L1210	LSPH	LB	MB	LM	MM
Imatinib	12.86 ± 1.11	16.79 ± 0.55	21.18 ± 2.80	31.37 ± 2.90	10.81 ± 3.53	9.95 ± 0.15	3.39 ± 0.31
AgNO <sub>3</sub>	2.91 ± 0.26	0.72 ± 0.38	7.76 ± 2.05	7.76 ± 1.30	10.87 ± 6.10	4.25 ± 2.52	4.42 ± 2.40
AgNP1	4556.39 ± 635.32	976.65 ± 126.39	> 5560*	> 5560*	4560.87 ± 82.98	> 5560*	> 5560*
AgNP2	1027.85 ± 43.75	623.04 ± 22.44	> 5560*	> 5560*	4022.36 ± 2296.99	> 5560*	> 5560*
AgNP3	3884.65 ± 320.46	2542.03 ± 1030.49	> 5560*	> 5560*	1299.56 ± 72.61	> 5560*	> 5560*
AgNP4	777.21 ± 60.54	42.86 ± 5.56	> 5560*	> 5560*	3409.79 ± 1235.98	> 5560*	> 5560*
AgNP5	3651.59 ± 851.81	71.31 ± 22.51	> 5560*	> 5560*	5083.59 ± 1019.25	> 5560*	> 5560*

LSPH: Linfocitos de Sangre Periférica Humana; LB: Linfocitos de Bazo de ratones BALB/c; MB: Monocitos de Bazo de ratones BALB/c; LM: Linfocitos de Médula de ratones BALB/c; MM: Monocitos de Médula de ratones BALB/c

\* IC<sub>50</sub> no alcanzada, por lo que la concentración debe ser de al menos 5560 mM de plata metálica. Se encontró aproximadamente un 20% de disminución de viabilidad celular de linfocitos humanos y murinos en la concentración más alta evaluada en este trabajo (5560 mM).



**Figura 5.** Comparación de los valores de IC<sub>50</sub> de la línea celular de leucemia linfocítica humana *Jurkat* y los valores de IC<sub>50</sub> de linfocitos de sangre periférica humana, obtenidos después de 24 horas de exposición a las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit*, AgNO<sub>3</sub> e Imatinib. Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. La línea roja indica la concentración máxima de palta metálica evaluada en este trabajo (5.5 mM).

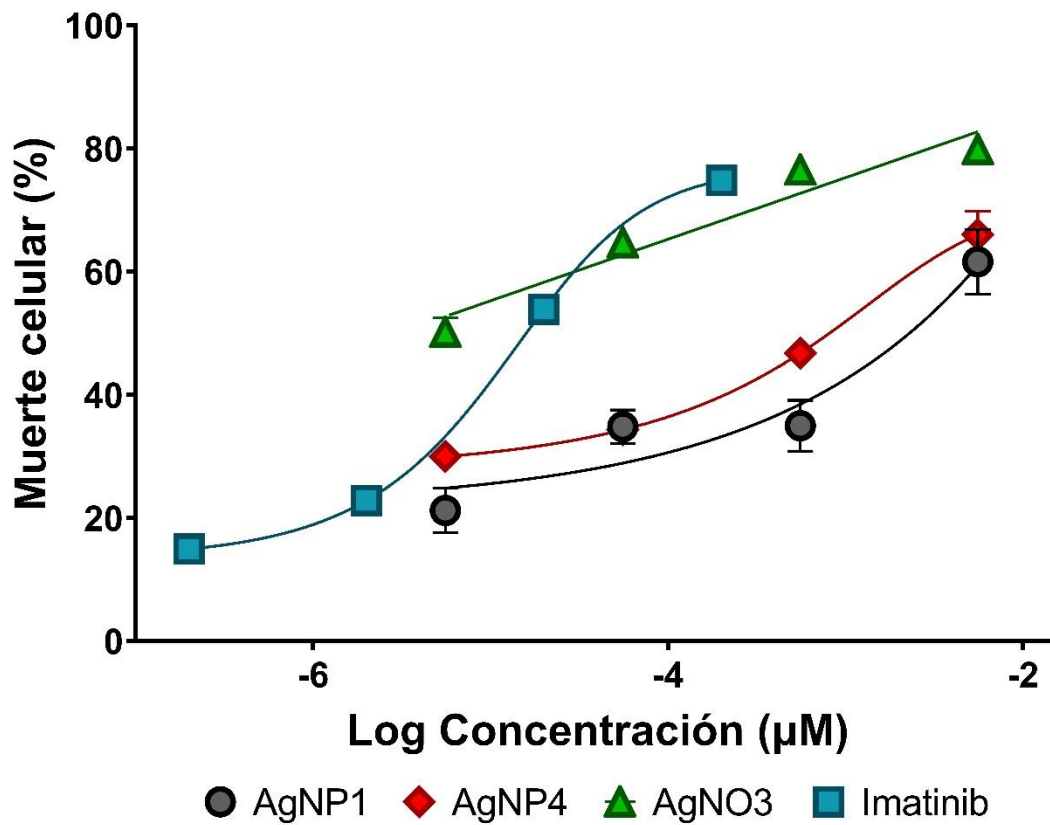
**Tabla 3.** Valores de potencia de las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* en células humanas evaluadas en este trabajo.

<b>Estímulo</b>	<b>Potencia en células transformadas</b>		<b>Potencia en células sanas</b>	
	Jurkat (AgNO <sub>3</sub> ) <sup>A</sup>	Jurkat (Imatinib) <sup>B</sup>	LSPH (AgNO <sub>3</sub> ) <sup>A</sup>	LSPH (Imatinib) <sup>B</sup>
AgNP1	1568.12	354.27	> 716.43	> 262.46
AgNP2	353.74	79.91	> 716.43	> 262.46
AgNP3	1336.93	302.04	> 716.43	> 262.46
AgNP4	267.48	60.43	> 716.43	> 262.46
AgNP5	1526.72	283.92	> 716.43	> 262.46
Imatinib	4.42		2.72	

<sup>A</sup> Potencia respecto al AgNO<sub>3</sub>

<sup>B</sup> Potencia respecto al Imatinib

LSPH: Linfocitos de Sangre Periférica Humana



**Figura 6.** Comparación de la actividad antiproliferativa en leucemia linfocítica humana *Jurkat* después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556 µM y 5.5 mM de plata metálica) de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>, en comparación con Imatinib (0.2, 2, 20 y 200 µM). Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado.

## 8.4 Análisis del índice de selectividad y ventana de seguridad *in vitro* en los modelos linfocíticos humanos

Con los resultados obtenidos de  $IC_{50}$  de la actividad de las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* en células *Jurkat* y linfocitos de sangre periférica humana, se determinó el índice de selectividad y las concentraciones terapéuticas farmacológicas, para comparar con los tratamientos de  $AgNO_3$  e Imatinib (**Tabla 4**). De manera general, la AgNP2 y AgNP4 mostraron los índices de selectividad más altos, con valores de 5.40 y 7.15, respectivamente. Incluso el  $AgNO_3$  (2.67) mostró un índice de selectividad superior al de Imatinib (1.64), siendo que ambos se identifican con un estrecho intervalo de ventana de seguridad *in vitro*. Se identificó que la AgNP4 resultó ser aproximadamente 4 veces más selectiva que el Imatinib y casi 3 veces más selectiva que el  $AgNO_3$ . Por lo tanto, la formulación AgNP4 mostró un intervalo de ventana de seguridad *in vitro* más grande, pues al tener un buen efecto antiproliferativo en células de leucemia linfocítica humana a una baja concentración e inducir daño citotóxico prácticamente nulo a una concentración elevada en linfocitos sanos de sangre periférica humana, demuestra su selectividad en el tratamiento de células transformadas. En comparación, la AgNP1 mostró el índice de selectividad más bajo de las formulaciones de *Argovit* evaluadas en el modelo humano, resultando en una ventana de seguridad *in vitro* estrecha.

**Tabla 4.** Valores de índice de selectividad (IS) e intervalos de ventana de seguridad *in vitro* (VS) de las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* determinadas en este trabajo.

Estímulo	IS			VS		
	Linfocitos humanos	Linfocitos murinos	Monocitos murinos	Linfocitos humanos	Linfocitos murinos	Monocitos murinos
AgNP1	1.22	5.69	4.67	5560 – 4556.39	5560 – 976.65	4560.87 – 976.65
AgNP2	5.40	8.92	6.46	5560 – 1027.84	5560 – 623.04	4022.35 – 623.04
AgNP3	1.43	2.18	0.51	5560 – 3884.65	5560 – 2542.03	1299.56 – 2542.03 <sup>A</sup>
AgNP4	7.15	129.73	79.56	5560 – 777.21	5560 – 42.85	3409.79 – 42.85
AgNP5	1.52	77.96	71.29	5560 – 3651.59	5560 – 71.31	5083.59 – 71.31
AgNO <sub>3</sub>	2.67	10.79	15.12	7.76 – 2.91	7.76 – 0.71	10.87 – 0.71
Imatinib	1.64	1.86	0.64	21.18 – 12.86	31.37 – 16.79	10.81 – 16.79 <sup>B</sup>

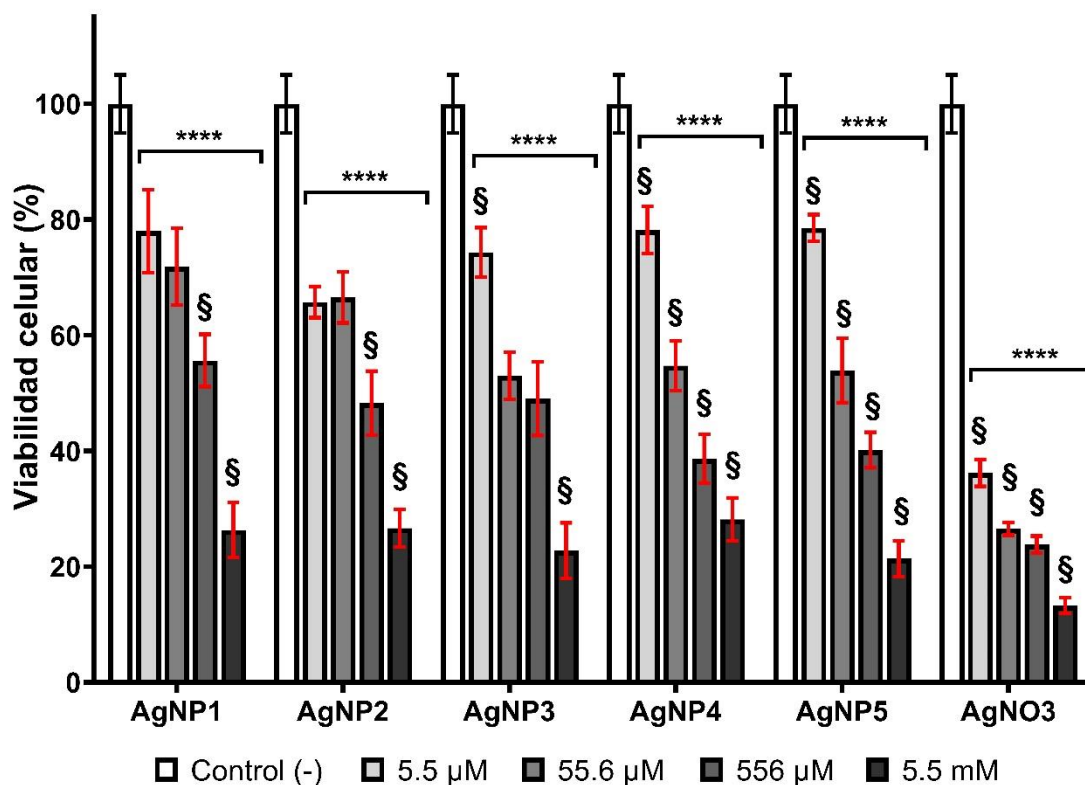
<sup>A</sup> La IC<sub>50</sub> de monocitos de bazo de ratones BALB/c estimada para AgNP3 es menor al IC<sub>50</sub> encontrado para células L1210

<sup>B</sup> La IC<sub>50</sub> de monocitos de bazo de ratones BALB/c estimada para Imatinib es menor al IC<sub>50</sub> encontrado para células L1210

## 8.5 Actividad antiproliferativa en células *L1210*

El efecto antiproliferativo de las formulaciones de AgNPs *Argovit* se evaluó en células de leucemia linfocítica murina *L1210* mediante la prueba de exclusión vital de azul tripano tras 24 horas de exposición a 5.5, 55.6, 556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica de las AgNPs. Los porcentajes de viabilidad celular obtenidos de las cuatro concentraciones evaluadas de las formulaciones de AgNPs *Argovit* y  $\text{AgNO}_3$  se graficaron en comparación con el control sin tratamiento (**Figura 7**). El análisis de varianza mostró que el efecto inducido por la exposición a las diferentes formulaciones de *Argovit* y  $\text{AgNO}_3$  es significativamente diferente respecto al control negativo. Además, la prueba *post-hoc* de Tukey indica que para la totalidad de las formulaciones de *Argovit*, el efecto inducido para la máxima concentración evaluada (correspondiente a 5.5 mM de plata metálica) es significativamente diferente en comparación con el resto de las concentraciones (5.5, 55.6 y 556  $\mu\text{M}$ ). En comparación con la actividad antiproliferativa identificada para las células de leucemia linfocítica humana *Jurkat*, las células de leucemia linfocítica murina *L1210* fueron más sensibles a los efectos de las formulaciones de AgNPs *Argovit* y el  $\text{AgNO}_3$ , presentando diferencias estadísticamente significativas en viabilidad celular para la totalidad de las concentraciones evaluadas.

Se graficaron de forma independiente los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en cada una de las concentraciones de plata metálica evaluadas en células *L1210* (**Figura A5**, página 78). Se identificó que, en todos los casos el tratamiento con  $\text{AgNO}_3$  induce una mayor disminución de la viabilidad celular en células *L1210* y por lo tanto muestra diferencias estadísticamente significativas en comparación con las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit*. Al igual que en las células humanas transformadas, fue posible distinguir resultados significativamente diferentes entre algunas de las formulaciones *Argovit* que comparten propiedades fisicoquímicas similares, como la AgNP1 y AgNP4, que tienen una respuesta en viabilidad celular significativamente diferente en 55.6 y 556  $\mu\text{M}$  (**Figura A5B** y **A5C**, página 78).



**Figura 7.** Viabilidad celular de la línea celular de leucemia linfocítica murina *L1210* después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica) de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. \* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre las concentraciones de una misma formulación de AgNP.

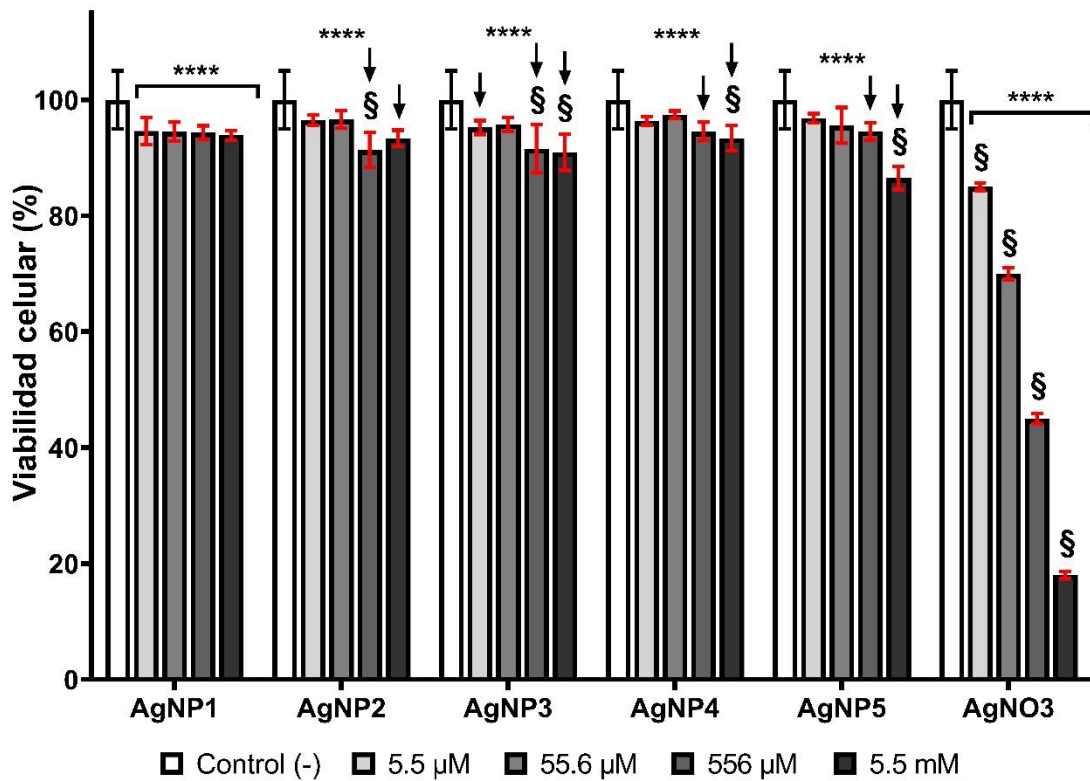
## 8.6 Efecto citotóxico en linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c

El efecto citotóxico de las formulaciones de AgNPs *Argovit* se evaluó en linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c mediante la prueba de exclusión vital de azul tripano tras 24 horas de exposición a 5.5, 55.6, 556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica de las AgNPs. Los porcentajes de viabilidad celular obtenidos de las cuatro concentraciones evaluadas de las formulaciones de AgNPs *Argovit* y  $\text{AgNO}_3$  se graficaron en comparación con el control sin tratamiento (**Figura 8**). El análisis de varianza mostró que el efecto inducido por la exposición a las diferentes formulaciones de *Argovit* es significativamente diferente respecto al control negativo en sólo algunas de las concentraciones evaluadas. De hecho, la prueba *post-hoc* de Tukey indica que en general sólo las concentraciones más altas (556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM) presentan diferencias estadísticamente significativas respecto del control sin tratamiento.

Para las formulación AgNP1, por el contrario, presentó diferencias estadísticamente significativas entre todas las concentraciones evaluadas y el control negativo. Diferente a lo identificado para las células de leucemia linfocítica murina *L1210*, las formulaciones de AgNPs *Argovit* no inducen una disminución de la viabilidad celular superior al 15% en linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c, lo que corrobora nuevamente la baja citotoxicidad de estas AgNPs en modelos celulares sanos. El  $\text{AgNO}_3$  presentó un efecto citotóxico elevado desde la concentración de 55.6  $\mu\text{M}$ , con sus últimas concentraciones evaluadas (556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica) con valores por debajo del 50% de viabilidad celular. La prueba *post-hoc* de Tukey evidenció que para el  $\text{AgNO}_3$  todas las concentraciones evaluadas fueron significativamente diferentes.

Cabe destacar que, a diferencia de lo identificado entre las células transformadas del modelo humano y murino, donde estas últimas presentaron una sensibilidad mayor respecto de las primeras, los linfocitos de cultivos primarios de ratones BALB/c no fueron más sensibles al efecto de las *Argovit* en comparación con los linfocitos humanos. Por lo tanto, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre viabilidades celulares de las células de ambos modelos sanos.

Del mismo modo, se graficaron de forma independiente los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en cada una de las concentraciones de plata metálica evaluadas en linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c (**Figura A6**, página 79). Se identificó que, en todos los casos el tratamiento con AgNO<sub>3</sub> induce una mayor disminución de la viabilidad celular y por lo tanto muestra diferencias estadísticamente significativas en comparación con las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit*. Nuevamente fue posible distinguir resultados significativamente diferentes entre las formulaciones AgNP1 y AgNP4, a 5.5 y 55.6 μM (**Figura A6A** y **A6B**, página 79).



**Figura 8.** Viabilidad celular de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica) de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. ↓\* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre las concentraciones de una misma formulación de AgNP.

## 8.7 Análisis de potencia en los modelos linfocíticos murinos

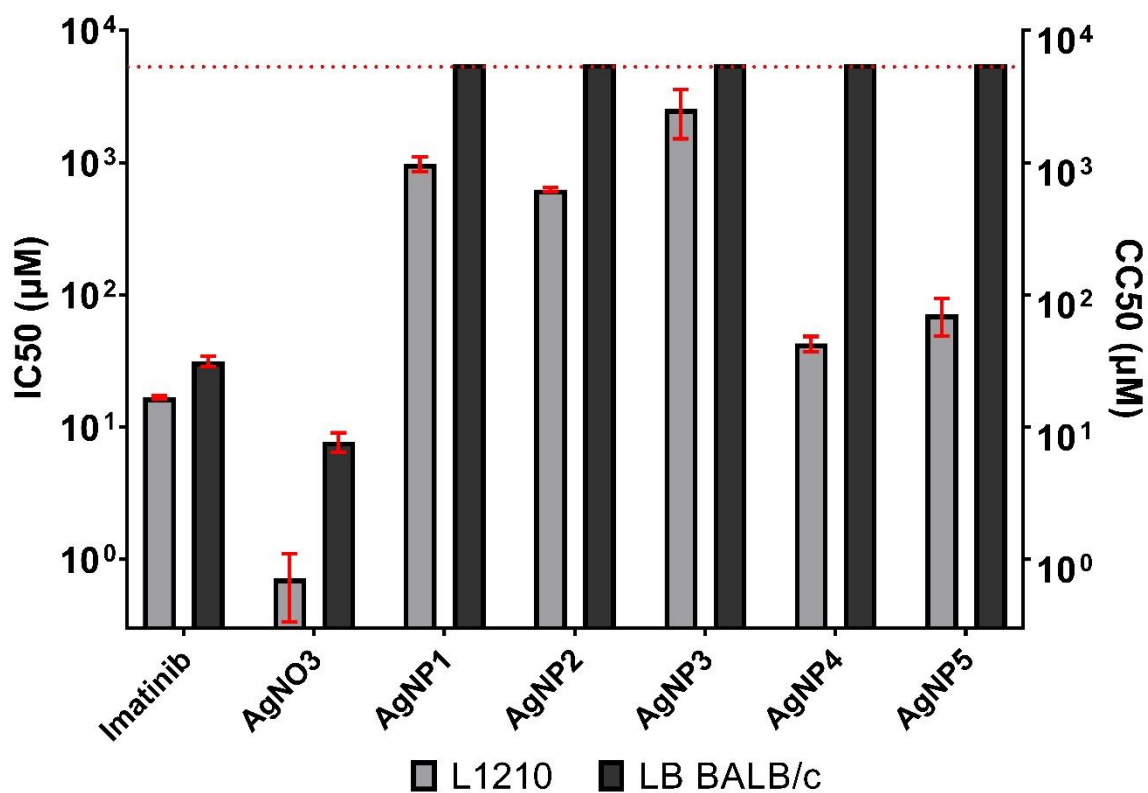
Con los resultados obtenidos de la actividad antiproliferativa de las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* en leucemia linfocítica murina *L1210* y su efecto citotóxico evaluado en linfocitos de bazo de cultivos primarios de ratones BALB/c, se determinaron las concentraciones del IC<sub>50</sub> para comparar con aquellas correspondientes al AgNO<sub>3</sub> e Imatinib (**Tabla 2**). Los porcentajes de muerte celular obtenidos se graficaron con respecto al logaritmo de las cuatro concentraciones evaluadas aplicando un ajuste sigmoideal y se trazaron en comparación con la curva de respuesta identificada para Imatinib y AgNO<sub>3</sub>. Esto se realizó tanto para la estimación del IC<sub>50</sub> en células *L1210* como para la estimación del CC<sub>50</sub> en linfocitos murinos, respectivamente (**Figura A7 y A8**, páginas 80 y 81). En la **Figura 9** se comparan los valores estimados de IC<sub>50</sub> de las formulaciones de AgNPs *Argovit* en células de leucemia linfocítica murina y linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c, respectivamente. Se puede observar como la totalidad de los IC<sub>50</sub> de las formulaciones de *Argovit* se sitúan por encima de los valores de IC<sub>50</sub> identificados para AgNO<sub>3</sub> e Imatinib.

Sin embargo, pese a que estos últimos presentan una mayor potencia en actividad antiproliferativa, inducen un efecto citotóxico que conduce a la muerte celular de las células sanas a bajas concentraciones. Por lo tanto, también presentan una alta potencia en linfocitos murinos no transformados. Al igual que lo identificado para linfocitos humanos, las AgNPs no produjeron efectos citotóxicos en células murinas sanas aún en la máxima concentración evaluada, correspondiente a 5.5 mM de plata metálica (línea roja marcada en la **Figura 7**), que origina una disminución menor al 15% de la viabilidad celular en linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c. Por esta razón, tampoco fue posible determinar el valor del IC<sub>50</sub> de estas formulaciones en el modelo murino.

En la **Tabla 5** se muestran los valores de potencia estimados para las formulaciones de *Argovit* respecto a AgNO<sub>3</sub> e Imatinib. La AgNP1 es aproximadamente 1359 veces menos potente que AgNO<sub>3</sub> y 58 veces menos potente que Imatinib para inhibir el 50% de la proliferación de células *L1210*. La AgNP4 es aproximadamente 60 veces menos potente que AgNO<sub>3</sub> y 3 veces menos potente que Imatinib para eliminar el 50% de células de leucemia linfocítica humana. Sin embargo, el AgNO<sub>3</sub> e Imatinib son al menos 717 y 177

veces más potentes que las formulaciones de *Argovit* eliminando el 50% de linfocitos de sangre periférica humana sanos, respectivamente.

Por su parte, el  $\text{AgNO}_3$  en comparación con Imatinib es aproximadamente 23 veces más potente para inhibir el 50% de células *Jurkat* y 4 veces más potente matando el 50% de linfocitos no transformados, posicionándolo como el estímulo más potente de esta evaluación. En la **Figura 10**, se muestra de mejor manera la comparación de la actividad antiproliferativa en células de leucemia linfocítica murina de las formulaciones de *Argovit* AgNP1 y AgNP4 en comparación con la actividad antiproliferativa de  $\text{AgNO}_3$  e Imatinib. Es apreciable el comportamiento casi lineal que se identificó para el  $\text{AgNO}_3$ , quien además presento una mayor potencia. Del mismo modo, se observan las curvas de las formulaciones AgNP1 y AgNP4 de *Argovit*, que difieren en la forma de las curvas, siendo las de la AgNP4 más potente que la de AgNP1. Sin embargo, ambas presentaron menor potencia en la muerte celular de células *L1210* respecto al Imatinib, que además sitúa su intersección con el  $\text{IC}_{50}$  varios ordenes de magnitud por debajo de las de las AgNPs.



**Figura 9.** Comparación de los valores de IC<sub>50</sub> de la línea celular de leucemia linfocítica murina *L1210* y los valores de IC<sub>50</sub> de linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c, obtenidos después de 24 horas de exposición a las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit*, AgNO<sub>3</sub> e Imatinib. Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. La línea roja indica la concentración máxima de palta metálica evaluada en este trabajo (5.5 mM).

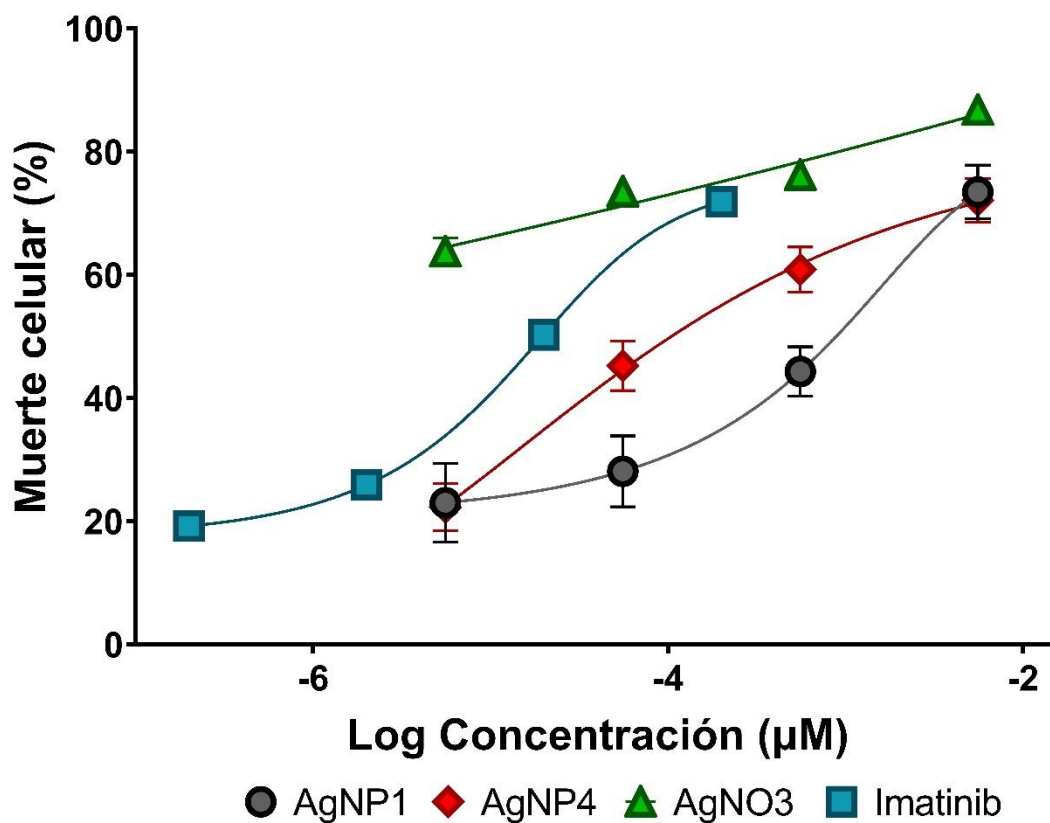
**Tabla 5.** Valores de potencia de las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* en células murinas evaluadas en este trabajo.

Estímulo	Potencia en células transformadas		Potencia en células sanas			
	L1210 (AgNO <sub>3</sub> ) <sup>A</sup>	L1210 (Imatinib) <sup>B</sup>	LB (AgNO <sub>3</sub> ) <sup>A</sup>	LB (Imatinib) <sup>B</sup>	MB (AgNO <sub>3</sub> ) <sup>A</sup>	MB (Imatinib) <sup>B</sup>
AgNP1	1358.59	58.15	> 716.63	> 177.23	419.65	421.81
AgNP2	866.70	37.10	> 716.63	> 177.23	370.10	372.01
AgNP3	3536.16	151.37	> 716.63	> 177.23	119.57	120.19
AgNP4	59.61	2.55	> 716.63	> 177.23	313.74	315.35
AgNP5	99.20	4.24	> 716.63	> 177.23	467.74	470.15
Imatinib	23.36		4.04		1.01	

<sup>A</sup> Potencia respecto al AgNO<sub>3</sub>

<sup>B</sup> Potencia respecto al Imatinib

LB: Linfocitos de Bazo de ratones BALB/c; MB: Monocitos de Bazo de ratones BALB/c.



**Figura 10.** Comparación de la actividad antiproliferativa en leucemia linfocítica murina *L1210* después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556 μM y 5.5 mM de plata metálica) de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>, en comparación con Imatinib (0.2, 2, 20 y 200 μM). Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado.

## 8.8 Análisis del índice de selectividad y ventana de seguridad *in vitro* en los modelos linfocíticos murinos

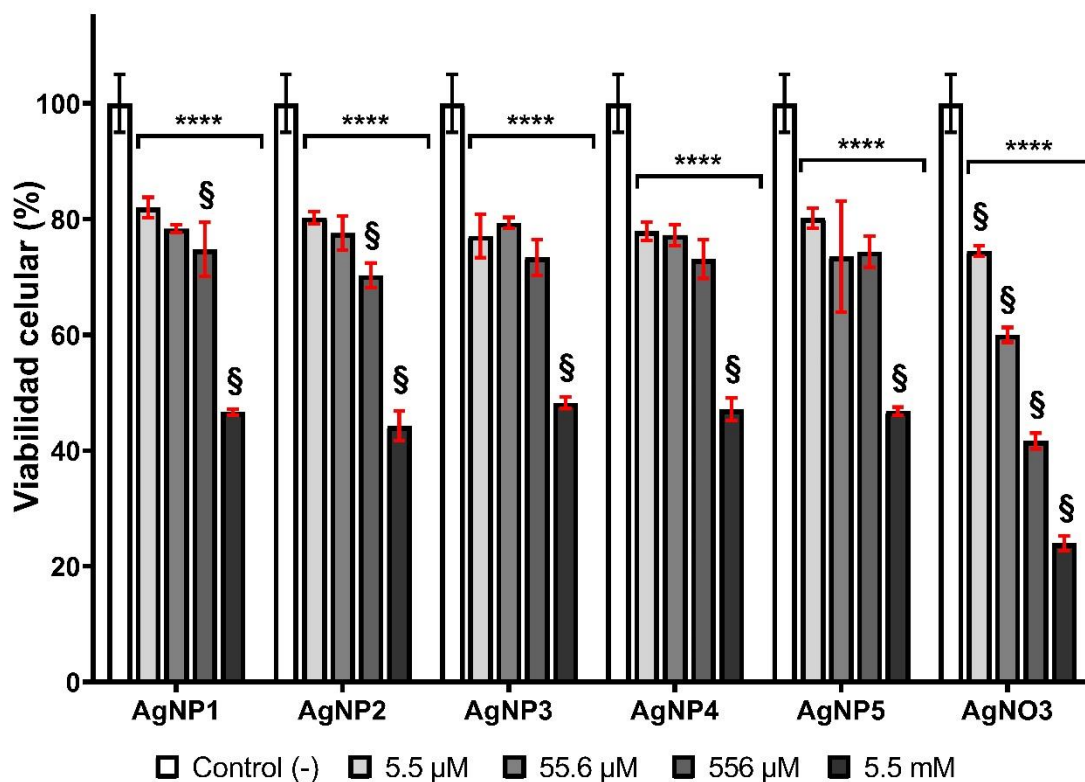
Con los resultados obtenidos de  $IC_{50}$  de la actividad de las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* en células *L1210* y linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c, se determinó el índice de selectividad y las concentraciones terapéuticas farmacológicas, para comparar con los tratamientos de  $AgNO_3$  e Imatinib (**Tabla 4**). De manera general, la AgNP4 y AgNP5 mostraron los índices de selectividad más altos, con valores de 129.73 y 77.96, respectivamente. Una vez más el  $AgNO_3$  (10.79) mostró un índice de selectividad superior al del Imatinib (1.86), siendo que ambos se identifican con una estrecha ventana de seguridad *in vitro*. Se identificó que la AgNP4 resultó ser aproximadamente 70 veces más selectiva que el Imatinib y casi 12 veces más selectiva que el  $AgNO_3$ . Por lo tanto, la formulación AgNP4 mostró una ventana de seguridad *in vitro* más grande, pues al tener un buen efecto antiproliferativo en células de leucemia linfocítica murina a una baja concentración e inducir daño citotóxico prácticamente nulo a una concentración elevada en linfocitos sanos de bazo de ratones BALB/c, demuestra su selectividad en el tratamiento de células transformadas. En comparación, la AgNP1 mostró un índice de selectividad de 5.69, que equivale a una selectividad 23 veces más baja que la AgNP4, resultando en una ventana de seguridad *in vitro* más pequeña.

## 8.9 Efecto citotóxico en monocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c

El efecto citotóxico de las formulaciones de AgNPs *Argovit* se evaluó en monocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c mediante la prueba de exclusión vital de azul tripano tras 24 horas de exposición a 5.5, 55.6, 556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica de las AgNPs. Los porcentajes de viabilidad celular obtenidos de las cuatro concentraciones evaluadas de las formulaciones de AgNPs *Argovit* y  $\text{AgNO}_3$  se graficaron en comparación con el control sin tratamiento (**Figura 11**). El análisis de varianza mostró que el efecto inducido por la exposición a las diferentes formulaciones de *Argovit* es significativamente diferente respecto al control negativo en la totalidad de las concentraciones evaluadas.

Además, la prueba *post-hoc* de Tukey indica que para la totalidad de las formulaciones de *Argovit*, el efecto inducido para la máxima concentración evaluada (correspondiente a 5.5 mM de plata metálica) es significativamente diferente en comparación con el resto de las concentraciones (5.5, 55.6 y 556  $\mu\text{M}$ ). Contrario a lo identificado para linfocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c, las formulaciones de AgNPs indujeron efectos citotóxicos en monocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c, reduciendo la viabilidad celular en todas las concentraciones evaluadas.

Adicionalmente, se graficaron de forma independiente los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en cada una de las concentraciones de plata metálica evaluadas en monocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c (**Figura A9, página 82**). Se identificó que con excepción de la concentración de 5.5  $\mu\text{M}$ , el tratamiento con  $\text{AgNO}_3$  induce una mayor disminución de la viabilidad celular en monocitos murinos y por lo tanto muestra diferencias estadísticamente significativas en comparación con las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit*. En este modelo las formulaciones AgNP1 y AgNP4 fueron significativamente diferentes solo a 5.5  $\mu\text{M}$  (**Figura A9A, página 82**).



**Figura 11.** Viabilidad celular de cultivos primarios de monocitos de bazo de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556 μM y 5.5 mM de plata metálica) de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. \* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre las concentraciones de una misma formulación de AgNP.

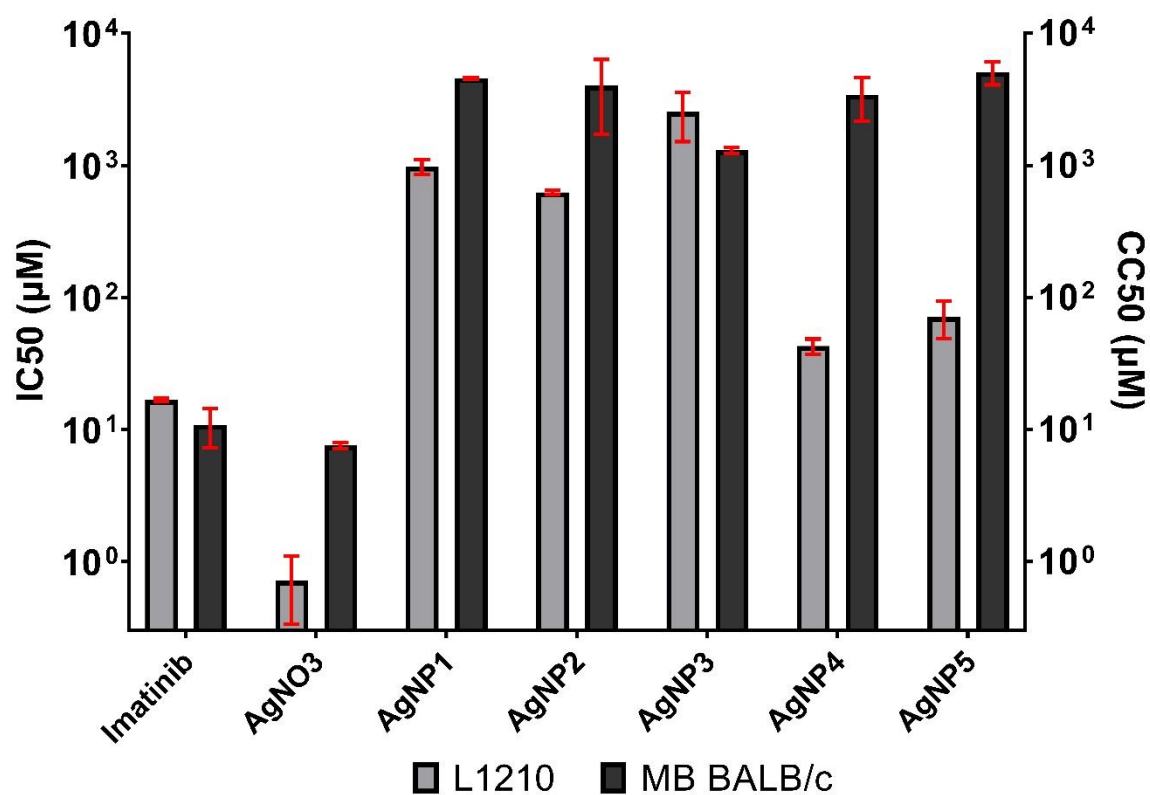
## 8.10 Análisis de potencia comparando con monocitos murinos

Con los resultados obtenidos del efecto citotóxico evaluado en monocitos de cultivos primarios de ratones BALB/c, se determinaron las concentraciones de IC<sub>50</sub> para comparar con aquellas correspondientes al AgNO<sub>3</sub> e Imatinib (**Tabla 2**). Los porcentajes de muerte celular obtenidos se graficaron con respecto al logaritmo de las cuatro concentraciones evaluadas aplicando un ajuste sigmoïdal y se trazaron en comparación con la curva de respuesta identificada para Imatinib y AgNO<sub>3</sub> (**Figura A10**, página 83). En la **Figura 12** se comparan los valores estimados de IC<sub>50</sub> de las formulaciones de AgNPs Argovit en células de leucemia linfocítica murina *L1210* y monocitos de cultivos primarios de ratones BALB/c, respectivamente.

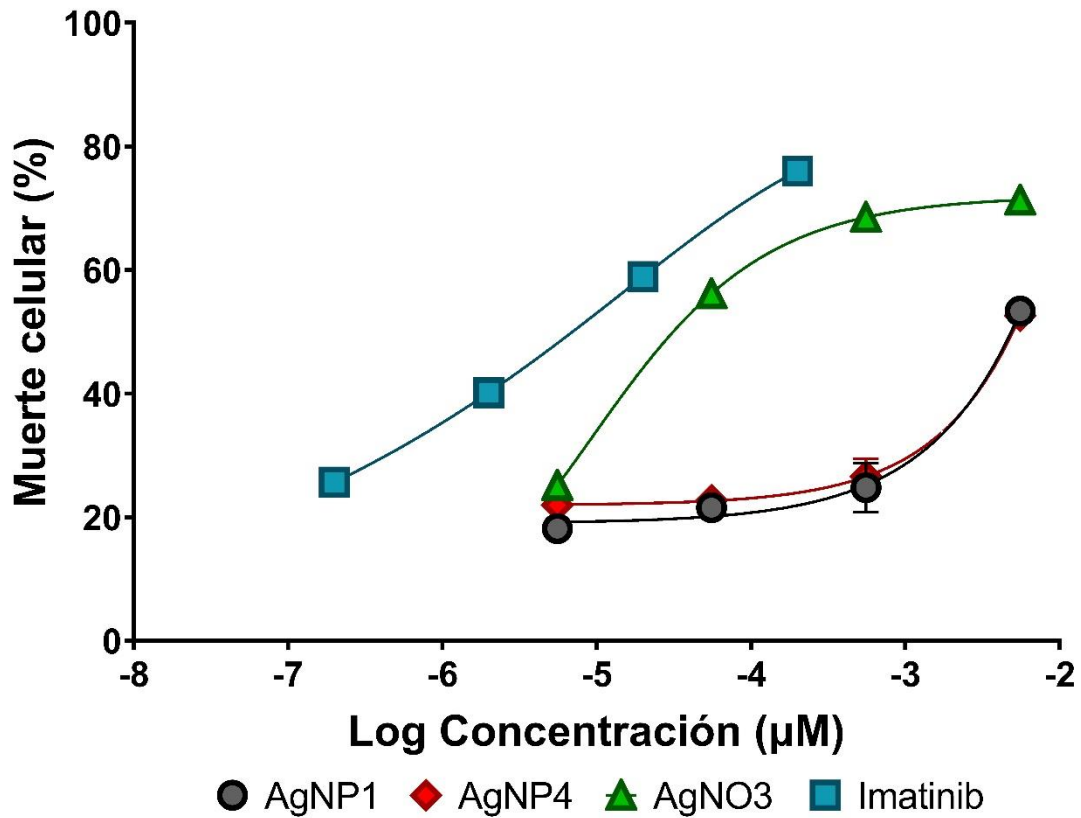
Se puede observar como la disminución en viabilidad celular inducida en monocitos murinos descrita previamente permitió determinar la IC<sub>50</sub> de las formulaciones de AgNPs *Argovit*, que con excepción de la AgNP3 se situó por encima de los valores de IC<sub>50</sub> estimados para células *L1210*, dejando un margen entre ambas concentraciones. Por su parte, el Imatinib induce efectos citotóxicos en monocitos murinos incluso a concentraciones menores a las que presenta actividad antiproliferativa, es decir, que el IC<sub>50</sub> identificado para células transformadas corresponde a una concentración mayor que la IC<sub>50</sub> estimada en células sanas. Contrario a esto, el AgNO<sub>3</sub> mostró un IC<sub>50</sub> de la misma magnitud que Imatinib, pero presentando un IC<sub>50</sub> a un orden de magnitud menor.

En la **Tabla 4** se muestran los valores de potencia calculados para las formulaciones de *Argovit* respecto a AgNO<sub>3</sub> e Imatinib. La AgNP1 es aproximadamente 420 veces menos potente que AgNO<sub>3</sub> y 422 veces menos potente que Imatinib para eliminar el 50% de monocitos de cultivos primarios de ratones BALB/c. La AgNP4 es aproximadamente 314 veces menos potente que AgNO<sub>3</sub> y 315 veces menos potente que Imatinib para eliminar el 50% de células de leucemia linfocítica humana. Por su parte, el AgNO<sub>3</sub> en comparación con Imatinib es igual de potente para inhibir el 50% de monocitos murinos sanos. En la **Figura 11**, se muestra de mejor manera la comparación de la actividad citotóxica en monocitos de cultivos primarios de ratones BALB/c de las formulaciones de *Argovit* AgNP1 y AgNP4 en comparación con AgNO<sub>3</sub> e Imatinib. Es apreciable la potencia identificada tanto para

AgNO<sub>3</sub> como para Imatinib, con las curvas de las formulaciones AgNP1 y AgNP4 de *Argovit* con un crecimiento más suave en la muerte celular.



**Figura 12.** Comparación de los valores de IC<sub>50</sub> de la línea celular de leucemia linfocítica murina *L1210* y los valores de IC<sub>50</sub> de monocitos de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c, obtenidos después de 24 horas de exposición a las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit*, AgNO<sub>3</sub> e Imatinib. Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. La línea roja indica la concentración máxima de palta metálica evaluada en este trabajo (5.5 mM).



**Figura 13.** Comparación de la actividad citotóxica en monocitos de cultivos primarios de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556 µM y 5.5 mM de plata metálica) de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>, en comparación con Imatinib (0.2, 2, 20 y 200 µM). Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado.

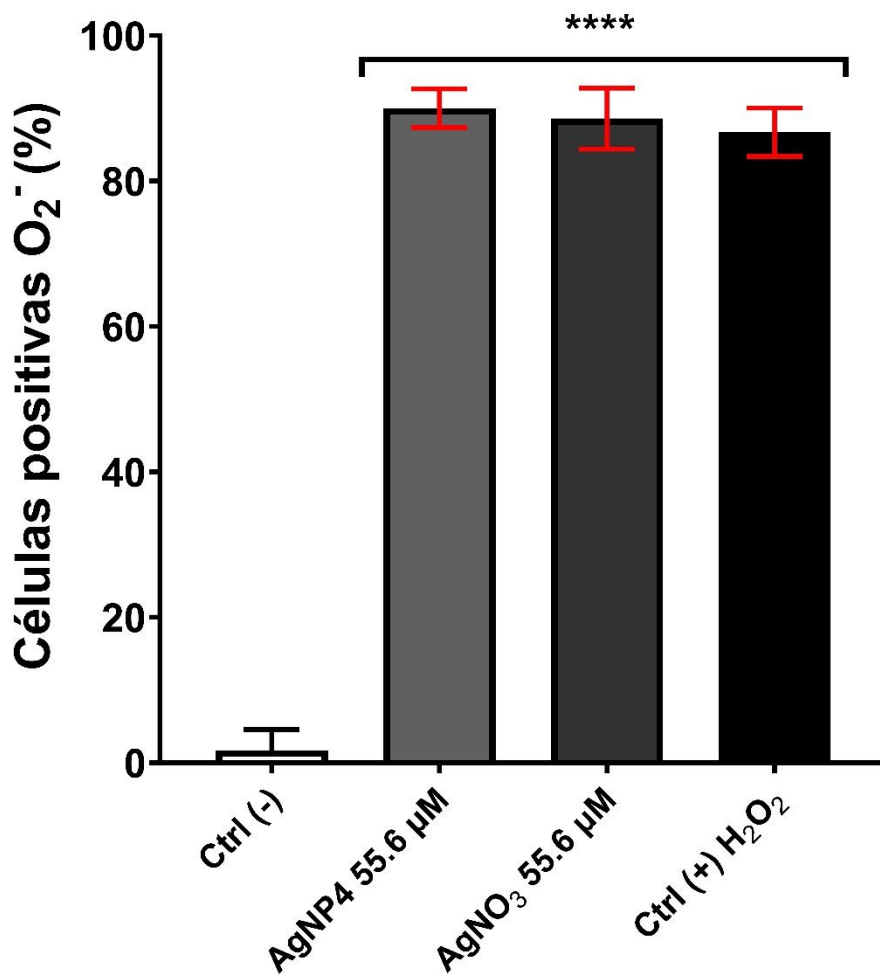
## 8.11 Análisis del índice de selectividad y ventana de seguridad *in vitro* comparando con monocitos murinos

Con los resultados obtenidos de  $IC_{50}$  de la actividad citotóxica de las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* en monocitos de cultivos primarios de ratones BALB/c, se determinó el índice de selectividad y las ventanas de seguridad *in vitro*, para comparar con los tratamientos de  $AgNO_3$  e Imatinib (**Tabla 5**). De manera general, la AgNP4 y AgNP5 mostraron los índices de selectividad más altos, con valores de 79.56 y 71.29, respectivamente. Incluso el  $AgNO_3$  (15.12) mostró un índice de selectividad superior al del Imatinib (0.64), que indujo efectos citotóxicos en el 50% de las células sanas a una menor concentración que la requerida para eliminar al 50% de células transformadas. Se identificó que la AgNP4 resultó ser aproximadamente 124 veces más selectiva que el Imatinib y casi 5 veces más selectiva que el  $AgNO_3$ . Por lo tanto, la formulación AgNP4 mostró una ventana de seguridad *in vitro* más amplia. En comparación, la AgNP1 mostró un índice de selectividad de 4.67, es decir, fue 17 veces menos selectivo que la AgNP4, pero aproximadamente 7 veces más selectivo que Imatinib.

## 8.12 Cuantificación de ROS mitocondriales en células *Jurkat*

La generación de superóxido mitocondrial inducida por las formulaciones de *Argovit* se evaluó en células de leucemia linfocítica humana *Jurkat* a través de microscopía de fluorescencia, utilizando el indicador rojo MitoSOX de Invitrogen tras 24 horas de exposición a 55.6  $\mu\text{M}$  de plata metálica de la AgNP4 y AgNO<sub>3</sub>. Los porcentajes de células positivas al ion superóxido se graficaron en comparación con un control sin tratamiento y un control positivo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 14**). El análisis de varianza mostró que la producción de superóxido mitocondrial por la exposición a AgNP4 y AgNO<sub>3</sub> es significativamente diferente respecto al control negativo. La prueba *post-hoc* de Tukey indica que no existe diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de células positivas a superóxido mitocondrial entre los tratamientos de AgNP4 y AgNO<sub>3</sub>.

En la Figura **A17** (página 90) se muestran las micrografías que comparan las células *Jurkat* con y sin fluorescencia tratadas para la evaluación de generación de superóxido mitocondrial. Puede observarse que pese a haber una disminución de la cantidad de células respecto al control sin tratamiento (**Figura A17A**, página 90), las imágenes de AgNP4 y AgNO<sub>3</sub> (**Figuras A17C y A17D**, respectivamente) se muestran con una baja cantidad de restos celulares. Sin embargo, debido a que la concentración evaluada (55.6  $\mu\text{M}$  de plata metálica) es menor al IC<sub>50</sub> calculado para AgNP4 en células *Jurkat*, no se presentó una gran disminución de viabilidad celular. El control positivo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura A17B**, página 90) redujo considerablemente la viabilidad celular del cultivo, sin embargo, la proporción de células que permanecieron viables que resultaron positivas a la generación de ion superóxido mitocondrial fue elevada (> 80%).



**Figura 14.** Generación de ion superóxido en células de leucemia linfocítica humana *Jurkat* después de 24 horas de tratamiento con 55.6 μM de plata metálica de la formulación AgNP4 de *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>, en comparación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. \* representa diferencias significativas respecto al control sin tratamiento.

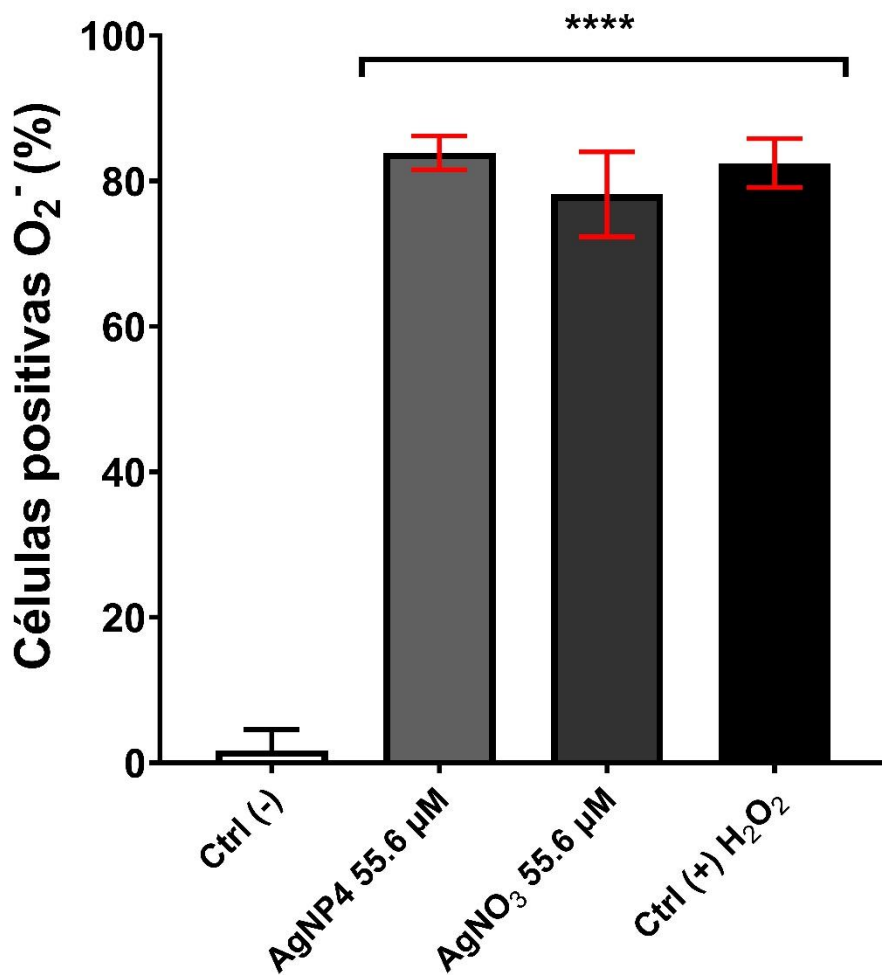
### 8.13 Cuantificación de ROS mitocondriales en células *L1210*

La generación de superóxido mitocondrial inducida por las formulaciones de *Argovit* también se evaluó en células de leucemia linfocítica murina *L1210* a través de microscopía de fluorescencia, utilizando el indicador rojo MitoSOX de Invitrogen tras 24 horas de exposición a 55.6  $\mu\text{M}$  de plata metálica de la AgNP4 y AgNO<sub>3</sub>. Los porcentajes de células positivas al ion superóxido se graficaron en comparación con un control sin tratamiento y un control positivo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 15**). El análisis de varianza mostró que la producción de superóxido mitocondrial por la exposición a AgNP4 y AgNO<sub>3</sub> es significativamente diferente respecto al control negativo. La prueba *post-hoc* de Tukey indica que no existe diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de células positivas a superóxido mitocondrial entre los tratamientos de AgNP4 y AgNO<sub>3</sub>.

En la Figura **A18** (página 90) se muestran las micrografías que comparan las células *L1210* con y sin fluorescencia tratadas para la evaluación de generación de superóxido mitocondrial. Puede observarse una marcada disminución de la cantidad de células respecto al control sin tratamiento (**Figura A18A**, página 90), donde AgNP4 y AgNO<sub>3</sub> (**Figuras A18C y A18D**, respectivamente) se muestran con una alta cantidad de restos celulares. Debido a que la concentración evaluada (55.6  $\mu\text{M}$  de plata metálica) es superior al IC<sub>50</sub> estimado previamente para células *L1210*, la viabilidad celular se redujo considerablemente. Sin embargo, la proporción de células que son positivas a la generación de ion superóxido no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a las células *Jurkat*, cuyo IC<sub>50</sub> es superior. Esto sugiere que la AgNP4 induce la generación de superóxido mitocondrial a concentraciones incluso por debajo del IC<sub>50</sub>, y que pese a causar una elevada cantidad de muerte celular, sigue induciendo a la generación de superóxido mitocondrial en las células que prevalecen.

Por su parte, el control positivo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura A18B**, página 90) también disminuyó la viabilidad celular del cultivo, sin embargo, la proporción de células que permanecieron viables que resultaron positivas a la generación de ion superóxido mitocondrial se mantuvo superior al 80%. Se identificaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la cantidad de células *Jurkat* y *L1210* positivas a la generación de ion superóxido con 55.6  $\mu\text{M}$  de plata metálica de AgNO<sub>3</sub>, donde un factor fundamental

puede ser nuevamente la sensibilidad por parte del modelo murino a los efectos de este tratamiento.



**Figura 15.** Generación de ion superóxido en células de leucemia linfocítica murina *L1210* después de 24 horas de tratamiento con 55.6 μM de plata metálica de la formulación AgNP4 de *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>, en comparación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. \* representa diferencias significativas respecto al control sin tratamiento.

## 9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se comparó la actividad antiproliferativa de las formulaciones de AgNPs *Argovit* en células de las líneas celulares de leucemia linfocítica humana *Jurkat* y murina *L1210*, con el objetivo de determinar su potencial anticancerígeno en ambos modelos. A su vez, se evaluó el efecto citotóxico de dichas formulaciones en linfocitos humanos aislados de sangre periférica y cultivos primarios de bazo y médula de ratones BALB/c, con el objetivo de definir sus posibles efectos en células sanas. De esta forma se presenta la respuesta biológica identificada de las formulaciones de AgNPs *Argovit* para determinar su potencial como agentes antileucémicos.

Por su parte, el Imatinib produjo la mayor cantidad de células muertas teñidas con azul tripano a partir de la concentración de 2  $\mu\text{M}$ . Más aún, fue el estímulo evaluado que presentó la mayor cantidad de restos celulares para todas las concentraciones evaluadas (0.2, 2, 20 y 200  $\mu\text{M}$ ). En ambos modelos registró una potencia superior a las formulaciones de AgNPs de *Argovit*, con  $\text{IC}_{50}$  de  $16.79 \pm 0.55 \mu\text{M}$  en células de leucemia linfocítica murina *L1210* y de  $12.86 \pm 1.11 \mu\text{M}$  en células de leucemia linfocítica humana *Jurkat*.

El Imatinib es un fármaco inhibidor de la tirosina cinasa, cuyo uso ha sido ampliamente reportado para el tratamiento de neoplasias hematológicas como leucemia linfocítica aguda y leucemia crónica mieloide, con  $\text{IC}_{50}$  estimados entre los 0.02 y 20  $\mu\text{M}$  (Das et al., 2018). Corresponde al primer fármaco desarrollado y aprobado para dirigirse específicamente a una proteína cinasa en el tratamiento de enfermedades (Cohen et al., 2021). Su principal función corresponde a inhibir la señal de proteína que promueve la proliferación de células cancerosas en el tratamiento de pacientes con neoplasias hematológicas o sarcomas malignos. Para ello, participa como un inhibidor competitivo específico de ATP. Se une con alta afinidad en el sitio de unión de la forma inactiva del dominio cinasa a ATP, bloqueando su unión y, por consiguiente, inhibe la actividad de la proteína al interrumpir la transferencia de fosfato del ATP a los residuos de tirosina (Cohen et al., 2021; Waller, 2014). Aunque es un fármaco ampliamente descrito en el tratamiento de enfermedades como leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide crónica en crisis blástica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia sistémica agresiva, mastocitosis, tumores del estroma

gastrointestinal y otras enfermedades, se ha identificado resistencia a su uso con el paso del tiempo en casi todos los pacientes (Das et al., 2018).

La resistencia farmacológica de las células cancerígenas se ha reconocido clínicamente como un problema en aumento, con el desarrollo de numerosas vías para generar resistencia tumoral a una amplia variedad de anticancerígenos después de la exposición a uno o varios fármacos. En la actualidad, la farmacoresistencia sigue siendo el principal factor limitante para curar a los pacientes con cáncer (Vasan et al., 2019). En lugar de eliminar a las células cancerosas directamente, se atribuye la resistencia al daño provocado por el agente anticancerígeno que desencadena la muerte celular programada o apoptosis. Por lo tanto, la resistencia surge de los mecanismos de defensa celulares que limitan el acceso del agente a un objetivo celular en particular o que evitan que la célula entre en apoptosis después de su exposición (Jagani et al., 2008; Ross, 2000).

La fármaco resistencia es un problema que va en aumento, y no es la excepción para los tratamientos antileucémicos (Vasan et al., 2019). Se ha reportado un incremento en la resistencia al tratamiento con Imatinib y otros bloqueadores de tirosina cinasa en células de leucemia, y aunque la forma por el cual se genera resistencia aun no es del todo clara, se han descrito varios posibles mecanismos (Das et al., 2018; Deininger, 2005; Quintás-Cardama et al., 2009). Entre ellos se encuentran la resistencia a fármacos relacionados con enzimas y proteínas, alteraciones genéticas, alteraciones de miRNA, o la activación aberrante de vías de señalización relacionadas con la resistencia a fármacos (J. Zhang et al., 2019).

Dentro de los mecanismos de resistencia descritos para leucemia, los mecanismos dependientes de BCR ABL1 son los mejor caracterizados para el tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa. Mutaciones en el gen BCR ABL1 reducen la afinidad de imatinib para la tirosina quinasa y por lo tanto inducen resistencia. Otro de los mecanismos propuestos deriva de una proteína de transporte asociada a la membrana, la glicoproteína P. Es una proteína que reside en las membranas plasmáticas y funciona como un transportador de xenobióticos. La sobreexpresión de esta proteína confiere resistencia a una amplia variedad de fármacos contra el cáncer, muchos de los cuales se utilizan en el tratamiento de la leucemia (Broxterman et al., 2000; Colechia et al., 2015; Das et al., 2018; Deininger, 2005; Quintás-Cardama et al., 2009; Ross, 2000). Se ha encontrado que la expresión de glicoproteína P está asociada con

cambios en varias vías reguladoras celulares que reflejan la reconstrucción de la arquitectura celular, particularmente de la membrana plasmática (Coculova et al., 2016).

Finalmente, el gen supresor de tumores TP53 es uno de los genes mutados con mayor frecuencia en el cáncer humano (Barbosa et al., 2019) y desempeña un papel central en el control del ciclo celular, la reparación del ADN y la activación de la apoptosis (Kamihira et al., 2009). Una de las funciones mejor estudiadas de TP53 es su papel en la limitación de la proliferación celular en respuesta a la expresión anómala de oncogenes. Las alteraciones de p53 se observan ampliamente en al menos 15% de los casos de leucemia (Barbosa et al., 2019; Kamihira et al., 2009; Kuykendall et al., 2018; A. Sharma et al., 2019). Aunque la frecuencia de las mutaciones de p53 es sustancialmente menor que en otros cánceres humanos, estas mutaciones se asocian con quimiorresistencia y alto riesgo de recaída (Barbosa et al., 2019).

Aunque el Imatinib es el fármaco de primera elección para una gran cantidad de neoplasias hematológicas, la mayoría de ellos eventualmente dejan de responder al tratamiento con este medicamento y comienza a presentar resistencia a su uso (Zhu et al., 2016). Debido a esta resistencia por parte de las células de leucemia, se ha propuesto el uso de este fármaco en combinación con otros agentes anticancerígenos (Nair et al., 2021; Waller, 2014; Zhu et al., 2016). El tratamiento óptimo para los pacientes que fracasan con el tratamiento con Imatinib es el aumento de la dosis, un inhibidor de tirosina cinasa de segunda generación (dasatinib, ruxolitinib), trasplante alogénico de células madre u otros agentes antileucémicos, como la homoharringtonina (Mu et al., 2021; Zhu et al., 2016). Además, se ha examinado el Imatinib en combinación con otros agentes, como interferón, citarabina y homoharringtonina (Mu et al., 2021; Waller, 2014). Diversos estudios informan que aun utilizando la terapia combinatoria entre dos o más agentes anticancerígenos se presenta resistencia al tratamiento y una baja selectividad por parte de estos anticancerígenos. Más aún, algunos informes muestran que incluso la combinación de Imatinib con otros anticancerígenos lo vuelven más tóxico que el incremento de las dosis (Waller, 2014).

En ese sentido, la terapia combinatoria no sólo se ha extendido al incremento de quimioterapéuticos en el esquema de tratamiento de las leucemias, pues hay un incremento considerable en la cantidad de publicaciones que sugiere el uso de medicamentos de primera elección, como el Imatinib, en coacción con nanomateriales. Dentro de estos nanomateriales,

el uso de las nanopartículas ha sido el más estudiado debido a que sus propiedades fisicoquímicas únicas les permiten modular o potenciar el efecto de estos antineoplásicos.

En cuanto a la potencial aplicación de la nanotecnología en el tratamiento del cáncer y los beneficios de una terapia combinada con Imatinib, recientemente se reportó el diseño de un nanoconjugado para lograr el silenciamiento del gen BCR-ABL1. Las nanopartículas de oro se funcionalizaron con un oligonucleótido de ADN monocatenario que se dirige selectivamente a BCR-ABL1 expresado por las células leucemia crónica mieloide K562. Como resultado se demostró que las nanopartículas funcionalizadas en conjunto con el Imatinib indujeron apoptosis en células K562 que expresan el gen BCR-ABL1 disminuyendo además la  $IC_{50}$  en comparación con la del fármaco. Este nanoconjugado de Au también fue capaz de inducir la pérdida de viabilidad de las células K562 resistentes a Imatinib (Vinhas et al., 2017). De este modo, se ha demostrado que la nanotecnología puede plantear nuevas y mejores alternativas en contra de enfermedades como el cáncer.

En lo que respecta a la actividad antiproliferativa en células de leucemia linfocítica humana *Jurkat* y murina *L1210*, se identificó la máxima actividad de las formulaciones de *Argovit* en la concentración más alta evaluada (correspondiente a 5.5 mM), que para ambos modelos presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a las demás concentraciones. Los conteos celulares para esta concentración mostraron a la totalidad de células teñidas del color de la disolución prueba de AgNPs, con algunas de las células teñidas con azul tripano. Resultados similares fueron previamente identificados para las mismas formulaciones de AgNPs *Argovit* en células de adenocarcinoma de colon humano HCT15, en donde la mayor concentración evaluada de plata metálica (5.5 mM) conllevó a la mayor actividad antiproliferativa (Cruz-Ramírez et al., 2021). La morfología de las células *Jurkat* y *L1210* permaneció inalterada en las concentraciones de 5.5, 55.6 y 556  $\mu$ M de plata metálica, tanto de las formulaciones de *Argovit* como del  $AgNO_3$ . En el conteo de estos ensayos exclusivamente se observaron células viables y el registro de restos celulares fue mucho menor en comparación con 5.5 mM. Se encontró una mayor sensibilidad a las especies con plata por partes de las células murinas transformadas, que presentan una mayor disminución de la viabilidad celular en comparación con las células humanas transformadas de leucemia linfocítica.

En ambos modelos, la AgNP4 de *Argovit* presentó una mejor actividad antiproliferativa, registrando los valores más bajos de IC<sub>50</sub> entre las formulaciones, con  $777.21 \pm 60.54 \mu\text{M}$  y  $42,68 \pm 5.56 \mu\text{M}$  de plata metálica en *Jurkat* y *L1210*, respectivamente. La AgNP4 fue aproximadamente 267 veces menos potente que AgNO<sub>3</sub> y 60 veces menos potente que Imatinib para eliminar células de leucemia linfocítica humana. Con respecto a las células de leucemia linfocítica murina, el AgNO<sub>3</sub> e Imatinib fueron 60 y 3 veces más potentes que AgNP4 de *Argovit*, respectivamente. En comparación, la AgNP1, que mantiene las mismas propiedades fisicoquímicas que la formulación AgNP4 (**Tabla 1**) con excepción de la longitud de la cadena del recubrimiento de PVP, fue significativamente menos potente. Con respecto a AgNO<sub>3</sub> e Imatinib en células *Jurkat*, la AgNP1 de *Argovit* fue 1568 y 354 veces menos potente, respectivamente. En células *L1210*, estos fueron 1359 y 58 veces más potentes, respectivamente. Es decir, la formulación AgNP1 fue aproximadamente 6 veces menos potente que la AgNP4 en leucemia linfocítica humana y aproximadamente 23 veces menos potente en leucemia linfocítica murina.

A pesar de la similitud entre ambas formulaciones de *Argovit*, se identificó una respuesta muy diferente en los modelos evaluados en este trabajo. El efecto del agente de recubrimiento en la respuesta biológica determinada en cultivos *in vitro* ha sido pobremente descrito. Aunque los agentes de recubrimiento son una parte integral de las nanopartículas, no han recibido suficiente atención por su posible contribución a la toxicidad general. La información de los agentes de recubrimiento de superficies a menudo ni siquiera está disponible por parte de los proveedores, lo que dificulta determinar su efecto en las pruebas de toxicidad (C. Zhang et al., 2016). Se sabe que el recubrimiento define las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs, determinando la interacción con el medio ambiente y el comportamiento general en la evaluación (Biba et al., 2022; Jurašin et al., 2016; Schubert & Chanana, 2018). El recubrimiento de la superficie es un componente importante, ya que mejora su estabilidad al proteger a las formulaciones de nanopartículas de la aglomeración y la oxidación del medio ambiente (Bélteky et al., 2021). Las formulaciones de *Argovit* están estabilizadas y recubiertas con PVP, que ha sido descrito como un buen estabilizador estérico que se une fuertemente a la superficie de las AgNPs (V. K. Sharma et al., 2014).

Varios estudios han propuesto que la toxicidad de las Ag-NP está asociada con la liberación de iones Ag<sup>+</sup> de las Ag-NP [32, 33, 34, 35]. Si bien en este estudio no se midió la

disolución de Ag-NP, se utilizó  $\text{AgNO}_3$  como fuente de iones  $\text{Ag}^+$  con fines comparativos. Nuestro estudio mostró que, a concentraciones equivalentes de plata, las AgNPs sin recubrimiento mostraron una mayor toxicidad que el  $\text{AgNO}_3$ . Esto sugiere que la disolución de plata no puede ser el único factor que contribuye a los efectos inducidos por Ag-NP sin recubrimiento en las células de prueba. Además, las Ag-NP recubiertas fueron menos tóxicas que el  $\text{AgNO}_3$  a concentraciones de plata equivalentes, lo que sugiere que los recubrimientos podrían tener efectos protectores sobre la liberación de iones  $\text{Ag}^+$  o que los mecanismos de toxicidad de las Ag-NP son diferentes del material a granel (Nguyen et al., 2013).

Los estudios de toxicidad de AgNPs han demostrado que las propiedades fisicoquímicas como el tamaño, la forma, el recubrimiento superficial, la carga superficial, la solubilidad y la composición química de la nanopartícula afectan drásticamente su comportamiento en los sistemas biológicos y, por lo tanto, influyen en su toxicidad. Se ha demostrado que el recubrimiento de la superficie afecta la afinidad de las AgNPs por la superficie celular y la disolución o liberación de iones  $\text{Ag}^+$  de las AgNP, que se ha propuesto como uno de los mecanismos de citotoxicidad para estas nanopartículas (Nguyen et al., 2013).

## 10. CONCLUSIONES

Se identificó que los cultivos de líneas celulares de leucemia linfocítica humana *Jurkat* y murina *L1210* presentan una sensibilidad diferente a los efectos en actividad antiproliferativa inducida por las formulaciones de AgNPs *Argovit* evaluadas en este trabajo.

Aunque en general las cinco formulaciones de AgNPs *Argovit* mostraron actividad antiproliferativa en células transformadas de leucemia, la formulación AgNP4 resultó ser la que mostró una mayor potencia en los modelos de células *Jurkat* y *L1210*.

Del mismo modo, aunque ninguna de las formulaciones de *Argovit* indujo una reducción de la viabilidad celular de linfocitos de sangre periférica humana o linfocitos de bazo de cultivos primarios de ratones BALB/c, la formulación AgNP4 mostró un mayor índice de selectividad en comparación con el resto de las AgNPs evaluadas.

Los resultados de actividad antiproliferativa y citotóxica postulan a la AgNP4 de *Argovit* como el mejor agente antileucémico entre las formulaciones evaluadas en este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ávalos, A., Haza, A. I., Mateo, D. & Morales, P. (2015). Effects of silver and gold nanoparticles of different sizes in human pulmonary fibroblasts. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 25(4), 287–295. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1025347>
- Awasthi, R., Roseblade, A., Hansbro, P. M., Rathbone, M. J., Dua, K. & Bebawy, M. (2018). Nanoparticles in Cancer Treatment: Opportunities and Obstacles. *Current Drug Targets*, 19(14), 1696–1709. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180326122831>
- Barbosa, K., Li, S., Adams, P. D. & Deshpande, A. J. (2019). The role of TP53 in acute myeloid leukemia: Challenges and opportunities. *Genes Chromosomes and Cancer*, 58(12), 875–888. <https://doi.org/10.1002/gcc.22796>
- Bélteky, P., Rónavári, A., Zakupszky, D., Boka, E., Igaz, N., Szerencsés, B., Pfeiffer, I., Vágvölgyi, C., Kiricsi, M. & Kónya, Z. (2021). Are smaller nanoparticles always better? Understanding the biological effect of size-dependent silver nanoparticle aggregation under biorelevant conditions. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 3021–3040. <https://doi.org/10.2147/IJN.S304138>
- Biba, R., Košpić, K., Komazec, B., Markulin, D., Cvjetko, P., Pavoković, D., Štefanić, P. P., Tkalec, M. & Balen, B. (2022). Surface coating-modulated phytotoxic responses of silver nanoparticles in plants and freshwater green algae. *Nanomaterials*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/nano12010024>
- Broxterman, H. J., Sonneveld, P., Van Putten, W. J. L., Lankelma, J., Eekman, C. A., Ossenkoppele, G. J., Pinedo, H. M., Löwenberg, B. & Schuurhuis, G. J. (2000). P-glycoprotein in primary acute myeloid leukemia and treatment outcome of idarubicin/cytosine arabinoside-based induction therapy. *Leukemia*, 14(6), 1018–1024. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401796>
- Coculova, M., Imrichova, D., Seres, M., Messingerova, L., Bohacova, V., Sulova, Z. & Breier, A. (2016). The expression of P-glycoprotein in leukemia cells is associated with the upregulated expression of nestin, a class 6 filament protein. *Leukemia Research*, 48, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2016.05.021>
- Cohen, P., Cross, D. & Jänne, P. A. (2021). Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(7), 551–569. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00195-4>
- Colecchia, D., Rossi, M., Sasdelli, F., Sanzone, S., Strambi, A. & Chiariello, M. (2015). MAPK15 mediates BCR-ABL1-induced autophagy and regulates oncogene-dependent cell proliferation and tumor formation. *Autophagy*, 11(10), 1790–1802. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1084454>
- Cruz-Ramírez, O. U., Valenzuela-Salas, L. M., Blanco-Salazar, A., Rodríguez-Arenas, J. A., Mier-Maldonado, P. A., García-Ramos, J. C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A. & Toledano-Magaña, Y. (2021). Antitumor activity against human colorectal adenocarcinoma of silver nanoparticles: Influence of [ag]/[pvp] ratio. *Pharmaceutics*, 13(7), 8–10. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071000>
- Das, C. K., Mandal, M. & Kögel, D. (2018). Pro-survival autophagy and cancer cell

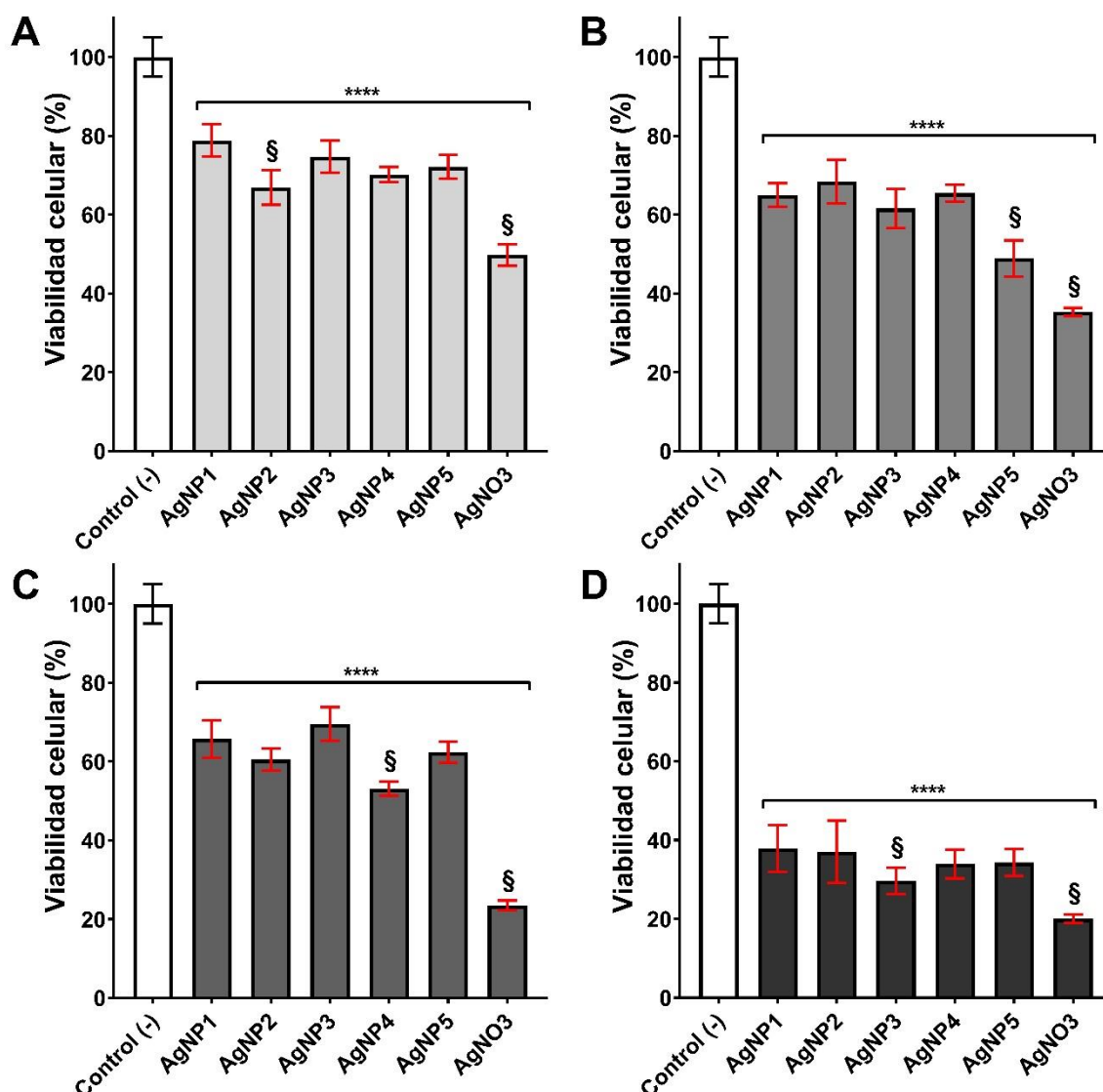
- resistance to therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(4), 749–766.  
<https://doi.org/10.1007/s10555-018-9727-z>
- Deininger, M. (2005). Resistance to imatinib: Mechanisms and management. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 3(6), 757–768.  
<https://doi.org/10.6004/jnccn.2005.0045>
- González-León, M.; et al. (2010). The burden of disease of cancer in the Mexican social security institute. Recuperado de:  
<http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/7781/10637> (14/05/20)
- Greulich, C., Diendorf, J., Geßmann, J., Simon, T., Habijan, T., Eggeler, G., Schildhauer, T. a., Epple, M. & Köller, M. (2011). Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 7(9), 3505–3514.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.030>
- Jagani, Z., Singh, A. & Khosravi-Far, R. (2008). FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: A matter of evasion of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1785(1), 63–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.10.003>
- Jurašin, D. D., Čurlin, M., Capjak, I., Crnković, T., Lovrić, M., Babič, M., Horić, D., Vrček, I. V. & Gajović, S. (2016). Surface coating affects behavior of metallic nanoparticles in a biological environment. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 7(1), 246–262. <https://doi.org/10.3762/bjnano.7.23>
- Kamihira, S., Terada, C., Sasaki, D., Yanagihara, K., Tsukasaki, K., Hasegawa, H. & Yamada, Y. (2009). Aberrant p53 protein expression and function in a panel of hematopoietic cell lines with different p53 mutations. *European Journal of Haematology*, 82(4), 301–307. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01211.x>
- Kuykendall, A., Duployez, N., Boissel, N., Lancet, J. E. & Welch, J. S. (2018). Acute Myeloid Leukemia: The Good, the Bad, and the Ugly. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 38, 555–573. [https://doi.org/10.1200/edbk\\_199519](https://doi.org/10.1200/edbk_199519)
- Leukemia and lymphoma society. (2020). Leukemia. Recuperado de:  
<https://www.lls.org/leukemia> (14/05/20)
- Miranda, R. R., Sampaio, I. & Zucolotto, V. (2022). Exploring silver nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 210(August 2021), 112254. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112254>
- MD Anderson Cancer Center, The University of Texas. (2020). Childhood leukemia. Recuperado de: <https://www.mdanderson.org/cancer-types/childhood-leukemia.html> (14/05/20)
- Mohar-Betancourt, A.; et al. (2017, Diciembre). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up OF Public Policies. *Journal of Global Oncology*, Vol. 3, No. 6, 740-748.
- Mu, H., Zhu, X., Jia, H., Zhou, L. & Liu, H. (2021). Combination Therapies in Chronic Myeloid Leukemia for Potential Treatment-Free Remission: Focus on Leukemia Stem Cells and Immune Modulation. *Frontiers in Oncology*, 11(May).  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.643382>
- Nair, R., Salinas-Illarena, A. & Baldauf, H. M. (2021). New strategies to treat AML: novel insights into AML survival pathways and combination therapies. *Leukemia*, 35(2), 299–311. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-01069-1>
- National Cancer Institute. (2020). Leukemia: patient versión. Recuperado de:  
<https://www.cancer.gov/types/leukemia> (14/05/20)
- Nguyen, K. C., Seligy, V. L., Massarsky, A., Moon, T. W., Rippstein, P., Tan, J. & Tayabali, A. F. (2013). Comparison of toxicity of uncoated and coated silver

- nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 429, 012025.  
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/429/1/012025>
- Nymark, P., Catalán, J., Suhonen, S., Järventaus, H., Birkedal, R., Clausen, P. A., Jensen, K. A., Vippola, M., Savolainen, K. & Norppa, H. (2013). Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. *Toxicology*, 313(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.014>
- Padilla-Raygoza, N.; et al. (2020). Cancer prevention programmes in Mexico: are we doing enough? Recuperado de: <https://ecancer.org/en/journal/article/997-cancer-prevention-programmes-in-mexico-are-we-doing-enough> (14/05/20)
- Piao, M. J., Kang, K. A., Lee, I. K., Kim, H. S., Kim, S., Choi, J. Y., Choi, J. & Hyun, J. W. (2011). Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*, 201(1), 92–100.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.010>
- Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H. M. & Cortes, J. E. (2009). Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*, 16(2), 122–131. <https://doi.org/10.1177/107327480901600204>
- Rivera-Luna, R.; et al. (2012, Agosto). Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *International Journal of Cancer*, Vol. 132, No. 7, 1646-1650.
- Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C., Carreño-Fuentes, L. & Moreno-Sánchez, R. (2009). Targeting of cancer energy metabolism. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(1), 29–48. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700470>
- Ross, D. D. (2000). Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia*, 14(3), 467–473. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401694>
- Rujanapun, N., Aueviriyavit, S., Boonrungsiman, S., Rosena, A., Phummiratch, D., Riolueang, S., Chalaow, N., Viprakasit, V. & Maniratanachote, R. (2015). Human primary erythroid cells as a more sensitive alternative in vitro hematological model for nanotoxicity studies: Toxicological effects of silver nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, 29(8), 1982–1992. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.08.005>
- Santoyo-Sánchez, A.; et al. (2016, Febrero). Te age and sex frequencies of patients with leukemia seen in two reference centers in the metropolitan area of Mexico City. *Gaceta Médica de México*, Vol. 152, No. 1, 186-189.
- Schubert, J. & Chanana, M. (2018). Coating Matters: Review on Colloidal Stability of Nanoparticles with Biocompatible Coatings in Biological Media, Living Cells and Organisms. *Current Medicinal Chemistry*, 25(35), 4553–4586.  
<https://doi.org/10.2174/0929867325666180601101859>
- Secretaría de Salud. (2019). 055: La leucemia representa el 50 por ciento de los casos de cáncer infantil. Recuperado de: <https://www.gob.mx/salud/prensa/055-la-leucemia-representa-el-50-por-ciento-de-los-casos-de-cancer-infantil> (14/05/20)
- Sharma, A., Boise, L. H. & Shanmugam, M. (2019). Cancer metabolism and the evasion of apoptotic cell death. *Cancers*, 11(8), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers11081144>
- Sharma, V. K., Siskova, K. M., Zboril, R. & Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Advances in Colloid and Interface Science*, 204, 15–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.002>

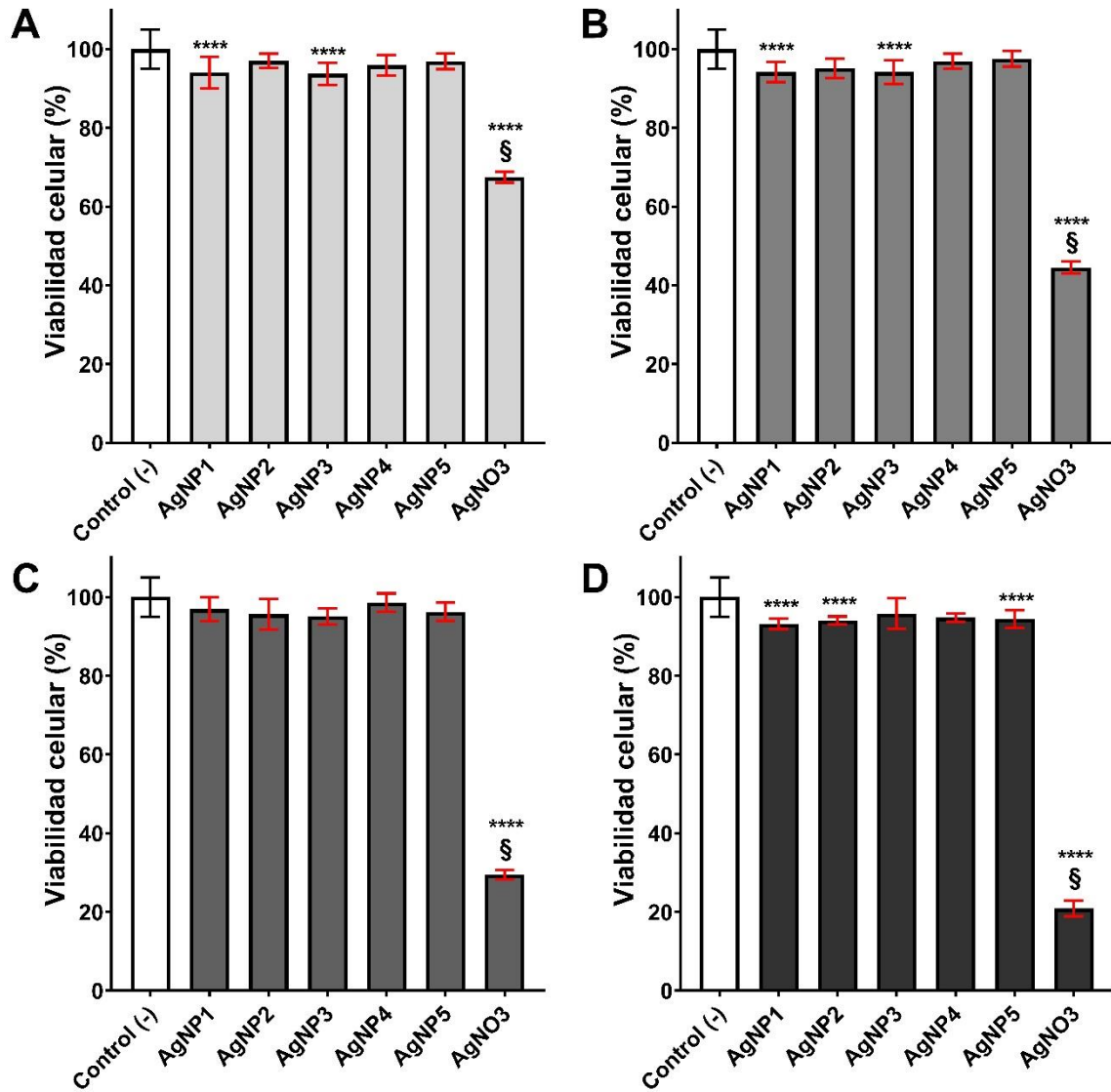
- The Global Cancer Observatory. (2019). Leukemia. Recuperado de: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/36-Leukaemia-fact-sheet.pdf> (14/05/20)
- Vasan, N., Baselga, J. & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299–309. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>
- Vinhas, R., Fernandes, A. R. & Baptista, P. V. (2017). Gold Nanoparticles for BCR-ABL1 Gene Silencing: Improving Tyrosine Kinase Inhibitor Efficacy in Chronic Myeloid Leukemia. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 7, 408–416. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.05.003>
- Waller, C. F. (2014). Imatinib mesylate. *Recent Results in Cancer Research*, 201. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54490-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54490-3_1)
- World Health Organization. (2019). Cancer. Recuperado de: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1) (14/05/20)
- Wu, M., Guo, H., Liu, L., Liu, Y. & Xie, L. (2019). Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4247–4259. <https://doi.org/10.2147/IJN.S201107>
- Zhang, C., Hu, Z. & Deng, B. (2016). Silver nanoparticles in aquatic environments: Physicochemical behavior and antimicrobial mechanisms. *Water Research*, 88, 403–427. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.025>
- Zhang, J., Gu, Y. & Chen, B. (2019). Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Oncotargets and Therapy*, 12, 1937–1945. <https://doi.org/10.2147/OTT.S191621>
- Zhu, Y., Pan, L., Hong, M., Liu, W., Qiao, C., Li, J. & Qian, S. (2016). The combination therapy of imatinib and dasatinib achieves long-term molecular response in two imatinib-resistant and dasatinibintolerant patients with advanced chronic myeloid leukemia. *Journal of Biomedical Research*, 30(6), 525–528. <https://doi.org/10.7555/JBR.30.20130172>



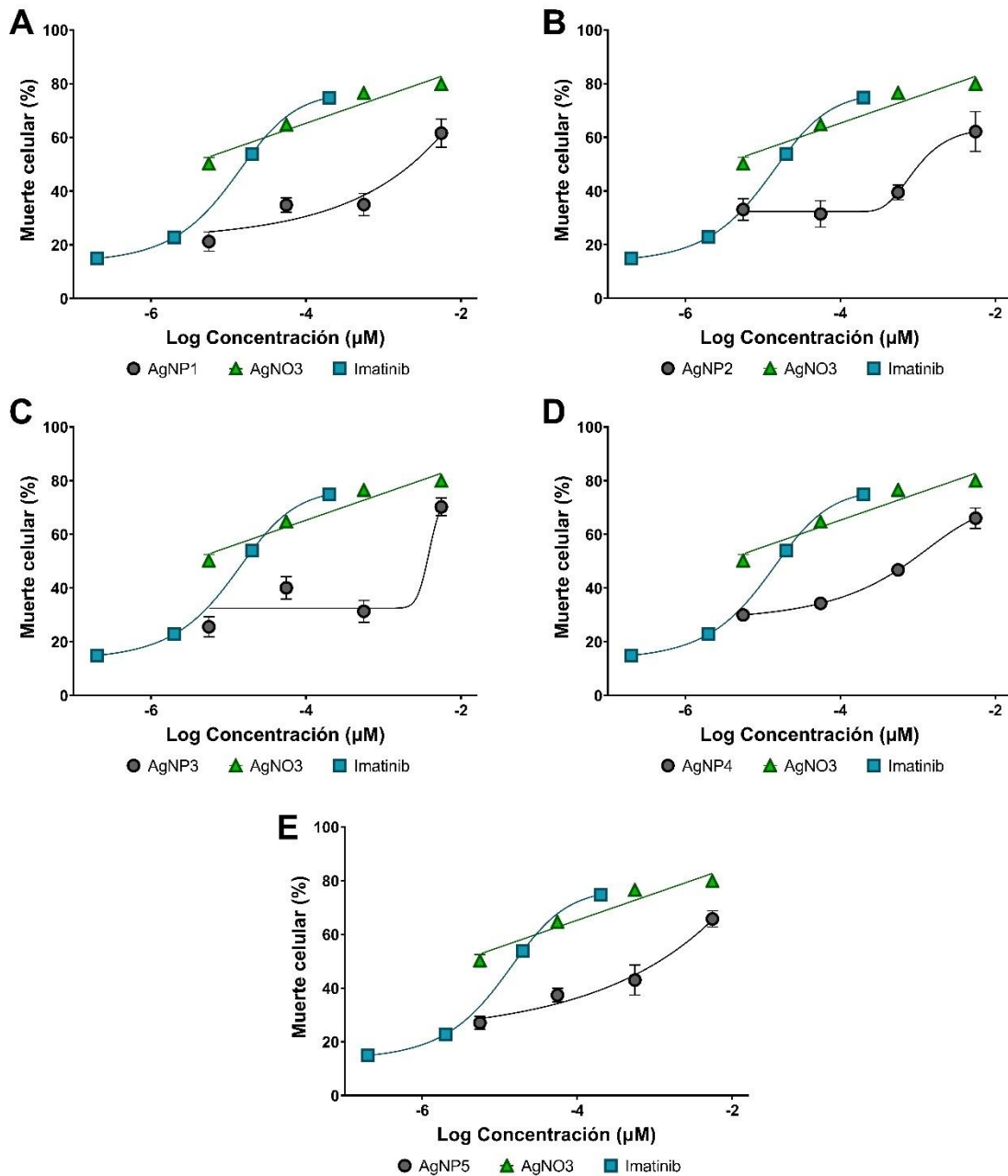
## APÉNDICE



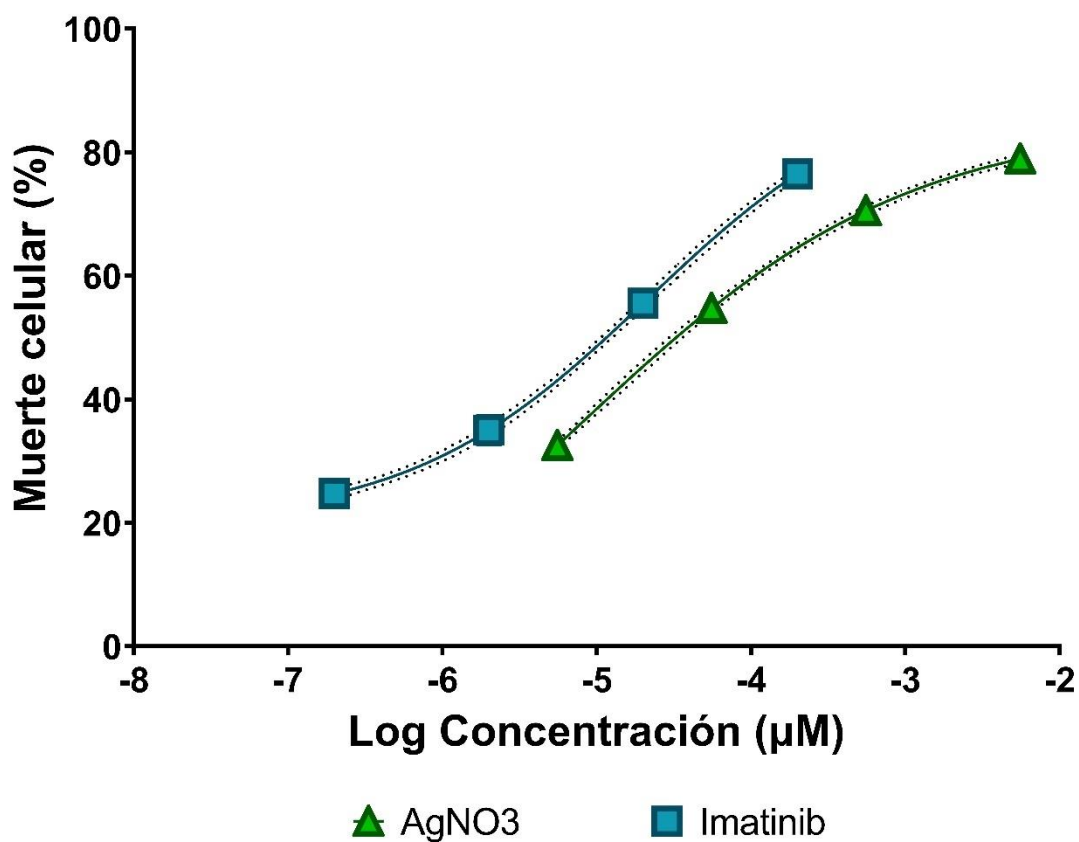
**Figura A1.** Viabilidad celular de la línea celular de leucemia linfocítica humana *Jurkat* después de 24 horas de tratamiento con A) 5.5, B) 55.6, C) 556  $\mu$ M, y D) 5.5 mM de plata metálica de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. \* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre formulaciones de AgNP o AgNO<sub>3</sub> evaluadas a la misma concentración.



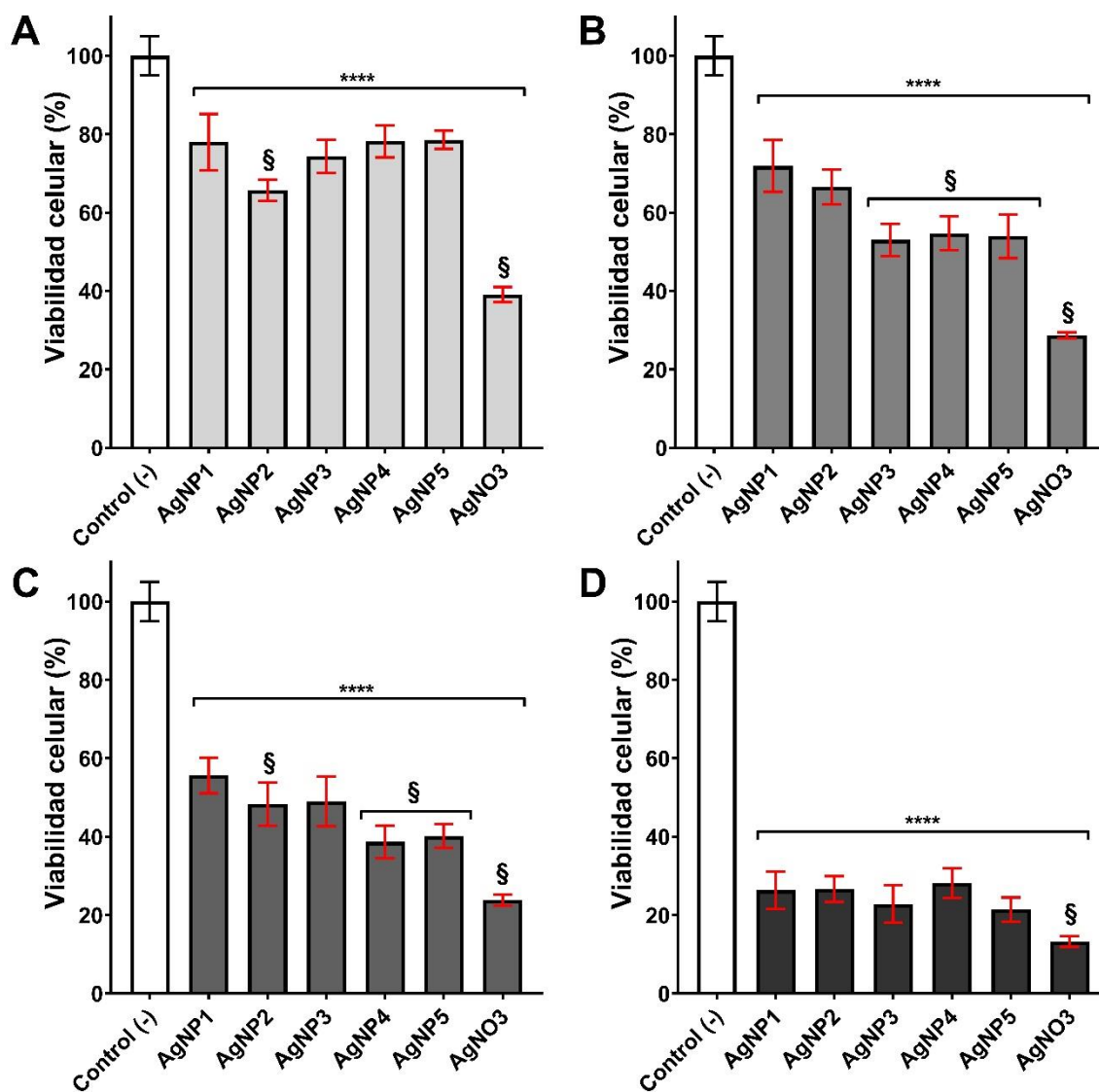
**Figura A2.** Viabilidad celular de linfocitos de sangre periférica humana después de 24 horas de tratamiento con A) 5.5, B) 55.6, C) 556  $\mu$ M, y D) 5.5 mM de plata metálica de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. \* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre las concentraciones de una misma formulación de AgNP.



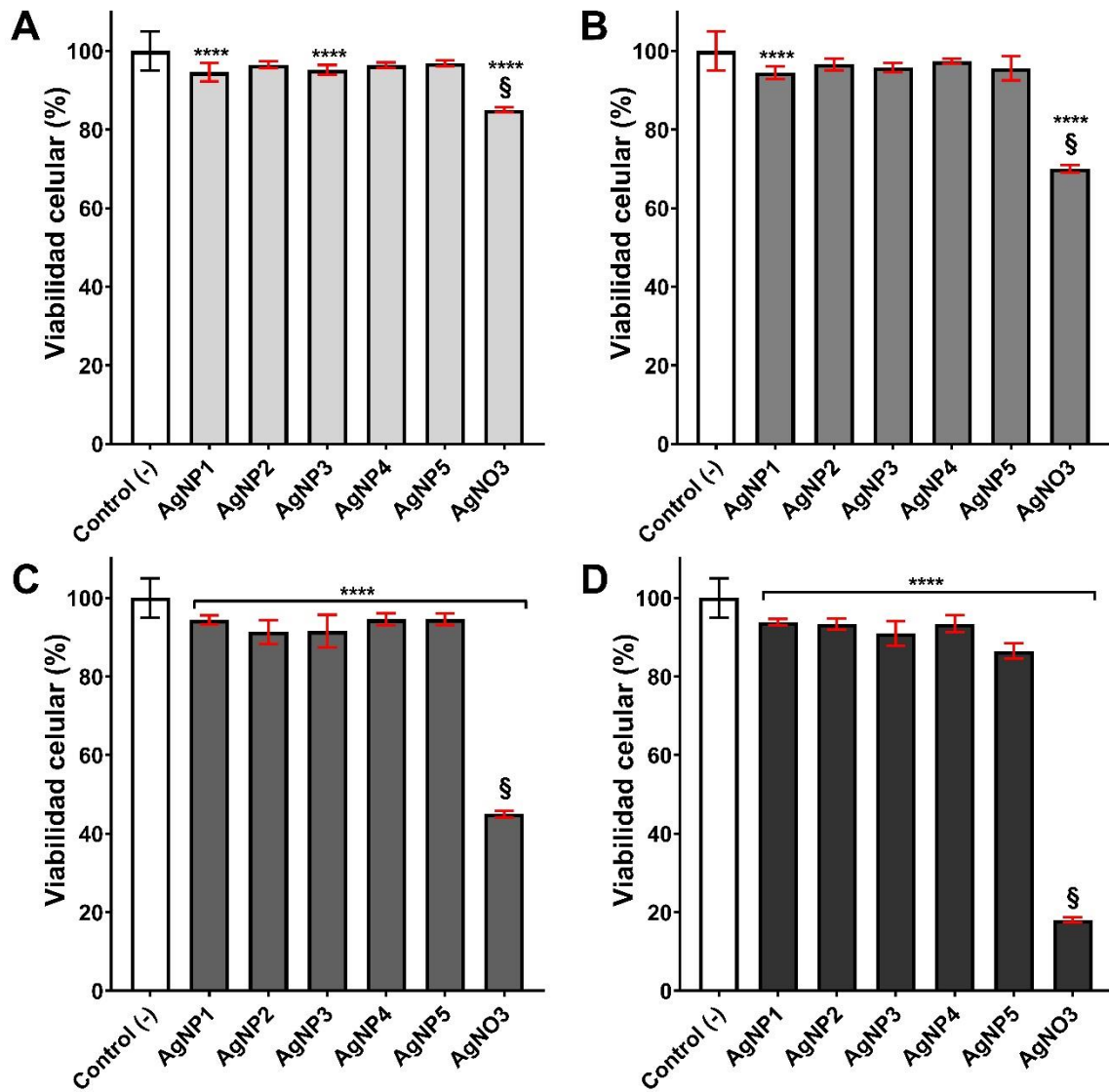
**Figura A3.** Comparación de la actividad antiproliferativa en leucemia linfocítica humana *Jurkat* después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556 µM y 5.5 mM de plata metálica) de las formulaciones A) AgNP1, B) AgNP2, C) AgNP3, D) AgNP4, y E) AgNP5 de *Argovit*, en comparación con AgNO<sub>3</sub> (5.5, 55.6, 556 µM y 5.5 mM de plata metálica) e Imatinib (0.2, 2, 20 y 200 µM). Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado.



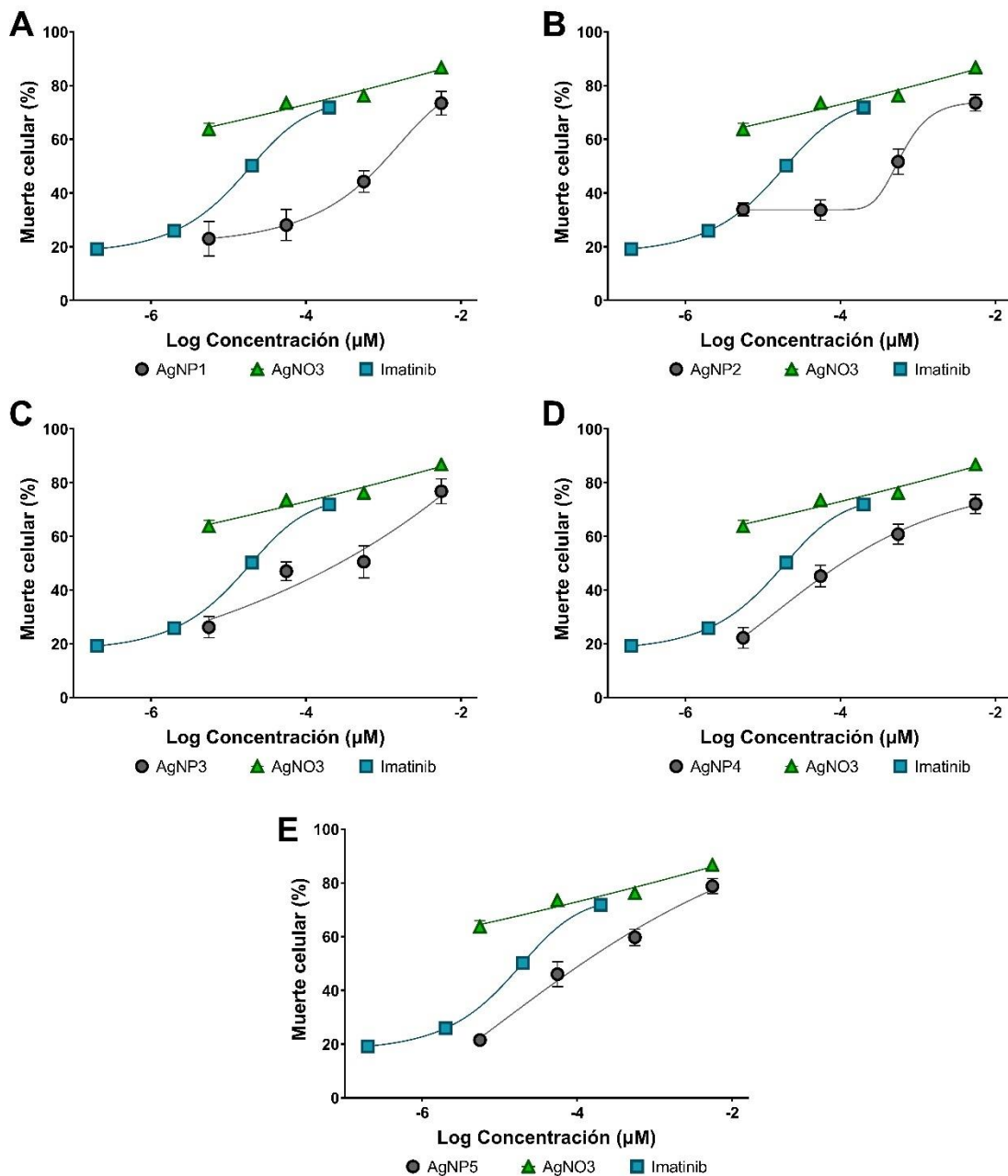
**Figura A4.** Comparación de la actividad citotóxica en linfocitos de sangre periférica humana después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556 μM y 5.5 mM de plata metálica) de AgNO<sub>3</sub> e Imatinib (0.2, 2, 20 y 200 μM). Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado.



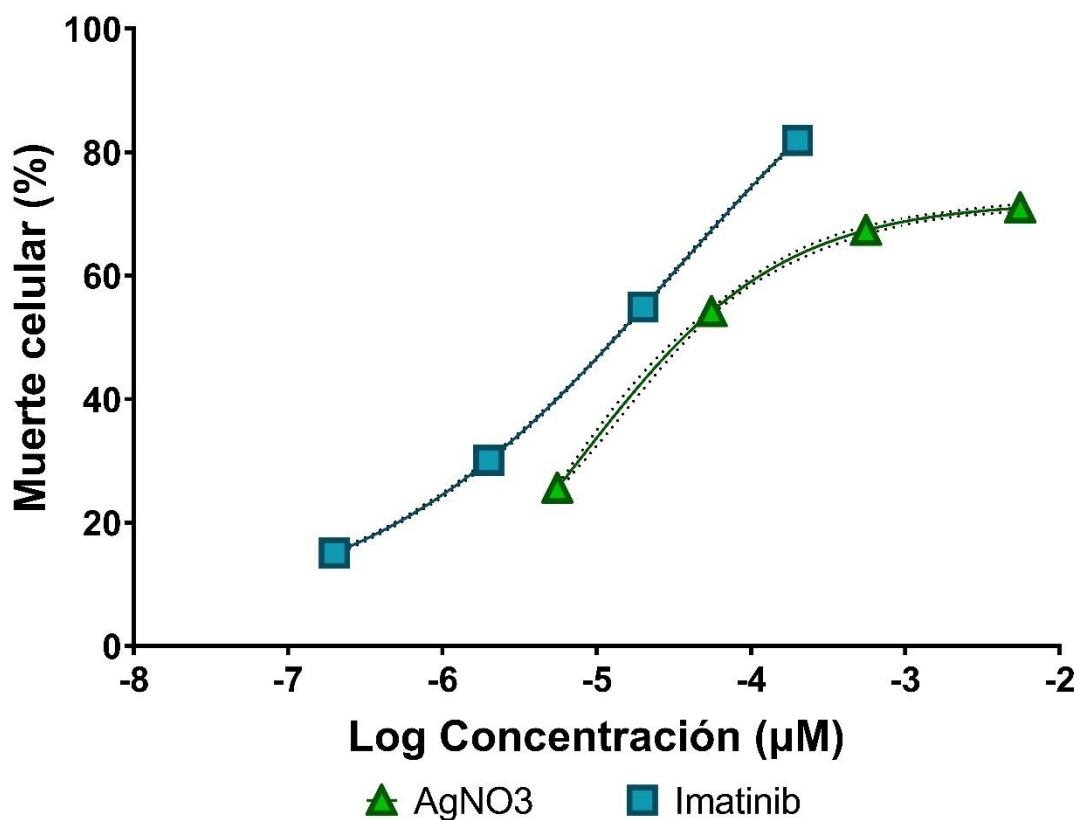
**Figura A5.** Viabilidad celular de la línea celular de leucemia linfocítica murina *L1210* después de 24 horas de tratamiento con A) 5.5, B) 55.6, C) 556  $\mu$ M, y D) 5.5 mM de plata metálica de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. \* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre formulaciones de AgNP o AgNO<sub>3</sub> evaluadas a la misma concentración.



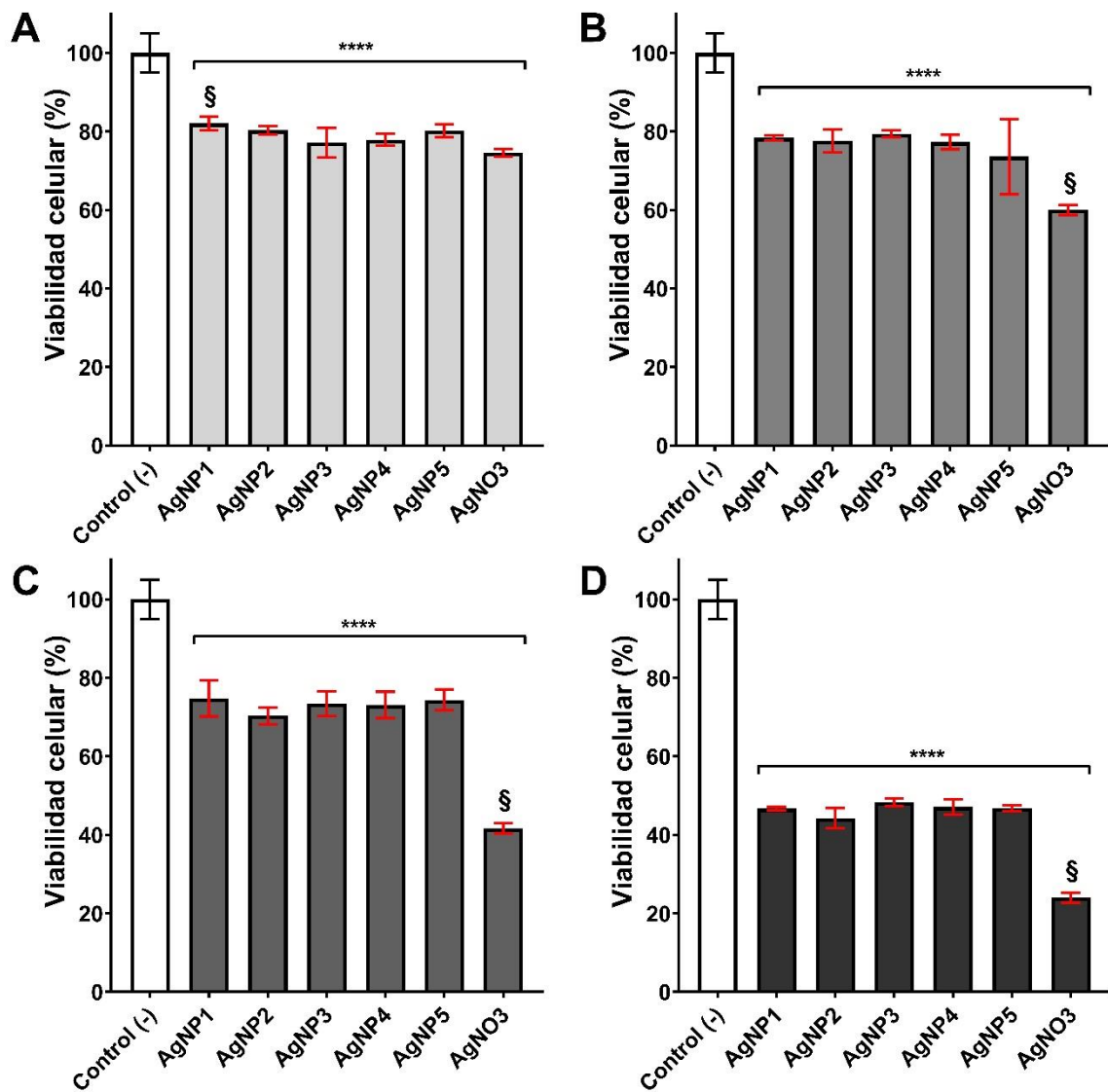
**Figura A6.** Viabilidad celular de cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con A) 5.5, B) 55.6, C) 556  $\mu\text{M}$ , y D) 5.5 mM de plata metálica de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. \* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre las concentraciones de una misma formulación de AgNP.



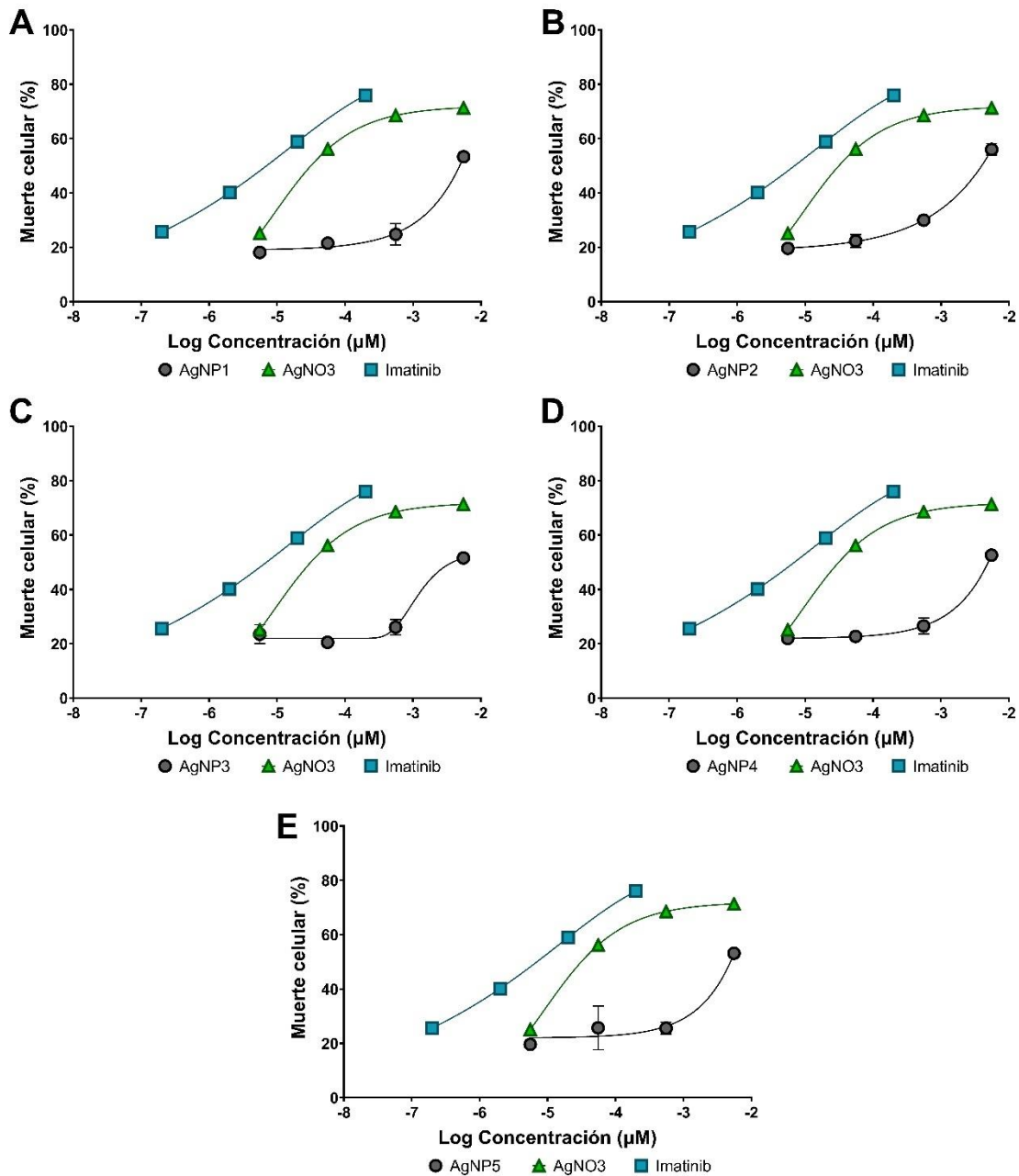
**Figura A7.** Comparación de la actividad antiproliferativa en leucemia linfocítica murina *L1210* después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556 µM y 5.5 mM de plata metálica) de las formulaciones A) AgNP1, B) AgNP2, C) AgNP3, D) AgNP4, y E) AgNP5 de *Argovit*, en comparación con AgNO<sub>3</sub> (5.5, 55.6, 556 µM y 5.5 mM de plata metálica) e Imatinib (0.2, 2, 20 y 200 µM). Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado.



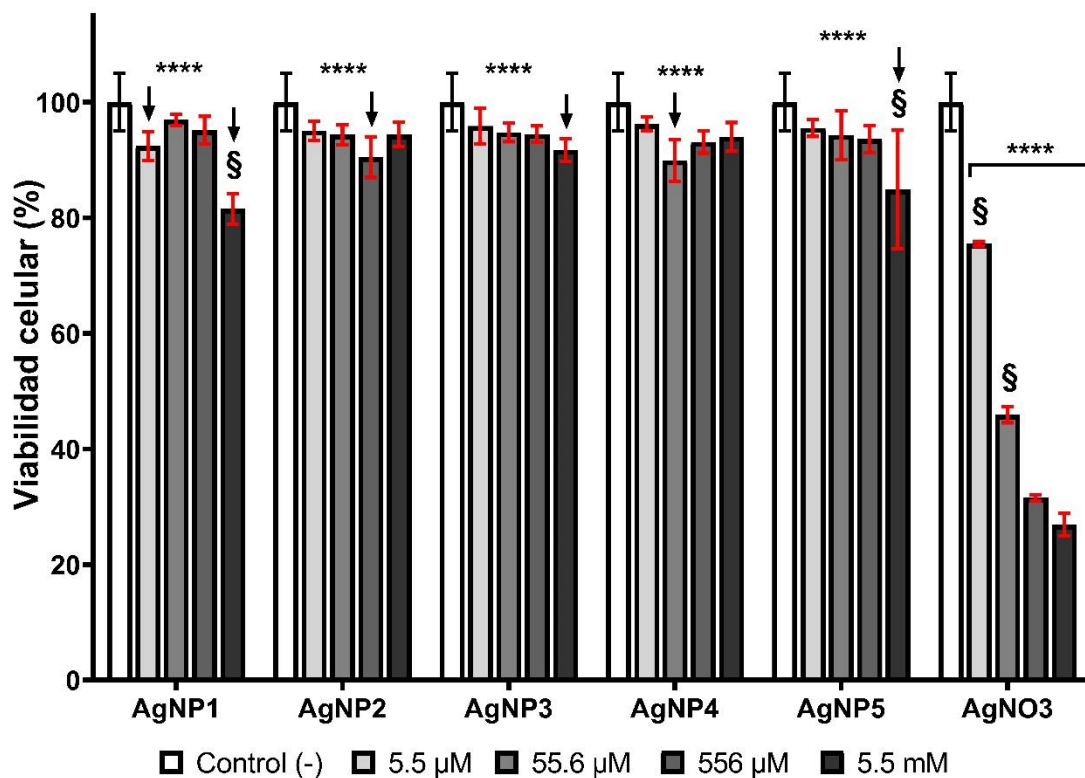
**Figura A8.** Comparación de la actividad citotóxica en linfocitos de bazo de cultivos primarios de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556 µM y 5.5 mM de plata metálica) de AgNO<sub>3</sub> e Imatinib (0.2, 2, 20 y 200 µM). Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado.



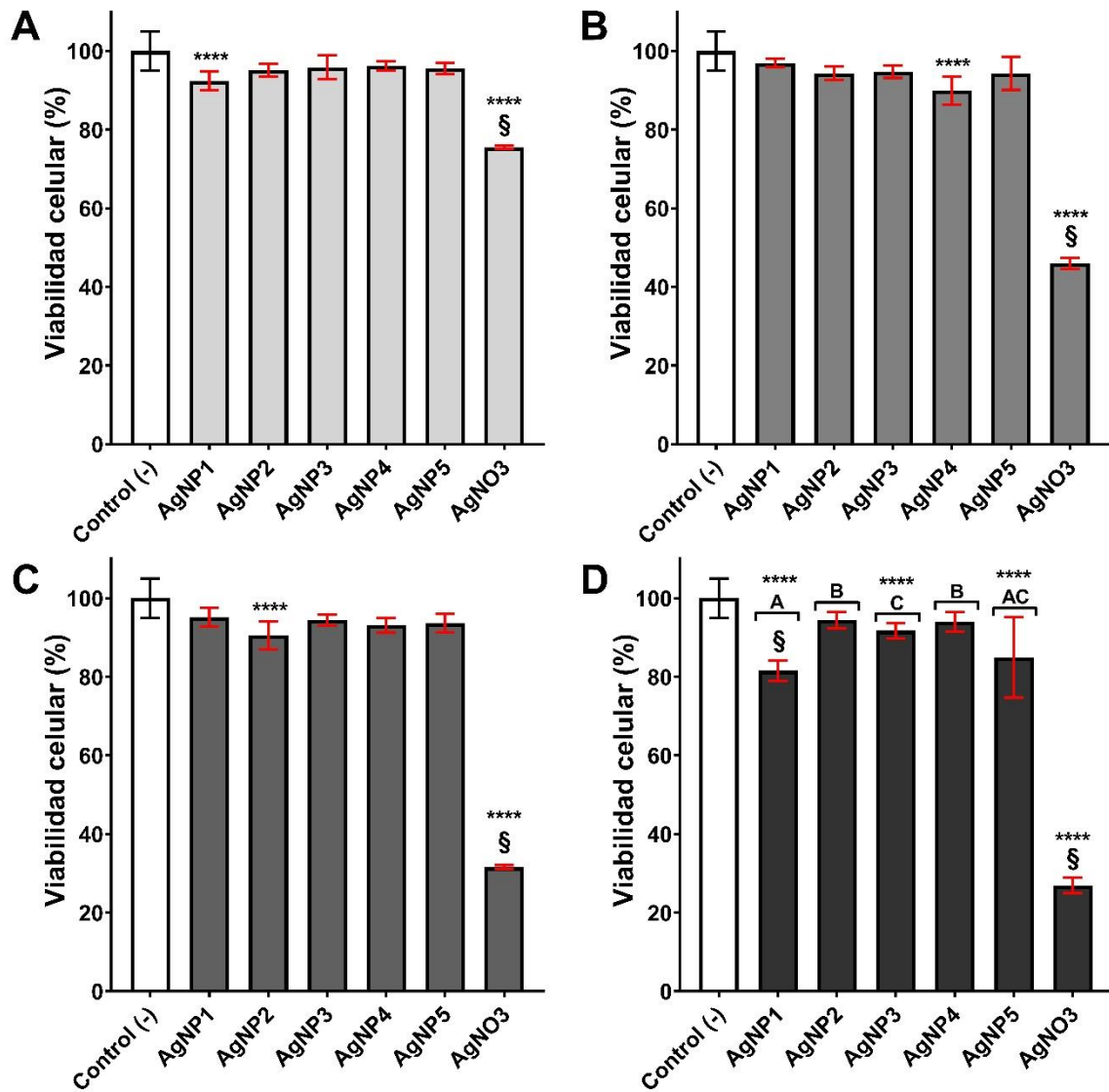
**Figura A9.** Viabilidad celular de cultivos primarios de monocitos de bazo de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con A) 5.5, B) 55.6, C) 556  $\mu\text{M}$ , y D) 5.5 mM de plata metálica de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. \* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre las concentraciones de una misma formulación de AgNP.



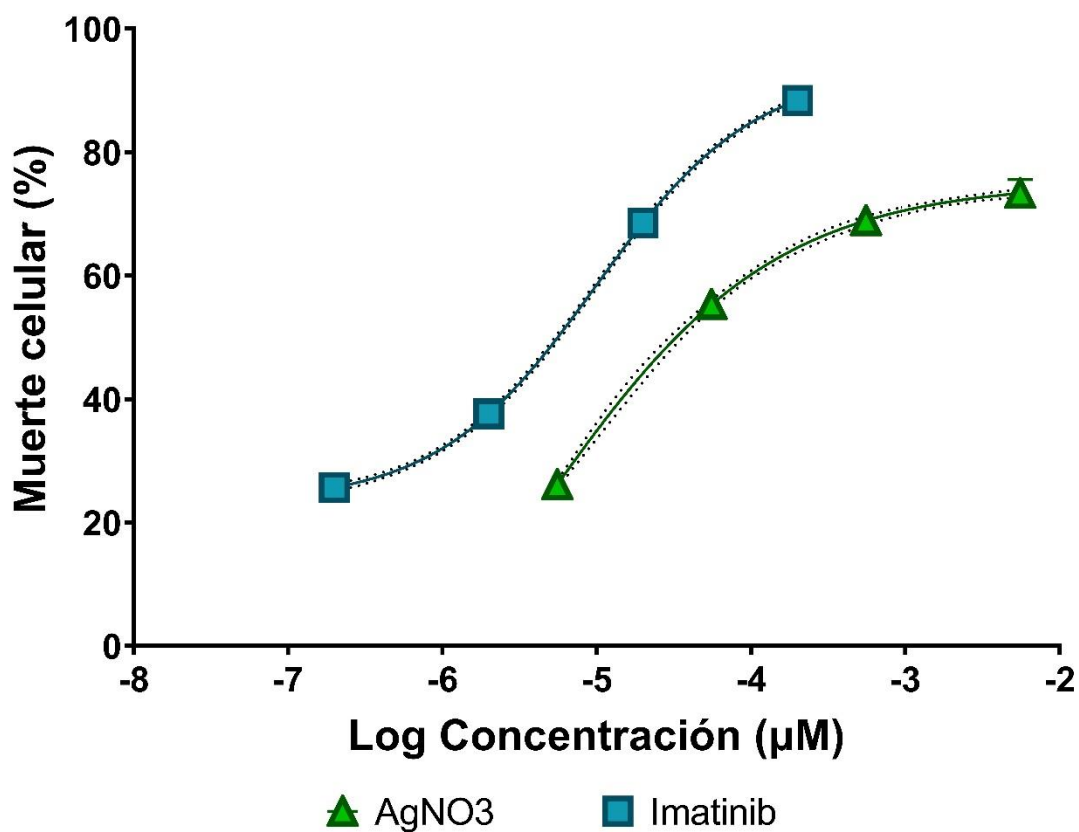
**Figura A10.** Comparación de la actividad citotóxica en monocitos de bazo de cultivos primarios de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica) de A) AgNP1, B) AgNP2, C) AgNP3, D) AgNP4, y E) AgNP5 de *Argovit*, en comparación con AgNO<sub>3</sub> (5.5, 55.6, 556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica) e Imatinib (0.2, 2, 20 y 200  $\mu\text{M}$ ). Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado.



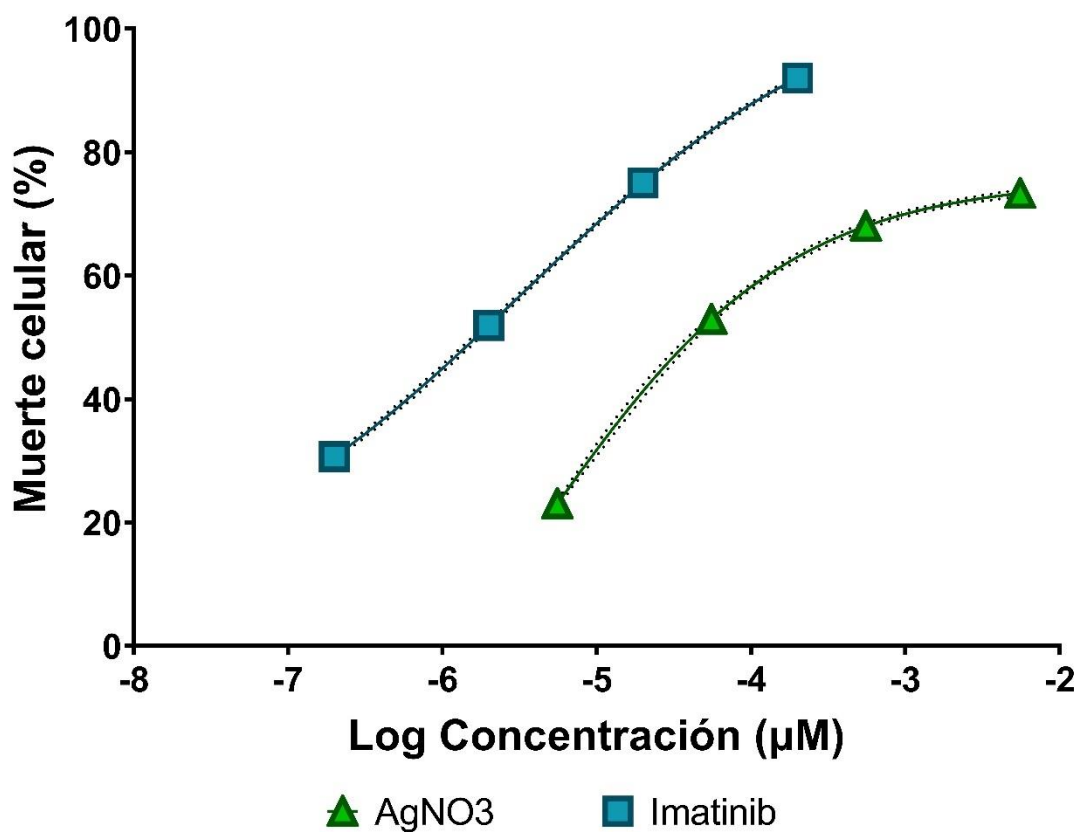
**Figura A11.** Viabilidad celular de cultivos primarios de médula de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556  $\mu\text{M}$  y 5.5 mM de plata metálica) de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. ↓\* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre las concentraciones de una misma formulación de AgNP.



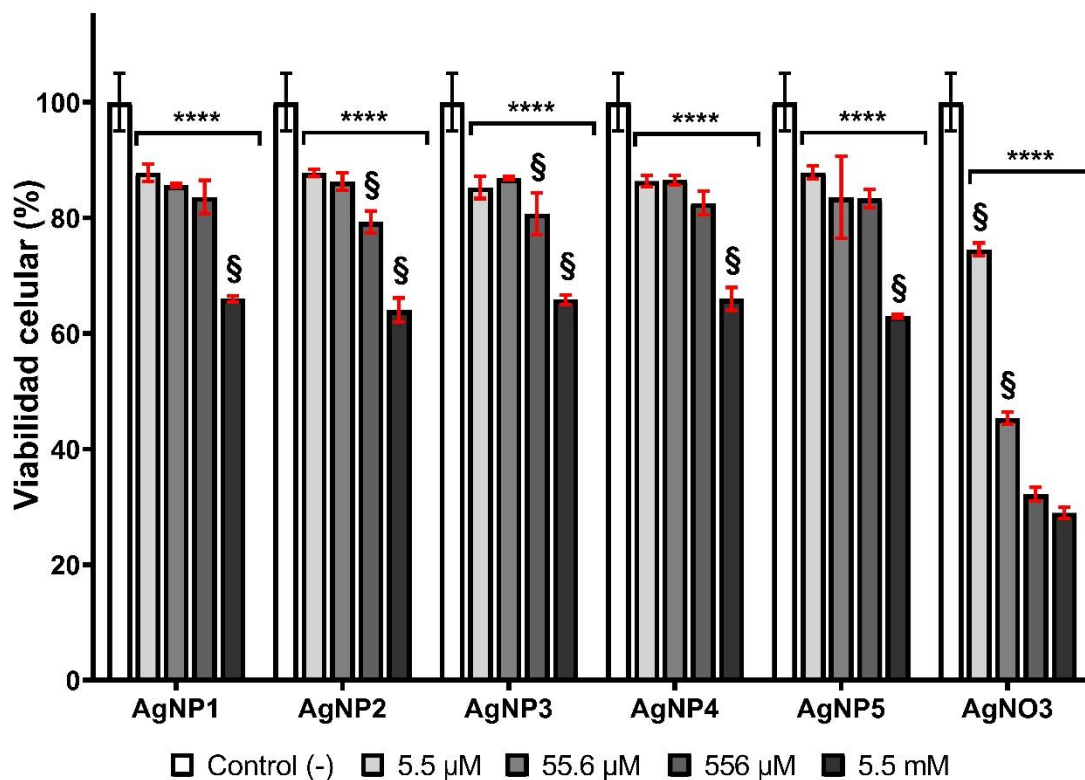
**Figura A12.** Viabilidad celular de cultivos primarios de médula de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con A) 5.5, B) 55.6, C) 556  $\mu$ M, y D) 5.5 mM de plata metálica de las formulaciones AgNP1-AgNP5 Argovit y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. \* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre las concentraciones de una misma formulación de AgNP.



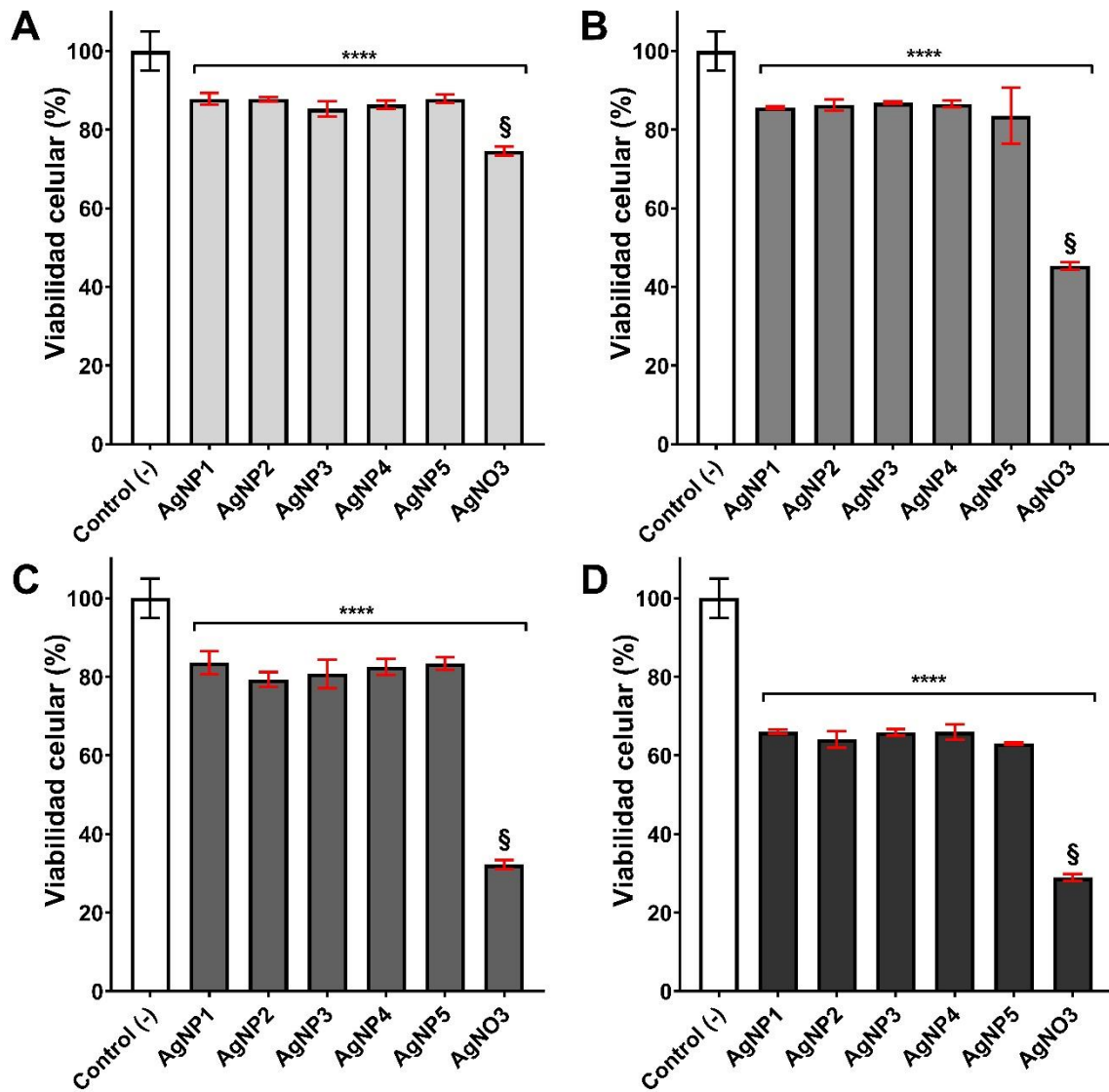
**Figura A13.** Comparación de la actividad citotóxica en linfocitos de médula de cultivos primarios de ratones BLAB/c después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556 µM y 5.5 mM de plata metálica) de AgNO<sub>3</sub> e Imatinib (0.2, 2, 20 y 200 µM). Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado.



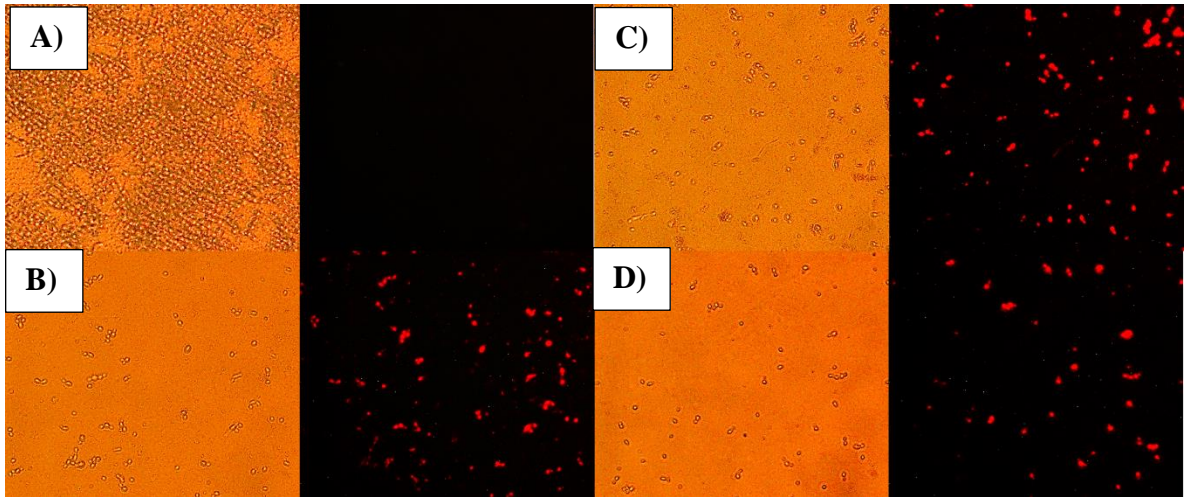
**Figura A14.** Comparación de la actividad citotóxica en monocitos de médula de cultivos primarios de ratones BLAB/c después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556 µM y 5.5 mM de plata metálica) de AgNO<sub>3</sub> e Imatinib (0.2, 2, 20 y 200 µM). Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado.



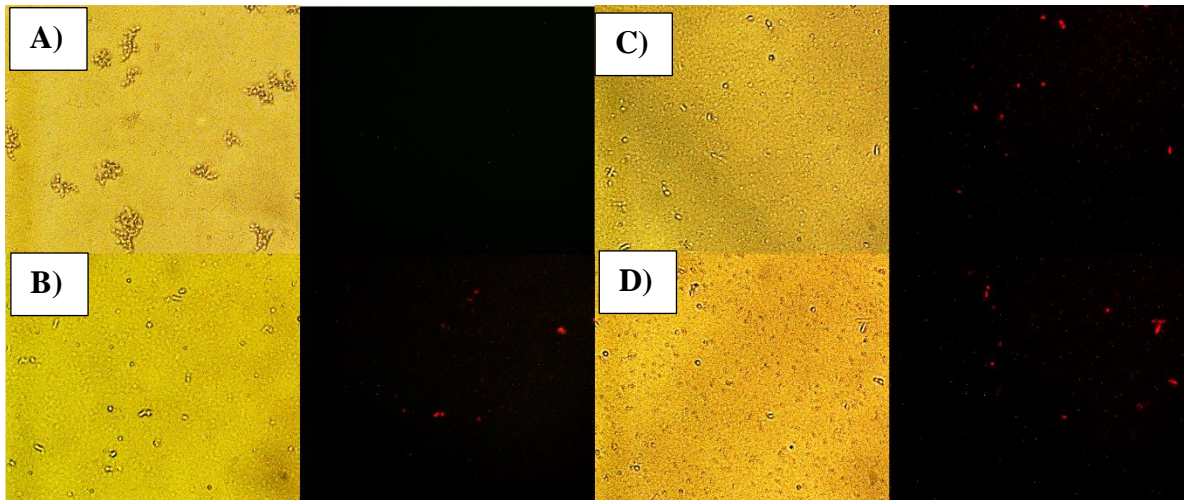
**Figura A15.** Viabilidad celular de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones (5.5, 55.6, 556  $\mu$ M y 5.5 mM de plata metálica) de las formulaciones AgNP1-AgNP5 *Argovit* y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. ↓\* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre las concentraciones de una misma formulación de AgNP.



**Figura A16.** Viabilidad celular de cultivos primarios de bazo de ratones BALB/c después de 24 horas de tratamiento con A) 5.5, B) 55.6, C) 556  $\mu$ M, y D) 5.5 mM de plata metálica de las formulaciones AgNP1-AgNP5 Argovit y AgNO<sub>3</sub>. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y prueba *post-hoc* de Tukey. \* representan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores con el control negativo, y § representa diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) al comparar los valores entre las concentraciones de una misma formulación de AgNP.



**Figura A17.** Micrografías representativas de la comparación de células *Jurkat* positivas a la generación de ion superóxido mitocondrial después de 24 horas de tratamiento con 55.6  $\mu\text{M}$  de plata metálica de la formulación AgNP4 de *Argovit* y  $\text{AgNO}_3$ . Los resultados muestran A) Control sin tratamiento con (derecha) y sin fluorescencia (izquierda), B) control positivo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con (derecha) y sin fluorescencia (izquierda), C) AgNP4 con (derecha) y sin fluorescencia (izquierda), y D)  $\text{AgNO}_3$  con (derecha) y sin fluorescencia (izquierda),



**Figura A18.** Micrografías representativas de la comparación de células *L1210* positivas a la generación de ion superóxido mitocondrial después de 24 horas de tratamiento con 55.6  $\mu\text{M}$  de plata metálica de la formulación AgNP4 de *Argovit* y  $\text{AgNO}_3$ . Los resultados muestran A) Control sin tratamiento con (derecha) y sin fluorescencia (izquierda), B) control positivo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con (derecha) y sin fluorescencia (izquierda), C) AgNP4 con (derecha) y sin fluorescencia (izquierda), y D)  $\text{AgNO}_3$  con (derecha) y sin fluorescencia (izquierda),