



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA,
ARQUITECTURA Y DISEÑO**



**“Efecto citotóxico de nanopartículas de plata en combinación con
5-fluorouracilo para el tratamiento de cáncer de colon”**

Para obtener el título de:

BIOINGENIERO

Presenta:

Salma López Rodríguez

Directora de tesis:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno

Codirector de tesis:

Dr. David Cervantes Vásquez

Ensenada, Baja California, México

Marzo de 2020

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

**EFFECTO CITOTÓXICO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN COMBINACIÓN CON
5-FLUOROURACILO PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE COLON**

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOINGENIERO

PRESENTA:

SALMA LÓPEZ RODRÍGUEZ

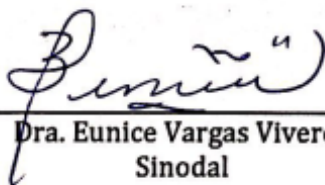
Aprobada por:



Dra. Karla Gyuky Juárez Moreno
Director




Dr. David Cervantes Vásquez
Codirector



Dra. Eunice Vargas Viveros
Sinodal



Dr. Franklin David Muñoz Muñoz
Sinodal



Dra. Dora Luz Flores Gutiérrez
Sinodal

RESUMEN

En México y en el mundo, el cáncer sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública. Para combatirlo, se siguen utilizando los tratamientos clásicos que acarrearán múltiples y devastadores efectos secundarios. Además, se ha reportado que las células cancerosas pueden presentar resistencia múltiple a fármacos, ocasionando que las terapias convencionales pierdan su efecto. Una de las propuestas más populares para resolver estas desventajas es la aplicación de nanopartículas de plata (AgNPs) cuyas propiedades antiproliferativas han sido extensivamente estudiadas, además de que han sido propuestas para solucionar la resistencia múltiple a fármacos. Asimismo, se ha demostrado que las AgNPs pueden tener efectos sinérgicos en combinación con fármacos antineoplásicos. En este trabajo se analizó la interacción de las AgNPs en combinación con el fármaco de primera línea 5-fluorouracilo (5-FU) en dos líneas celulares de cáncer de colon (HCT-15 y HT-29) para conocer si existe un efecto potenciador entre estos agentes. Para ello, se evaluó *in vitro* su citotoxicidad, su efecto en la migración celular y en la generación de especies reactivas de oxígeno, individualmente y en las combinaciones seleccionadas. Los resultados mostraron que existe una ligera potenciación entre las AgNPs y el fármaco 5-FU, que incrementa su efecto citotóxico, interrumpe procesos celulares esenciales como la migración celular y que además contribuye al aumento de la generación de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, se encontró que la contribución mayoritaria corresponde al elevado efecto citotóxico del fármaco y que, al tener un mecanismo divergente al de las AgNPs, induce la muerte celular antes de que el efecto citotóxico de las AgNPs en las células sea notorio. Los resultados de este trabajo, permiten establecer que los efectos potenciadores de las AgNPs y fármacos antineoplásicos son más evidentes si ambos agentes tienen mecanismos de acción convergentes.

Palabras clave: *cáncer de colon, nanopartículas de plata, 5-fluorouracilo, potenciación.*

ABSTRACT

In Mexico and the world, cancer remains one of the main public health problems. To combat it, classic treatments are still used, although their many and devastating side effects persist. Also, it has been reported that cancer cells may have multiple drug resistance. One of the most popular alternatives to solve these disadvantages is the use of silver nanoparticles (AgNPs) whose properties in biological agents have been extensively studied. These have been proposed to solve multiple drug resistance. Also, it has been shown that AgNPs can present synergistic effects in combination with antineoplastic drugs. In this work, the interaction of AgNPs in combination with the first-line drug 5-fluorouracil (5-FU) in two colon cancer cell lines (HCT-15 and HT-29) was analyzed to verify if there is an enhancer effect between these agents. Thus, the cytotoxicity, effect on cell migration and the reactive oxygen species generation, individually and in the selected combinations, were evaluated *in vitro*. The results showed that there is a slight potentiation between the agents that increases their cytotoxic effect, disrupts essential cellular processes such as cell migration and also increases the reactive oxygen species generation. However, it was found that the major contribution corresponds to the high cytotoxic effect of the drug and that, being its mechanism divergent from the AgNPs mechanism, it induces cell death before the contribution of AgNPs occurs. The results of this work allow establishing that the potentiating effects of AgNPs and antineoplastic drugs are more evident if both agents have a convergent action mechanism.

Key words: *colorectal cancer, silver nanoparticles, 5-fluorouracil, potentiation.*

DEDICATORIA

Para todos aquellos que dudan de lo que son capaces de lograr.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a Dios por ponerme en este camino en el que he coincidido con grandes personas.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California, mi alma mater, por mi formación como Bioingeniera y todas las experiencias gratas a lo largo de mi carrera universitaria.

Agradezco al Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM por facilitarme todo lo necesario para la realización de esta tesis. Gracias a la Dra. Katrin Quester, técnico académico, y al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, jefe del departamento.

Gracias al Dr. David Cervantes, Dra. Eunice Vargas, Dra. Dora Luz Flores y Dr. Franklin Muñoz, miembros de mi comité evaluador, por su tiempo y disposición.

A mis amigas de Nanotox Lab, Kathya, Melissa, María y Gloria, todas mujeres de ciencia, por enseñarme a ser decidida, noble, crítica y valiente. Nuestro tiempo juntas es de lo más valioso que me llevo de este proyecto.

A mis amigos Aidee y Gabriel por su amistad siempre sincera, solidaria y sin juicios.

A mis amigas Mauren, Isabel, Ana Paula y Fernanda, porque los recuerdos de nuestros momentos juntas me siguen dando lecciones de vida.

Gracias a mis padres por apoyar todas mis decisiones y siempre velar por mi bienestar y superación personal. Papá y mamá, a ustedes les debo todo.

A mi única y muy querida hermana Alondra, por ser tan unidas a pesar de ser tan diferentes.

A mi abuela Rosa María, por enseñarme con su ejemplo a trabajar con amor y entrega a los demás.

A Paco, mi fiel compañero de aventuras. Gracias por ser mi más íntimo amigo, por tu admiración perpetua, por tu cariño incondicional y por enfrentar a mi lado cada prueba que nos pone la vida. Me has enseñado el verdadero significado de sentir paz y trabajar en equipo.

Finalmente, mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno. Gracias por confiar en mis capacidades desde el primer día, por darme una perspectiva completamente nueva de la investigación científica y por ayudarme a desarrollar mi pensamiento analítico. Pero, sobre todo, gracias por tanta motivación, empatía y dedicación para mí y todos sus alumnos. Al final de este camino, me llevo lo mejor de mí y lo mejor de usted.

Gracias a todos, este logro es de y para ustedes.

ÍNDICE

Resumen en español	i
Resumen en inglés	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras.....	viii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	2
2.1 ¿Qué es el cáncer?.....	2
2.2 El cáncer como problema de salud pública	4
2.3 Cáncer de colon y tratamientos actuales.....	5
2.4 Fármaco 5-fluoruracilo y su mecanismo de acción	8
2.5 Resistencia múltiple a fármacos.....	10
2.6 Nanopartículas de plata y su mecanismo de acción.....	11
2.7 Interacción entre fármacos: sinergismo y potenciación	13
2.8 Interacción de las AgNPs con fármacos antineoplásicos.....	14
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis	16
5. Objetivos	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos específicos	16
6. Metodología	17
6.1 Origen y preparación de AgNPs	17
6.2 Caracterización fisicoquímica de AgNPs.....	17
6.2.1 Espectrofotometría UV-vis	17
6.2.2 Espectrofotometría FT-IR	17
6.2.3 Dispersión dinámica de luz	18
6.3 Líneas celulares.....	18
6.4 Preparación de medios y soluciones para cultivo celular	19
6.4.1 Medio de cultivo celular	19
6.4.2 Solución amortiguadora de fosfatos.....	19
6.4.3 Medio de criopreservación.....	19
6.5 Cultivo y mantenimiento celular	20
6.5.1 Descongelamiento.....	20

6.5.2 Pases celulares (subcultivos)	20
6.5.3 Criopreservación celular	21
6.6 Conteo celular por exclusión por azul tripano	21
6.7 Ensayo de citotoxicidad por reducción de MTT	22
6.7.1 Cultivo en placa (Día 1)	23
6.7.2 Tratamiento (Día 2)	23
6.7.3 Lectura y cálculo de viabilidad celular (Día 3)	24
6.8 Ensayo de estría	25
6.9 Medición de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	26
7. Resultados	28
7.1 Caracterización fisicoquímica	28
7.1.1 Plasmón de resonancia superficial	28
7.1.2 FT-IR	28
7.1.3 Tamaño y potencial Zeta	29
7.2 Ensayo de citotoxicidad por reducción de MTT	32
7.2.1 5-FU	32
7.2.2 AgNPs	33
7.2.3 Combinaciones	33
7.3 Ensayo de estría	35
7.3.1 5-FU	39
7.3.2 AgNPs	41
7.3.3 Combinaciones	43
7.4 Medición de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	44
8. Discusión	48
8.1 Caracterización fisicoquímica	48
8.2 Ensayos de citotoxicidad por reducción de MTT	50
8.3 Ensayos de estría	54
8.4 Ensayos de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	54
8.5 Sobre la MDR	55
9. Conclusiones	56
10. Trabajo futuro	57
11. Referencias	58
12. Anexos	61

Lista de figuras

Figura		Página
1	Esquema de los sellos distintivos del cáncer	3
2	Porcentajes de incidencia y mortalidad en 2018.....	4
3	Número de nuevos casos de cáncer en México durante 2018.....	5
4	Estructura química del uracilo (izquierda) y 5-FU (derecha).....	9
5	Mecanismo de acción del 5-FU.....	8
6	Mecanismo de la toxicidad de AgNPs propuesto por AshaRani, 2009.....	12
7	Esquema de los cuadrantes de la cámara de Neubauer.....	22
8	Reducción de las sales de tetrazolio.....	23
9	Espectro de absorbancia UV-Vis (izquierda) y espectro FT-IR (derecha) de las AgNPs.....	28
10	Curvas de distribución de tamaños de las AgNPs en distintos medios a tiempo 0.....	29
11	Curvas de distribución de tamaños de las AgNPs en distintos medios a 24 horas.....	30
12	Comparación de potenciales Zeta de las AgNPs en distintos medios a 0 y 24 horas.....	32
13	Viabilidad celular en ambas líneas celulares a diferentes concentraciones de 5-FU.....	32
14	Viabilidad celular en ambas líneas celulares a diferentes concentraciones de AgNPs.....	33
15	Muerte celular en línea HT-29 a diferentes combinaciones de concentraciones de 5-FU y AgNPs.....	34
16	Muerte celular en línea HCT-15 a diferentes combinaciones de concentraciones de 5-FU y AgNPs.....	35
17	Porcentaje de cierre de la estría en ambas líneas celulares con tratamientos de 5-FU a las 48 horas.....	36
18	Porcentaje de cierre de la estría en ambas líneas celulares con tratamientos de AgNPs a las 48 horas.....	37
19	Porcentaje de cierre de la estría con combinaciones de tratamientos de 5-FU y AgNPs a las 48 horas.....	37

20	Evolución de la estría en línea HT-29 con 5 mM 5-FU, DMEM suplementado y DMSO a 0, 24 y 48 horas.....	38
21	Evolución de la estría en línea HCT-15 con 5 mM 5-FU, DMEM suplementado y DMSO a 0, 24 y 48 horas.....	39
22	Evolución de la estría en línea HT-29 con 25 μ M AgNPs, 50 μ M AgNPs y DMEM suplementado a 0, 24 y 48 horas.....	40
23	Evolución de la estría en línea HCT-15 con 25 μ M AgNPs, 50 μ M AgNPs y DMEM suplementado a 0, 24 y 48 horas.....	41
24	Evolución de la estría en línea HT-29 con 5 mM 5-FU + 25 μ M AgNPs, 5 mM 5-FU + 50 μ M AgNPs y DMEM suplementado a 0, 24 y 48 horas.....	42
25	Evolución de la estría en línea HCT-15 con 5 mM 5-FU + 25 μ M AgNPs, 5 mM 5-FU + 50 μ M AgNPs y DMEM suplementado a 0, 24 y 48 horas.....	43
26	Evaluación cualitativa de la formación de radicales libres (ROS) en la línea celular HT-29 a diferentes concentraciones de 5-FU y AgNPs, TBHP como control positivo y DMEM suplementado como control negativo.....	45
27	Evaluación cualitativa de la formación de radicales libres (ROS) en la línea celular HT-29 a diferentes concentraciones de 5-FU y AgNPs, TBHP como control positivo y DMEM suplementado como control negativo.....	46
28	Evolución de la estría en línea HT-29 con 10, 15 y 20 mM 5-FU a 0, 24 y 48 horas.....	61
29	Evolución de la estría en línea HCT-15 con 10, 15 y 20 mM 5-FU a 0, 24 y 48 horas.....	62
30	Evolución de la estría en línea HT-29 con 12.5 μ M AgNPs, 100 μ M AgNPs y DMSO a 0, 24 y 48 horas.....	63
31	Evolución de la estría en línea HCT-15 con 12.5 μ M AgNPs, 100 μ M AgNPs y DMSO a 0, 24 y 48 horas.....	64
32	Evolución de la estría en línea HT-29 con DMSO a 0, 24 y 48 horas como control negativo de ensayo con combinaciones de tratamientos.....	65
33	Evolución de la estría en línea HCT-15 con DMSO a 0, 24 y 48 horas como control negativo de ensayo con combinaciones de tratamientos.....	65

1. INTRODUCCIÓN

Debido a la problemática de salud mundial que representa el cáncer, se han puesto en marcha diversas investigaciones que proponen soluciones a esta enfermedad multisistémica y en gran proporción, letal.

En específico, el cáncer de colon es uno de los tipos más incidentes y con mayor índice de mortalidad anual. Su alta tasa de aparición se debe tanto a condiciones hereditarias como a variados hábitos negativos de la población, tales como la mala alimentación y el sedentarismo (GLOBOCAN, 2018).

Para tratarlo, la opción más común sigue siendo la quimioterapia, a pesar de sus devastadores efectos secundarios que reducen la calidad de vida de los pacientes y que, a la larga, ocasionan en las células cancerosas condiciones de resistencia a fármacos. El fármaco más utilizado en el tratamiento de cáncer de colon es la flúorpirimidina 5-fluoruracilo (5-FU).

Mucho se ha propuesto para eliminar o reducir las desventajas de los tratamientos clásicos, entre las contribuciones más relevantes se enlistan los nanomateriales. Particularmente, las nanopartículas de plata (AgNPs) han sido de interés por sus características fisicoquímicas y potenciales aplicaciones biomédicas. Además, estudios recientes han demostrado que las AgNPs pueden presentar un efecto sinérgico con algunos fármacos utilizados en quimioterapia (Fahrenholtz, Swanner, Ramirez-Perez, & Singh, 2017).

Este trabajo propone establecer un modelo *in vitro* de la interacción del fármaco de primera línea 5-FU y las AgNPs en dos de las líneas celulares de cáncer de colon más utilizadas como prototipos en esta clase de ensayos, las cuales son: HCT-15 y HT-29. Los ensayos de esta investigación se realizaron en ambas líneas celulares a fin de analizar las diferencias esenciales de sus respuestas a los tratamientos.

2. ANTECEDENTES

2.1 *¿Qué es el cáncer?*

Es una enfermedad compleja y multisistémica, que se caracteriza por la aparición y proliferación de células que tienen anomalías distintivas y comunes, aunque cada tipo de cáncer tiene una forma distinta de crecer y propagarse. Puede originarse casi en cualquier parte del cuerpo y es diagnosticado una vez que comienza el crecimiento descontrolado de las células anormales (American Cancer Society, 2016).

Al crecer descontroladamente, las células cancerosas desplazan a las células sanas y, la mayoría, forman una estructura de tejido a la que se conoce como tumor maligno. Si la proliferación alcanza órganos o tejidos adyacentes al tumor, el cáncer puede desplazarse a otras partes del cuerpo (metástasis) donde se alojará y continuará creciendo, aunque seguirá siendo referida de acuerdo a donde se originó (American Cancer Society, 2016).

Una de las grandes problemáticas del cáncer es que a pesar de que se han determinado características comunes para todas las clases, las células son tan heterogéneas que cada uno requiere un tratamiento distinto y con frecuencia se administran dos o más simultáneamente para mejorar los resultados. Dentro de sus diferencias, se han logrado clasificar en carcinomas (células epiteliales), sarcomas (tejido conectivo o conjuntivo), leucemias (médula ósea) y linfomas (tejidos linfáticos), además se añaden prefijos que indican el tipo de célula que lo ocasionó. Recientemente, la biología molecular abre la posibilidad de establecer perfiles moleculares de cada tumor y que las terapias puedan dirigirse a las necesidades particulares de cada paciente (Sociedad Española de Oncología Médica, 2019).

A pesar de la heterogeneidad de esta enfermedad neoplásica, para tratarla se ha recurrido a la generalización de capacidades biológicas distintivas en las células cancerosas. Más allá de esto, se ha reportado que las células normales que interactúan con el tumor maligno adquieren estas capacidades distintivas evolucionando a un

estado neoplásico. En consecuencia, los tumores son más que masas de células anómalas en proliferación, son tejidos complejos que “reclutan” células sanas formando un “microambiente tumoral” (Hanahan & Weinberg, 2011).

Hanahan y Weinberg propusieron, en el año 2000, seis características distintivas de toda célula cancerígena. Después de una década de estudio, en 2011, actualizaron su propuesta y actualmente la lista la constituyen ocho distinciones moleculares, esquematizadas en la Figura 1.

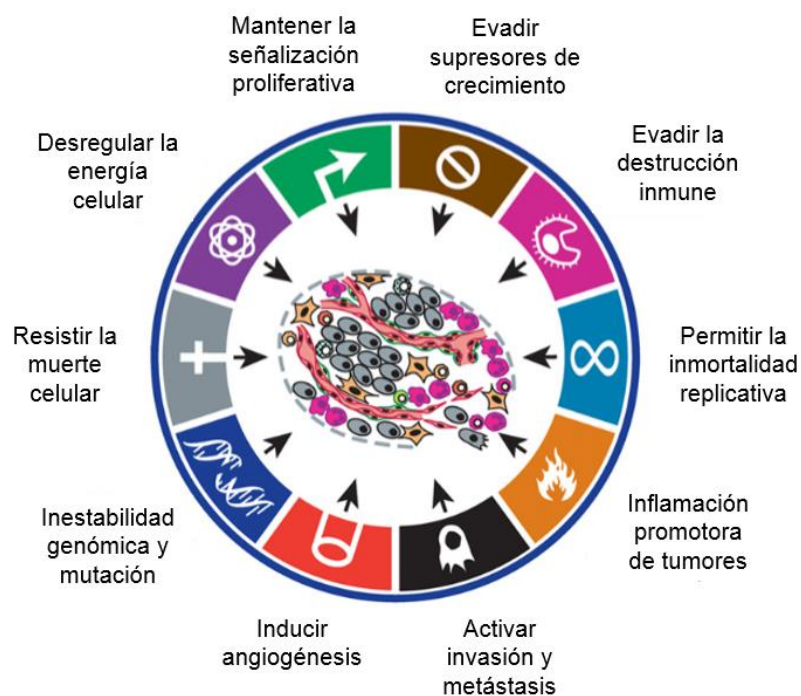


Figura 1.- Esquema de los sellos distintivos del cáncer. Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011.

Con los años y los avances médicos, los casos de supervivencia y tratamientos eficaces han aumentado, sin embargo, esta enfermedad aún representa un problema de salud pública con imperante necesidad de una cura.

2.2 El cáncer como problema de salud mundial

Desde hace varias décadas, el cáncer se ha posicionado como una de las primeras causas de mortalidad a nivel mundial representando así un grave problema de salud pública. Según el último reporte de GLOBOCAN, en 2018, se estima que la carga de casos nuevos aumentó a 18.1 millones, con 9.6 millones de muertes por esta causa. Esto representa que, durante su vida, 1 de cada 5 hombres y 1 de cada 6 mujeres desarrollan cáncer. Con respecto a la mortalidad, 1 de cada 8 hombres y 1 de cada 11 mujeres mueren por esta enfermedad. De la misma manera, la OMS proyecta que, debido a la evolución en los estilos de vida, el crecimiento poblacional y el envejecimiento, en 2040 los casos de cáncer sobrepasarán los 20 millones anuales (GLOBOCAN, 2018).

Sin consideraciones de sexo o edad, los tres tipos más incidentes a nivel mundial son el cáncer de pulmón, mama y colorrectal; juntos representan un tercio del total de casos a nivel mundial. En términos de mortalidad, los primeros en la clasificación son el cáncer de pulmón, colorrectal y de estómago, en orden descendente. Particularmente, el cáncer colorrectal ocasionó 1.8 millones de casos, cifra que representa el 10.2 % del total.

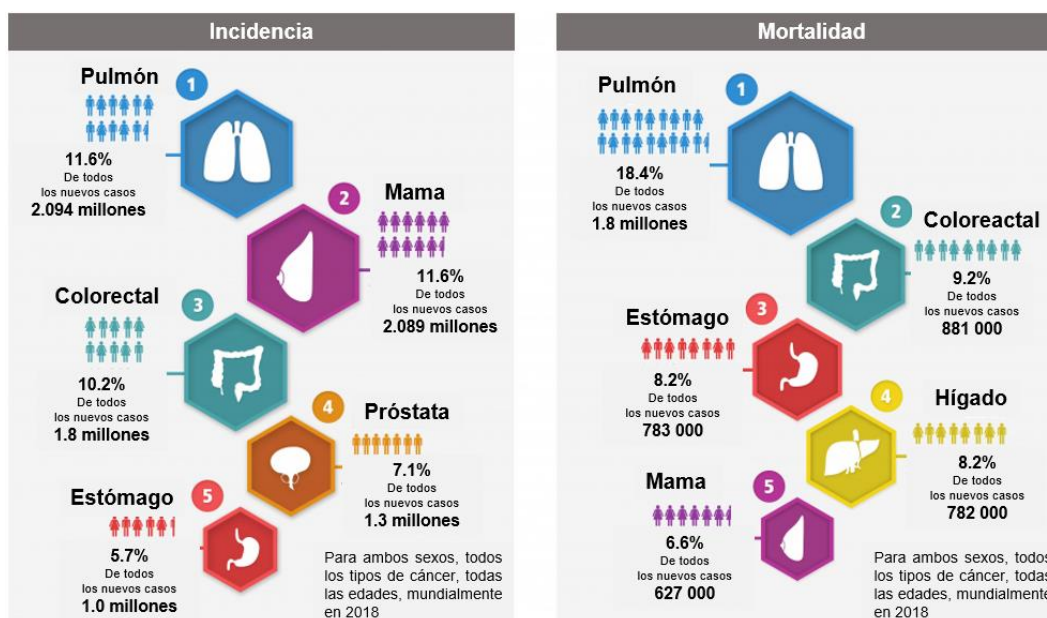


Figura 2.- Porcentajes de incidencia y mortalidad en 2018. Ambos sexos, todas las edades. Modificado de Globocan, 2018.

En México, el cáncer representa la tercera causa de mortalidad, a la que únicamente se anteponen las enfermedades cardíacas y la diabetes *mellitus*. Específicamente, en el año 2018, hubo 14,900 casos de cáncer colorrectal, cifra que equivale al 7.8% del total nacional. Este tipo de neoplasia es la segunda más recurrente entre los varones mexicanos y la cuarta entre las mujeres mexicanas (World Health Organization, 2018).

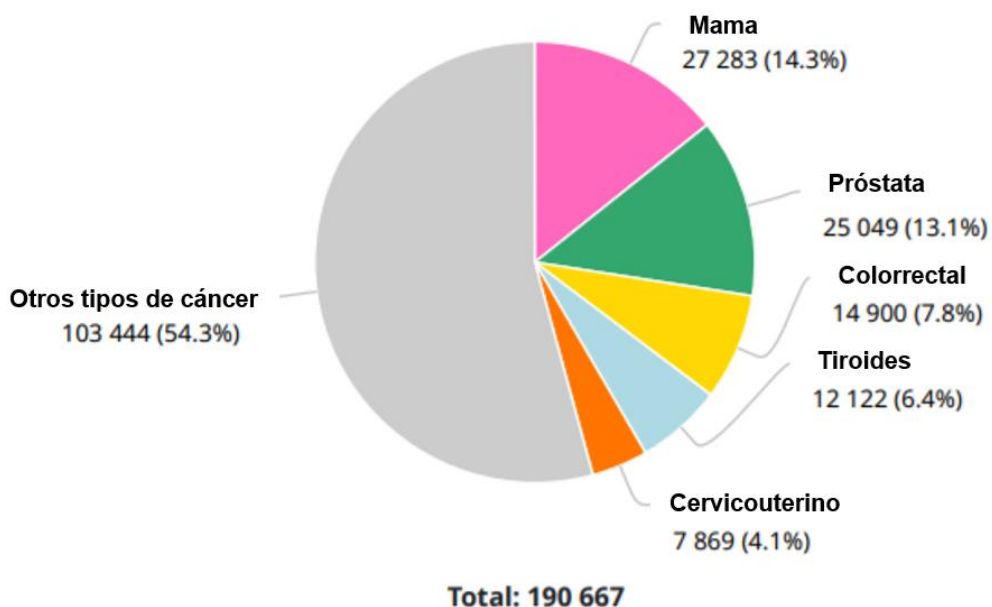


Figura 3.- Número de nuevos casos de cáncer en México durante 2018. Ambos sexos, todas las edades. Modificado de Globocan, 2018.

2.3 Cáncer de colon y tratamientos actuales

El cáncer de colon es uno de los tipos de cáncer con más incidencia en el mundo, sin distinciones de sexo o edad. Es una enfermedad que puede desarrollarse en cualquiera de las cuatro partes del colon o en el recto y que inicia con el crecimiento de un tejido conocido como pólipo. Un pólipo puede evolucionar en un adenoma, mismo que se considera una afección precancerosa. Más del 95 % de los tumores colorrectales son adenocarcinomas que comienzan en la mucosidad que lubrica colon y recto, aunque también los hay de otros tipos, como son los tumores carcinoides, linfomas, sarcomas y tumores del estroma gastrointestinal (INFOCáncer, 2019a).

Los factores más comunes que aumentan el riesgo de que un pólipo sea cancerígeno son el tamaño del pólipo; si existen más de dos de ellos; y si, después de la extirpación, se encuentran en el revestimiento del colon o recto, células con aspecto anormal. Los pólipos cancerígenos suelen originarse en la mucosa interna de los órganos y pueden extenderse hasta vasos sanguíneos o linfáticos, lo que puede derivar en metástasis. La propagación de las células cancerosas es la razón de que la estadificación (determinación de la etapa del cáncer) sea crucial para el tratamiento (American Cancer Society, 2018).

Para el cáncer colorrectal, se emplea el sistema de estadificación vigente del *American Joint Committee on Cancer*, basado en tres datos principales: el tamaño del tumor, su propagación a sitios adyacentes y su propagación a sitios distantes.

Se han aislado líneas celulares de distintos tipos de adenocarcinomas para evaluarlas *in vitro* y utilizarlas como prototipos en el estudio de nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer. Dos de las más utilizadas son las líneas celulares HCT-15 y HT-29, provenientes de un hombre y una mujer, respectivamente.

Existen diferentes alternativas para tratar el cáncer colorrectal, dependiendo de la etapa en la que se encuentre el tumor, que pueden emplearse en combinación o consecutivamente. Los principales tratamientos son la cirugía, radioterapia, quimioterapia y la terapia dirigida (INFOCáncer, 2019b). A continuación, se exponen las características, ventajas y limitantes de los mismos:

- **Cirugía:** es el tratamiento principal para las etapas iniciales del tumor. Consiste en la extirpación de parte del colon y los ganglios linfáticos adyacentes. Estas cirugías suelen ser dolorosas y pueden causar daños en órganos cercanos. Además, pueden manifestarse fugas intestinales que derivan en infecciones o adherencias entre órganos o tejidos que requieren una operación adicional. No garantiza la remoción total de las células cancerígenas y normalmente se acompaña con radioterapia, quimioterapia o ambas (INFOCÁNCER, 2019).

- **Radioterapia:** consiste en la administración de rayos de alta energía con el fin de destruir las células cancerosas. Se utiliza cuando el tumor se ha adherido al órgano o tejido, haciéndolo difícil o imposible de extirpar. También se emplea antes de la cirugía para facilitar la remoción o después de la misma para prevenir la metástasis. Cuando se combina con la quimioterapia para mejorar su eficacia, se conoce como quimiorradiación o quimiorradioterapia. La radioterapia, sin embargo, ocasiona náuseas, irritación en la dermis de la zona radiada, incontinencia intestinal, evacuaciones dolorosas, irritación de la vejiga y fatiga, entre otros efectos secundarios que es posible no desaparezcan completamente después de finalizado el tratamiento (INFOCÁNCER, 2019).
- **Quimioterapia:** se define como el suministro intravenoso u oral de fármacos contra el cáncer, que puede administrarse de manera sistémica o regional. Es el tratamiento más conocido y puede usarse durante los distintos estadios. Recibe un nombre diferente dependiendo de la finalidad de su aplicación, tal que se denomina quimioterapia adyuvante cuando se emplea después de la cirugía para ayudar a prevenir recidivas, eliminar células que hayan podido permanecer tras la intervención quirúrgica y aquellas que pudieron haberse separado del tumor primario y estén alojándose en otras partes del cuerpo. Por otra parte, se conoce como quimioterapia neoadyuvante cuando se utiliza antes de la cirugía para reducir el tamaño del tumor, facilitando su remoción. En casos de cáncer muy avanzado, constituye un factor que prolonga el tiempo de vida, no así la calidad de la misma. Los quimioterapéuticos atacan a las células que se dividen rápidamente, mas no diferencian entre células cancerosas y otras células del cuerpo que se dividen con la misma rapidez como lo son las células madre, los folículos pilosos y el revestimiento de los intestinos. Los quimiofármacos usados más frecuentemente contra el cáncer de colon son el 5-fluorouracilo (5-FU), Capecitabina, Irinotecán y Oxaliplatino, éstos pueden administrarse solos o en combinación (INFOCÁNCER, 2019).

- **Terapia dirigida:** surge de la investigación sobre los cambios en los genes y proteínas de las células cancerígenas. Consiste en el suministro de versiones artificiales de anticuerpos monoclonales que atacan distintos factores de crecimiento celular como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que contribuye con la angiogénesis, y el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que promueve al crecimiento celular y está presente en altas cantidades en la superficie de las células cancerosas. Se administran como infusiones intravenosas y con frecuencia se utilizan para tratar estadios avanzados, como alternativa cuando el paciente no responde a los otros tratamientos o tiene algún padecimiento que le impida tomarlos. Estos tratamientos han demostrado prolongar el tiempo de vida en casos de cáncer avanzado cuando se combina con la quimioterapia, pero los efectos secundarios son graves y diversos, entre los que se destacan perforaciones en el colón, problemas cardiacos, presión arterial alta o baja, fiebre y reacciones alérgicas, entre otros (INFOCÁNCER, 2019).

2.4 Fármaco 5-fluoruracilo y su mecanismo de acción

El 5-fluoruracilo (5-FU) es un fármaco de primera línea en el tratamiento de varios tipos de cáncer, entre los que destaca el cáncer de colon. Pertenece a la clasificación química de los antimetabolitos, que pueden ser definidos como moléculas análogas a los compuestos endógenos de las rutas biosintéticas que reemplazan o interfieren en la acción de los mismos (Eritja et al, 2018).

En este caso, el 5-FU es el antimetabolito del uracilo, precursor de la timina, una de las cuatro bases nitrogenadas indispensables para la síntesis de DNA. Ambas pirimidinas, entran en las células por mecanismos de transporte facilitado, ya que comparten la misma estructura química con la diferencia de que uno de los hidrógenos del uracilo es sustituido por un radical flúor en el carbono 5 del anillo (García, 2018).

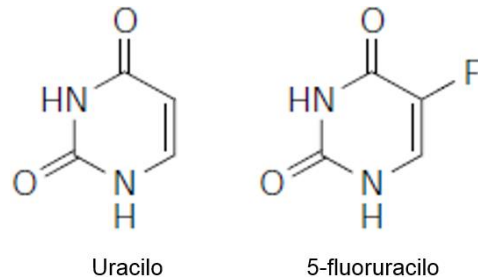


Figura 4.- Estructura química del uracilo (izquierda) y 5-FU (derecha). Modificado de Longley et al, 2003.

El compuesto en mayor concentración en el medio extracelular, penetrará la membrana en mayor proporción que el otro. Una vez dentro de la célula, competirán por unirse a los sitios activos de la timidilatosintasa (TS), enzima que cataliza la metilación del uracilo para transformarlo en timina por acción del cofactor 5,10-metilenetetrahidrofolato. Antes de poder interactuar con la enzima TS, el 5-FU debe seguir la misma ruta de bioactivación que el uracilo para dar paso a la formación de monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), metabolito activo que interrumpirá la acción de la enzima TS (García, 2018; Longley et al., 2003).

El FdUMP forma un complejo terciario irreversible con la enzima TS y el cofactor, bloqueando el paso a la unión del verdadero sustrato (dUMP) e inhibiendo la contribución normal de la enzima en la síntesis de timidilato (dTMP), lo que ocasionará un desbalance en los nucleótidos disponibles para sintetizar y reparar el ADN (García, 2018.; Longley et al., 2003).

Por otra parte, el FdUMP y el dUMP acumulado en el medio, pueden trifosforilarse dando paso a la formación de trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) y trifosfato de desoxiuridina (dUTP), respectivamente. Estas moléculas pueden ser incorporadas a las cadenas de ADN por la ADN polimerasa, donde actuarán como agente mutagénico desencadenando la ruptura de la cadena (García, 2018).

Las reacciones anteriormente descritas, finalmente activarán el gen p53, regulador de la apoptosis y supresor tumoral que se encuentra inhibido en las células cancerosas, programando la muerte celular. El 5-fluorouracilo es un compuesto eficaz en el

tratamiento del cáncer pero que acarrea terribles efectos secundarios y tiene como limitante la resistencia múltiple a fármacos presente en diversos tipos de líneas celulares (Longley et al, 2003).

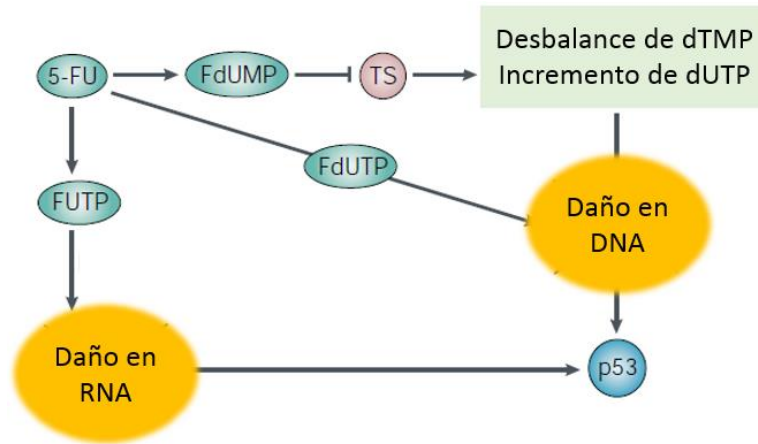


Figura 5.- Mecanismo de acción del 5-fluoruracilo (5-FU). Modificado de Longley et al, 2003.

2.5 Resistencia múltiple a fármacos

De entre todas las opciones, la quimioterapia es fundamental para el tratamiento de esta enfermedad, no obstante, sus efectos tóxicos se presentan en las células cancerígenas y a nivel sistémico. Frecuentemente, esto ocasiona que las células cancerígenas desarrollen una resistencia múltiple a fármacos, haciendo que la quimioterapia sea inefectiva, existan recidivas y una mala prognosis en los pacientes.

La resistencia múltiple a fármacos (MDR, por sus siglas en inglés), es un fenómeno de resistencia cruzada a fármacos con estructuras químicas no relacionadas, y diversos blancos y mecanismos moleculares (Yuan et al., 2016). La ineficacia de la quimioterapia en los tumores con MDR ha sido asociada al transporte activo de los fármacos antineoplásicos desde el citoplasma a la región extracelular. Esto se debe a la sobreexpresión de proteínas transportadoras de fármacos de la familia ABC (del inglés, ATP-binding cassette). Estas proteínas actúan como agentes de eflujo de los xenobióticos que encuentren dentro de la célula, incluyendo muchos quimioterapéuticos

que pueden ser sustrato de diversas proteínas ABC simultáneamente. Una de las proteínas principales relacionadas con la MDR en el cáncer humano es la glicoproteína de permeabilidad (P-gp).

Se han desarrollado varias estrategias para superar la MDR, como la modificación de los regímenes de quimioterapia, la inactivación de los genes y bloqueo de las proteínas MDR, el uso de inhibidores de los transportadores ABC, etc. (Tomlinson et al., 2014). Sin embargo, ninguna ha sido totalmente efectiva y existe una necesidad para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas contra la MDR en los pacientes con cáncer.

En este sentido, la nanotecnología ofrece una serie de estrategias para contrarrestar la MDR. El tratamiento de tumores sólidos mediante nanopartículas ha sido posible debido a su tamaño nanométrico (1-100 nm). Se ha reportado en estudios *in vitro*, la capacidad de las nanopartículas de plata para modular la expresión de la proteína P-gp en células de cáncer de colon con MDR (Kóvacs et al., 2015).

2.6 Nanopartículas de plata (AgNPs) y su mecanismo de acción

Los nanomateriales han sido ampliamente estudiados debido a sus particulares características fisicoquímicas, como una alta reactividad, atribuidas en su mayoría a la relación superficie-área-volumen. Su tamaño, forma, estabilidad y actividad dependen en gran medida del método de síntesis que se emplee y de los compuestos precursores utilizados (Bryaskova, 2011).

Dentro de la extensa variedad de nanomateriales, las nanopartículas de plata (AgNPs) son uno de los nanomateriales con mayores aplicaciones biomédicas. Se han estudiado extensivamente sus propiedades antibacterianas, antivirales, antimicóticas y antiinflamatorias (Rai et al., 2012).

Cabe destacar que el mecanismo de citotoxicidad de las AgNPs no está bien establecido aún, pues se ha encontrado que pueden seguir distintas rutas de acción.

Sin embargo, en 2009, AshaRani y colaboradores propusieron varias vías por las que las AgNPs interrumpen las funciones celulares normales (Figura 6).

AshaRani describe primeramente que la internalización de las AgNPs en las células se da mayormente por endo y macropinocitosis. Una vez dentro, la superficie de las AgNPs se oxida liberando iones tóxicos de plata (Ag^+) que pueden alojarse en el núcleo celular donde se especula que alteran la división celular y la replicación de DNA. Estos iones también interactúan con otros componentes celulares como la mitocondria donde intervienen con los transportadores de Ca^{2+} ocasionado daño en la membrana mitocondrial que a su vez deriva en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y la inhibición de la síntesis de ATP. Además, se propone que existen un deterioro morfológico debido a la posible intervención de las AgNPs en la estructura y actividad del citoesqueleto de actina y la membrana plasmática. En conjunto estas alteraciones activan las cascadas de señalización de la apoptosis.

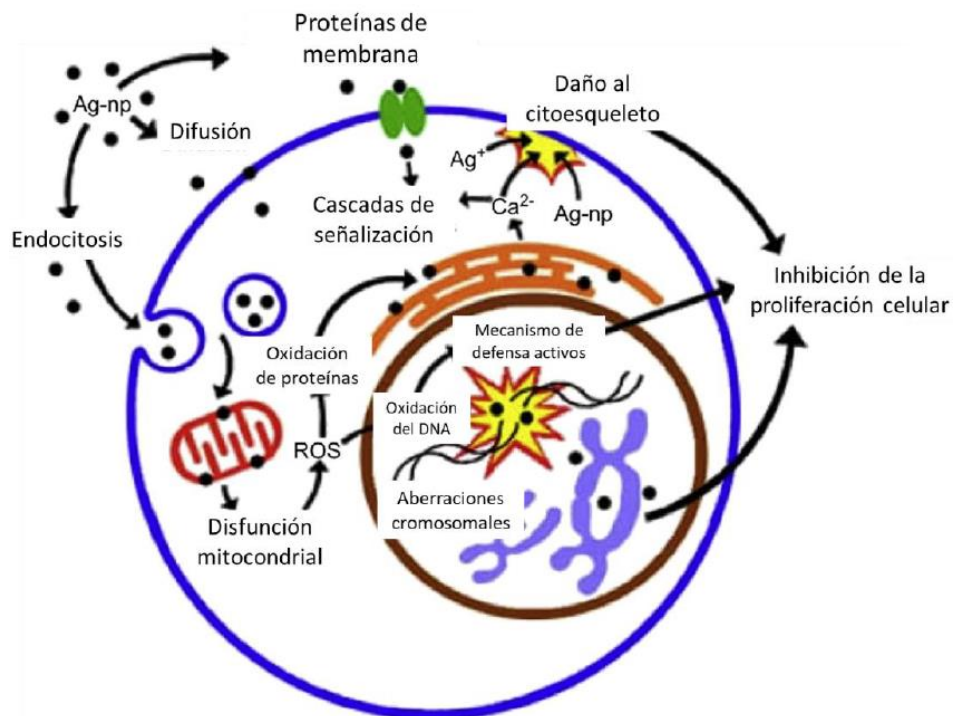


Figura 6.- Mecanismo de la toxicidad de AgNPs propuesto por AshaRani, 2009.

En general, el efecto tóxico de las AgNPs consiste en la formación de ROS que puede deberse a la unión de iones plata a la membrana celular y que, en consecuencia, desencadena la señalización para el bloqueo de la función respiratoria mitocondrial. En adición, se sabe que estos iones desacoplan la cadena respiratoria de transporte de electrones de la fosforilación oxidativa mediante la inhibición de las cadenas enzimáticas respiratorias (Dakal, et al., 2016).

Todas las propiedades de las AgNPs anteriormente descritas, las posicionan como una herramienta potencial para la resolución de los desafíos actuales del cáncer, pero son necesarios estudios posteriores que corroboren su bioseguridad y biocompatibilidad en escenarios *in vivo*.

2.7 Interacción entre fármacos: sinergismo y potenciación

Hasta el momento existen varios estudios sobre la relación dosis-efecto de tratamientos y combinaciones de éstos, en un intento por determinar cuál es su contribución individual y conjunta, además de si existe o no un efecto sinérgico entre ellos. Esto se vuelve mucho más complicado al tratarse de evaluaciones en sistemas biológicos, debido a que son excesivamente complejos y la acción de los compuestos individuales o en combinación utilizados en los tratamientos, puede intervenir en numerosas rutas moleculares.

En la interacción de los fármacos, se pueden describir principalmente tres tipos de respuestas: adición (muchas veces llamada potenciación), antagonismo y sinergia.

Se habla de potenciación cuando la combinación de una sustancia A, que tiene un efecto, con una sustancia B, sin efecto, tienen una acción mayor a la de A individualmente. Suponiendo ahora que A y B son sustancias con efectos individuales, se considera sinergia cuando el efecto de su combinación es mayor que la suma de sus efectos independientes. Finalmente, se considera adición cuando, en combinación, sus efectos individuales se suman; y antagonismo, cuando éstos se oponen entre sí (Chou, 2006).

Por lo tanto, el uso simultáneo de compuestos con diferentes mecanismos de acción podría contribuir a mejorar el objetivo particular que se desea tratar, apostando por los beneficios de un sistema sinérgico, propuestos por Chou en 2006, los cuales son: incremento de la eficacia en el efecto terapéutico, decremento de la dosis necesaria para aumentar o mantener la misma eficiencia, retrasar el desarrollo de la resistencia a fármacos y proveer sinergismo selectivo.

2.8 Interacción de las AgNPs con fármacos antineoplásicos

A partir de todas las propiedades descritas de las AgNPs, se ha propuesto que es posible encontrar un efecto potenciado o sinérgico entre éstas y los quimiofármacos típicamente utilizados en la actualidad.

En 2015, Kóvacs y colaboradores, fueron los primeros en analizar la contribución de las AgNPs en acción con metotrexato, cisplatino, carmustina, bleomicina, vinblastina y verapamilo en células sensibles a fármacos Colo 205 y células con MDR Colo 320 de cáncer de colon. Encontraron que las AgNPs inhiben la sobreexpresión de la proteína P-gp, evitando el transporte del fármaco fuera de la célula y restaurando la condición de MDR, además de que ejercen un efecto sinérgico sobre los compuestos evaluados (Kovács et al., 2015).

Posteriormente, Fahrenholtz y colaboradores, en 2017, examinaron la interacción del cisplatino con AgNPs en las líneas de cáncer de ovario SKOV3, A2870 y OVCAR3. Las líneas A2780 y SKOV3 fueron susceptibles a los efectos de las AgNPs individualmente, no así, la línea OVCAR3. Sin embargo, al analizar la respuesta a la combinación con cisplatino, se encontró un efecto sinérgico entre las AgNPs y el cisplatino en A2780 y OVARCAR3, considerando los parámetros establecidos por Chou en 2010. Esto sugiere que no es necesaria una alta sensibilidad a los tratamientos individuales para obtener una interacción sinérgica (Fahrenholtz et al., 2017).

Más tarde, en 2019, Gopisetty y colaboradores, utilizaron dos tamaños de AgNPs (5 y 75 nm) en combinación con doxorubicina para evaluar su efecto conjunto en células

resistentes de cáncer de mama (MCF-7/KCR). Determinaron que las AgNPs de 75 nm ayudan a modular la actividad de la P-gp contribuyendo a eliminar la MDR y reduciendo significativamente la viabilidad celular, pero no estudiaron el tipo de interacción entre el fármaco y las nanopartículas (Gopisetty et al., 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

Como consecuencia de las alarmantes estimaciones sobre el aumento de casos de cáncer en los años próximos, y a los devastadores efectos secundarios de la quimioterapia aunado a la resistencia múltiple a los quimioterapéuticos que algunos tipos de células cancerígenas presentan, se ha priorizado la investigación sobre los posibles tratamientos alternativos a la quimioterapia. En este sentido, la nanotecnología ofrece una serie de estrategias para contrarrestar la MDR y aprovechar los mecanismos de acción de ciertos nanomateriales para reducir la concentración necesaria en los tratamientos de quimioterapia. Diversos estudios *in vitro* han demostrado el efecto antineoplásico de las nanopartículas de plata (AgNPs) en diferentes tipos de células de cáncer. Esto abre la posibilidad de utilizarlas como agentes antineoplásicos. Además, se ha reportado que, en ciertos tipos de cáncer, las AgNPs actúan como potenciador del efecto citotóxico de algunos fármacos antineoplásicos. Sin embargo, es importante determinar si este efecto existe de forma general en cualquier tipo de célula cancerígena y utilizando otro tipo de fármacos, por lo que sería importante explicar cuáles son los factores que intervienen en dicho fenómeno con la finalidad de reducir el efecto genotóxico de ambos agentes. Por lo que este trabajo contribuye al conocimiento de la interacción de las AgNPs con fármacos antineoplásicos, particularmente del 5-FU como un modelo *in vitro* para el tratamiento de cáncer de colon.

4. HIPÓTESIS

Existen concentraciones subtóxicas de AgNPs que, al combinarse con concentraciones subtóxicas del fármaco quimioterapéutico 5-FU, ejercen un efecto antiproliferativo potenciado en células de cáncer de colon.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* el efecto antiproliferativo de las AgNPs en combinación con 5-FU en células de cáncer de colon.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar las AgNPs mediante dispersión dinámica de luz (DLS), espectrofotometría de luz UV-Vis y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).
2. Determinar el efecto citotóxico y la concentración media inhibitoria (IC_{50}) de las AgNPs en las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y HCT-15.
3. Determinar el efecto citotóxico y la concentración media inhibitoria (IC_{50}) del quimioterapéutico 5-fluorouracilo en las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y HCT-15.
4. Determinar el efecto citotóxico de la combinación de proporciones menores a la IC_{50} del quimioterapéutico 5-FU y de las AgNPs en las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y HCT-15.
5. Evaluar la formación de especies reactivas de oxígeno inducidas en las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y HCT-15, por las combinaciones de AgNPs.

6. METODOLOGÍA

6.1 Origen y preparación de las nanopartículas de plata (AgNPs)

Las AgNPs recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP), fueron adquiridas en la compañía Nanostructures & Amorphous Materials, INC. (Texas, USA). El fabricante reporta que estas AgNPs tienen un diámetro promedio de 80 nm, con una pureza del 99 % y 0.3 % de PVP. Se preparó una solución de AgNPs a una concentración de 80 mM (basados en el contenido de plata metálica) en agua Mili-Q, la solución se dispersó por sonicación durante 30 min antes de ser caracterizadas y utilizadas para los ensayos de citotoxicidad.

6.2 Caracterización fisicoquímica de las AgNPs

6.2.1 Plasmón de resonancia superficial por espectrofotometría de luz UV-vis

Para medir el plasmón de resonancia superficial de las AgNPs, se mezclaron 50 μ L de las AgNPs (80 mM) previamente sonicadas durante 30 min y 950 μ L de agua desionizada MiliQ. Se colocó la mezcla en una celda de cuarzo de 1 cm y se realizó la lectura en un intervalo de longitudes de onda de 200-800 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Multiskan GO; el blanco de lectura fue 1 mL de agua desionizada MiliQ. Los resultados obtenidos se graficaron como la absorbancia de las AgNPs en relación a la longitud de onda.

6.2.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Para comprobar la presencia del recubrimiento con polivinilpirrolidona (PVP), las AgNPs fueron analizadas mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés). Se utilizaron 50 μ L de agua desionizada como blanco de lectura en un espectrofotómetro de infrarrojo (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Después, se colocaron 50 μ L de una dilución (1:100) de las

AgNPs y se llevó a cabo la lectura en el intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} . Los espectros de absorción fueron comparados con el espectro de absorción de PVP sólido estándar.

6.2.3 Distribución del tamaño de nanopartícula y potencial Zeta mediante dispersión dinámica de luz

El tamaño y distribución de las AgNPs, así como su potencial Zeta, fueron determinados mediante dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) en un equipo Zetasizer (Nano-ZS DTS 1060, Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom) operado a $\lambda=532$ nm. Se mezclaron 50 μL de las AgNPs (80mM) previamente sonicadas durante 30 min y 950 μL de agua desionizada MiliQ. Se colocó 1 mL de la dilución en una celda capilar y se llevó a cabo la lectura. Agregando las mismas cantidades, se realizó la dilución utilizando medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB-Biowest Cat. L0010-100) y sin suplementar y se repitieron las lecturas. Se prepararon otra serie de diluciones de las AgNPs con agua desionizada, medio de cultivo DMEM suplementado y sin suplementar, y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO_2 . Posteriormente, se leyeron en el Zetasizer con los mismos parámetros. Se llevó a cabo una comparación de la estabilidad de las AgNPs al encontrarse en agua desionizada y rodeadas de los iones y proteínas que contiene el medio de cultivo celular, tomando el potencial Zeta a 0 y 24 horas. Los resultados se obtuvieron directamente usando el software del equipo.

6.3 Líneas celulares de cáncer de colon

Las líneas celulares de cáncer de colon: HCT-15 (ATCC, CCL-225) y HT-29 (ATCC, HTB-38), se adquirieron en el American Type Culture Collection ATCC. HCT-15 es una línea de células adherentes con morfología epitelial que fue extraída de un adenocarcinoma colorrectal de un individuo de sexo masculino. Mientras que, la línea celular HT-29 es también una línea adherente con morfología epitelial, extraída de un adenocarcinoma colorrectal de una fémina caucásica.

6.4 Preparación de medios y soluciones para cultivo celular

6.4.1 Medio de cultivo celular

El crecimiento de ambas líneas celulares se realizó en medio de cultivo DMEM. Para prepararlo, se disolvieron 13.5 g de DMEM (Sigma Aldrich-Cat. D7777) en 500 mL de agua destilada estéril. De igual forma se añadieron 1.5 g de bicarbonato de sodio, 10 mL (1 % v/v) de L-Glutamina (Biowest Cat. X0550-100), 10 mL (1 % v/v) de una solución de penicilina y estreptomina (Biowest Cat. S165H-500) y 100 mL (10 % v/v) de Suero Fetal Bovino. Se aforó a 1 L y se esterilizó mediante filtración a través de un filtro con tamaño de poro de 0.22 μm . Para su fácil manejo se distribuyó en frascos pequeños y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Este medio de cultivo se denominará DMEM suplementado.

6.4.2 Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Se disolvieron 8 g de NaCl [137 mM], 0.2 g de KCl [2.7 mM], 1.44 g de Na₂HPO₄ [10 mM] y 0.24 g de KH₂PO₄ [2 mM] en 800 mL de agua destilada. Se aforó a 1 L y ajustó el pH a 7.4; la mezcla se hizo pasar a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.22 μm y finalmente, se esterilizó por autoclave, se dividió y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

6.4.3 Medio de criopreservación

Se preparó una mezcla con 50 % (v/v) de Suero Fetal Bovino, 40 % (v/v) de DMEM suplementado y 10 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO).

6.5 Cultivo y mantenimiento celular

6.5.1 Descongelamiento de células criopreservadas

Para obtener un cultivo a partir de células en criopreservación, éstas se descongelaron a temperatura ambiente, se resuspendieron y se trasladaron a un tubo de microcentrífuga que se centrifugó a 1250 rpm por 5 min a 25 °C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1 mL de medio de cultivo para centrifugar nuevamente con los mismos parámetros. Una vez más se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 1 mL de medio de cultivo. Por otra parte, se colocaron 5 mL de medio de cultivo DMEM suplementado y 500 µL de células resuspendidas en cada caja a cultivar, mismas que se rotularon con la línea celular correspondiente, número de pase, fecha y nombre de usuario. Las células se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ y su morfología y crecimiento fue monitoreado cada 24 horas con un microscopio óptico invertido.

6.5.2 Pases celulares (Subcultivos)

Para realizar subcultivos celulares se removieron las células de las cajas de cultivo por acción enzimática de la tripsina y acción mecánica del operador. Para comenzar la separación, se descartó el medio viejo y se realizó un lavado del cultivo con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Se colocó 1 mL de tripsina por cada subcultivo y se incubaron las células por 5 min a 37 °C y 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se golpeó ligeramente la caja de cultivo y se recirculó su contenido con una micropipeta a fin de separar las células mecánicamente. El contenido de cada caja se colocó en un tubo de microcentrífuga que se centrifugó a 1250 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con PBS, centrifugando bajo los parámetros anteriormente mencionados. Una vez más, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet y las células se colocaron en una caja de cultivo con 5 mL de medio de cultivo DMEM suplementado. La cantidad de células a cultivar se determinó con base al conteo

celular previo, cuyo procedimiento se describe en el apartado 6.6. Finalmente, las cajas se rotularon con la línea celular correspondiente, número de pase y fecha y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂.

6.5.3 Criopreservación celular

Para criopreservar los cultivos celulares, se repitió el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2. Sin embargo, la suspensión celular se colocó en tubos con 1 mL de medio de criopreservación celular, a los que se añadió el volumen necesario para congelar al menos 1 millón de células por cada criotubo. Los criotubos se rotularon con el nombre de la línea celular, número de pase y fecha y fueron almacenados a -80 °C.

6.6 Conteo celular por exclusión de azul tripano

A fin de conocer la cantidad de células viables presentes en un cultivo celular, se realizó un conteo por exclusión en una cámara de *Neubauer* utilizando el colorante azul tripano. Cuando las células están muertas o en proceso de morir, la membrana plasmática se ve alterada en función y estructura, por lo que puede permitir el paso a moléculas a las que normalmente sería impermeable dada su naturaleza hidrofóbica. En los ensayos por exclusión de colorantes, como es el caso del azul tripano, la molécula podrá atravesar la membrana celular únicamente si está dañada, por lo que, caso contrario, este colorante teñirá de azul las células muertas, mientras que las células viables permanecen translúcidas (Martín, 2014).

Así, sólo se contaron las células sin teñir y que no se encontraran sobre los márgenes exteriores de cada cuadrante de la cámara. Pueden ser tomadas en cuenta las células localizadas en los márgenes interiores de los cuadrantes, representados por líneas gruesas en la Figura 7.

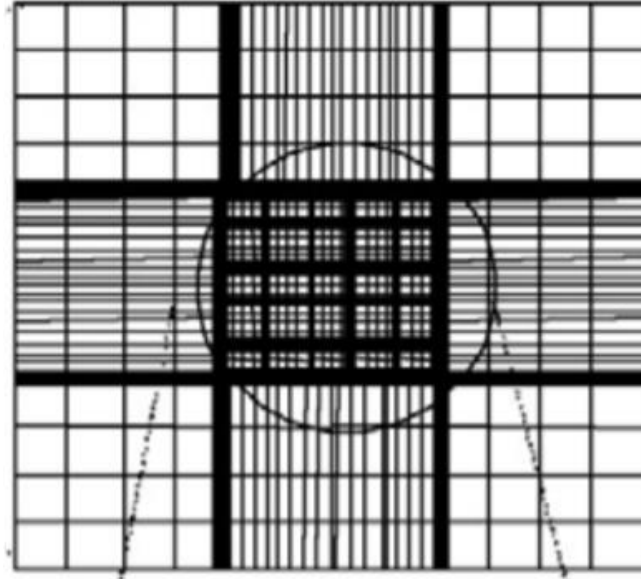


Figura 7.- Esquema de los cuadrantes de la cámara de Neubauer. Modificado de Pica Granados, Ronco, & Díaz Báez, 2004.

Para realizar el conteo de la viabilidad celular se colocaron en la cámara 10 μ L de una mezcla con 10 partes del medio con células y 40 partes de azul tripano, de tal forma que se obtuvo un factor de dilución de 5. La cantidad de células por mililitro se calculó según la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = (x)(FD)(10,000)$$

donde:

x : promedio del conteo de los cuatro cuadrantes

FD : factor de dilución

6.7 Ensayo de citotoxicidad por reducción de MTT

La viabilidad celular se midió con el método colorimétrico por reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). El MTT es una sal de tetrazolio, de color amarillo, que se reduce a cristales púrpura de formazán debido a la acción de las enzimas mitocondriales presentes en las células vivas (Figura 8). Si se utiliza una

población celular homogénea, es posible considerar que la cantidad de formazán generada es proporcional al número de células viables (Mosmann, 1983).

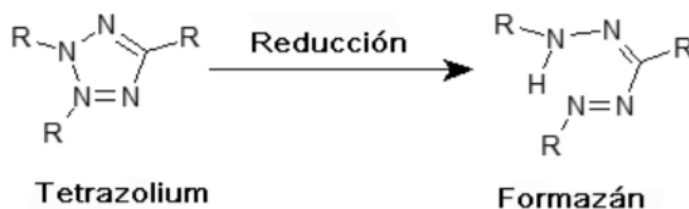


Figura 8.- Reducción de las sales de tetrazolio. Recuperado de Martín Piedra, 2014.

Los ensayos de citotoxicidad tienen una duración de tres días. A continuación, se describen los procedimientos seguidos en cada uno de ellos.

6.7.1 Cultivo celular en placa (Día 1)

Para sembrar las células en placa de cultivo, se tomó como base el conteo por exclusión de azul tripano descrito en el apartado anterior. A partir de la cantidad determinada de células por mililitro se realizaron los cálculos para sembrar en una placa de 96 pozos una cantidad de 10,000 células en un volumen final de 100 μL de medio DMEM suplementado. Así, el volumen total calculado se colocó en un reservorio en el que se mezclaron las células cuidadosamente y del cual se recuperó el contenido utilizando una micropipeta multicanal para colocarlo en los pozos. Posteriormente, la placa se incubó durante 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5 % de CO_2 .

6.7.2 Tratamiento de las células con las AgNPs o el fármaco 5-FU (Día 2)

A partir de una solución de 300 mM de 5-FU, se prepararon diferentes disoluciones de cada tratamiento a analizar con un volumen final de 350 μL , las concentraciones evaluadas fueron: 5 mM, 10 mM, 15 mM, 30 mM, 60 mM y 120 mM, seleccionadas a partir de los valores de IC_{50} reportados por (Du et al., 2004). Se removió el medio de cultivo en el que se encontraban las células y se colocaron 100 μl por pozo de cada concentración del fármaco a evaluar, ubicando un tratamiento por fila. Las últimas filas

de la placa se utilizaron como controles en los que se colocó el mismo volumen por pozo de DMEM suplementado como control positivo de viabilidad celular y dimetilsulfóxido (DMSO) como control negativo. Finalmente, la placa se incubó nuevamente durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Se siguió el mismo procedimiento para las AgNPs utilizando una solución 80 mM a partir de la cual se prepararon disoluciones a diferentes concentraciones: 12.5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM y 400 µM, propuestas por estudios previos de laboratorio. En el caso de los ensayos para evaluar el efecto citotóxico de las combinaciones de 5-FU y AgNPs, se hicieron los cálculos para considerar la cantidad de cada uno de ellos, a partir de las dos soluciones stock anteriormente mencionadas, 80 mM para las AgNPs y 300 mM para el 5-FU. Se eligieron cuatro concentraciones de 5-FU (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM) que se combinaron con cuatro concentraciones seleccionadas de AgNPs (12.5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) a partir de los resultados de los ensayos de viabilidad celular. El volumen final de medio DMEM suplementado de cada combinación fue de 100 µL por pozo. Los ensayos se realizaron tres veces con sus respectivos triplicados internos y controles.

6.7.3 Lectura y cálculo de la viabilidad celular (Día 3)

Al tercer día del ensayo, se descartó el medio de cultivo que contenía las diferentes concentraciones de fármaco o AgNPs. Posteriormente, se realizaron tres lavados con solución PBS, colocando 200 µL en cada pozo y agitando cuidadosamente. Después se añadieron 10 µL de reactivo MTT (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich M-8910) y 90 µL de medio DMEM suplementado. La placa de cultivo celular, se incubó durante 4 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo, se agregaron 100 µL de isopropanol a cada pozo para disolver los cristales de formazán formados por la reducción del reactivo MTT. Posteriormente, la placa se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Los resultados de absorbancia se obtuvieron leyendo la placa a 570 y 690 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Multiskan GO; las lecturas a 690 nm se utilizaron como blanco.

Para calcular la viabilidad celular, los valores de absorbancia obtenidos a 690 nm fueron restados a los obtenidos a 570 nm. Con los resultantes de la resta, se promediaron los datos del triplicado de control positivo y se consideró esa cantidad como el 100 % de viabilidad celular. Se calculó el promedio de los triplicados en las filas restantes y se identificó su valor porcentual con respecto al control positivo y la desviación estándar correspondiente en todos los casos. Para los ensayos con combinaciones de 5-FU y AgNPs, se calculó el 100 % de viabilidad celular con base en el control positivo y el 100 % de muerte celular con base en el control negativo. A cada valor en la resta de absorbancias se le determinó un porcentaje con respecto al 100 % establecido en el control negativo y después se le restó el dato obtenido como 100 % del control positivo. Por último, se calcularon los promedios por triplicado y su desviación estándar.

6.8 Ensayo de estría

El ensayo de estría evalúa la motilidad de las células, a través de su capacidad para migrar y cerrar una herida hecha en una monocapa de células confluentes. En este caso, se utilizó para determinar el comportamiento de la migración celular como consecuencia de cada tratamiento seleccionado. Los resultados de este ensayo pueden presentar variaciones importantes debido a que la estría es realizada por un operador. Para ayudar a disminuir dichas variaciones se coloca en cada pozo o placa el mismo número de células a fin de lograr confluencia sincrónica, manteniendo un estado celular adecuado desde el principio (Justus, Leffler, Ruiz-Echevarria, 2014).

En una placa de 12 pozos, se sembraron 80,000 células (HCT-15 o HT-29) por pozo. Una vez que los pozos estuvieron confluentes, en cada uno se realizó una estría (herida) vertical del principio al final del pozo, utilizando una punta de micropipeta de 200 μ L. Inmediatamente después se colocaron las concentraciones seleccionadas de fármaco (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM), preparadas de acuerdo con lo descrito en el apartado 6.7.2, ahora con un volumen final de 1 mL. La última fila de la placa se utilizó para los controles: medio DMEM suplementado como control positivo y dimetilsulfóxido

(DMSO) como control negativo. Se fotografiaron todos los pozos, capturando cuatro partes distintas de la estría en cada caso. El crecimiento celular se monitoreo con un microscopio invertido y se tomaron fotografías de las células en cultivo a las 24 y 48 horas posteriores a la adición del tratamiento, incubando las células a 37 °C y 5 % de CO₂ el resto del tiempo. A partir de las imágenes obtenidas, con ayuda de un portaobjetos graduado, se midió el ancho de la estría en cada una de las cuatro tomas de cada pozo para determinar el promedio de las mediciones por día y, en consecuencia, el tamaño de la estría. Finalmente, se compararon los tamaños de cada día para evaluar el comportamiento de la estría en los distintos tratamientos y controles, tomando como referencia el tamaño de la primera medición en cada caso. Se siguió el mismo procedimiento para las AgNPs con concentraciones de 12.5 µM, 25 µM, 50 µM y 100 µM. Para los ensayos con combinaciones de 5-FU y AgNPs, se seleccionaron únicamente 5 mM 5-FU+25 µM AgNPs y 5 mM 5-FU+50 µM AgNPs, con base en los resultados de los ensayos de viabilidad celular en los que se emplearon las cuatro combinaciones de 5-FU y AgNPs descritas en el apartado 6.7.2. La significancia de los resultados se determinó mediante un análisis ANOVA de dos vías.

6.9 Medición de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Si bien la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) es un mecanismo que ocurre en todas las células sanas, en condiciones de estrés oxidativo, la presencia de ROS alcanza niveles que dañan los componentes de la membrana celular. A fin de evaluar el efecto de las diferentes concentraciones que AgNPs, 5-FU y sus combinaciones tienen en la inducción de ROS, se utilizó el compuesto fluorogénico diacetato de 5-(y-6)-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (carboxi-H₂DCFDA) como marcador de las ROS y el colorante azul fluorescente como Hoechst 33342 como tinción específica nuclear, para observar las células por microscopía confocal. Se añadió hidropéroxido de tert-butilo (TBHP) al control positivo como inductor de la producción de ROS, de acuerdo al manual de *Molecular Probes*.

Se sembraron en una caja de 16 pozos, 80,000 células por pozo en 100 μ L de medio DMEM suplementado. Estas células se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, el medio en que se incubaron fue reemplazado por los tratamientos seleccionados y preparados de acuerdo a lo descrito en el apartado 6.7.2. Así, se colocaron en cada pozo los siguientes tratamientos: 5 mM 5-FU, 50 μ M AgNPs, 5 mM 5-FU+ 25 μ M AgNPs, 5 mM 5-FU+ 50 μ M AgNPs y medio DMEM suplementado en dos pozos control, todos con un volumen final de 100 μ L. De nuevo, la placa se incubó durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Al tercer día, se reemplazó el medio de cultivo y en uno de los pozos control se colocaron 100 μ L de hidroperóxido de tert-butilo (TBHP) a una concentración final de 100 μ M preparados a partir de una solución stock 100 mM; las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C y 5 % de CO₂. Después, se removió el medio de todos los pozos y a cada uno se le añadieron 100 μ L de diacetato de carboxi-2',7'-diclorodihidro-fluoresceína (carboxi-H₂DCFDA) a una concentración final de 25 μ M preparados a partir de una solución stock de 10 mM; la placa se incubó durante 25 min a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, para realizar la tinción nuclear, a cada pozo se le agregaron 50 μ L del reactivo Hoechst 33342 a una concentración final de 1 μ M, preparados a partir de una solución stock 1 mM, y la placa de cultivo se incubó 5 min a 37 °C y 5 % de CO₂. Finalmente, se realizaron tres lavados con solución PBS y se agregaron 100 μ L de medio DMEM suplementado en todos los pozos.

Las células se observaron a través de un microscopio confocal invertido Olympus Fluoview FV100, usando un objetivo 20X. La tinción nuclear con el reactivo Hoescht, así como la reducción del H₂DCFDA, se observaron con la ayuda de un láser de iones de argón (excitación a 488 nm) con filtros FTIC para emisión a 515-530 nm. La intensidad del láser se mantuvo en un 20 % para reducir el foto-blanqueo. Las micrografías se capturaron utilizando el software FV-10 ASW y se analizaron con el software Visor FV-10ASW versión 3.1 de Olympus. La barra de escala representa 50 μ m.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización fisicoquímica

7.1.1 Plasmón de resonancia superficial

Se determinó el plasmón de resonancia superficial de las AgNPs preparadas y se obtuvo un pico de absorción máxima en 420 nm (Figura 9).

7.1.2 FT-IR

El espectro de FT-IR del PVP sólido utilizado como estándar presentó los picos característicos del polímero. En 3435 cm^{-1} se encontraron los enlaces OH del agua, los estiramientos C-H simétricos y asimétricos a 2953 cm^{-1} y 2872 cm^{-1} , respectivamente. A 1646 cm^{-1} se observa el estiramiento del grupo carbonilo (C=O) y a 1268 cm^{-1} el estiramiento del nitrógeno en el heterociclo. Por otra parte, el espectro de FT-IR de la muestra de AgNPs, únicamente exhibe dos picos a 2953 cm^{-1} y 2919 cm^{-1} , ambos correspondientes al estiramiento C-H.

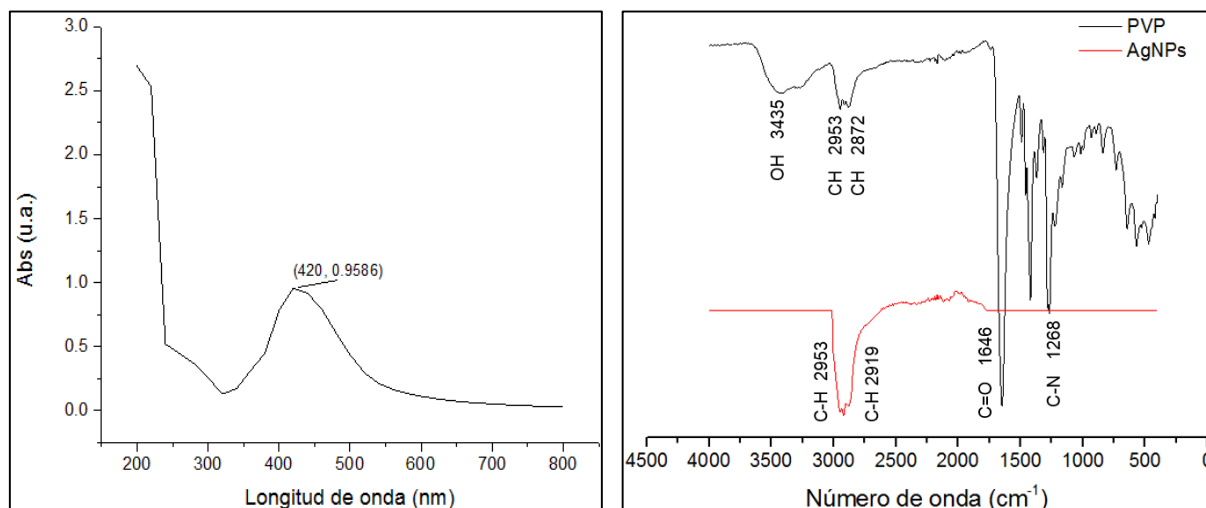


Figura 9.- Espectro de absorción UV-Vis (izquierda) y espectro de FT-IR (derecha) de las AgNPs.

7.1.3 Tamaño y potencial zeta

A fin de conocer si el tamaño y la estabilidad inicial de las AgNPs en solución cambia con respecto a la relación del tipo de solvente y el tiempo de incubación en el mismo, se analizó mediante DLS, la distribución del tamaño de las AgNPs en agua desionizada, medio de cultivo DMEM sin suplementar y medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino. Así, se obtuvieron las curvas de distribución de tamaños que se presentan en la Figura 10.

Como se puede observar, el tamaño de las AgNPs al tiempo cero en agua desionizada presenta un pico máximo en la curva de distribución de tamaños de 30.5 nm, mientras que el tamaño de estas nanopartículas en medio DMEM sin suplementar fue de 62.04 nm y 68.36 nm para el caso de las mediciones en medio DMEM suplementado.

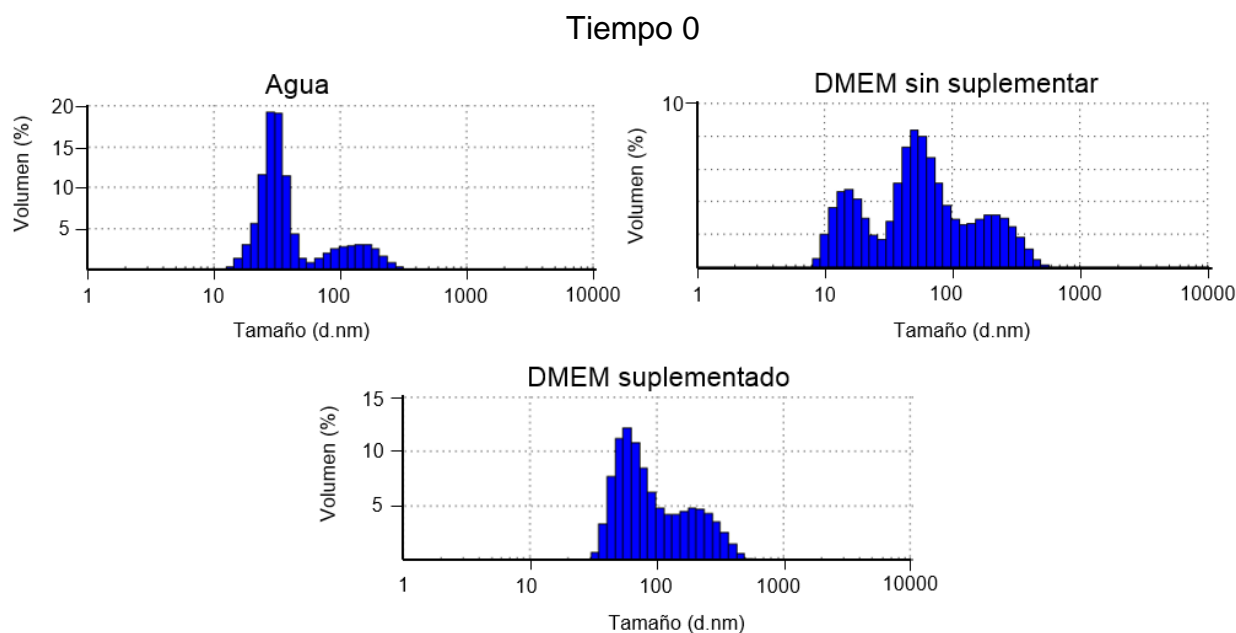


Figura 10.- Curvas de distribución de tamaños de las AgNPs obtenidas por DLS en distintas soluciones a tiempo inicial.

Con el propósito de reproducir las condiciones en las que se encuentran las AgNPs durante los ensayos, también se analizó la distribución de sus tamaños tras 24 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂ (Figura 11), que son los parámetros bajo los cuales se mantiene el cultivo celular.

De esta forma, a 24 horas, los picos máximos de las lecturas pueden apreciarse a 71.96 nm en agua desionizada, 71.78 nm en medio DMEM sin suplementar y 76.02 nm de medio DMEM suplementado.

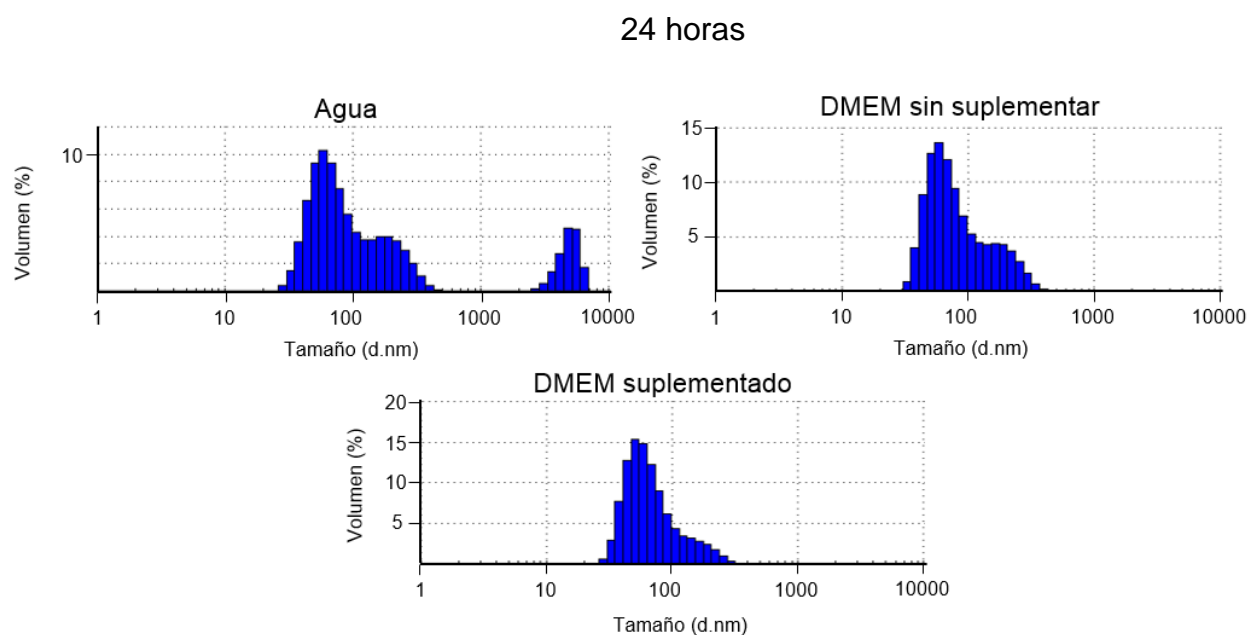


Figura 11.- Curvas de distribución de tamaños de las AgNPs obtenidas mediante DLS en distintas soluciones incubadas por 24 horas a 37 °C y 5 % CO₂.

En la Tabla 1, se presentan los valores de todos los picos de distribución de tamaños obtenidos en el tiempo 0 y a las 24 horas para cada una de las soluciones (agua, medio DMEM sin suplementar y medio DMEM suplementado), así como el porcentaje de volumen de la muestra a la que corresponden. Además, se resumen los valores de potencial Zeta medidos en cada una de las diluciones. Todas las mediciones se presentan con su respectiva desviación estándar.

Los resultados de las mediciones de potencial Zeta, graficados en la Figura 12, permiten apreciar la diferencia de estabilidad de las AgNPs en los distintos medios a 0 y 24 horas.

Las AgNPs en agua desionizada mantienen su potencial Zeta entre las dos mediciones. En medio DMEM sin suplementar, el potencial Zeta incrementa ligeramente, mientras que en medio DMEM suplementado este valor disminuye.

Tabla 1.- Tamaños y potenciales Zeta de las AgNPs en diferentes medios a 0 y 24 horas.

			Tamaño (nm)	Volumen (%)	Desviación Estándar (nm)	Potencial Zeta (mV)	Desviación Estándar (mV)
Tiempo 0	<i>Agua</i>	Pico 1	136.3	22.8	52.58	-18	0.7
		Pico 2	30.5	77.2	7.581		
		Pico 3	0	0	0		
	<i>DMEM sin suplementar</i>	Pico 1	16.64	25.3	5.03	-8.97	0.88
		Pico 2	62.04	52.2	23.79		
		Pico 3	225.9	22.6	85.3		
	<i>DMEM suplementado</i>	Pico 1	68.36	66.6	22.81	-11.6	0.35
		Pico 2	221.3	33.4	82.68		
		Pico 3	0	0	0		
24 horas	<i>Agua</i>	Pico 1	71.96	63.7	28.59	-18.1	0.9
		Pico 2	212.6	21.1	61.88		
		Pico 3	4889	15.1	902.2		
	<i>DMEM sin suplementar</i>	Pico 1	71.78	79	27.58	-10.5	0.3
		Pico 2	203.4	21	55.72		
		Pico 3	0	0	0		
	<i>DMEM suplementado</i>	Pico 1	76.02	100	45.13	-9.14	1.44
		Pico 2	0	0	0		
		Pico 3	0	0	0		

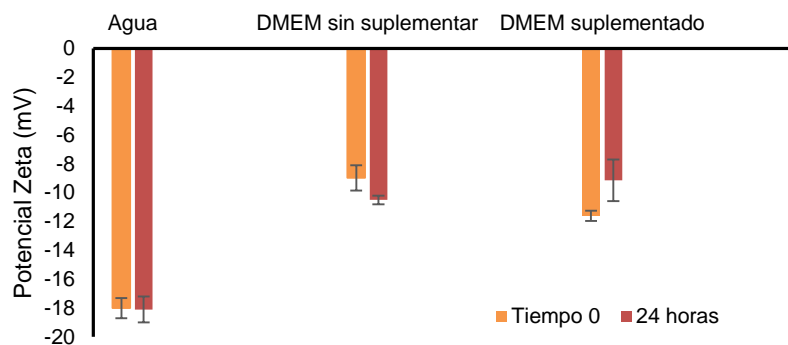


Figura 12.- Comparación de potenciales Zeta de las AgNPs en distintos medios a 0 y 24 horas.

7.2 Ensayo de citotoxicidad por reducción de MTT

7.2.1 Ensayo de citotoxicidad del 5-FU en células de cáncer de colon

En la Figura 13, se presentan los resultados de viabilidad celular en ambas líneas celulares de cáncer de colon expuestas a las concentraciones seleccionadas de fármaco (5, 10, 15, 30, 60 y 120 mM). Para el caso de las células HCT-15, la IC_{50} se presenta en ~30 mM a diferencia de las células HT-29, donde se encuentra en ~15 mM. En ambas líneas celulares, después de 30 mM la viabilidad permanece en el mismo orden de valores, es decir, cercano al 40 %.

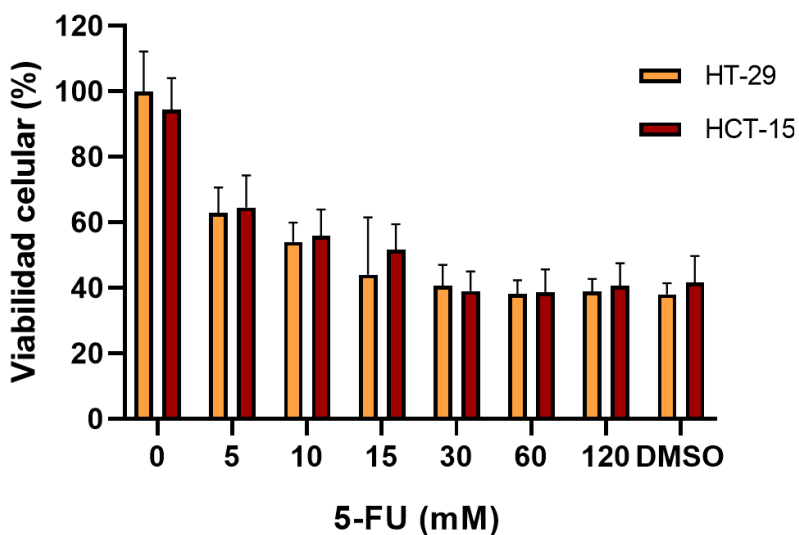


Figura 13.- Viabilidad de las líneas celulares HCT-15 y HT-29 de cáncer de colon en presencia de diferentes concentraciones de 5-FU.

7.2.2 Ensayo de citotoxicidad de las AgNPs en líneas celulares de cáncer de colon

En la Figura 14, se grafican los resultados de la viabilidad celular en ambas líneas celulares de cáncer de colon expuestas a las concentraciones de 12.5, 25, 50, 100, 200 y 400 μM de AgNPs. Como se observa, en ninguna de las líneas celulares HCT-15 y HT-29, fue posible determinar la IC_{50} , pues no se obtuvieron porcentajes de viabilidad celular iguales o menores al 50 % al ser expuestas a las concentraciones seleccionadas.

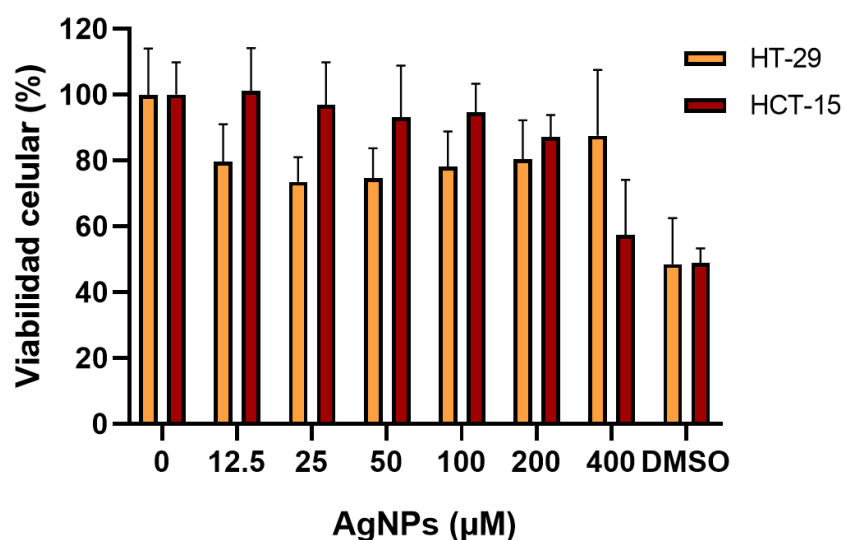


Figura 14.- Viabilidad de las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15 y HT-29, expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs.

7.2.3 Viabilidad celular de las combinaciones de 5-FU y AgNPs en células de cáncer de colon

Con base en los resultados de viabilidad celular del fármaco 5-FU y de las AgNPs, se combinaron cuatro concentraciones de cada agente con los que se repitieron los ensayos de viabilidad en las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15 y HT-29. Los resultados se muestran en las gráficas de las Figuras 15 y 16, en las que se colocó en el eje vertical el porcentaje de muerte celular.

En la línea celular HT-29 (Figura 15), se encontró que existe un efecto de potenciación entre el 5-FU y las AgNPs en las combinaciones de 5 mM 5-FU con 12.5, 50 y 100 μ M AgNPs y 10 mM 5-FU con 25, 50 y 100 μ M AgNPs. En todas las combinaciones restantes, se observó que la muerte celular corresponde principalmente a la acción del fármaco.

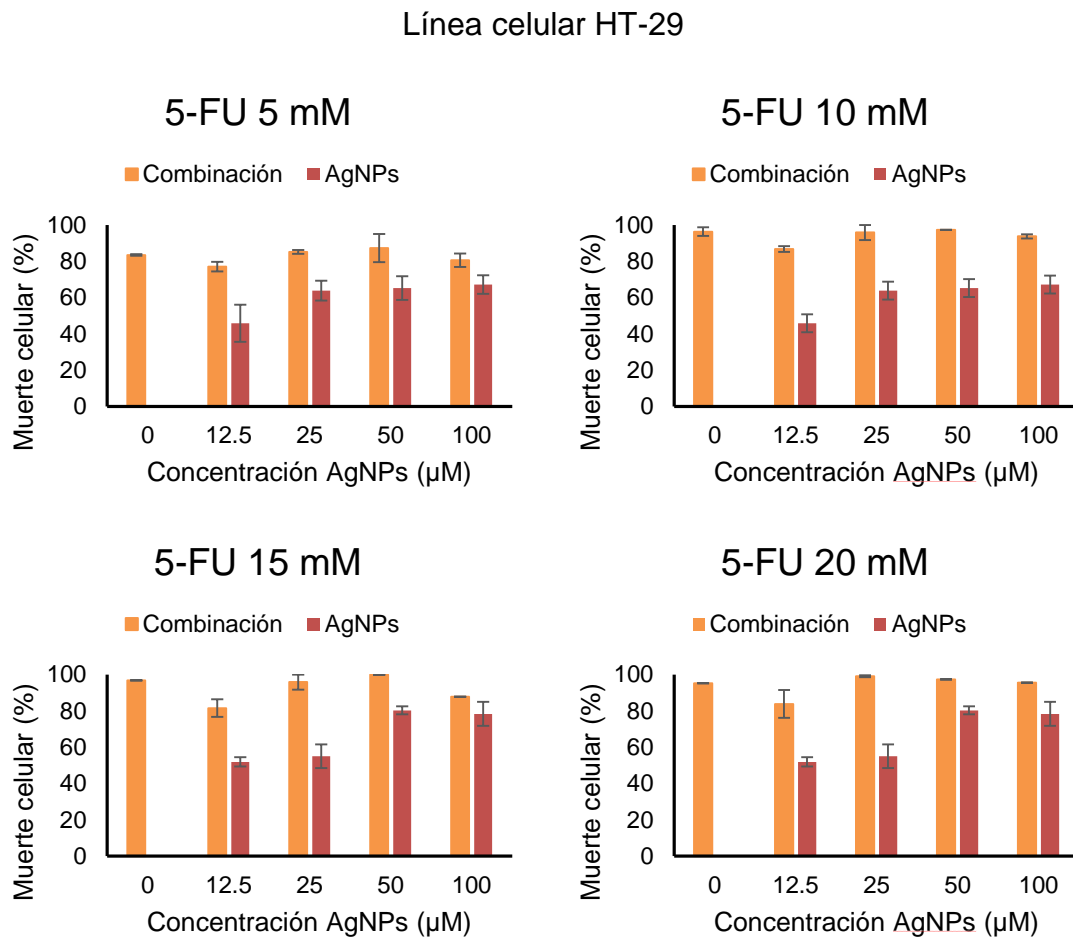


Figura 15.- Muerte de la línea celular de cáncer de colon HT-29 expuesta a diferentes combinaciones de concentraciones de 5-FU y AgNPs.

En la línea celular HCT-15 (Figura 16), también se encontró un efecto de potenciación entre el fármaco 5-FU y las AgNPs en las combinaciones de 5 mM 5-FU con 25 y 50 μ M AgNPs, 10 mM 5-FU con 50 y 100 μ M AgNPs y 20 mM con 25 y 100 μ M AgNPs. En todas las combinaciones restantes, se observó que la muerte celular corresponde principalmente a la acción del fármaco.

Línea celular HCT-15

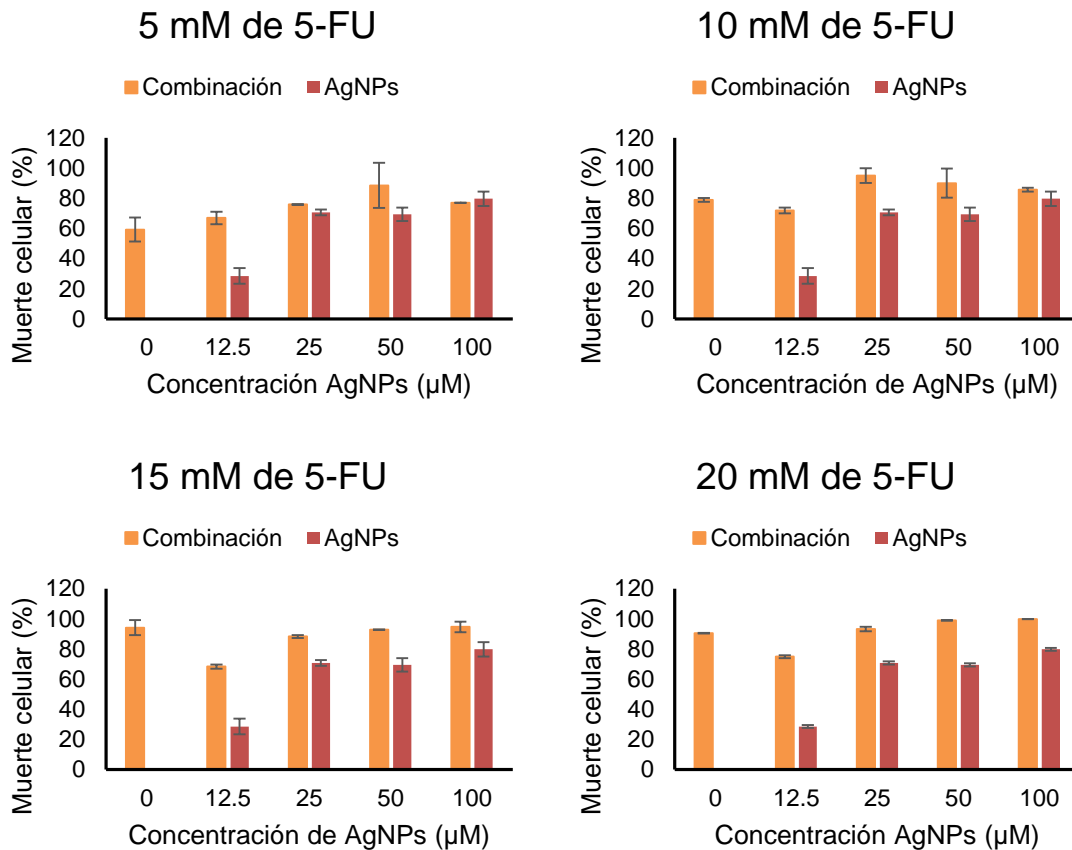


Figura 16.- Muerte celular de la línea de cáncer de colon HCT-15 expuesta a diferentes combinaciones de concentraciones de 5-FU y AgNPs.

7.3 Ensayo de estría

A fin de evaluar el efecto de las AgNPs, el fármaco 5-FU y sus combinaciones en alguna de las funciones básicas celulares, se eligió realizar el ensayo de estría o "herida" para evaluar el efecto de estos tratamientos en la migración celular. Por lo tanto, se midió el porcentaje de cierre de la estría posterior a la exposición a los diferentes tratamientos por 24 y 48 horas. El ensayo se dividió en tres partes: tratamientos con 5-FU, con AgNPs y con las combinaciones seleccionadas a partir de los ensayos de viabilidad (5 mM 5-FU + 25 μM AgNPs y 5 mM 5-FU + 50 μM AgNPs).

En las Figuras 17, 18 y 19, se muestran los porcentajes de cierre de cada tratamiento evaluado y sus respectivos controles para ambas líneas celulares de cáncer de colon. En la Figura 17, se observa que la estría de la línea celular HT-29, cerró completamente en dos de las cuatro concentraciones de fármaco (15 y 20 mM de 5-FU), mientras que, con las dos concentraciones restantes, 5 y 10 mM de fármaco, el porcentaje de cierre no supera el 20 %. En contraste, para la línea celular de cáncer de colon HCT-15, todas las concentraciones del fármaco 5-FU no tuvieron un efecto considerable en la migración celular, por lo que fue posible observar un cierre total de la herida (Figura 17).

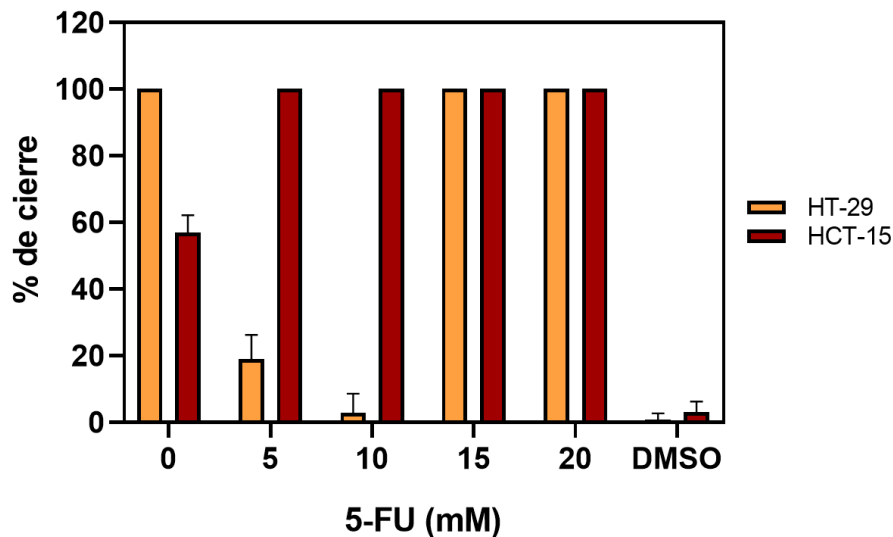


Figura 17.- Porcentaje de cierre de la estría en las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15 y HT-29 expuestas a diferentes concentraciones de 5-FU a las 48 horas.

En el caso del efecto de las AgNPs en el cierre de la estría, fue posible observar en la Figura 18 que, para la línea celular HT-29, en las dos concentraciones menores de AgNPs (12.5 y 25 μ M) la estría se cerró completamente. Mientras que para el caso de las concentraciones de 50 y 100 μ M de AgNPs, la estría se cerró en un 82.5 % y 73 %, respectivamente, aunque los valores de la desviación estándar son considerables y, por lo tanto, estadísticamente estos valores no son diferentes de los obtenidos en las otras concentraciones. Por el contrario, para el caso de los porcentajes de cierre en la línea celular HCT-15 fueron muy variados, pero ninguno sobrepasó el 40 % (Figura 18).

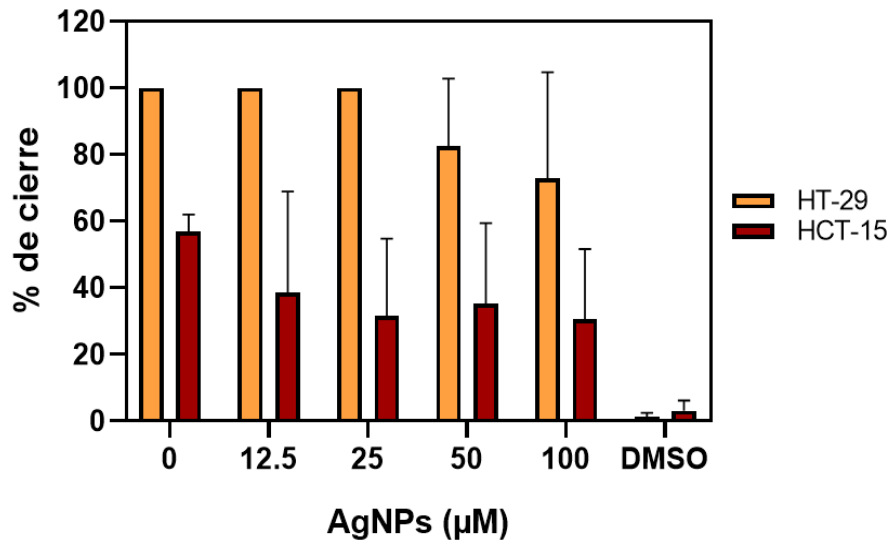


Figura 18.- Porcentaje de cierre de la estría de las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y HCT-15 expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs a las 48 horas.

Finalmente, en las combinaciones seleccionadas de AgNPs y 5-FU, en la Figura 19, se observó que los porcentajes de cierre para el caso de las células HT-29 son mayores a los obtenidos con las células HCT-15. Es importante mencionar que, en ambas líneas celulares, los porcentajes de cierre son mayores en la combinación de 5 mM 5-FU + 50 μM AgNPs (Figura 19).

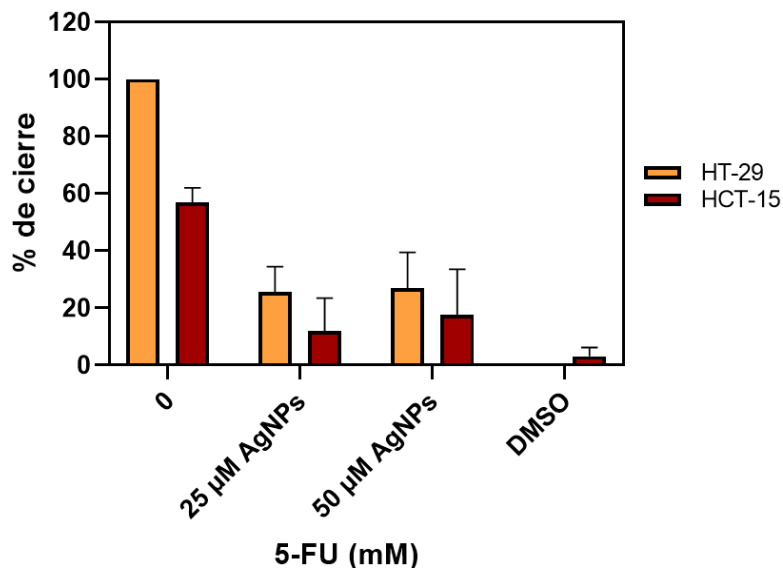


Figura 19.- Porcentaje de cierre de la estría de células de cáncer de colon expuestas a las combinaciones de tratamientos de 5-FU y AgNPs a las 48 horas.

En los siguientes tres apartados, se recopilaron las evidencias fotográficas de la evolución de las estrías en cada tratamiento seleccionado (Figuras 20 – 25).

8.3.1 5-FU

Línea celular HT-29

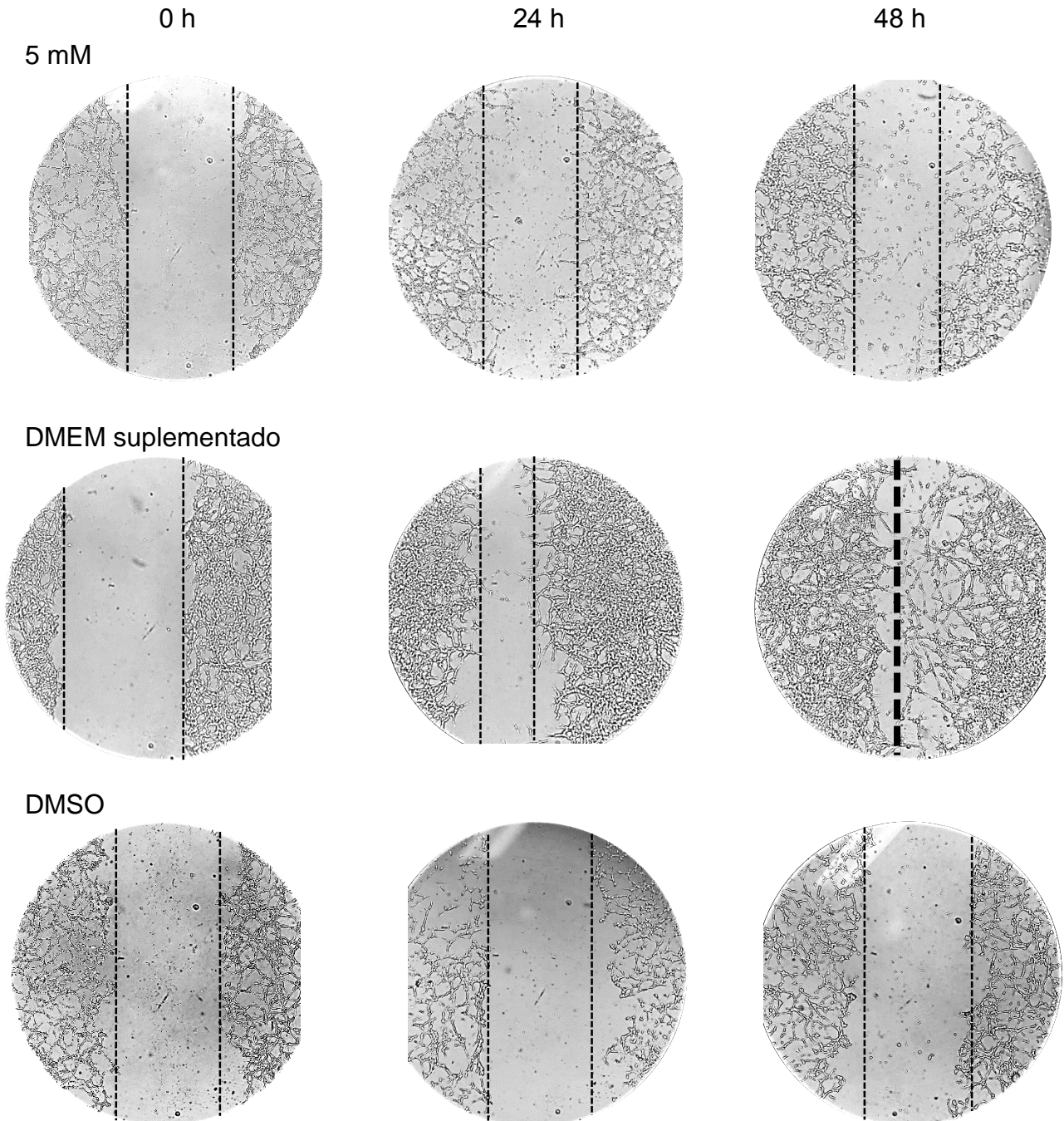


Figura 20.- Evolución de la estría en línea HT-29 con 5 mM 5-FU, DMEM suplementado y DMSO a 0, 24 y 48 horas.

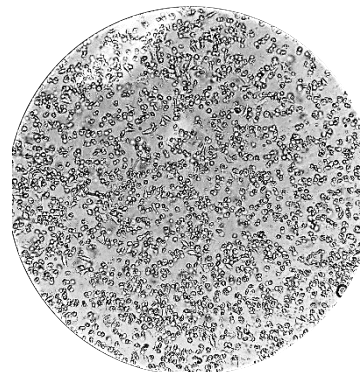
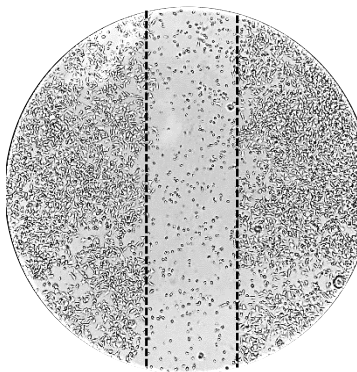
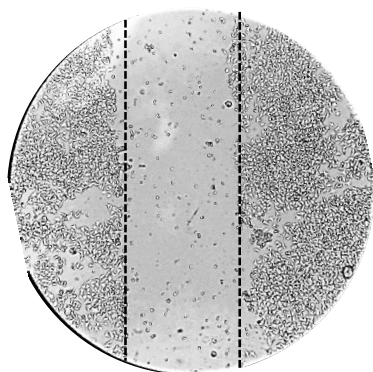
Línea celular HCT-15

0 h

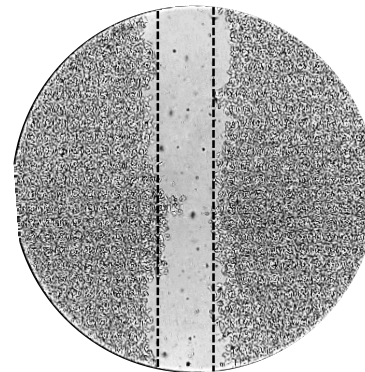
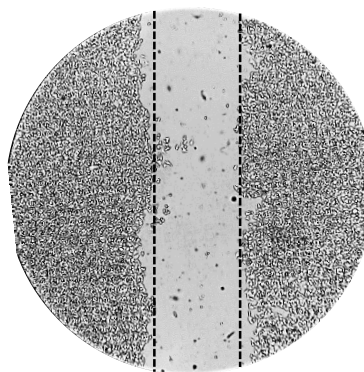
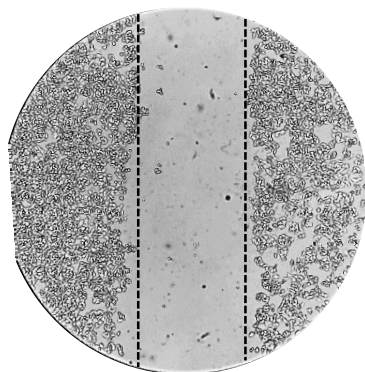
24 h

48 h

5 mM



DMEM suplementado



DMSO

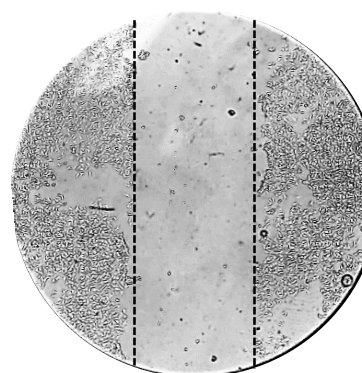
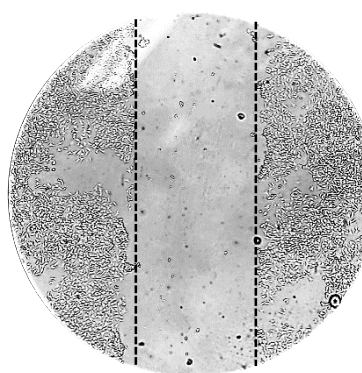
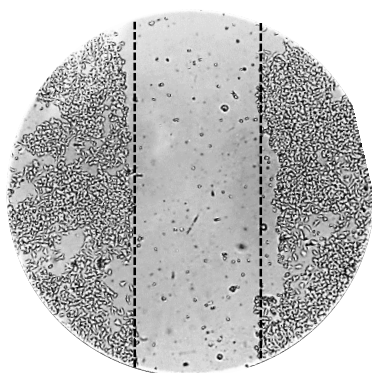


Figura 21.- Evolución de la estría en línea HCT-15 con 5 mM 5-FU, DMEM suplementado y DMSO a 0, 24 y 48 horas.

7.3.2 AgNPs

Línea celular HT-29

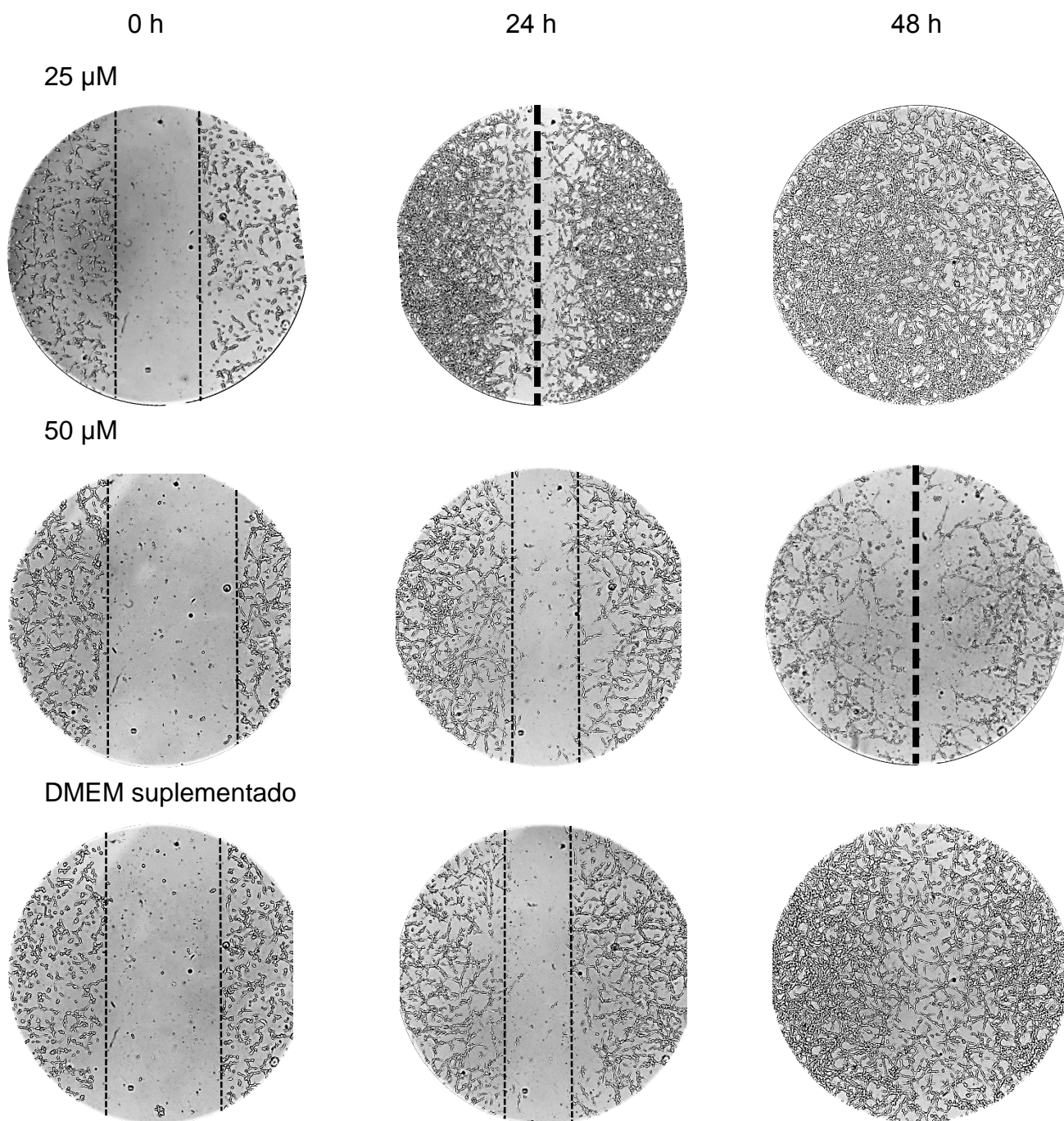


Figura 22.- Evolución de la estría en línea HT-29 con 25 μ M AgNPs, 50 μ M AgNPs y DMEM suplementado a 0, 24 y 48 horas.

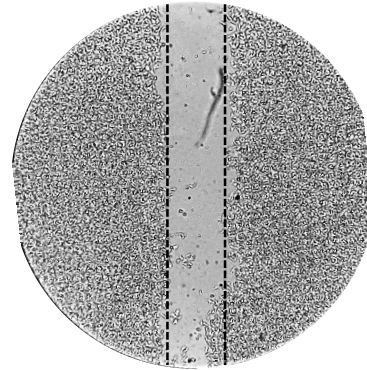
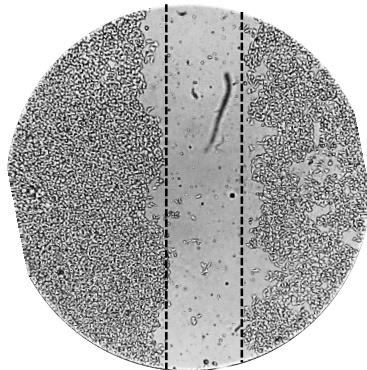
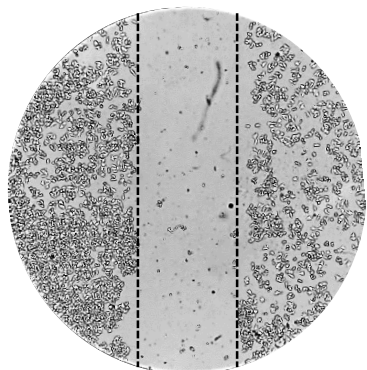
Línea celular HCT-15

0 h

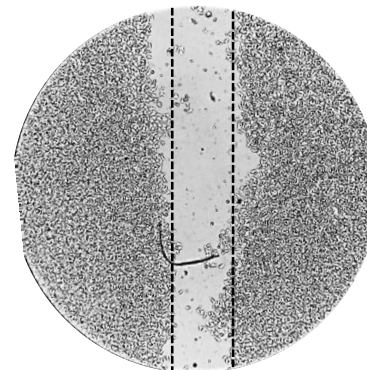
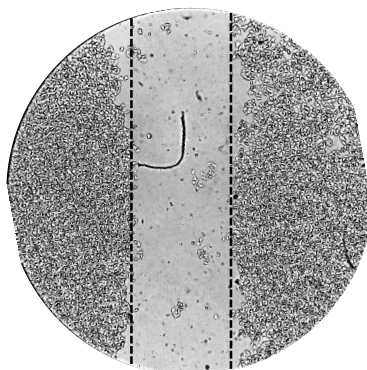
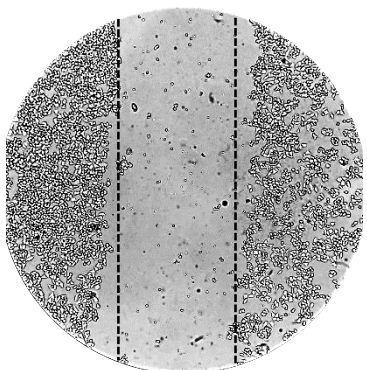
24 h

48 h

25 μ M



50 μ M



DMEM suplementado

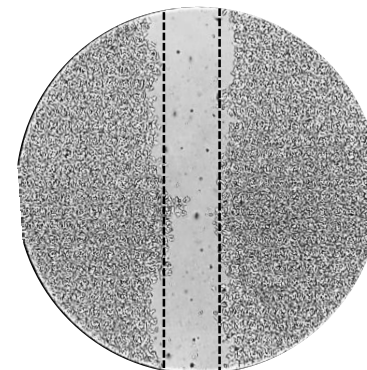
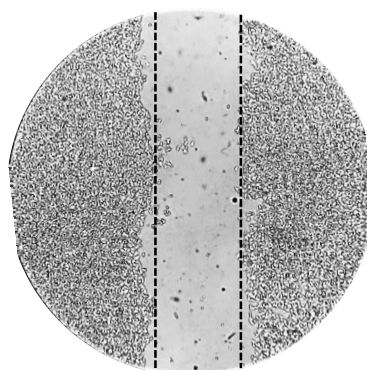
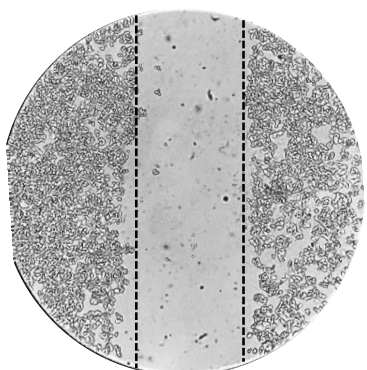


Figura 23.- Evolución de la estría en línea HCT-15 con 25 μ M AgNPs, 50 μ M AgNPs y DMEM suplementado a 0, 24 y 48 horas.

7.3.3 Combinaciones

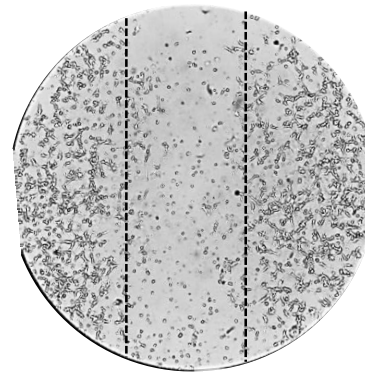
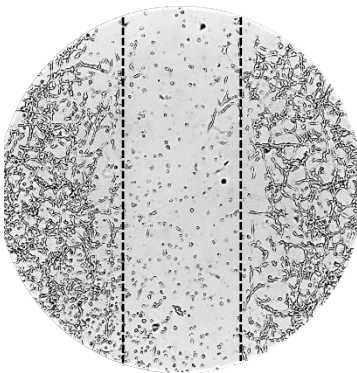
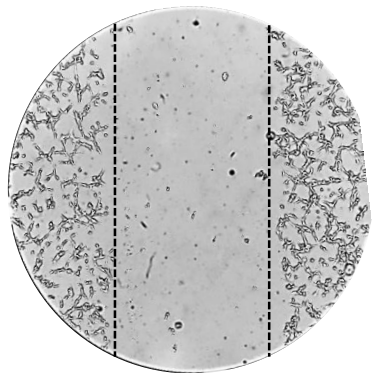
Línea celular HT-29

0 h

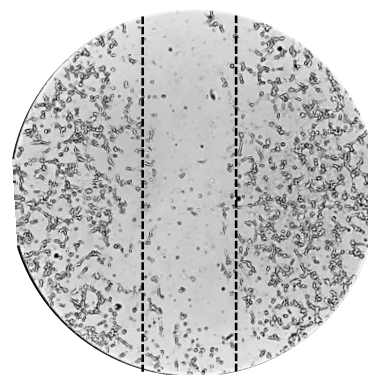
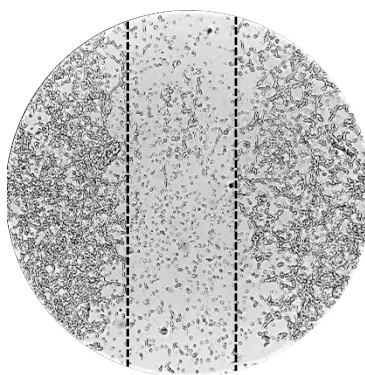
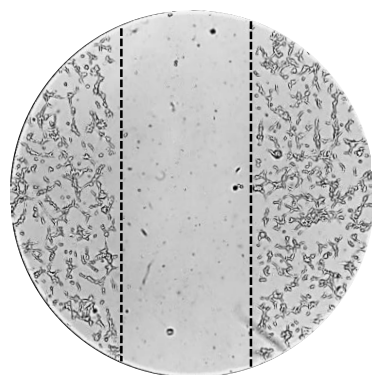
24 h

48 h

5 mM 5-FU + 25 μ M AgNPs



5 mM 5-FU + 50 μ M AgNPs



DMEM suplementado

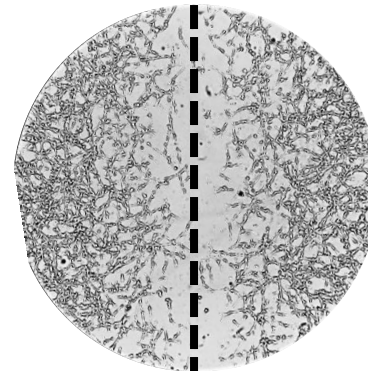
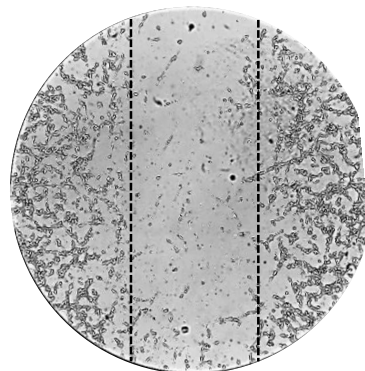
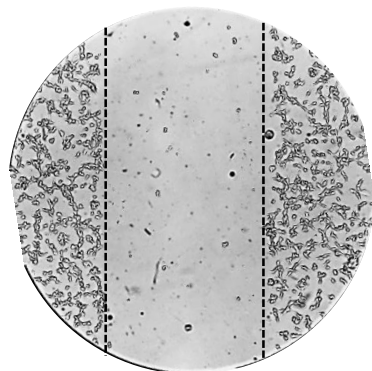


Figura 24.- Evolución de la estría en línea HT-29 con 5 mM 5-FU + 25 μ M AgNPs, 5 mM 5-FU + 50 μ M AgNPs y DMEM suplementado a 0, 24 y 48 horas.

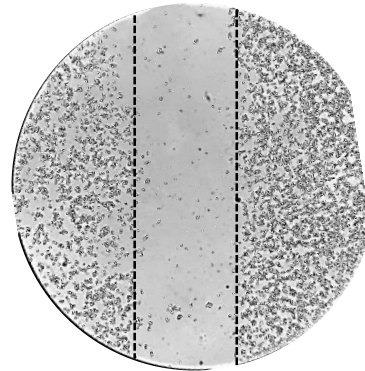
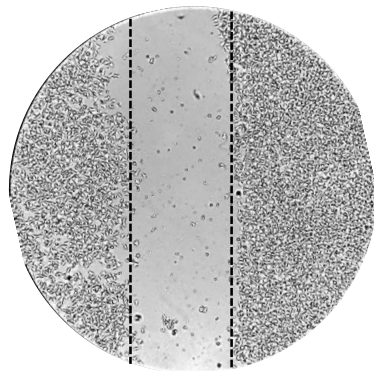
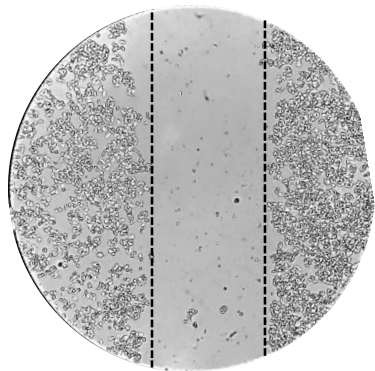
Línea celular HCT-15

0 h

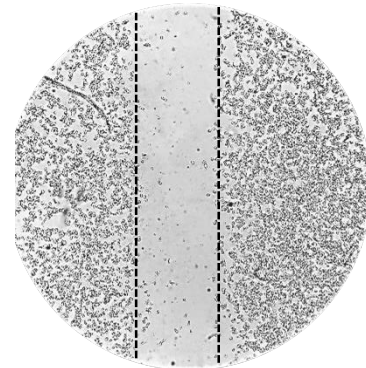
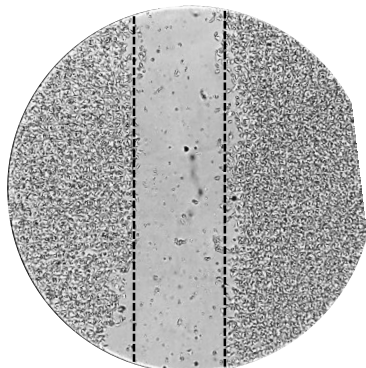
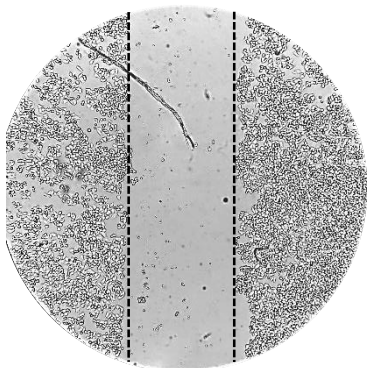
24 h

48 h

5 mM 5-FU + 25 μ M AgNPs



5 mM 5-FU + 50 μ M AgNPs



DMEM suplementado

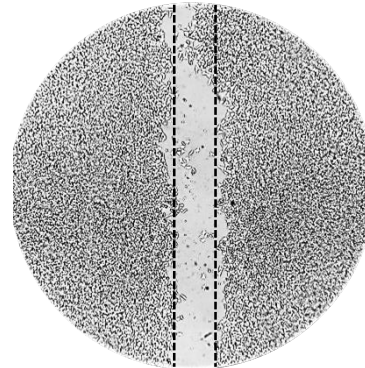
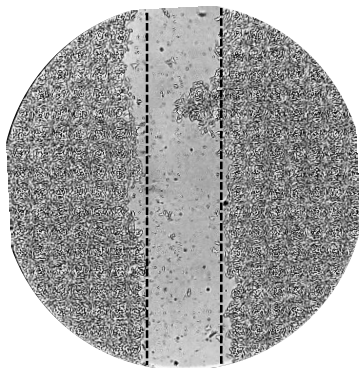
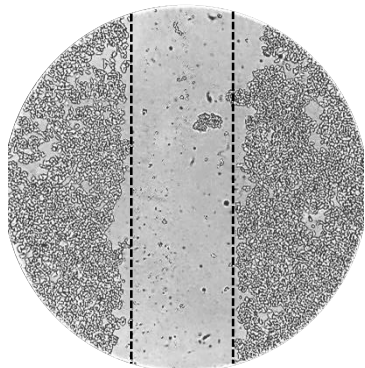


Figura 25.- Evolución de la estría en línea HCT-15 con 5 mM 5-FU + 25 μ M AgNPs, 5 mM 5-FU + 50 μ M AgNPs y DMEM suplementado a 0, 24 y 48 horas.

7.4 Ensayo de formación de especies reactivas de oxígeno

Este ensayo se realizó como una evaluación cualitativa de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), propuestas como uno de los mecanismos de acción del efecto citotóxico las AgNPs. Para ello, se utilizaron las dos combinaciones de fármaco y AgNPs utilizadas en los ensayos de citotoxicidad y de estría, las cuales fueron 5 mM 5-FU + 25 μ M AgNPs y 5 mM 5-FU + 50 μ M AgNPs, así como las concentraciones individuales de cada agente y los controles correspondientes.

En las Figuras 26 y 27 se observó que, en ambas líneas celulares de cáncer de colon, la generación de ROS es mayor en las combinaciones de fármaco y AgNPs, particularmente en la combinación de 5 mM 5-FU + 25 μ M AgNPs.

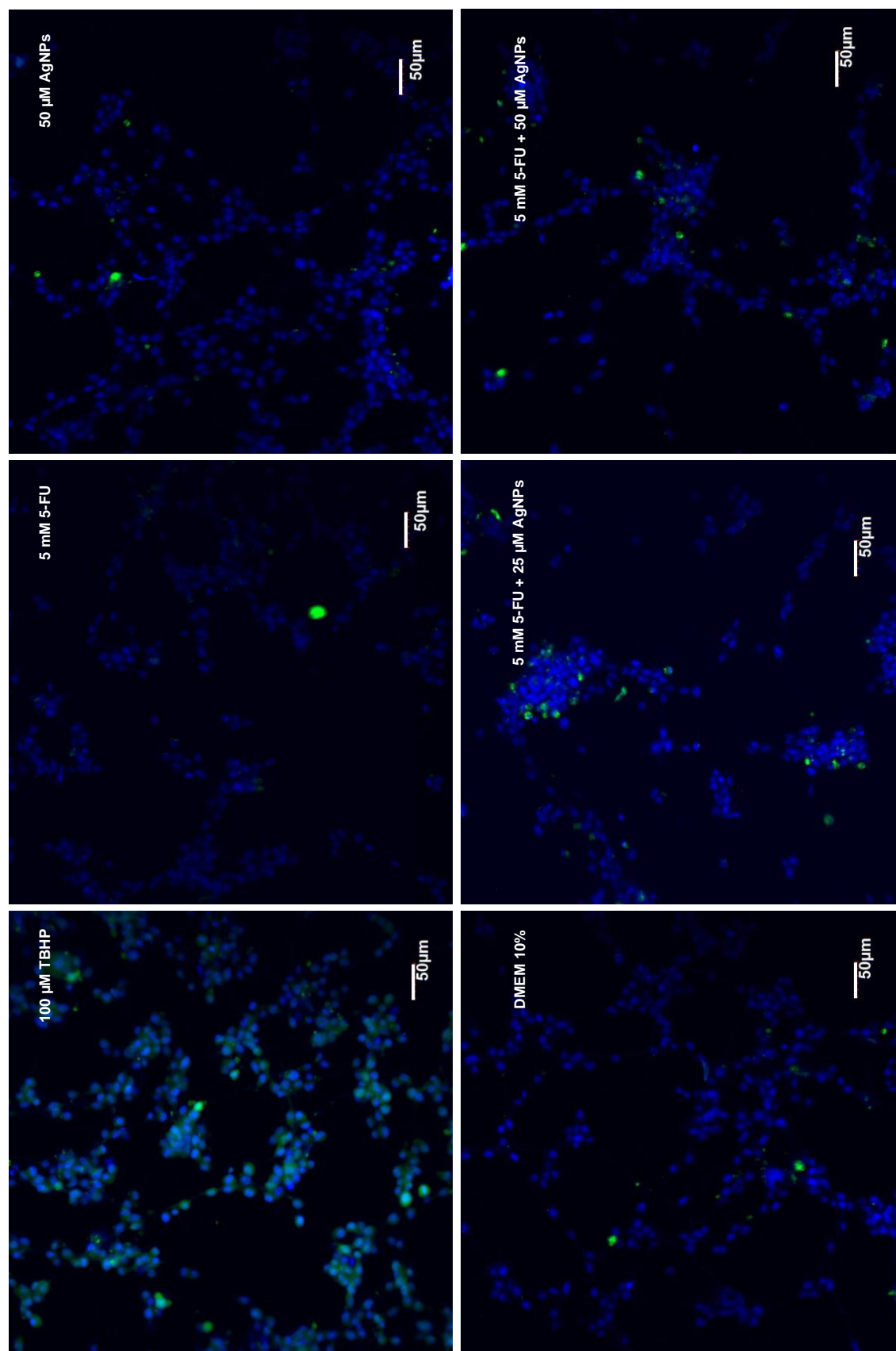


Figura 26.- Evaluación cualitativa de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HT-29 a diferentes concentraciones de 5-FU y AgNPs, TBHP como control positivo y DMEM suplementado como control negativo

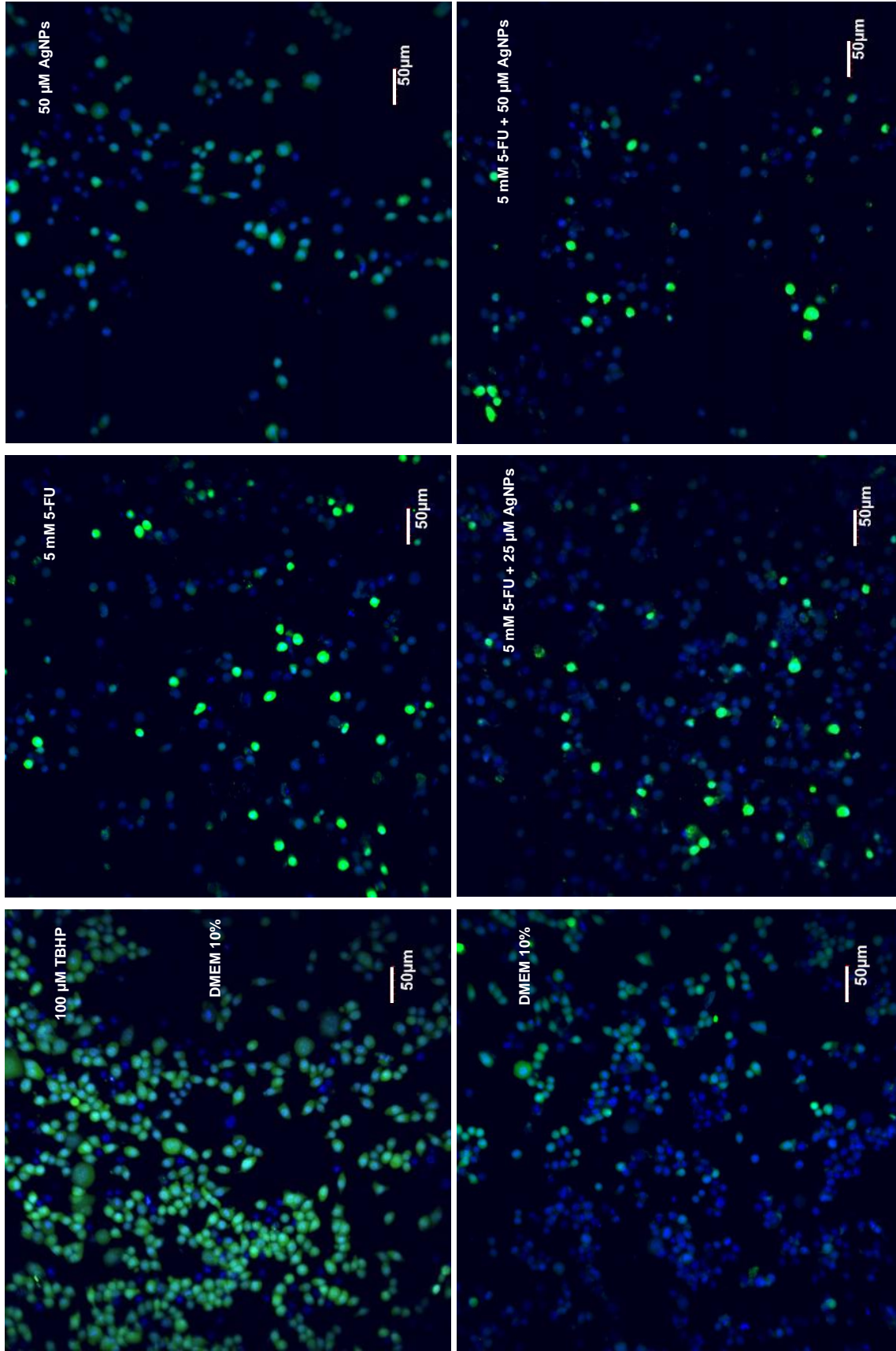


Figura 27.- Evaluación cualitativa de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular HCT-15 a diferentes concentraciones de 5-FU y AgNPs, TBHP como control positivo y DMEM suplementado como control negativo.

8. DISCUSIÓN

8.1 Caracterización fisicoquímica de las AgNPs

Al igual que otros nanomateriales, las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs están relacionadas con algunas de sus propiedades biológicas, por lo que en este trabajo inicialmente se identificó si el material con el que se trabajó era en efecto de tamaño nanométrico y su componente principal lo constituía la plata. En ese sentido, el análisis de la caracterización de las AgNPs por espectrofotometría UV-Vis, demostró que este material presentaba un pico de absorción máxima a 420 nm característico del plasmón de resonancia superficial de las AgNPs (Juarez-Moreno et al., 2017; Morales, Morán, Quintana, & Estrada, 2009; Slistan-Grijalva et al., 2005).

En la caracterización de las AgNPs por FT-IR, el espectro del estándar de PVP corresponde con el reportado por Bryaskova en 2011 y Juarez-Moreno en 2017. Por su parte, las AgNPs exhibieron un espectro muy similar a los reportados por Zhang en 2016 y Kumar en 2017, donde aparecen dos picos principales que evidencian los enlaces vibracionales de los grupos hidroxilo (OH) y carbonilo (C=O). La cresta correspondiente al estiramiento de los grupos carbonilo, se muestra ligeramente desplazada en relación a la que aparece en el espectro del estándar de PVP. Este desplazamiento puede ser asociado con la formación de enlaces entre los iones plata y el oxígeno o nitrógeno aportado por las unidades de PVP. Por lo que es posible aseverar que las AgNPs están en efecto recubiertas con PVP de acuerdo a lo reportado por el fabricante (Bryaskova, Pencheva, Nikolov, & Kantardjiev, 2011; Juarez-Moreno et al., 2017; Kumar, Smita, Cumbal, & Debut, 2017; Zhang, Liu, Shen, & Gurunathan, 2016).

A fin de conocer más sobre el comportamiento en solución de las AgNPs, se realizaron mediciones por la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés), con la que es posible, determinar la distribución de los tamaños de las NPs, considerando su radio hidrodinámico, y a la estimación de su estabilidad tomando en

consideración el potencial Zeta promedio de la muestra como referencia. Dicho potencial depende de las propiedades fisicoquímicas de las NPs y del medio en que se encuentran y corresponde a la carga de la superficie de las NPs con la que interactuarán entre sí y con otras superficies (Lowry et al., 2016). Por lo tanto, se analizó el potencial Zeta de las AgNPs dispersadas en diferentes soluciones, la primera se realizó en agua desionizada para determinar el potencial Zeta *per se* de las AgNPs, la segunda medición se hizo en medio de cultivo celular DMEM sin suplementar, para estimar la interacción de las AgNPs con los iones provenientes de las sales del medio de cultivo. Finalmente, la tercera medición, se realizó en medio de cultivo celular DMEM suplementado con suero fetal bovino para conocer la interacción de las AgNPs con las proteínas del medio de cultivo y la posible formación de la “corona proteica”, debido al elevado contenido de proteínas por efecto de la adición del suero fetal bovino al medio. De forma adicional, se consideró que el tiempo de exposición es un parámetro importante en la medida de la interacción de las AgNPs entre ellas y otros componentes del medio, las mediciones se realizaron a 0 y 24 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂ (parámetros utilizados en la incubación de las células de cáncer) (Mora Sanz, 2015).

Comenzando por el análisis de distribución de tamaños, al tiempo inicial, las AgNPs en agua desionizada se separan en dos grupos de 136.3 y 30.5 nm. Considerando el tiempo al que corresponden estos valores, esta discrepancia con la descripción del fabricante, que reporta un tamaño de 80 nm, y la presencia de un pico de distribución que supera la escala nanométrica, puede deberse a la presencia de agregados que no se separaron completamente con la preparación previa de las AgNPs (Hielscher Ultrasound Technology, s.f.). Transcurridas 24 horas de incubación de las AgNPs con el agua, se presentan tres grupos de tamaños, de los cuales solo uno es menor a los 100 nm. Un efecto similar se presenta en las mediciones del tamaño, obtenidas en medio DMEM sin suplementar. A las 0 horas, existen tres distribuciones de tamaño las cuales se reducen a dos poblaciones después de las 24 horas de incubación, siendo una de ellas de tamaño nanométrico. Por último, las mediciones del tamaño de las AgNPs incubadas en el medio DMEM suplementado, indica que existen dos

distribuciones iniciales que posterior a la incubación por 24 horas, se agrupan en una sola distribución cuyo tamaño de nanopartícula es comparable con la reportada por el fabricante.

Todas estas observaciones sugieren la formación de agregados de AgNPs, para el caso del medio DMEM sin suplementar, estos agregados son de esperarse, debido a que la elevada fuerza iónica del medio en que se encuentran las AgNPs podría inducir a la agregación del material (Lowry et al., 2016) y en el caso del medio DMEM suplementado con suero fetal bovino, estos agregados podrían aparecer debido a la formación de proteínas corona en la superficie de las AgNPs (Mora Sanz, 2015). Sin embargo, en el caso particular del agua desionizada, se esperaría que la cubierta de PVP de las AgNPs, reportada por el fabricante, previniera la aglomeración de las mismas (Slistan-Grijalva et al., 2005). Por ello se considera que es probable que el porcentaje de recubrimiento de las AgNPs con un 0.3 % de PVP que reporta el fabricante, no sea capaz de evitar las aglomeraciones de las nanopartículas y les brinde poca estabilidad en solución. De ser así, las AgNPs sin recubrimiento inducirán su aglomeración según lo descrito por el efecto Ostwald, el cual indica que en un medio acuoso existe el desprendimiento de partículas menores (iones Ag^+) y su posterior translocación a partículas de mayor tamaño a las que se unen por fuerzas de interacción (Bae, Lee, Kim, Choi, & Yi, 2013; Liu & Hu, 2019). Aunque se trata de un fenómeno dependiente del tiempo de exposición, los grandes problemas de la agregación son que los aglomerados pueden precipitar, diluyendo así la solución, y que las partículas en solución restantes dejan de ser representativas de la mayoría aglomerada (Lowry et al., 2016), además de que afecta el tamaño, estabilidad, transporte y, según los reportes de Bae y colaboradores en 2013, en presencia de sistemas biológicos la aglomeración disminuye la toxicidad.

Por otra parte, con referencia al potencial Zeta, las partículas de mayor tamaño o agregados, tienden a presentar valores menores (o más cercanos al cero) de potencial Zeta. Según lo reportado en 2016 por Lowry y colaboradores, valores de potencial Zeta de ± 30 mV son considerados moderadamente estables ante la agregación. Ninguno de

los valores reportados en este trabajo, se acerca a este parámetro. El potencial Zeta de las AgNPs dispersadas en agua desionizada es prácticamente el mismo después de 24 horas (-18 mV). Mientras que en medio DMEM sin suplementar, existe un ligero cambio en el potencial Zeta de las AgNPs, siendo de -8.9 mV en el tiempo inicial y llegando a los -10.5 mV, después de 24 horas, estos valores podrían asociarse a la elevada fuerza iónica de la solución debido al alto contenido en sales y vitaminas. Finalmente, en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino, los valores del potencial Zeta van de -11.6 mV en el tiempo inicial a -9.14 mV, después de 24 horas, lo que puede asociarse al incremento en el tamaño de las AgNPs presentes en la solución debido a la agregación mediada por la formación de proteínas corona en la superficie de las nanopartículas. Sin embargo, se debe considerar que el potencial Zeta es una medición indirecta del tamaño de las nanopartículas y que sus cambios no necesariamente son indicadores del estado de agregación de las nanopartículas (Lowry et al., 2016).

8.2 Ensayos de citotoxicidad por reducción de MTT

En este trabajo, se utilizaron dos de las líneas celulares de cáncer de colon más empleadas como modelos para el estudio de la absorción, transporte y secreción *in vitro* de este tipo de adenocarcinomas. El objetivo de llevar a cabo los ensayos en ambas líneas celulares es analizar la diferencia entre sus respuestas a cada estímulo debido a las diferencias en su origen, esto se debe a que la línea celular HT-29 proviene de un adenocarcinoma femenino y la HCT-15 de un adenocarcinoma masculino.

En los ensayos de citotoxicidad con 5-FU en ambas líneas celulares de cáncer de colon, se determinó que la IC₅₀ en HCT-15 se presenta aproximadamente en 30 mM, mientras que para la línea celular HT-29, el valor de la IC₅₀ se presenta alrededor de 15 mM. Ninguno de estos valores corresponde a las IC₅₀ de 5-FU reportadas por otros autores en estas líneas celulares. Anteriormente, se han establecido valores de IC₅₀ de 10 mM en la línea celular HCT-15 y entre 17.3 y 19.3 μ M para la línea celular HT-29

(Lim, Rhee, Bae, & Chun, 2007; Nita et al., 1998). A pesar de estas diferencias, tanto los valores encontrados en los ensayos de citotoxicidad como los reportados en la bibliografía, evidencian que la línea celular HCT-15 es más resistente al fármaco 5-FU que la línea celular HT-29.

Por otra parte, en los ensayos de citotoxicidad con AgNPs, no fue posible determinar la IC_{50} para ninguna de las dos líneas celulares. Esto puede deberse a que la aglomeración, sugerida por los resultados de caracterización fisicoquímica de las AgNPs, altera su interacción con las células, disminuyendo su internalización y toxicidad (Bae et al., 2013). Sin embargo, aún bajo estas condiciones es posible evidenciar nuevamente la resistencia de la línea celular HCT-15 sobre la línea celular HT-29.

Con base en los estudios de Kovács y Fahrenholtz (Fahrenholtz et al., 2017; Kovács et al., 2015) y los resultados de citotoxicidad de 5-FU, se tomó como referencia el valor mayor de IC_{50} entre ambas líneas celulares (30 mM) y se eligieron cuatro concentraciones menores a este valor (5, 10, 15 y 20 mM) para realizar los ensayos en combinación con las AgNPs. Como no fue posible determinar ningún valor de IC_{50} para las AgNPs, se seleccionaron las cuatro concentraciones menores utilizadas en el ensayo de citotoxicidad individual.

A partir de los ensayos de la interacción entre el 5-FU y las AgNPs, se encontró que en la línea celular HT-29 existe una potenciación en las combinaciones de 5 mM de 5-FU con 12.5, 50 y 100 μ M de AgNPs y 10 mM de 5-FU con 25, 50 y 100 μ M de AgNPs. Por otro lado, para la línea celular HCT-15, este efecto de potenciación se presentó en las combinaciones de 5 mM de 5-FU con 25 y 50 μ M de AgNPs, 10 mM de 5-FU con 50 y 100 μ M de AgNPs y 20 mM de 5-FU con 25 y 100 μ M de AgNPs. Cabe destacar nuevamente que las concentraciones requeridas para ocasionar muerte celular en las células HCT-15 son mayores que para la línea celular HT-29. El efecto de potenciación encontrado puede deberse a la adición de la ligera contribución en la toxicidad de las AgNPs y a la potente acción citotóxica del fármaco. Si bien, se ha propuesto anteriormente que la aglomeración de las AgNPs podría estar impidiendo su

internalización a las células, es necesario considerar que aún pueden estar interaccionando con las membranas celulares y a partir de este contacto, desencadenar señalizaciones para el bloqueo de funciones celulares específicas. Sin embargo, la contribución de las AgNPs en el porcentaje de muerte celular no es suficiente como para tener un impacto significativo en la combinación con el fármaco 5-FU.

A diferencia de los estudios de Kovács y Fahrenholtz (Fahrenholtz et al., 2017; Kovács et al., 2015), en los que reportan el efecto aditivo y sinérgico citotóxico de las AgNPs con diferentes fármacos antineoplásicos (en los que no se incluye el 5-FU) en células de cáncer de colon y de cáncer de mama; en este trabajo no se encontró un efecto sinérgico entre las AgNPs y el 5-FU en ninguno de los casos evaluados, lo cual se asocia al mecanismo de acción del fármaco. En otras palabras, la interrupción en la síntesis de DNA a causa del fármaco 5-FU es tan abrupta que el efecto de las AgNPs no termina de presentarse antes de que la apoptosis haya sido desencadenada a consecuencia del mecanismo del fármaco, contrario a lo que exponen estos autores quienes evaluaron fármacos con mecanismos de acción convergentes al de las AgNPs, como la generación de especies reactivas de oxígeno.

Según estos resultados y tomando en cuenta que una de las propuestas de esta investigación es reducir la concentración de fármaco requerida, se seleccionaron dos combinaciones de concentraciones de 5-FU y de AgNPs para los siguientes ensayos, las cuales son 5 mM de 5-FU + 25 μ M de AgNPs y 5 mM de 5-FU + 50 μ M AgNPs.

8.3 Ensayos de estría o herida

Para evaluar el efecto del fármaco, las AgNPs y las combinaciones seleccionadas de éstos en funciones celulares esenciales como la migración celular, se llevaron a cabo ensayos de estría a 48 horas de exposición en ambas líneas celulares de cáncer de colon.

De las cuatro concentraciones de 5-FU analizadas, se encontró que 5 mM y 10 mM en la línea celular HT-29 detienen la migración celular. Por lo demás, las concentraciones

restantes en la línea HT-29 (15 y 20 mM) y todas las concentraciones en la línea celular HCT-15 (5, 10, 15 y 20 mM), ocasionaron el cierre total de la estría. Sin embargo, las células observadas en el espacio donde anteriormente se encontraba la estría, no tienen la morfología típica de su línea celular por lo que, a pesar de la desaparición completa de la herida, no es posible aseverar que el cultivo siga siendo viable. Este contraste entre la migración de las líneas celulares, pone en evidencia de nuevo que la línea HT-29 es más susceptible a la acción del fármaco que la línea HCT-15.

En la línea celular HT-29, la estría se cerró completamente en las dos concentraciones menores de AgNPs (12.5 y 25 μ M), no así en las dos concentraciones mayores (50 y 100 μ M), aunque tomando en cuenta las desviaciones estándar podría considerarse que todas las concentraciones provocaron el cierre total de la estría. Esta ausencia de efecto en la migración celular, puede deberse nuevamente a la dificultad de las AgNPs para internalizarse en las células y ocasionar un efecto citotóxico evidente.

Al analizar los resultados en la línea celular HCT-15, podría parecer que las AgNPs previenen la migración celular, pero la evidencia fotográfica demuestra que las diferencias en los porcentajes de cierre entre las líneas celulares se deben a las diferencias en los tiempos de crecimiento de cada cultivo, lo que puede corroborarse con el control positivo del ensayo. Estos resultados concuerdan con los presentados en los ensayos de citotoxicidad con AgNPs en la línea HCT-15 y refuerzan el planteamiento de que las células que “cerraron la herida” en los ensayos tratados con 5-FU podrían ser células no viables.

Por último, en los resultados de los ensayos de estría con las combinaciones seleccionadas de ambos agentes (5 mM de 5-FU + 25 μ M de AgNPs y 5 mM de 5-FU + 50 μ M de AgNPs), los porcentajes de cierre de la estría para la línea celular HCT-15 siguen siendo menores que los de HT-29, situación que nuevamente se atribuye a que la proliferación celular en HCT-15 es más lenta. En ambas líneas celulares, se aprecia que la exposición a la combinación 5 mM 5-FU + 50 μ M AgNPs deriva en porcentajes mayores de cierre en comparación con la combinación 5 mM 5-FU + 25 μ M AgNPs. Sin embargo, es posible considerar que ambas combinaciones tienen efectos similares en

la migración celular, ya que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ellas.

8.4 Ensayos de generación de especies reactivas de oxígeno

Con el propósito de evaluar la contribución de las AgNPs al efecto citotóxico por el mecanismo propuesto en 2009 por AshaRani y colaboradores, se realizó la medición cualitativa de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en ambas líneas celulares de cáncer de colon (AshaRani, Mun, Hande, & Valiyaveetil, 2009). Para corroborar la acción de las AgNPs en cada caso, se evaluaron las ROS en las concentraciones individuales de 5-FU, AgNPs y sus combinaciones.

En la línea celular HT-29, para las concentraciones individuales tanto de fármaco como de AgNPs, no se observa un incremento en la presencia de ROS con respecto al control negativo. Por el contrario, en las combinaciones de estas concentraciones, es notable el aumento en la presencia de ROS en una proporción similar para ambos casos.

Por otra parte, en la línea celular HCT-15, existe una generación normal de ROS mayor a la que se presenta en HT-29, si se comparan los resultados de los controles negativos. En este sentido, el efecto de los tratamientos es similar en ambas líneas, aunque es menos evidente en la línea HCT-15 debido a la diferencia entre las líneas celulares anteriormente mencionadas. Para este caso, se observa también que las contribuciones en la generación de ROS de los agentes por separado son similares a la cantidad de ROS generadas en condiciones normales por las células. En cuanto a las combinaciones, la generación de ROS es mayor respecto de los agentes individualmente evaluados y, en esta ocasión, hay una ligera diferencia entre las combinaciones, presentándose una mayor proporción en la combinación 5 mM de 5-FU + 25 μ M de AgNPs. De conformidad con los resultados de los ensayos de citotoxicidad con combinaciones, es posible que este aumento en la proporción de la generación de ROS refleje la potenciación registrada en dicha combinación.

8.5 Sobre la MDR

Los resultados expuestos y analizados en este trabajo, difieren de aquellos previamente reportados en donde los mecanismos de acción de los fármacos y de las AgNPs utilizados convergen en incrementar la generación de especies reactivas de oxígeno en las células de cáncer estudiadas. Sin embargo, una de las preguntas que se pretendían responder con este trabajo, era la de determinar si este efecto citotóxico potenciado de las AgNPs en combinación con concentraciones subtóxicas de fármacos antineoplásicos se presenta de forma general para cualquier tipo de fármaco y en distintos tipos de cáncer. De tal manera que, con los resultados encontrados en este trabajo, es posible generar la hipótesis de que los efectos de potenciación y sinergia de los fármacos antineoplásicos en combinación con AgNPs, sólo es posible si ambos comparten mecanismos de inducción de la citotoxicidad convergentes para la inducción del estrés oxidativo. Por lo que resulta ser una evidencia útil en el establecimiento de nuevos modelos de interacción de distintos fármacos antineoplásicos con AgNPs, en un intento por utilizar concentraciones subtóxicas de ambos y disminuir así los efectos secundarios adversos asociados a la genotoxicidad de la quimioterapia.

9. CONCLUSIONES

Existe un efecto citotóxico ligeramente potenciador entre las AgNPs y el fármaco 5-FU, sin embargo, no es suficiente para ser considerado como un efecto aditivo o sinérgico en las células de cáncer de colon HCT-15 y HT-29.

La línea celular de cáncer de colon HCT-15, es más sensible a la acción del fármaco 5-FU en comparación con la línea celular HT-29. Debido a la aglomeración de las AgNPs no fue posible determinar la acción citotóxica de las AgNPs en ninguna de las dos líneas celulares evaluadas.

La funcionalización de las AgNPs con 0.3 % de PVP (de acuerdo a lo reportado por el fabricante), es inadecuada para prevenir la aglomeración de las AgNPs que afecta su acción citotóxica.

La ligera contribución de las AgNPs al efecto citotóxico potenciador no resulta ser tan evidente como el inducido por el fármaco, debido a que el mecanismo de acción de éste último es mucho más abrupto interviniendo directamente con la síntesis y reparación de la cadena de DNA.

Se sugiere que, a fin de encontrar un efecto citotóxico sinérgico entre las AgNPs y los fármacos antineoplásicos, es necesario utilizar un fármaco que tenga un mecanismo de acción convergente al de las AgNPs, es decir, que también induzca estrés oxidativo.

10. TRABAJO FUTURO

A fin de continuar esta investigación, con base en los resultados y conclusiones expuestos, se propone realizar los experimentos de citotoxicidad con AgNPs comerciales que tengan un recubrimiento de PVP superior al 0.3%, bajo la premisa de que aumentando la estabilidad de las NPs por medio del recubrimiento será posible encontrar la citotoxicidad del material reportada por otros autores y, por lo tanto, determinar los valores de IC_{50} en ambas líneas celulares.

También, se propone seleccionar un fármaco quimioterapéutico cuyo mecanismo de acción induzca la generación de especies reactivas de oxígeno y determinar la IC_{50} del mismo en ambas líneas celulares.

Una vez que se conozca este valor de cada agente para cada línea celular, se sugiere llevar a cabo ensayos de citotoxicidad utilizando combinaciones de concentraciones menores a las IC_{50} de dichos agentes y evaluar los resultados según los parámetros establecidos por Chou en 2006.

11. REFERENCIAS

- American Cancer Society. (2016). ¿Qué es el cáncer? Retrieved April 13, 2020, from <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>
- American Cancer Society. (2018). Etapas del cáncer colorrectal. Retrieved April 13, 2020, from <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-de-la-etapa.html>
- AshaRani, P. V., Mun, G. L. K., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 3(2), 279–290. <https://doi.org/10.1021/nn800596w>
- Bae, E., Lee, B. C., Kim, Y., Choi, K., & Yi, J. (2013). Effect of agglomeration of silver nanoparticle on nanotoxicity depression. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 30(2), 364–368. <https://doi.org/10.1007/s11814-012-0155-4>
- Bryaskova, R., Pencheva, D., Nikolov, S., & Kantardjiev, T. (2011). Synthesis and comparative study on the antimicrobial activity of hybrid materials based on silver nanoparticles (AgNps) stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP). *Journal of Chemical Biology*, 4(4), 185–191. <https://doi.org/10.1007/s12154-011-0063-9>
- Fahrenholtz, C. D., Swanner, J., Ramirez-Perez, M., & Singh, R. N. (2017). Heterogeneous Responses of Ovarian Cancer Cells to Silver Nanoparticles as a Single Agent and in Combination with Cisplatin. *Journal of Nanomaterials*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5107485>
- GLOBOCAN. (2018). New Global Cancer Data. Retrieved April 13, 2020, from <https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018>
- Gopisetty, M. K., Kovács, D., Igaz, N., Rónavári, A., Béteky, P., Rázga, Z., ... Kiricsi, M. (2019). Endoplasmic reticulum stress: major player in size-dependent inhibition of P-glycoprotein by silver nanoparticles in multidrug-resistant breast cancer cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0448-4>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hielscher Ultrasound Technology. (n.d.). Dispositivos ultrasónicos para dispersar nanomateriales. Retrieved April 13, 2020, from https://www.hielscher.com/es/nano_01.htm

INFOCáncer. (2019a). Cáncer colorrectal - Cáncer Colorrectal. Retrieved April 13, 2020, from INFOCáncer website: <http://infocancer.org.mx/?t=cancer-colorrectal>

INFOCáncer. (2019b). Tratamiento - Cáncer Colorrectal. Retrieved April 13, 2020, from INFOCáncer website: <http://infocancer.org.mx/?t=tratamiento-colorrectal>

Juarez-Moreno, K., Gonzalez, E. B., Girón-Vazquez, N., Chávez-Santoscoy, R. A., Mota-Morales, J. D., Perez-Mozqueda, L. L., ... Bogdanchikova, N. (2017). Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Human & Experimental Toxicology*, 36(9), 931–948. <https://doi.org/10.1177/0960327116675206>

Kovács, D., Szoke, K., Igaz, N., Spengler, G., Molnár, J., Tóth, T., ... Kiricsi, M. (2015). Silver nanoparticles modulate ABC transporter activity and enhance chemotherapy in multidrug resistant cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(3), 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.015>

Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., & Debut, A. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.006>

Lim, Y.-J., Rhee, J.-C., Bae, Y.-M., & Chun, W.-J. (2007). Celecoxib attenuates 5-fluorouracil-induced apoptosis in HCT-15 and HT-29 human colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 13(13), 1947–1952. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i13.1947>

Liu, B., & Hu, X. (2019). Hollow Micron- and Nanomaterials: Synthesis and Applications. In *Advanced Nanomaterials for Pollutant Sensing and Environmental Catalysis* (p. 1).

Lowry, G. V., Hill, R. J., Harper, S., Rawle, A. F., Hendren, C. O., Klaessig, F., ... Rumble, J. (2016). Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environmental Science: Nano*, 3(5), 953–965. <https://doi.org/10.1039/c6en00136j>

Martín Piedra, M. Á. (2014). *Evaluación de los perfiles de viabilidad celular de células madre de*

la pulpa dental y de la gelatina de Wharton como control de calidad para su uso en Ingeniería Tisular.

Mora Sanz, V. (2015). *Estudio de asociaciones de nanopartículas de plata con medios biológicos mediante electroforesis en gel y detección por Ablación Láser-ICP-MS.*

Morales, J., Morán, J., Quintana, M., & Estrada, W. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta sol-gel a partir de nitrato de plata. Retrieved April 13, 2020, from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2009000200004

Nita, M. E., Nagawa, H., Tominaga, O., Tsuno, N., Fujii, S., Sasaki, S., ... Muto, T. (1998). 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *British Journal of Cancer*, 78(8), 986–992. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.617>

Pica Granados, Y., Ronco, A., & Díaz Báez, M. C. (2004). Ensayo de toxicidad crónica con *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Método de enumeración celular basado en el uso de hemocitómetro Neubauer. In *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. Retrieved from <https://www.idrc.ca/sites/default/files/openebooks/147-7/index.html>

Slistan-Grijalva, A., Herrera-Urbina, R., Rivas-Silva, J. F., Ávalos-Borja, M., Castellón-Barraza, F. F., & Posada-Amarillas, A. (2005). Classical theoretical characterization of the surface plasmon absorption band for silver spherical nanoparticles suspended in water and ethylene glycol. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 27(1–2), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2004.10.014>

Sociedad Española de Oncología Médica. (2019). ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? Retrieved April 13, 2020, from <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>

World Health Organization. (2018). *Mexico Source: Globocan 2018.*

Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016, September 13). Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>

12. ANEXOS

Ensayo de estría de las concentraciones no seleccionadas de 5-FU en la línea celular HT-29.

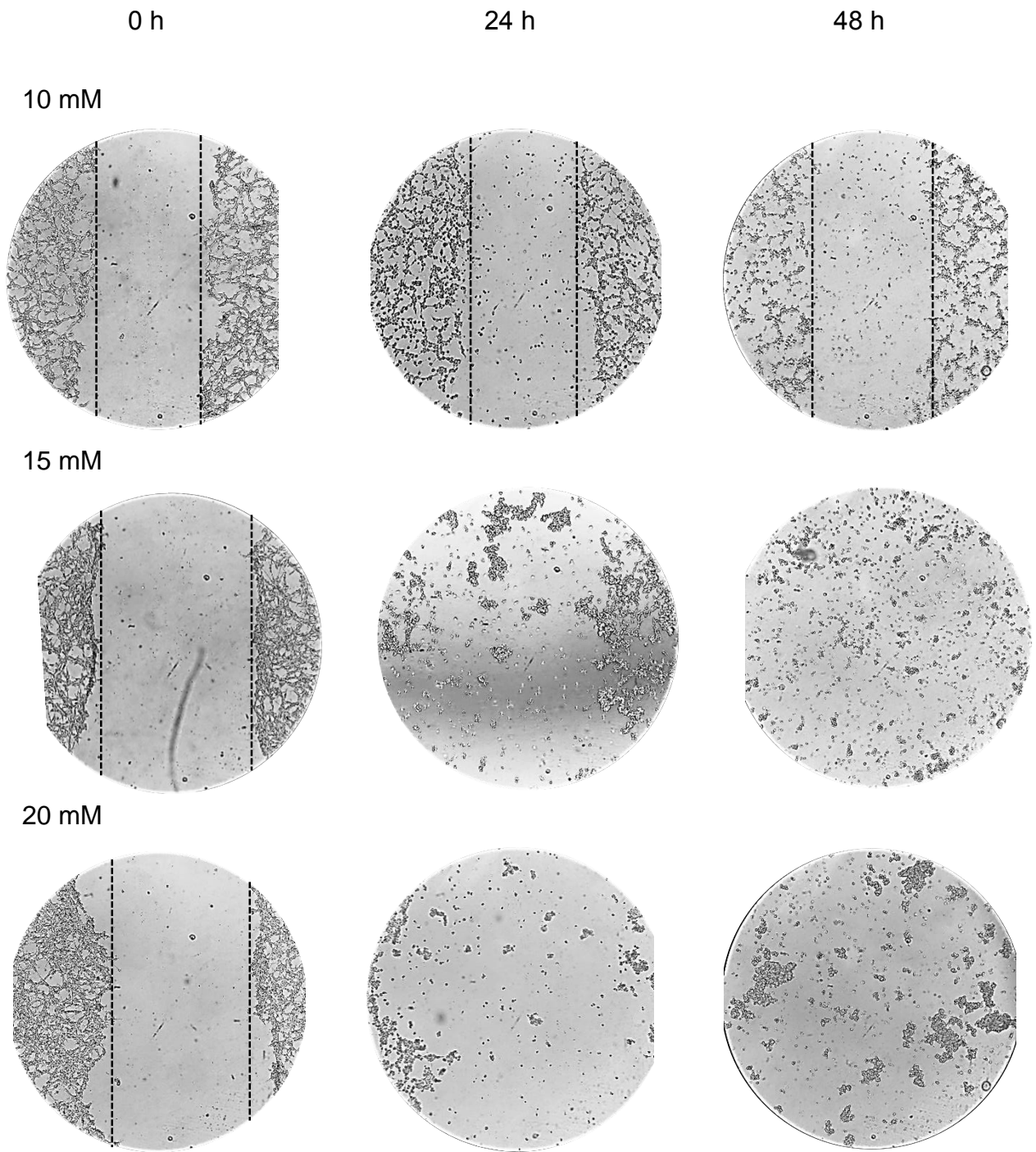


Figura 28.- Evolución de la estría en línea HT-29 con 10, 15 y 20 mM 5-FU a 0, 24 y 48 horas.

Ensayo de estría de las concentraciones no seleccionadas de 5-FU en la línea celular HCT-15.

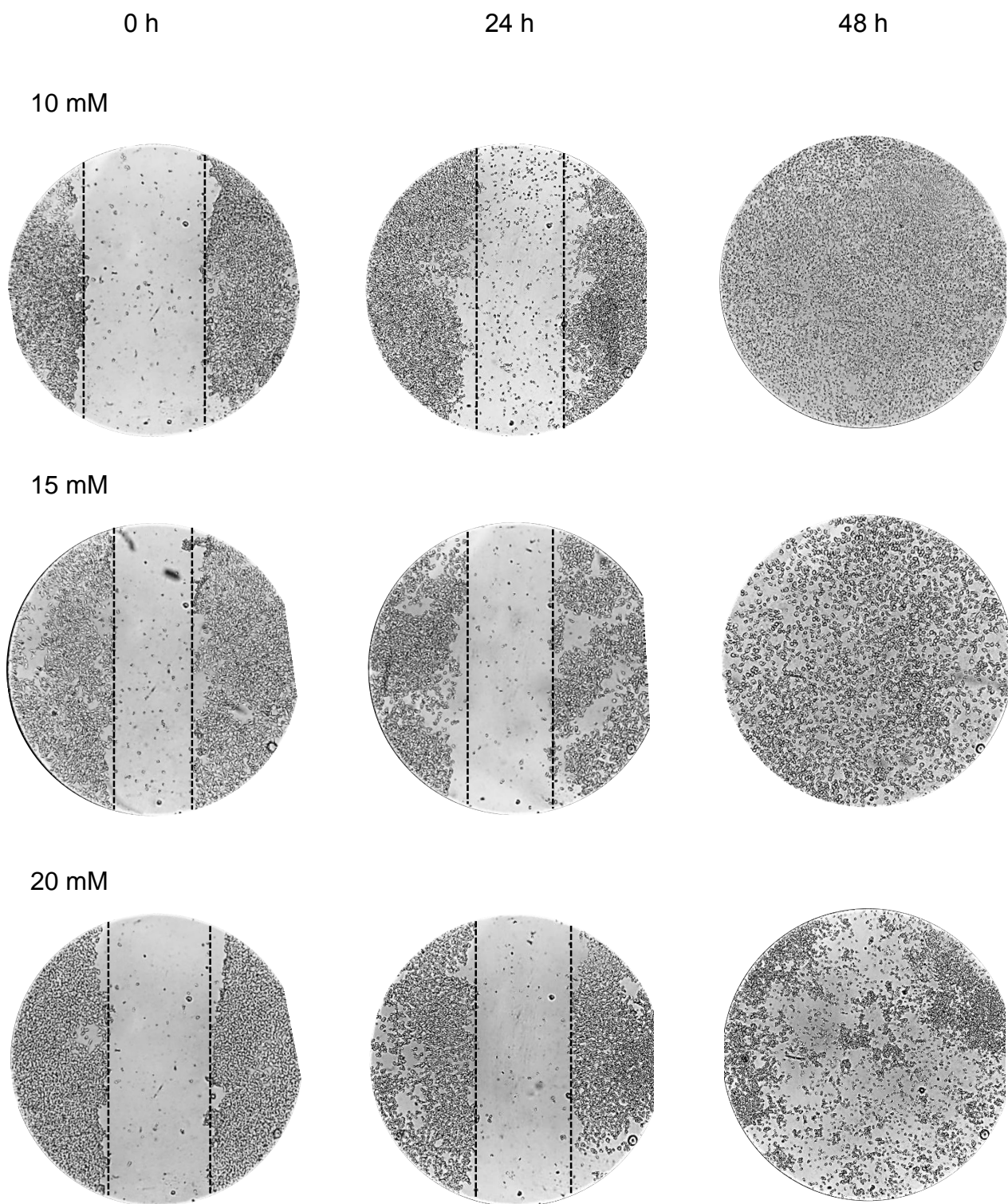


Figura 29.- Evolución de la estría en línea HCT-15 con 10, 15 y 20 mM 5-FU a 0, 24 y 48 horas.

Ensayo de estría de las concentraciones no seleccionadas de AgNPs en la línea celular HT-29.

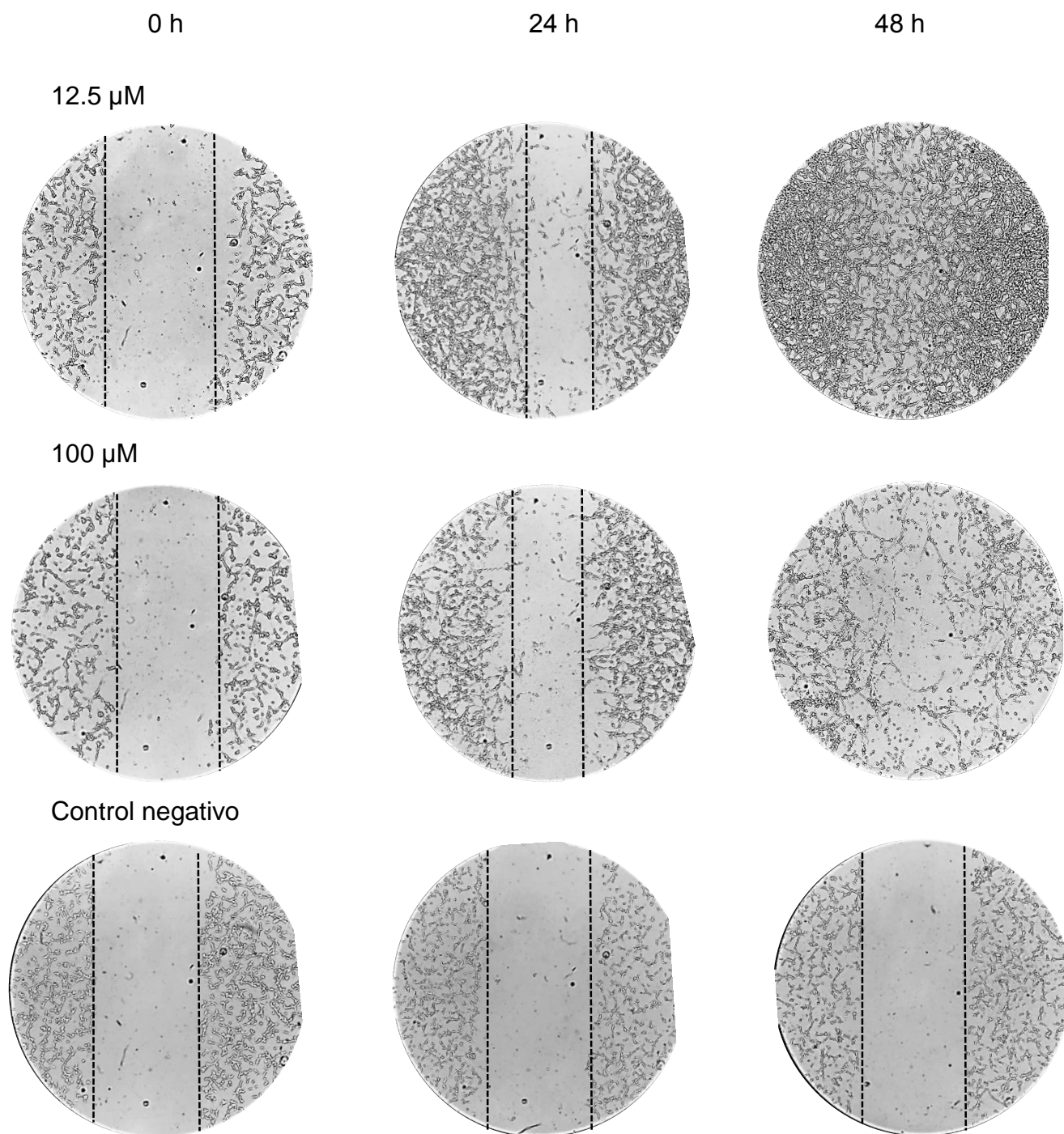


Figura 30.- Evolución de la estría en línea HT-29 con 12.5 μ M AgNPs, 100 μ M AgNPs y DMSO a 0, 24 y 48 horas.

Ensayo de estría de las concentraciones no seleccionadas de AgNPs en la línea celular HCT-15.

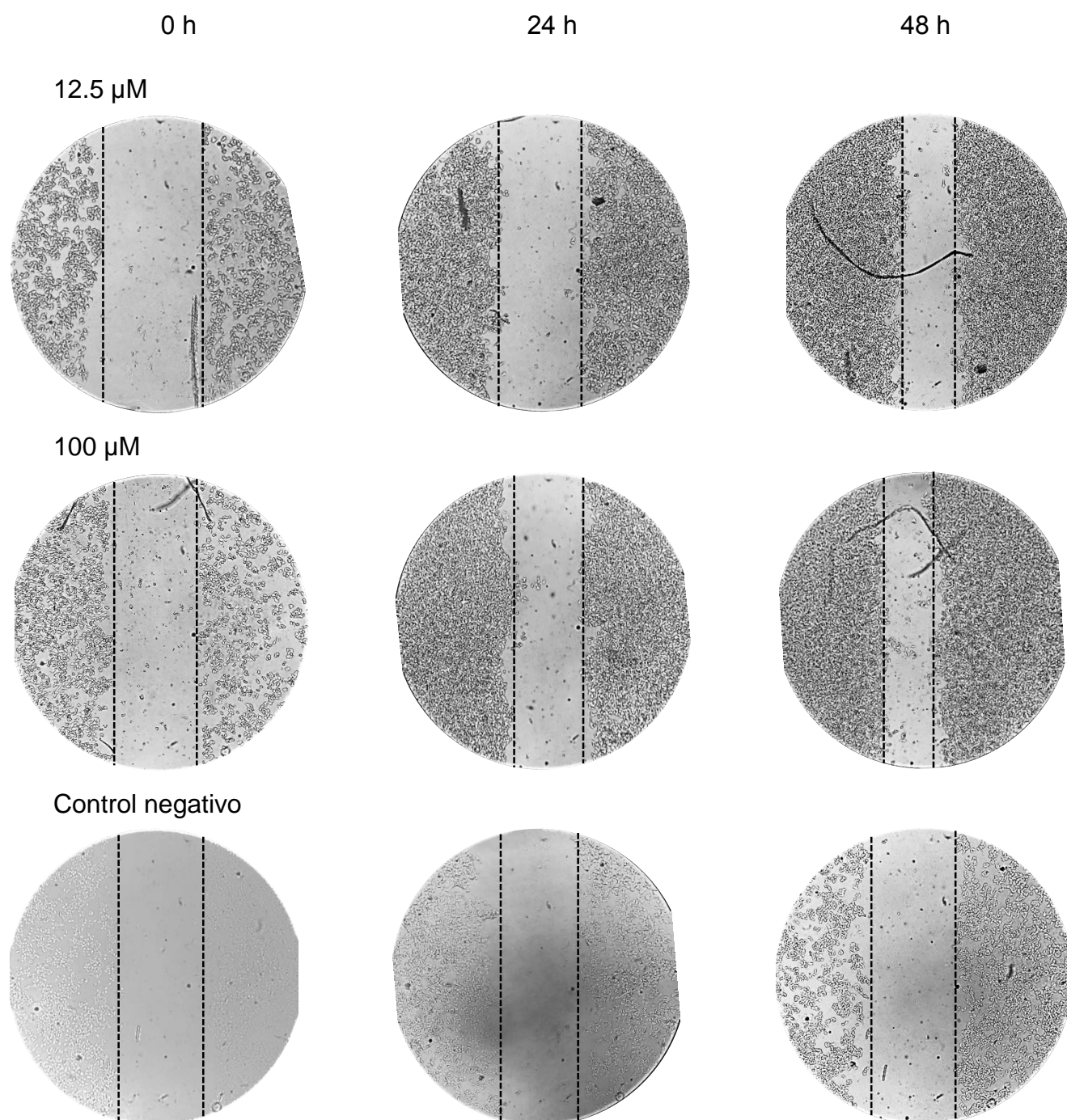


Figura 31.- Evolución de la estría en línea HCT-15 con 12.5 μ M AgNPs, 100 μ M AgNPs y DMSO a 0, 24 y 48 horas.

