



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA.

**ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE NANOPARTÍCULAS DE
PLATA EN CULTIVOS DE CÁNCER DE COLON HUMANO.**

TESIS.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JESÚS DAVID PERRUSQUÍA HERNÁNDEZ.



CIUDAD DE MÉXICO

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre.

VOCAL: **Profesor:** Dr. Francisco Hernández Luis.

SECRETARIO: **Profesor:** Dra. Yanis Toledano Magaña.

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Dr. Octavio Castro Escamilla.

2° SUPLENTE: **Profesor:** Dr. Genaro Jiménez Reyes.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE NANOMEDICINA, DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA DE NANOMATERIALES, CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA, ENSENADA BAJA CALIFORNIA.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Yanis Toledano Magaña.

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Juan Carlos García Ramos.

Firma

Firma

SUSTENTANTE:

Perrusquía Hernández Jesús David.

FIRMA

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por brindarme las herramientas necesarias para afrontar las herramientas necesarias para afrontar los retos académicos presentados en el presente trabajo.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología en Ensenada, Baja California por brindarme su equipo e instalaciones para realizar mi trabajo de tesis.

A la Red internacional de Bionanotecnología con impacto en biomedicina, alimentación y bioseguridad de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, liderada por la Dra. Nina Bogdanchikova, quien en compañía de mis tutores, la Dra. Yanis y Dr. Juan Carlos, amablemente me brindaron los recursos, tiempo y conocimientos necesarios para poder concluir este trabajo de la mejor manera posible y enriquecer en la manera de lo posible mis conocimientos y aportaciones para con la ciencia en México.

Índice General

Abreviaturas y Acrónimos.....	1
Resumen.....	3
1.0 Introducción	5
1.0 Cáncer	5
1.1 Cáncer de colon (Cáncer colorrectal, CCR)	6
1.2 Cáncer como problema de salud en México y el mundo	9
1.3. Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal.	14
1.3.1 Adicciones y estilo de vida.	14
1.3.2 Dieta	16
1.3.3 Causas genéticas del desarrollo de CCR	17
1.4 Diagnóstico y tratamientos contra el cáncer colorrectal	20
1.4.1 Cirugía de la metástasis	21
1.5 Tratamientos no quirúrgicos contra el cáncer colorrectal	21
1.5.1 Radiofrecuencia	22
1.5.2 Quimioterapias	22
1.6 Nanotecnología	25
1.7 Nanopartículas de plata (AgNPs)	25
1.7.1. Polivinilpirrolidona en síntesis de Nanopartículas de Plata	29
1.7. 2. Citotoxicidad de Nanopartículas de Plata	29
1.8 Efectos Genotóxicos de las Nanopartículas de Plata	31
2.0 Justificación	33
3.0 Hipótesis.....	33
4.0 Objetivos	34
4.1 GENERALES	34
4.2 PARTICULARES	34
5.0. Metodología y materiales.	35
5.1 Nanopartículas de plata Argovit™	35
5.2 Mantenimiento de la línea celular HCT-15	35
5.3 Ensayos de Citotoxicidad	36
5.3.1 Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀)	37
5.4 Citometría de flujo	37

5.4.1(CMFDA) Kit Ensayo para detección de Especies reactivas de Oxígeno Celulares	37
5.4.2 Detección de Especies Reactivas de Oxígeno mitocondriales (MitoSOX)	38
5.4.3 Marcadores de Apoptosis/ Necrosis (ANEXINA V/ Yoduro de Propidio)	38
5.5 Caracterización de las nanopartículas de plata Argovit	39
5.5.1 Microscopía de Transmisión Electrónica TEM	39
5.5.2 Determinación de composición por UV- vis	39
6.0 Resultados.	40
6.1. Cultivo celular	40
6.2. Caracterización por TEM	42
6.3 Caracterización por espectro ultravioleta	43
6.4. Resultados de termogravimetría	44
6.5 Viabilidad	45
6.5.1 Determinación de IC ₅₀	46
6.6 Generación de especies reactivas de Oxígeno en cultivos de HCT-15 tratados con AgNPs. 46	
6.7 Generación de especies reactivas de Oxígeno localizados mitocondria en cultivos de HCT-15 tratados con AgNPs	48
6.8 Marcadores de muerte por apoptosis y necrosis en células HCT-15 de cáncer colorrectal humano	49
6.9 Marcadores de necrosis en la línea celular HCT-15.....	51
7.0 Discusión de Resultados.....	53
7.1 Nanopartículas de plata	53
7.2 Núcleo y Recubrimiento	54
7.3 Viabilidad celular	55
7.4 Apoptosis y Necrosis	60
7.5 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	60
8.0 Conclusiones.....	66
9.0 Perspectivas	67
10.0 Referencias.....	68

Índice de figuras.

Figura 1: Etapa 0 y 1 de CCR.....	7
Figura 2 Etapa 2.....	7
Figura 3 Etapa 3.....	8
Figura 4 Metástasis	9
Figura 5 Incidencia y mortalidad por región	12
Figura 6 CCR México. Edades 30- 59 años.....	13
Figura 7 México y CCR Edades 60 a más	14
Figura 8 Modelo molecular en el desarrollo del tumor CCR.....	18
Figura 9 Mecanismos de acción como causantes de citotoxicidad por nanomateriales.....	32

Resultados

Imagen 1 Cultivo de células HCT-15 de CCR humano	40
Imagen 2 Determinación por TEM	42
Imagen 3 Determinación por UV- vis	43
Imagen 4 Determinación de porcentaje de PVP.	44
Imagen 5 Resultados de viabilidad en cámara de Neubauer	45
Imagen 6 Determinación de ROS por citometría	47
Imagen 7 Determinación de ROS mitocondriales	48
Imagen 8 Resultados de apoptosis.....	49
Imagen 9 Apoptosis tardía	50
Imagen 10 Resultados de necrosis	51
Imagen 11 Apoptosis total	52
Imagen 12 Mecanismo de acción propuesto para generación de ROS	62

Índice de tablas

Tabla 1 Etapas de desarrollo de CCR y tratamientos utilizados.....	24
Tabla 2 Determinación de IC50.....	46
Tabla 3 Comparación de AgNPs en literatura	59

Abreviaturas y Acrónimos.

5-FU: 5-Fluorouracilo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Ag⁺: Ión plata

Ag⁰: Plata metálica

AGEs: Productos finales de la glicosilación.

AgNPs: Nanopartículas de Plata.

APC gen: Poliposis adenomatosa coli.

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosin trifosfato.

CCR: Cáncer colorrectal.

CMFDA: Diacetato de 5-Clorometilfluoresceína.

DSC: Calorimetría diferencial de barrido.

FAP: Poliposis adenomatosa familiar.

FDA: *Food and Drug Administration*.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

IARC: Agencia Internacional del cáncer.

IGF-I: Factor de crecimiento de insulina 1.

NF-Kb: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas.

NOX: Compuestos *N*-nitrosos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PEG: Polietilenglicol.

PVP: Polivinilpirrolidona.

RAGEs: Proteínas Reactivas para productos finales de glicosilación.

RB: Retinoblastoma.

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo).

SFB: Suero Fetal Bovino.

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión.

TGA: Análisis termogravimétrico.

Resumen.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de colon o colorrectal es el quinto más diagnosticado a nivel mundial. Y se encuentra dentro e los primeros 3 con mayor tasa de mortalidad entre las personas de la tercera edad.

Existen diferentes factores de riesgo que aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer. Dentro de estas causas se encuentra una vida sedentaria, alcoholismo, tabaquismo, herencia genética, bajo consumo de fibra, entre otros.

Debido a que es una de las enfermedades que tienen una tasa de mortalidad muy alta con respecto a la morbilidad, la cual sigue en aumento año con año, se han desarrollado diferentes arsenales de fármacos antitumorales para contrarrestar la incidencia de este mal. Sin embargo, muchos de estos fármacos son inútiles en contra del cáncer colorrectal por diferentes motivos, algunos de estos son las etapas tan avanzadas de la enfermedad y también la resistencia a los fármacos, lo que pone en evidencia la necesidad de desarrollar nuevas terapias

En los años recientes se ha demostrado la efectividad de los nanomateriales en contra de algunos tipos de cáncer en modelos *in vitro e in vivo*. Principalmente se ha estudiado la actividad de las nanopartículas de plata (AgNPs), las cuales han demostrado un potencial antitumoral satisfactorio en diferentes líneas celulares cancerígenas y modelos animales.

En el presente trabajo se estudió el efecto citotóxico de 4 diferentes formulaciones de nanopartículas de plata (AgNPs) Argovit™, a cuatro concentraciones diferentes (600, 60, 6 y 0.6 µg/mL) en contra de la línea tumoral de cáncer colorrectal humano HCT-15 de la ATCC (American Type Cell Cultutre) durante 24h de exposición bajo condiciones específicas de humedad, temperatura y concentraciones de CO₂. Se determinó la actividad antiproliferativa de las formulaciones utilizando azul tripano como colorante de exclusión vital y contabilizada con ayuda de una Cámara de Neubauer en un microscopio óptico.

También se evaluó la capacidad de las AgNPs para inducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares, ROS específicas en mitocondria y los mecanismos de muerte celular por citometría de flujo en todos los casos.

En general se obtuvo, una reducción significativa en la viabilidad de las células en diferentes concentraciones, dosis dependiente en el caso de 2 de las formulaciones evaluadas.

A partir de los resultados de viabilidad se determinaron las concentraciones inhibitorias 50 (IC_{50}) para las formulaciones Ag7 y Ag10 con la utilización de un programa estadístico Probit. Posteriormente se realizaron los experimentos de citometría de flujo estableciendo como concentraciones experimentales $0.5 IC_{50}$, IC_{50} y $2 IC_{50}$.

Todas las formulaciones mostraron un incremento de ROS aproximadamente de 80% con respecto al control positivo. Mientras que las ROS mitocondriales aumentaron aproximadamente 50% con respecto al valor del control positivo, después de 24 horas de exposición a las AgNPs.

Los marcadores de apoptosis y necrosis mostraron que sólo algunas concentraciones presentaron diferencias significativas con respecto a los controles positivos. En los experimentos realizados.

El principal mecanismo por el cual actúan las formulaciones de AgNPs es la generación de ROS y la inducción de apoptosis (temprana y tardía). Una vía de muerte celular por necrosis está relacionada con el posible daño a tejidos mientras que la apoptosis es una muerte celular ordenada lo que evita un daño colateral. Esto sugiere que las formulaciones de AgNPs podrían ser candidatos potenciales para continuar con las pruebas preclínicas como agentes antitumorales.

1.0 Introducción

1.0 Cáncer

Cáncer es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades relacionadas entre ellas. En todos los tipos de cáncer, alguna de las células del cuerpo comienza a dividirse sin ninguna clase de control reprimiendo los mecanismos de muerte naturales, además puede propagarse a diferentes lugares causando afectaciones en diferentes tejidos. (7)

Esta enfermedad se divide en diversas etapas: 1) Iniciación; La cual comienza con la proliferación celular descontrolada en los tejidos, 2) Evasión de muerte de tipo apoptótica por diferentes mecanismos moleculares que están relacionados con los daños sufridos en el material genético. 3) Las células cancerígenas en su mayoría presentan el fenómeno de metástasis y propagación a diferentes órganos en todo el cuerpo. 4) Presentan angiogénesis, principalmente para mantener el flujo de nutrientes hacia las zonas de implantación. 5) Activación sostenida de vías de señalización de factores de crecimiento. 6) Son sensibles a las señales de inhibición del crecimiento que son reguladas por el sistema inmunitario. (8)

El cáncer puede comenzar casi en cualquier parte del cuerpo humano algunas veces formando tumores, los cuales están hechos de millones de células que por cualquier factor ambiental o endógeno pueden sufrir algún tipo de mutación que no pueda ser reparado. Normalmente las células se dividen para formar nuevas células, tanto como el cuerpo las requiera. Cuando las células crecen y sufren un daño, dependiendo de la gravedad de este, lo reparan o entran en un proceso de muerte programado (apoptosis) o descontrolado (necrosis). Así una vez que la célula ha muerto, otra nueva puede tomar su lugar y cumplir con sus funciones.

Cuando se presenta el cáncer cualquiera de estos procesos naturales se rompe. Como las células mutadas se dividen de una manera descontrolada, estas necesitan una gran cantidad de nutrientes para poder cubrir estos requisitos energéticos. Sin embargo, en algún momento la densidad celular en una zona es tan grande que comienzan a crecer sobre el tejido formando protuberancias llamadas tumores. (7).

Los cambios genéticos que contribuyen al desarrollo del cáncer afectan de 3 maneras principalmente: genes-protooncogenes, genes represores de tumor y genes de reparación de ADN. Estos cambios son a menudo llamados conductores del cáncer.

Los protooncogenes se encuentran de manera natural en las células, sin embargo, cuando este tipo de genes están alterados de cierta forma o con un mayor número de copias en el genoma que lo normal, es más probable que se sufra una mutación que desemboque en el surgimiento de cáncer, permitiendo la supervivencia de las células aún en casos adversos. (7)

Los genes supresores de tumores se encuentran involucrados en el control del crecimiento de las células. Las células cuando sufren alguna alteración en alguno de los genes supresores se pueden dividir de manera descontrolada (7). Dentro de los genes supresores de tumores más importantes se pueden encontrar los pertenecientes a la familia de las proteínas RB (Retinoblastoma) y p53 (14).

Los genes de reparación al ADN están involucrados en la reparación y mantenimiento del material genético en buen estado. Las células que sufren mutaciones en este tipo de genes tienden a desarrollar proteínas no funcionales, las cuales no actúan de forma óptima permitiendo el desarrollo de células anormales. (7) Juntos estos tres tipos de mutaciones son las señales más fuertes para desarrollo y propagación del cáncer.

1.1 Cáncer de colon (Cáncer colorrectal, CCR)

El colon pertenece al aparato digestivo. El intestino grueso es la primera parte del intestino y tiene alrededor de 1.5 metros de largo. De la misma manea el recto y el ano, conforman la última parte del intestino y tiene una longitud total de aproximadamente 15–20 cm. El conducto anal termina en el ano, parte que conecta el intestino con la parte exterior del cuerpo.

Las principales funciones del colon son, la absorción de agua y electrolitos del quimo y el almacenamiento

Como la mayoría de los tipos de cáncer, el cáncer de colon también se divide en 4 etapas diferentes.

Etapa de mutación y formación de carcinoma *in situ*: Las células anormales que se encuentran en la mucosa de la capa interior de la pared del colon. Estas células anormales pueden evolucionar a cáncer y expandirse dentro del tejido normal.

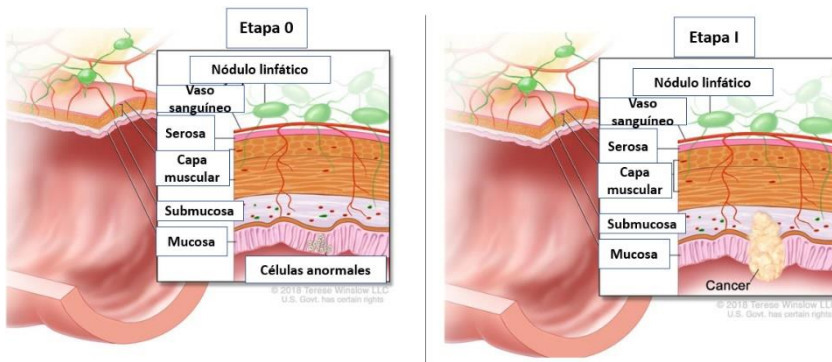


Figura 1: Desarrollo del cáncer de colon, etapa 0 y etapa 1. Mutación y formación de carcinoma *in situ*. Localización de las células cancerígenas en la mucosa del epitelio intestinal. Imagen recuperada y extraída desde

https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq#_112

El carcinoma ya está formado en la mucosa del intestino, por lo que comienza a propagarse hacia la submucosa e incluso hacia la capa muscular.

El carcinoma ya asentado en la mucosa del intestino se expande a las siguientes capas celulares, aún no es vascularizado.

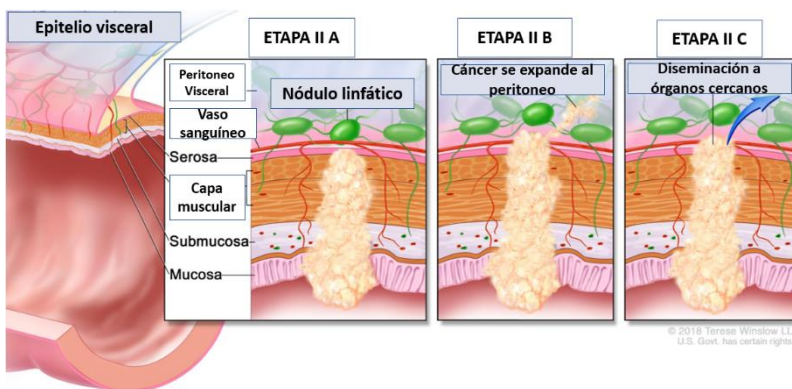


Figura 2: Segunda etapa, proliferación de las células cancerígenas.

Imagen modificada desde:

https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq#_112

Esta etapa se puede dividir en 3 diferentes etapas: A, B y C. Estas Tres se diferencian una de la otra dependiendo de la capa que lleguen a atravesar.

En la etapa II A, las células cancerígenas logran atravesar a través de la capa muscular de la pared del intestino hasta la capa serosa de la pared del colon.

En el caso II B, las células cancerosas se diseminan a través de la capa serosa hasta la capa más externa del intestino.

En la etapa II C, las células cancerígenas se pueden expandir a través de la serosa hasta tejidos de los órganos cercanos del abdomen en el peritoneo visceral.



Figura 3. Diseminación del cáncer de colon hacia los nódulos linfáticos y órganos cercanos.

Imágenes recuperadas y modificadas desde https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq#_112

En la etapa 3A, las células cancerígenas se expanden a través de la capa mucosa hasta la capa submucosa o incluso hasta el músculo. Para esta etapa, dependiendo de la zona hasta la que se haya diseminado, se estima el número de nódulos linfáticos que alcanza. Se estima que si las células cancerígenas se expanden hasta la capa submucosa se habrán alcanzado de 1-3 nódulos linfáticos cercanos. Mientras, mayor sea el tiempo de evolución, mayor será el número de nódulos linfáticos a los que las células cancerígenas tendrán acceso.

En la etapa 3B, las células cancerígenas se expanden a través de la capa muscular hasta la capa serosa de la pared del colon, en donde ya alcanzaron las delimitaciones del órgano con los demás órganos circundantes, es por esto por lo que, en esta etapa el cáncer se puede expandir a través de los nódulos linfáticos hacia otros órganos. A través de la mucosa hacia la submucosa/ capa muscular de la pared del intestino, el cáncer se puede diseminar hasta 7 de los nódulos linfáticos más cercanos.

En la etapa 3C, a través de la capa serosa de la pared del intestino, puede alcanzar de 4-6 nódulos linfáticos. Mientras que si se va a través de la capa muscular a la

capa serosa se expande a través de la capa serosa al tejido divisorio de los demás órganos, el cáncer se puede expandir a través de al menos 7 nódulos linfáticos.

Y si el cáncer alcanza la línea divisoria entre los órganos, las células cancerígenas pueden desplazarse a través de uno o más nódulos linfáticos o incluso colonizar directamente los órganos vecinos.

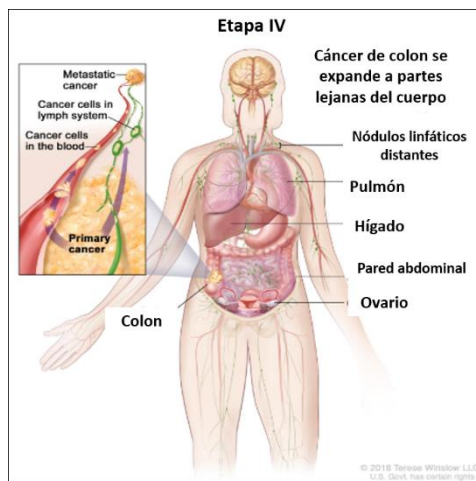


Figura 4: Metástasis a diferentes órganos por medio de los nódulos linfáticos y dispersión de las células por medio de los tejidos.

En la última etapa del cáncer de colon, las células cancerígenas ya han logrado expandirse más allá de los límites del colon produciendo metástasis a órganos más alejados tales como riñón, bazo, pulmón, etc. Mientras que en los órganos circundantes ya se ha diseminado completamente la enfermedad. (11)

Imagen extraída y modificada desde https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq#_112

1.2 Cáncer como problema de salud en México y el mundo

Lo más importante de esta enfermedad es que puede ser desarrollada por la exposición a cualquier tipo de agente que provoque un daño irreparable al material genético de las células y además en la mayor parte de los casos estas células son capaces de migrar a otras partes del cuerpo (1). En la mayoría de los casos se trata de padecimientos crónico-degenerativos, por lo tanto, sus incidencias y tasas de mortalidad tienden a incrementarse con la edad. Asimismo, se han identificado tipos de cáncer más comunes en mujeres que en hombre y viceversa, así como los exclusivos por sexo. (2)

Cuando se habla de cáncer de colon se hace referencia a una enfermedad que afecta a cierta parte de la población de todas las edades, principalmente a las personas entre 45 y 65 años de edad, grupo en donde la enfermedad es más frecuente. (6)

Las manifestaciones del cáncer de colon son una serie de síntomas bien identificados, sin embargo, es una de las enfermedades con la tasa de mortalidad más alta del mundo con relación a su morbilidad.

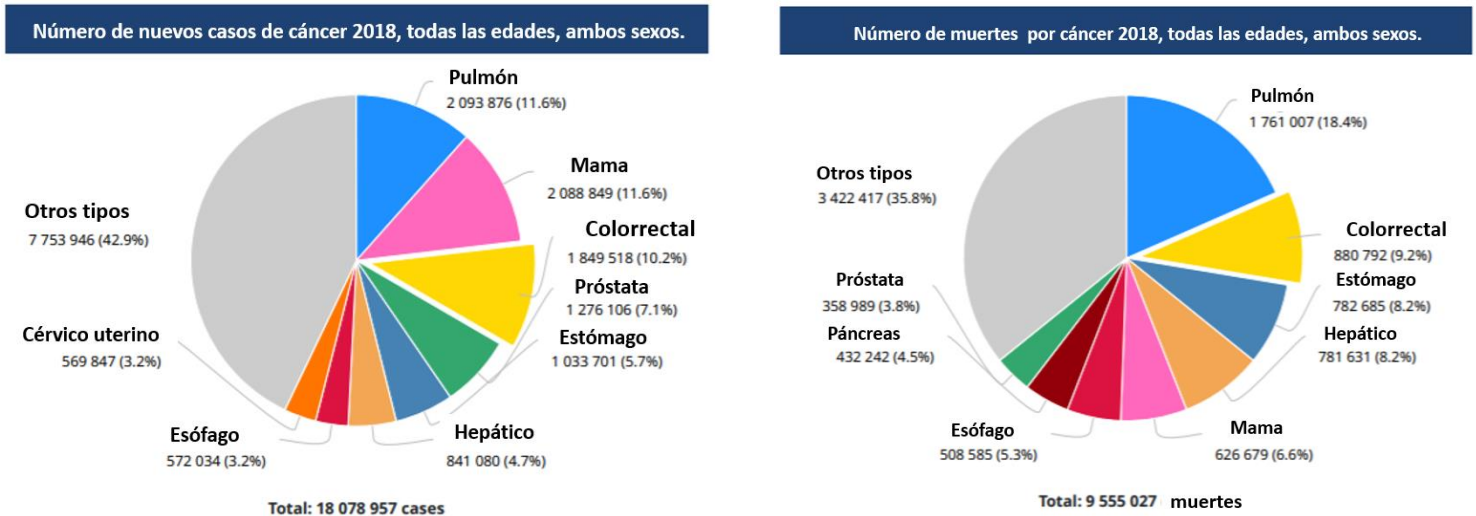


Figura 5: Datos estadísticos de incidencia y mortalidad del cáncer de colon en el año 2018. Gráficas extraídas desde: <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>.

Dentro de estos tipos de cáncer se logran identificar 5 tipos de cáncer con la mayor prevalencia: cáncer pulmonar (1.69 millones), cáncer hepático (788 000 muertes), cáncer colorrectal (774 000 muertes), cáncer gástrico (754 000 muertes) y cáncer de mama (571 000) (4).

Las estadísticas el cáncer de colon a nivel mundial no son nada favorables. De acuerdo con los resultados emitidos por Globocan en el año de 2018, se reconocieron 1,849,518 de nuevos casos de cáncer de colon a nivel global, siendo así la cuarta manifestación de cáncer más frecuente a nivel global, precedida por cáncer de pulmón y de mama. (14)

El carcinoma colorrectal es la tercera causa de muerte por cáncer en países occidentales, de acuerdo con diferentes instituciones sanitarias de países de América y Europa (16).

Las estadísticas de muerte a nivel mundial son muy altas, con respecto a los de otro tipo de cáncer en las mismas etapas de desarrollo, de acuerdo con los datos emitidos por la Organización Mundial de la Salud.

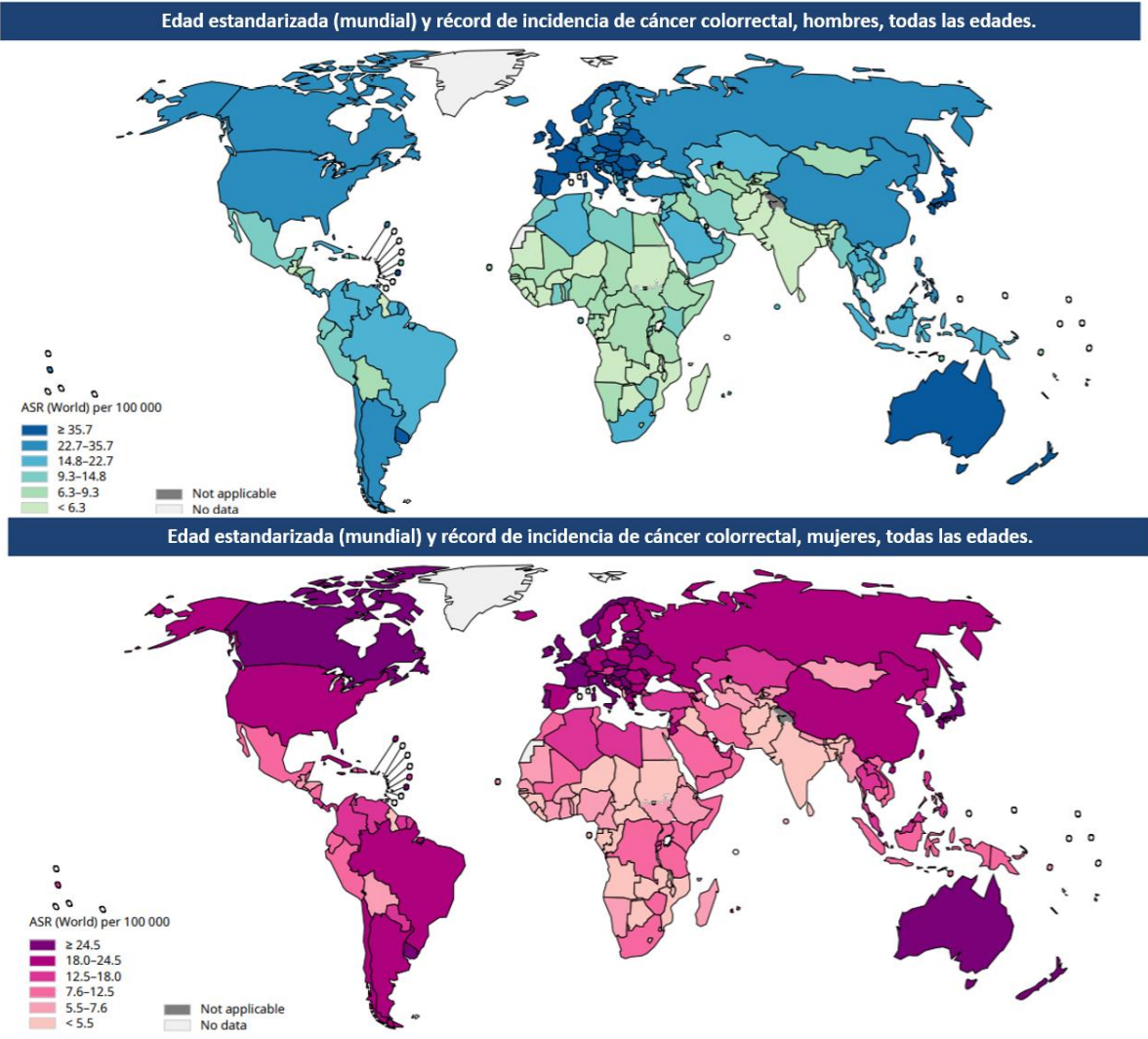
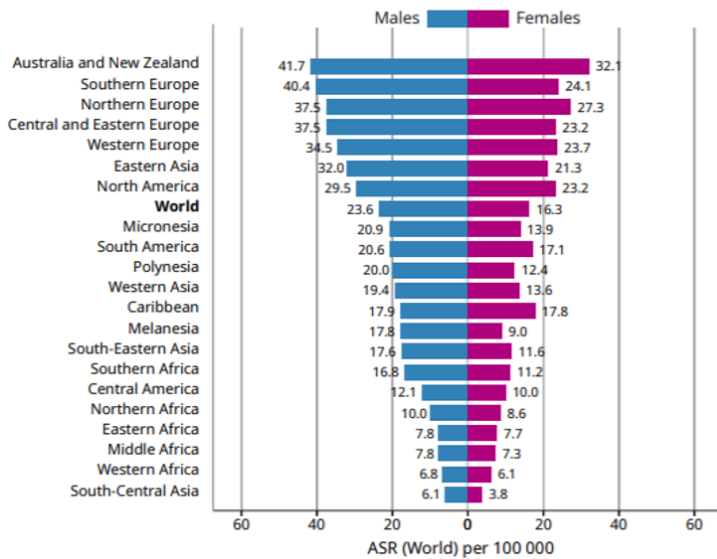


Figura 6: Mapa de calor representando la incidencia de cáncer colorrectal a nivel mundial en el año 2018 de acuerdo con el género. Imágenes extraídas y modificadas desde: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>

Edad estandarizada (mundial) de incidencia de cáncer colorrectal, por sexo.



Edad estandarizada (mundial) de incidencia y mortalidad de cáncer colorrectal.

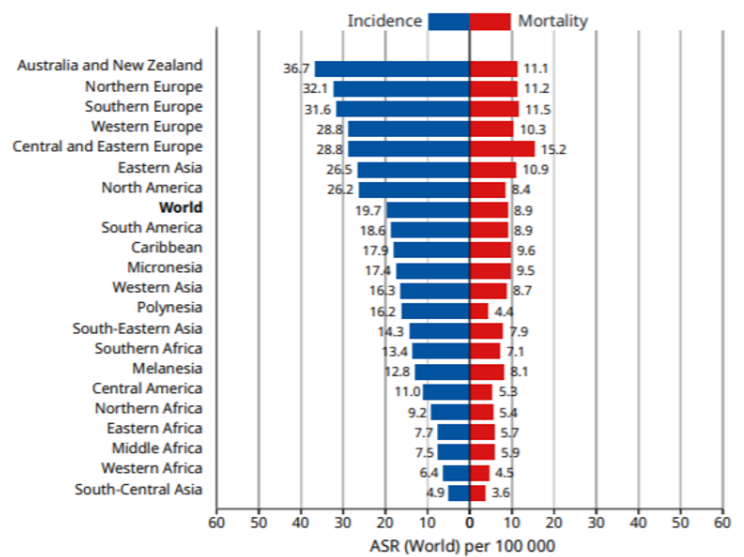


Figura 7: Estadísticas de incidencia y mortalidad del cáncer colorrectal por género y región geográfica de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. Imágenes extraídas y modificada desde: World Health Organization <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>

Si bien el cáncer no es una enfermedad exclusiva de las personas mayores, la incidencia que existe en la población joven es relativamente alta, a comparación de unas décadas atrás. Existen varios tipos de cáncer que pueden desarrollarse en una temporada de vida. A diferencia de los cánceres que aparecen en adultos mayores que están fuertemente ligados al estilo de vida de las personas, los tipos de cáncer que aparecen en las personas jóvenes están relacionados con la mutación de las células por errores del material genético que aparecen en la etapa embrionaria o en los primeros años de vida.

De acuerdo con las estadísticas que arrojó el Instituto Nacional de Estadística y Geografía en el año de 2018 (5), en México, la población más expuesta a padecer este tipo de enfermedad es la que se encuentra entre los 30 y 59 años. Dependiendo el sexo se verá incrementada o disminuida su prevalencia en la población (5).

De igual forma, el cáncer de órganos digestivos es el de mayor mortalidad y relevancia en las personas mayores a 60, seguido por el tipo de cáncer de ovario

(5). Estos datos recaudados en el último censo de 2016, los posicionan como una de las tasas de mortalidad más altas en el país.

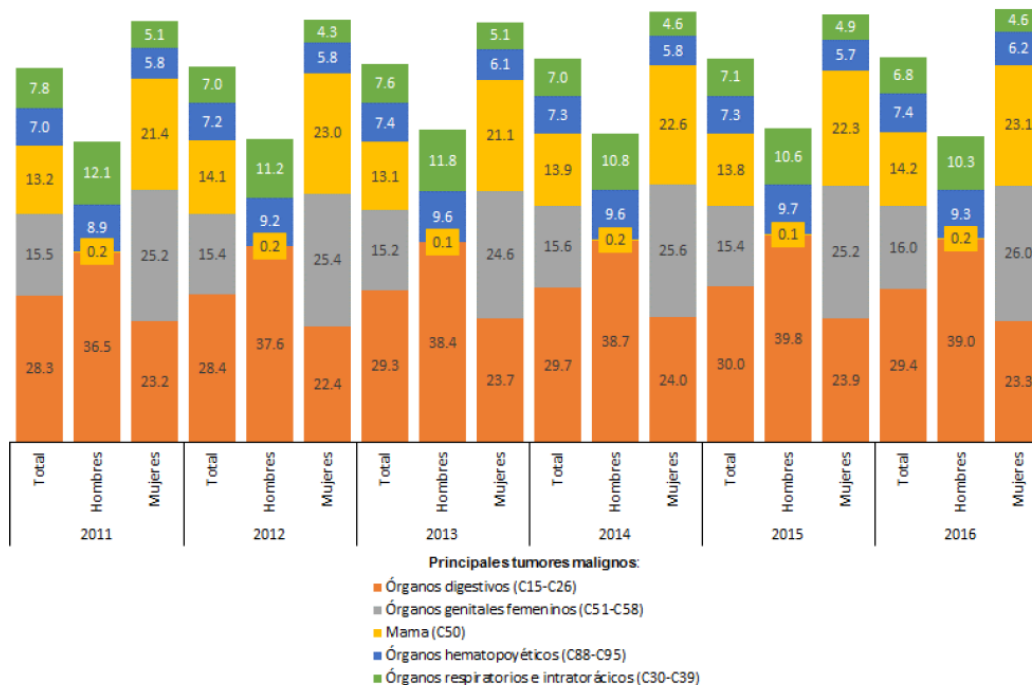


Figura 8: Gráfica Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 30 a 59 años según sexo. Años 2011 a 2016. Imagen obtenida de; Datos estadísticos del censo de población 2016, INEGI, 2018 Gráficas obtenidas desde: Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos Nacionales. Instituto Nacional de Estadística y Geografía <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018>

Se observa que 3 de cada 10 muertes por cáncer en la población en este intervalo de edad, se deben a cáncer colorrectal; en cada uno de los años analizados los porcentajes de defunciones en los varones superan en más de 13 puntos porcentuales a los datos obtenidos con respecto a las mujeres, aunque para ellas también es una de las enfermedades más predominantes causada por tumores malignos.

De la misma manera, la mortalidad debida a los tumores malignos en población de 60 años y más se ve acentuada por los cambios fisiológicos, mayor tiempo de exposición a agentes carcinogénicos o a factores de riesgo hereditarios, desajustes hormonales, dietéticos y metabólicos. (3)

Se observa que en México de 2011 a 2016, el porcentaje más alto de muertes observadas por cáncer se debe a los tumores malignos de los órganos digestivos, principalmente colon y estómago. Sin embargo, a diferencia de la población de entre 30 a 59 años, el sector más vulnerable es el femenino ya que presentan los índices más altos de mortalidad.

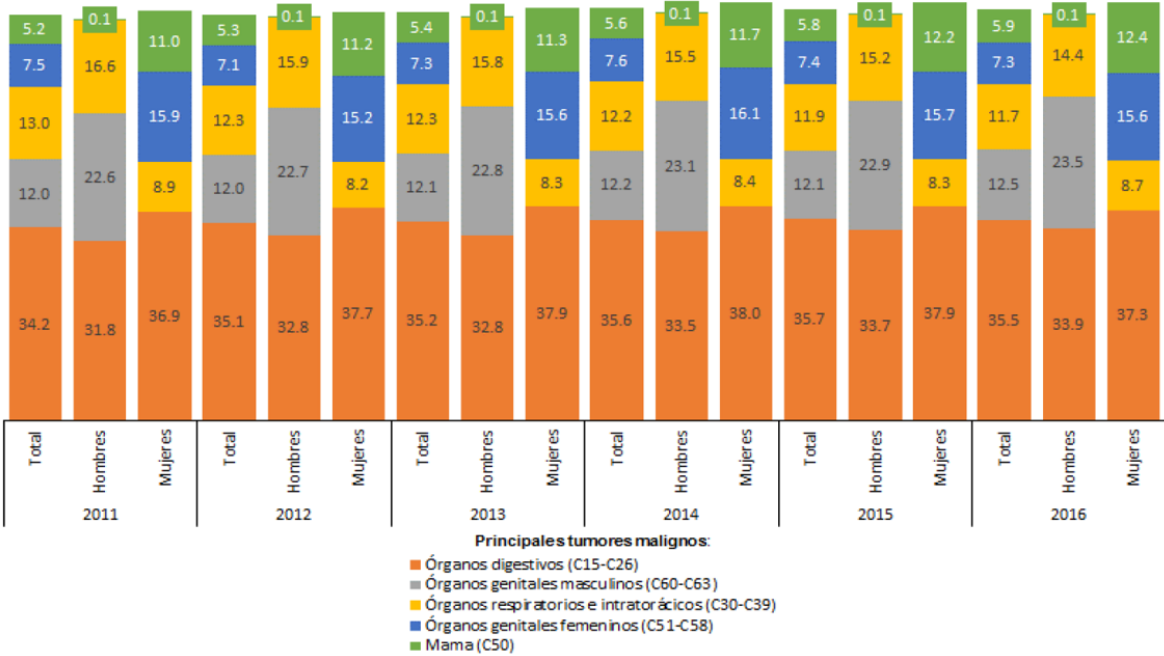


Figura 9: Porcentaje de muertes observadas por los cinco principales tumores malignos en la población de 60 años y más según sexo. Años 2011 a 2016. Imagen obtenida de; Datos estadísticos del censo de población 2016, INEGI, 2018 Gráficas obtenidas desde: Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos Nacionales. Instituto Nacional de Estadística y Geografía <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018>

1.3. Factores de riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal.
1.3.1 Adicciones y estilo de vida.

El estilo de vida de una persona es determinante en muchos aspectos para el desarrollo de enfermedades multifactoriales como el cáncer, al propiciar un ambiente idóneo para permitir que se desarrolle la enfermedad. En diversos

artículos se ha referenciado que su desarrollo está asociado fuertemente al tipo de dieta y la calidad de esta, el consumo de alcohol, tabaquismo y está fuertemente asociado al sedentarismo (15).

El CCR (cáncer colorrectal) se relaciona fuertemente con el alcoholismo, ya que se ha propuesto que en el proceso normal de metabolización del etanol en el hígado, el etanol pasa a formar acetaldehído (por acción de la alcohol deshidrogenasa), y en condiciones normales sería metabolizado casi de inmediato a ácido acético (por la aldehído deshidrogenasa). Sin embargo, en condiciones de alcoholismo crónico, se ha visto que la función de la enzima aldehído deshidrogenasa se encuentra disminuida (16), lo que hace que el acetaldehído permanezca de una manera más prolongada en el cuerpo, siendo este compuesto carcinogénico (grupo 1) de acuerdo a la clasificación de la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer (IARC) (17). La razón por la cual el acetaldehído favorece la aparición de cáncer es porque interfiere con la comunicación celular por medio de hormonas e interviene con el metabolismo del ácido retinoico y mecanismos de reparación del ADN. (22)

El tabaquismo es un estilo de vida que está íntimamente relacionado con el desarrollo de muchísimos tipos de cáncer, principalmente con el pulmonar, lengua, esófago y garganta, ya que muchas de las sustancias que contiene el cigarrillo son considerados como carcinogénicos, la mayoría de ellos de naturaleza alquilante. Además, contiene *N*-nitrosaminas, que son compuestos generados por la combustión y el cambio de pH a un ambiente más ácido (saliva o estómago). Dichos compuestos tienen la particularidad de difundir de manera pasiva a través de la membrana plasmática y nuclear, interactuando de manera directa con el ADN. provocando aductos o alquilándolo, y de esta manera promoviendo anomalías en la codificación de los genes que puede resultar en una mutación sin reparación (20).

Existe evidencia irrefutable que la obesidad y el CCR están íntimamente relacionados con el desarrollo de cáncer. Las mayores evidencias de esto es que en los países occidentales, se presenta una mayor incidencia debido al estilo de

vida o al ambiente que se tiene en estos lugares, siendo estos factores considerados más importantes que los factores genéticos (19, 20, 21).

A la población que padece de diabetes mellitus tipo II, hiperinsulinemia y obesidad abdominal, se les ha relacionado mucho con un mayor riesgo para desarrollar CCR (21). La principal razón de ello es que la mayoría de estas personas mantienen un nivel constante de hiperinsulinemia, lo cual puede promover el crecimiento celular por medio de las proteínas IGF-1 (Insuline Growth Factor 1) en el colon y de esta manera inhibir la apoptosis. De la misma manera la grasa corporal estimula la respuesta inflamatoria que a su vez puede promover el desarrollo de CCR. (20,22).

De modo contrario, al presentarse una hiperglucemia constante, la glucosa puede reaccionar con diferentes moléculas orgánicas y debido a su naturaleza reductora propicia la formación de AGEs (Productos finales de la glicación) (23) Estos Productos Glicosilados son detectados por Proteínas Reactivas en la membrana (RAGEs) las cuales a su vez sufren un cambio conformacional que puede ser capaz de desencadenar una respuesta dependiente de RAGE. La consecuencia biológica de la activación de las señalizaciones RAGE es que la célula es capaz de despertar una respuesta robusta para tratar de atenuar la interacción a cuerpo extraño.

Las evidencias convincentes y actuales demuestran que este tipo de respuesta es el combustible perfecto que orilla a las condiciones adecuadas para que se desarrolle un microambiente propicio para la implantación de tumores en el intestino.

1.3.2 Dieta

La dieta es uno de los factores que más influyen en el desarrollo de CCR debido a que muchos de los alimentos que consumimos contienen, aunque sea en mínimas proporciones, moléculas y compuestos considerados como carcinogénicos. Uno de los ejemplos más estudiados a la fecha es el consumo de carnes rojas. (21)

Uno de los mecanismos propuestos y estudiados para soportar esta teoría, es que produce un estado de hiperinsulinemia, además de que la carne contiene un alto contenido de hierro, debido a su naturaleza animal (25). Se ha descrito que el hierro

del grupo hemo ayuda a catalizar la formación endógena de compuestos *N*-nitrosos y ROS, siendo los primeros por su naturaleza alquilante, (26). La asociación de la inducción de CCR por consumo de carnes rojas es atribuida principalmente a la formación de aminas heterocíclicas que interfieren en el ciclo replicativo celular (26). La cantidad de nitrógeno en el tracto intestinal es proveniente de la cantidad de proteínas consumidas, la presencia de compuestos *N*-nitrosos (NOX). Los NOX producidos por la oxidación de las proteínas, metabolismo realizado por la microbiota intestinal, los aminoácidos son nitrosados en presencia de agentes nitrosantes como el NO y la nitración puede ocurrir en presencia de ambientes alcalinos o neutros (26).

Se ha demostrado que la presencia de esos compuestos induce inflamación en la mucosa del colon (27), la presencia de amonio libre es considerado como el más tóxico de esos compuestos liberados, por lo que se propone que mientras más cantidad de amonio se forme y permanezca en el lumen intestinal, más alto será el riesgo de que este cause afectaciones en las células y promueva la formación de adenomas.

1.3.3 Causas genéticas del desarrollo de CCR

Una de las principales fuentes de formación de tumores es la inestabilidad cromosómica que consiguen las células debido a las diferentes mutaciones adquiridas durante exposición a agentes genotóxicos o mutagénicos. (28)

El desarrollo de una célula se da por etapas, de las cuales se tienen identificados diferentes pasos.

Una de las señales más frecuentes que se han identificado al momento de desarrollar el CCR es que se tiene una aberración en el gen “ras” (28). Cuando se transfectan células receptoras con este gen mutado, esta mutación confiere propiedades neoplásicas. Aproximadamente el 50% de los tumores que se encuentran en los carcinomas colorrectales y un número similar de carcinomas de 1cm de diámetro presentan este tipo de mutación (29).

Adicionalmente a las mutaciones que se generan en los genes “ras” existe evidencia que demuestra que la proliferación de las células se debe a la amplificación de las repeticiones de diferentes regiones del genoma. Algunos de los casos que se han reportado incluyen la amplificación de los genes neu, c-myc o c-myb encontrados en los tumores primarios de cáncer de colon (30)

La pérdida de una región cromosómica específica ocurre con frecuencia en las neoplasias colorrectales. Usualmente se pierde uno solo de los dos cromosomas parentales presentes en una célula normal. Esta pérdida de alelos ha sido interpretada como evidencia de que las regiones suprimidas contienen genes supresores de tumores, cuyo producto normalmente regulan el crecimiento y la diferenciación de manera negativa el crecimiento de la célula y así suprimir de manera indirecta el crecimiento neoplásico (31).

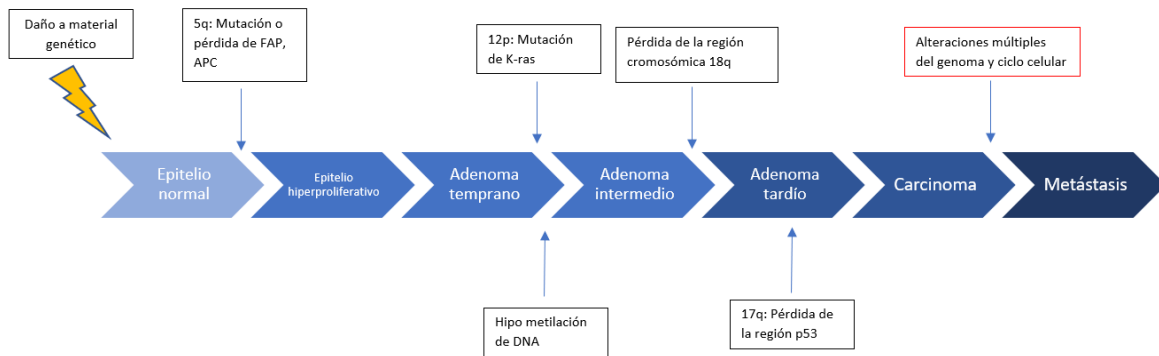


Figura 10: Modelo molecular en la tumorogénesis del CCR. Imagen modificada, tomando como modelo las figuras de los artículos (28) y (32). Se describe los mecanismos moleculares ya descritos en la literatura que permiten el desarrollo, establecimiento y crecimiento de los tumores en el CCR.

La tumorogénesis procede a través de una serie de alteraciones genéticas que incluyen oncogenes (ras), genes de represión tumoral (particularmente los de los cromosomas 5q, 17p y 18q). Los tres estados de los adenomas están definidos uno de otro por la delección de una parte del genoma específica, que le otorga a la célula en desarrollo la capacidad de incrementar de tamaño y número, provocar displasia.

En los pacientes con poliposis adenomatosa familiar (FAP), en el cromosoma 5q es inherente una delección del gen APC (Poliposis adenomatosa coli) que es un gen

supresor de tumores. Esta alteración es la responsable de la capacidad hiperproliferativa de las células durante el CCR. En los pacientes que no tienen este factor familiar, la región del cromosoma 5q no necesariamente debe estar suprimida, existe la posibilidad de que se encuentre, pero de forma mutada, o ambas. (28)

De acuerdo con la secuencia adenoma-carcinoma la mayoría de los casos de CCR provienen de adenomas colorrectales, que también se puede asociar de manera directa con la obesidad, ya que se ha demostrado que las personas obesas tienden a padecer CCR de un 32–45% más con respecto a las que se encuentran dentro de un peso óptimo. (32)

La regulación que más se ha estudiado a la fecha es la metilación de regiones génicas específicas, dentro de las cuales las más importantes son las islas CpG (34).

Se ha logrado asociar diferentes mecanismos del desarrollo de cáncer con zonas hiper metiladas debido a que algunas regiones que pueden estar silenciadas se relacionan con genes supresores de tumores y/o pro apoptóticos.

La mutación del gen *ras* (frecuentemente *K-ras*) parece ocurrir una de las células preexistentes en el adenoma pequeño y por medio de la división celular el gen se multiplica e incrementa su proporción, haciendo que el tumor se vuelva displásico. Esto debido a que este gen codifica para una GTPasa, que cuando está inactivada conduce a la activación constitutiva de la vía de señalización RAS-RAF-MEK-ERK (33)

Las partes de los cromosomas más afectadas, a menudo borradas, son las regiones 5q,17p y 18q. (32)

La delección del alelo que contiene la región 17p y 18q, usualmente ocurren ya en etapa finales del adenoma (también llamado adenoma tardío) para dar paso al carcinoma. Este paso es de vital importancia para el desarrollo del CCR y en general cualquier tipo de cáncer, debido a que en esta región cromosómica se encuentra el gen p53 (33), cuya importancia en las vías de señalización para los procesos de muerte celular son muy relevantes (11,14).

1.4 Diagnóstico y tratamientos contra el cáncer colorrectal

A pesar de los programas de concientización y las campañas de información para tratar de prevenir el desarrollo de este tipo de cáncer, la enfermedad sigue en aumento en una gran parte de la población de mediana y avanzada edad, es por esta razón por la cual las campañas no son suficientes para la prevención y erradicación del cáncer colorrectal en el futuro próximo.

Esta población se estratifica dependiendo de la edad, sexo, antecedentes de cánceres familiares y estilo de vida.

La población se divide en un semáforo de riesgo en el cual se encuentran las personas de alto, medio y bajo riesgo de padecimiento (38)

En la actualidad existen algunos tratamientos aprobados por diversas agencias de salubridad a nivel mundial. Estos medicamentos se enfocan al tratamiento de cáncer colorrectal, principalmente en las etapas primarias de la enfermedad como la etapa 1 y 2 B, donde el daño aún se encuentra localizado en el tracto intestinal.

Riesgo bajo: Son todas aquellas personas jóvenes asintomáticas que no tengan antecedentes de algún tipo de cáncer colorrectal, pero que por un estilo de vida no saludable o por situaciones de exposición a algún tipo de agente, se encuentran como candidatas a padecer este tipo de enfermedad. (38)

Riesgo medio: Este tipo de clasificación incluye a las personas mayores a 50 años sin otro factor de riesgo añadido de cáncer colorrectal más que la edad. Teniendo como una de las pruebas más importantes la detección de sangre oculta en heces con cada 6 meses o una vez al año. También se recomienda una rectosigmoidoscopia o colonoscopia cada 5 años.

Alto riesgo: Los pacientes que se consideran de alto grado, son aquellos que cumplen con los rubros de las dos categorías anteriores, pero aumentando de manera exponencial por los factores de cáncer colorrectal familiar

Incluye a todos los tipos de CCR con agregación familiar. Se denomina cáncer de colon familiar para distinguirlo de formas inequívocamente hereditarias y representa del 10–30% del 100% de los casos. (38)

Los métodos quirúrgicos han sido los tratamientos para CCR localizado más utilizados desde el siglo pasado. La escisión local sólo puede curar los tumores confinados a la pared rectal hasta en 4 mm de profundidad dentro del lumen, ya que estos parámetros de referencia física están relacionados con la diseminación hacia los ganglios linfáticos (38).

La cirugía es la base fundamental del tratamiento con éxito del CCR. El objetivo principal de ésta es la extirpación del tumor primario y de cualquier extensión de este mientras se encuentre de manera localizada. (40)

1.4.1 Cirugía de la metástasis

Uno de los mayores problemas que tiene el cáncer colorrectal es que tiene una tendencia muy alta a desarrollar metástasis hepática, esto debido a que el hígado recibe directamente el drenaje venoso del colon confluye directamente a este órgano, lo que aumenta de manera dramática el riesgo de muerte en esta etapa.

La supervivencia a 5 años de los pacientes con CCR y metástasis hepática es de menos del 10%, con una tasa de curación menor al 2% con los esquemas de tratamiento disponibles. (40)

1.5 Tratamientos no quirúrgicos contra el cáncer colorrectal

Estos tratamientos en un principio ofrecieron una mayor eficacia comparados con métodos tradicionales. Debido a su popularidad muchos de estos lograron desplazar y sustituir a las cirugías como tratamiento de primera elección. (40)

En la actualidad hay distintos tipos de tratamiento para los tipos de cáncer existentes, muchos de ellos se encuentran aprobados por entidades internacionales de salud y otros en fase experimental. Los ejemplos más recurrentes son los

radiofrecuencias y quimioterapias, que son tratamientos utilizados en su mayoría como adyuvantes y/o de primera elección. (41)

Aunados a estos tratamientos, en la última década se han buscado alternativas a los tratamientos de primera elección, siendo los más estudiados el uso de anticuerpos monoclonales y el empleo de la nanotecnología como tratamientos específicos contra las células tumorales.

1.5.1 Radiofrecuencia

La radiofrecuencia y la criopoblación permiten destruir pequeñas metástasis en un intento paliativo o como medio para conseguir resecciones completas asociadas a la cirugía. La primera destruye el tejido tumoral por calor y la segunda por congelación. La radiofrecuencia se puede aplicar de forma percutánea o intraoperatoria, pero tiene el inconveniente de que es una técnica de muy alto costo. Su eficacia en metástasis de adenocarcinoma colorrectal es muy poco estudiada, ya que muy pocos centros a nivel mundial la utilizan como tratamiento de primera elección (38).

1.5.2 Quimioterapias

Las quimioterapias son tratamientos oncológicos sistémicos que son ampliamente utilizados en el área médica contra diversos tipos de cáncer en muchas etapas de esta enfermedad (41).

Las quimioterapias son utilizadas a menudo como tratamiento para tratar cánceres en etapas tempranas, o bien, como tratamientos adyuvantes a las cirugías. (42)

La clasificación del uso de las quimioterapias depende de la etapa en la que se administra con respecto a la cirugía. La primera clasificación es la neoadyuvante, la cual se ocupa previo a la cirugía. En esta etapa las células cancerígenas se encuentran localizadas en un punto específico del tracto colorrectal, en el cual se mantiene un microambiente tumoral específico.

Existe la clasificación de quimioterapia adyuvante, en donde esta se administra después de haber sido realizada la cirugía de remoción tumoral. Aquí la cirugía no

fue capaz de eliminar las células tumorales, así que la quimioterapia es utilizada para matar a las células remanentes para evitar su propagación a hígado.

Por último, existe la quimioterapia paliativa la cual es administrada una vez que el cáncer colorrectal está en una etapa avanzada y se ha dispersado previamente a diferentes tejidos a través de los ganglios linfáticos. En este caso, la cirugía no puede eliminar el cáncer, así que la mejor opción para tratar de frenar el avance de la enfermedad es con quimioterapias, las cuales ayudarían a mejorar el estado físico del paciente e incrementaría su calidad de vida. (42)

De acuerdo con el tipo de quimioterapia que se le administre al paciente, existe una batería de fármacos aprobados por la FDA, que se pueden administrar. Dentro de este grupo de fármacos se encuentran el cis-platino, carbaplatino, oxaliplatino y el 5-fluorouracilo, irinotecán y cetuximab como fármacos de primera línea, siendo este último el más utilizado como adyuvante y neoadyuvante para el tratamiento de cáncer colorrectal. (41)

El 5-fluorouracilo (5-FU) ha sido la principal opción para el tratamiento quimioterapéutico para el tratamiento del cáncer colorrectal desde hace 2 décadas. Comúnmente es utilizado en combinación con vitamina A, quien ejerce un efecto sinérgico en el efecto del 5-FU. (42)

Este tratamiento es usado principalmente como quimioterapia paliativa, principalmente la etapa III y III-B (43, 44). A pesar de la eficacia que se tiene con este fármaco administrado de manera única en cuanto a la cura del cáncer colorrectal, en etapas tardías las tasas de respuestas favorables de los pacientes son de entre 10 y 15%. (45)

Debido a los mecanismos de acción tan inespecíficos, estos antitumorales afectan de igual manera a células tumorales y normales ya que no existe un criterio de especificidad más allá de la velocidad de replicación, por lo que el criterio de riesgo-beneficio es muy alto. Se han reportado diferentes efectos secundarios causados por estos fármacos que afectan la salud, como sistema inmunológico y tejidos con tasas de recambio más acelerado (Epitelio bucal, revestimiento del tracto

gastrointestinal, folículos pilosos del cuero cabelludo y la médula ósea). Dichas afectaciones son apreciables en los pacientes bajo tratamiento, ya que son personas que pierden el cabello fácilmente, presentan frecuentes cuadros de náuseas y vómito, pérdida del apetito, llagas bucales, diarrea y baja de las defensas frecuentemente acompañada con anemias. (43)

En general, se ha detectado que la quimioterapia ha fallado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, como mama, ovario y colorrectal en pacientes en etapas finales de la enfermedad (46), atribuido al desarrollo de cepas multirresistentes.

De los mecanismos más estudiados, se ha descubierto que una sobreexpresión de una proteína extra membranal llamada biglicano (BGN) está relacionado con la evasión al sistema inmune y a los fármacos antitumorales.

La sobreexpresión de esta proteína induce la activación de la vía NF-kB (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas) promueve la progresión del cáncer, siendo una pieza fundamental en el desarrollo de la enfermedad. (47)

Etapa	0	I	II	III	IV
Tratamiento local	Cirugía	Cirugía	Cirugía laparoscópica	Cirugía	Cirugía de metástasis
Tratamiento quimioterapéutico	No necesario	No necesario	5- FU, Leucovorin, Oxaliplatino	5- FU y leucovorin. 5-FU y capecitabina, FOLFOX, CapeOx.	Capecitabina, Cetuximab, Irinotecán, Panitumunab, Regorafenib, 5-FU +Leucovorín, FOLFOX, FOLFOXIRI, CapeOx

Tabla 1: Etapas de desarrollo de CCR y tratamientos utilizados: 5- FU, 5 fluoro uracilo; Cape OX, Capecitabina + Oxaliplatino; FOLFIRI, 5-FU +Leucovorin + Irinotecán; FOLFOX, 5- FU + Leucovorin + Oxaliplatino; FOLFOXIRI, 5- FU+ Leucovin + Oaliplatino + Irinotecán. Tabla obtenida desde American Cancer Society (ACS) What is colorectal cancer? Revisado el 25 de junio de 2019 desde <http://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html>

1.6 Nanotecnología

La nanotecnología es la ciencia que se encarga del estudio de estructuras extremadamente pequeñas, con un tamaño entre 0.1 a 100 nm. La nanomedicina es una ciencia con aplicaciones y mejoras relativamente nueva ya que su crecimiento de manera exponencial y aplicaciones comenzaron hace unas 4 décadas. (70)

Uno de los campos que más se han desarrollado en el tema es el de las nanopartículas. Ya que se enfoca en el estudio y manufacturación de diferentes materiales como metales, moléculas orgánicas etc, para modificar propiedades fisicoquímicas en materiales con dimensiones nanométricas (48)

Dentro de los nanomateriales se incluyen estructuras como partículas, fibras, y tubos, materiales compuestos y nanoestructurados, superficies, etc. Con una dimensión menor a 100 nm.

A lo largo de las últimas décadas, el interés por los nanomateriales con características fisicoquímicas específicas ha crecido de manera exponencial, esto por el gran número de aplicaciones que se están desarrollando, así como el creciente número de productos comercializados hoy en día. (49)

1.7 Nanopartículas de plata (AgNPs)

Uno de los grupos de nanoestructuras que más se han desarrollado son las nanopartículas de plata (49) debido a que estas poseen propiedades fisicoquímicas únicas incluyendo alta conductividad eléctrica y óptica, propiedades superficiales de mayor extensión, estabilidad química, actividad catalítica, relaciones de área de superficie mejoradas y separación energética de los niveles electrónicos. (56)

Las nanopartículas de plata (AgNPs), han sido ampliamente utilizados en productos industriales, domésticos y relacionados con la medicina, también llamada nanomedicina, debido a su actividad antimicrobiana. Con el aumento de la exposición de los seres humanos a las AgNPs, el riesgo de efectos secundarios por parte de la acumulación, efectos citotóxicos agudos o prolongados, incrementan.

A pesar de que se conocen los efectos antimicrobianos eficaces, no se han estudiado a profundidad los posibles efectos que estas puedan causar en la salud humana después de su exposición. (50)

Las evaluaciones de riesgo de las AgNPs están diseñadas para probar sus efectos biológicos, posibles mecanismos y enfoques eficientes para disminuir sus efectos negativos. La nanotoxicidad se centra en probar los efectos biológicos, y es fundamental para comprender los mecanismos de acción y predecir los posibles efectos adversos de los AgNPs para un desarrollo sustentable en el futuro. (50)

Artículos recientes de diferentes grupos a nivel mundial han probado la efectividad que tienen diferentes formulaciones de AgNPs contra enfermedades de diferentes etiologías, tales como parasitarias como amibiasis y giardiasis (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*) (51), de origen bacteriano (52), víricas como Hepatitis A, B (53), VPH, VIH, virus de la mancha blanca del camarón (54), enfermedades fúngicas por microorganismos oportunistas (*Candida sp*), contra el tratamiento del pie diabético y sobre todo, el uso de las nanopartículas de plata contra diferentes tipos de cánceres. (55)

A pesar de que se han demostrado los beneficios que este tipo de tratamientos, recientes estudios han reportado los efectos tóxicos de las nanopartículas bajo ciertas condiciones experimentales. En particular los efectos secundarios, así como los efectos deseados, de las AgNPs dependen de determinadas características en la formulación de las nanopartículas. Dentro de estos rubros se tienen descritos 4 importantes características que confieren sus propiedades citotóxicas son: 1) tamaño, 2) recubrimiento, 3) tiempo de exposición, 4) modelo celular. (57)

El tamaño de la nanopartícula es crucial para el potencial citotóxico de la misma, debido a que dependiendo de este será la facilidad que tendrá para atravesar las diferentes membranas celulares. (57)

Los nanomateriales, una vez inhalados, ingeridos, o administrados de manera tópica o intravenosa, pueden ser transportados a través de la sangre o acumulados en diferentes órganos. Estudios en modelos animales han demostrado que las

AgNPs pueden estar localizadas en sangre circular y en el Sistema nervioso central (SNC), induciendo reacciones inflamatorias en vías pulmonares y problemas cardiovasculares y más allá de acumularse en órganos como, hígado, hígado, nódulos linfáticos y médula ósea. (58)

Se sabe que existen diversas rutas de ingreso de las nanopartículas al cuerpo siendo las principales la vía respiratoria, gastrointestinal, y tópica. La mayoría de estas están mediadas por células epiteliales, células del sistema inmune y por medio de células acarreadoras en el torrente sanguíneo, como los macrófagos. (59)

Dado que las membranas celulares permiten la difusión simple de moléculas pequeñas como O₂, CO₂, H₂O y moléculas orgánicas hidrófobas no polares. También se ha descrito que la internalización de moléculas más complejas como lípidos, glucosa y diferentes materiales particulados de entre 10 y 30 nm, se internan por vías de transporte activo conocidas como fagocitosis y pinocitosis. (59)

Ambos mecanismos de recaptura son realizados por tipos especializados de células como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliales; con el fin principal de ingresar moléculas eléctricamente cargadas, tamaños superiores a moléculas simples como gases o agua y que necesitan un transportados membranaral. Ambos se caracterizan por la inclusión de trozos invaginados de membrana celular conocidos como vesículas, que se adentra al citoplasma y donde acarrea el cargo. (59)

La pinocitosis se puede dividir en 4 categorías: 1) macro pinocitosis (mecanismo de internalización mediada por actina e iniciada por la invaginación de la membrana seguido por la formación de las vacuolas), 2) Endocitosis mediada por clatrina, también conocida como endocitosis mediada por receptor cuya iniciación se da por la interacción ligando recepto y seguida con la internalización de la membrana incluyendo al receptor específico. 3) Endocitosis mediada por caveola (Internalización de ligandos extracelulares y biomoléculas a través de invaginaciones en forma de matraz llamadas caveolas, que consiste en caveolina, proteína unida a colesterol. Y por último 4) Endocitosis no mediada ni por clatrina ni caveolina. (60)

El tamaño de las nanopartículas es el rubro principal que afecta la captura. Se sabe que las nanopartículas catiónicas y neutrales son eficientes transportadas a las células. Las nanopartículas catiónicas tienen una mayor absorción que las neutrales mientras que las neutras son mayormente endocitadas por vía de la caveolina.

La forma también es un parámetro importante, ya que las NP son en su mayoría de forma esférica, teniendo mayor probabilidad de internalización con respecto a las asimétricas. Sin embargo, esto no es una regla general en todos los tejidos corporales, ya que se ha visto de manera experimental que las células pulmonares internalizan de mayor y mejor manera las NP con formas discales. Mientras que las células pulmonares prefieren internalizar (61).

Las células de cáncer de mama y colon prefieren las formas esféricas.

De manera experimental, se ha evaluado la significancia del tamaño de la nanopartícula y su efecto citotóxico. De acuerdo con los resultados obtenidos por diferentes estudios de trabajo, se ha demostrado que en líneas celulares humanas, las nanopartículas con tamaños de entre 5-30 nm son las que poseen un mayor potencial citotóxico. (62) Esto no es una regla general, ya que los resultados varían dependiendo del tipo celular con el que se estudie.

Otro rubro importante para evaluación de la formulación de las AgNPs y su interacción con los modelos biológicos es el recubrimiento.

El recubrimiento de las AgNPs es fundamental en la formulación de estas, ya que estas confieren estabilidad al núcleo metálico que las componen. Existen diferentes tipos de recubrimientos que se usan actualmente en el desarrollo de las NPs, siendo de los más utilizados el Polietilenglicol (PEG), diferentes tipos de citratos, Polivinilpirrolidona (PVP) ya que son los únicos aprobados por la FDA como excipientes recomendados para consumo humano en la industria farmacéutica. (62)

El papel principal del recubrimiento en las nanopartículas es el de conferir la estabilidad necesaria al metal que contienen, evitar que este reaccione de manera descontrolada con el medio que los rodea.

1.7.1. Polivinilpirrolidona en síntesis de Nanopartículas de Plata

La síntesis coloidal ofrece una ruta a las nanopartículas con composición controlada y características estructurales de la misma. Esta perspectiva describe el uso de la PVP para obtener dichas estructuras. La PVP puede servir como estabilizador de superficie, modificador de crecimiento dispersante de nanopartículas y agente reductor. Todo ello depende de las características experimentales en la síntesis.

Estas propiedades surgen a partir de la naturaleza anfifílica (molécula con una parte polar y una no polar) de las moléculas de PVP junto al peso de la cadena molecular que conforma al polímero.

La síntesis coloidal ofrece una ruta a las NPs con composición controlada y características estructurales determinadas. Esta prospectiva describe el uso de la PVP para obtener dichas nanoestructuras.

Se le atribuye a la PVP estas cualidades de modificación de la superficie, pero no se limita solo a ello, ya que se siguen estudiando los efectos citotóxicos por parte de este excipiente tan utilizado en la industria farmacéutica. (63)

1.7. 2. Citotoxicidad de Nanopartículas de Plata

Una de las ventajas más fuertes que se han encontrado en el uso de las AgNPs en contra de líneas celulares tumorales es que no siguen un mismo mecanismo de acción, como en el caso de las moléculas quimioterapéuticas convencionales. (64)

Uno de los mecanismos más estudiados con respecto al mecanismo de citotoxicidad es el de sobre producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

De manera natural, en las mitocondrias de las células, el ATP (Adenosintrifosfato) se sintetiza a partir de la recepción electrónica del O₂ a través de una secuencia de reacciones de tipo Red-Ox. Durante este proceso, un pequeño porcentaje del oxígeno reaccionante, no se reduce completamente, dando como resultado la formación de radical anión superóxido (O₂^{•-}) y posteriormente radicales con átomos

de oxígeno altamente reactivo. Así, los ROS son subproductos del metabolismo oxidativo, cuya gran parte se realiza en la membrana mitocondrial.

La transición de metales como el cobre, hierro, pueden participar como catalizadores naturales durante las reacciones Red-Ox. La sobreproducción de ROS puede producir inducir estrés oxidativo, que a menudo resulta en el fallo del mantenimiento de las funciones fisiológicas normales de las células y su desarrollo. El daño en la función celular y desarrollo incluye la modificación oxidativa de proteínas por la oxidación de aminoácidos, iniciación de lipoperoxidación en las membranas celulares, provocando su inestabilidad estructural, ruptura de las cadenas de DNA y modificación de ácidos nucleicos, modulación de la expresión de genes a través de factores de transcripción sensibles a Red-Ox y modulación de la respuesta inmunitaria a través de señales de transducción. Todo esto para guiar a la célula a la muerte y/o efectos genotóxicos. (64)

Contrario a las células normales, las células cancerígenas experimentan un incremento en la generación de ROS y estrés oxidativo, resultando en la estimulación de proliferación celular, mutaciones genéticas e inestabilidad cromosómica. Así, estructuras químicas que puedan causar un incremento significativo en los niveles basales de ROS, pueden ser utilizados como potenciales medicamentos para uso quimioterapéutico. (65)

Los bajos niveles de ROS son necesarios para mantener los procesos de transducción, y por lo tanto el funcionamiento normal de la célula. En condiciones fisiológicas normales las ROS son fácilmente controladas por los sistemas antioxidantes endógenos como el Glutación (GSH) y enzimas antioxidantes manteniendo un equilibrio químico entre especies reactivas y moléculas antioxidantes. (67)

Diversos autores refieren que la citotoxicidad de las AgNPs es debida a la naturaleza de la plata iónica. (68)

Dichos iones de plata (Ag^+) son liberados del núcleo de la NP por deficiencias en la capa de recubrimiento, ya que la plata metálica, al entrar en contacto con el medio

acuoso, forma de manera rápida óxido de plata (Ag_2O), que entra en equilibrio con las especies reactivas producidas de manera general. Las propiedades catalíticas de la plata propician la sobre producción de ROS por medio de reacciones tipo Fenton y reacciones Heiber-Weiss (69)

Las particularidades fisicoquímicas estructurales dominantes determinantes en la generación de ROS y citotoxicidad incluye tamaño molecular, recubrimiento, estado de oxidación del metal, área de contacto, especies de unión en la superficie, solubilidad, grado de agregación y aglomeración.

A través de estas determinantes intrínsecas ciertos materiales pueden estimular o generar inflamación que química o catalíticamente convertir en oxidantes menos tóxicos, como radical anión superóxido y peróxido, en radicales libres más reactivos como radical hidroxilo. (64)

1.8 Efectos Genotóxicos de las Nanopartículas de Plata

La genotoxicidad es la capacidad de un material para producir daño a la célula a través de la interacción directa con el material genético de la misma. El daño al material genético puede ocasionar mutaciones o lesiones que a célula no puede reparar, causándole la muerte.

Se han descrito diferentes mecanismos de interacción de las AgNPs con el material genético, siendo los más relevantes la interacción directa (66) y a través de la producción de ROS (64)

Aunado a estos mecanismos de interacción directa con los grupos nucleofílicos, grupos de investigación como el de Ahamed *et al*, han reportado que el potencial genotóxico demostrado por la regulación al alza de genes de supresión tumoral como p53 con nanopartículas de cobre y plata. (67) Mientras que las nanopartículas de TiO_2 inducen la ruptura de la doble cadena y los daños oxidantes evitan la reparación por las células. (68).

De acuerdo con los estudios de *Verano Braga et al*. El tamaño de la nanopartícula está directamente relacionado con los efectos citotóxicos que producen. De acuerdo

con este autor, las nanopartículas que tienen un tamaño mayor a 100 nm, al estar impedidos estéricamente por las membranas celulares y propiciar que esta gaste energía para su internalización, las rutas de muerte utilizadas no son de manera directa como las de tamaños inferiores, sino que afectan rutas de señalización pro apoptóticas como MAPK. Lo que regula de manera no directa la transcripción de genes.

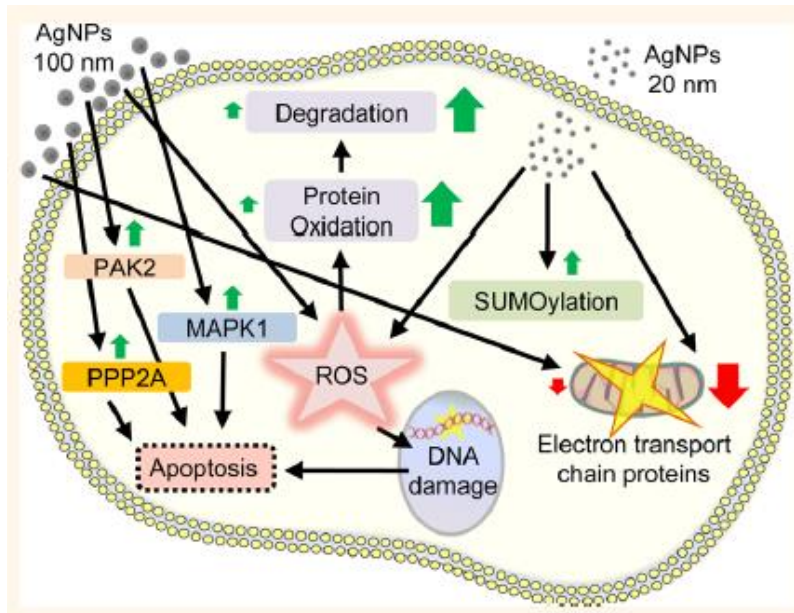


Figura 11: Mecanismos de acción propuestos como posibles causantes de nanotoxicidad en células animales. Los mecanismos más estudiados son el de generación de ROS, inhibición de la cadena de transporte de electrones al abatir el potencial de membrana mitocondrial. Otro de los mecanismos ejemplificado es el de interacción directa con el DNA y membranas celulares lo que produce una muerte por apoptosis o necrosis. También se relaciona que el incremento del tamaño en las nanopartículas dificulta su ingreso al interior de la célula.

Teniendo como antecedentes todas las referencias anteriores, se presume que las nanopartículas de plata probadas en este ensayo obtendrán resultados similares o superiores a las diferentes formulaciones de nanopartículas reportadas en la literatura. Específicamente en las características de mayor selectividad, menor citotoxicidad y evaluar si estas siguen los mecanismos descritos en artículos revisados.

2.0 Justificación

La utilización de las Nanopartículas de plata para tratar diversas enfermedades de tipo crónico degenerativas, incluyendo algunos tipos de cáncer, ha sido estudiada ampliamente, demostrando en varios casos efectividad satisfactoria al reducir la viabilidad de las células cancerígenas en modelos *in vitro*.

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, las nanopartículas de plata (AgNPs) presentan tratamiento prometedor para tratar de resolver el problema de salud pública que es el cáncer de colon a nivel mundial. Esto debido a que no presentan un mecanismo único de acción, por lo cual es mucho más difícil que las células cancerígenas desarrollen algún tipo de mecanismo de resistencia.

De la misma manera, se ha probado la citotoxicidad de las nanopartículas en cultivos primarios de diferentes órganos de modelos murinos, resultando en su mayoría no tóxicas para las células en concentraciones bajas, con respecto a los fármacos de primera línea, lo cual nos podría ofrecer una ventana terapéutica mucho más amplia.

3.0 Hipótesis.

De manera general se espera que las nanopartículas de plata presenten una actividad terapéutica en contra de la línea celular de carcinoma colorrectal humano HCT- 15 de una manera dosis-dependiente.

4.0 Objetivos

4.1 GENERALES

Evaluar si al menos una de las AgNPs de venta comercial Argovit™ poseen efecto anti proliferativo al estar en exposición con la línea tumoral de carcinoma colorrectal HCT-15.

4.2 PARTICULARES

- Evaluar si el efecto antiproliferativo se da de una manera dosis-dependiente y así poder evaluar una IC₅₀ para cada una de las formulaciones.
- Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de manera general en el interior de la célula.
- Evaluar si existe un aumento de ROS localizados en la mitocondria.
- Evaluar si las células expuestas a las nanopartículas de plata expresan algún tipo de marcadores apoptóticos.
- Evaluar si las células expuestas a las nanopartículas expresan algún tipo de marcador que indique procesos de necrosis.
- Determinar cuál de las formulaciones es la que causa una mayor cantidad de muerte por apoptosis y necrosis.
- Discernir entre todas las formulaciones para evaluar cual es la(s) formulación(es) que podrían ser utilizadas como posible(s) tratamiento(s) contra el cáncer colorrectal.

5.0. Metodología y materiales.

5.1 Nanopartículas de plata Argovit™

Las AgNPs utilizadas durante los ensayos de citotoxicidad del presente trabajo, fueron proporcionadas por la Dra. Nina Bogdanchikova del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN, Ensenada Baja California, UNAM) quien las desarrolló en colaboración con el Dr. Alexey Nikolaevich Pestryakov y el Dr. Vasily Burmistroy en la Universidad Politécnica de Tomsk, Rusia y actualmente se producen en el Centro de Investigación y desarrollo Vector-Vita, Rusia.

Como características principales se ha determinado su tamaño por medio de TEM (Transmission Electron Microscopy) y por la técnica de DLS (Dynamic Light Scattering) La suspensión se encuentra al 20% m/m la cual consiste en 1.2% de Ag metálica y 18.8 % de Polivinilpirrolidona (PVP). La concentración de la suspensión stock es de 12mg/mL de plata metálica (5.6mM) en la solución más concentrada. Las nanopartículas de plata se mantienen a 4°C en condiciones de oscuridad evitando la agitación para evitar la oxidación de la plata y aglomeración de las NPs.

La preparación de las diluciones de trabajo se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

Las 4 formulaciones de nanopartículas que se utilizaron se diluyeron a partir de la solución stock (12mg/mL), tomando 50 µL y aforando a 500 µL con agua destilada, así sucesivamente hasta una concentración final de 0.6 µg/mL.

5.2 Mantenimiento de la línea celular HCT-15

Todos los ensayos con células se realizaron bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

La línea celular de carcinoma colorrectal humano HCT.15 fue adquirida del Colección Estadounidense de Cultivos Celulares (ATCC® CCL-225™). Las células fueron sembradas en cajas Petri de 10 cm con medio RPMI- 1640 (Millipore, EUA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB; Biowest, Estados Unidos) y 0.01% de antibiótico-antimicótico (Streptomycina y penicilina G: Biowest, Estados Unidos) a 37°C y una atmósfera con 5 % de CO₂ y humedad al 75%.

Después de 48 h, o en cuanto la confluencia celular en la caja Petri alcanzaba el 80% se les retiró el medio con micropipeta sin dejar a sequedad, se les agregó 1 mL de Tripsina-EDTA al 0.05% (Biowest, Estados Unidos), y se incubaron 5 min a 37°C. Posteriormente se detiene la reacción de la tripsina con medio RPMI-1640 suplementado.

Una vez que las células son resuspendidas en el medio de cultivo se realiza un pase agregando 1–2 mL de la suspensión de células en otra caja Petri con 10-20 mL de medio RPMI-1640 suplementado.

La viabilidad de las células fue evaluada por el método de exclusión con azul de Tripán (Sigma Aldrich, Estados Unidos) cuyo conteo se realizó en microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania) en un aumento de 10X.

5.3 Ensayos de Citotoxicidad

Se siembran 10,000- 20,000 células HCT-15 por pozo en cajas de 96 pozos (Biologix, Estados Unidos) con 190 μ L de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado y se dejan adherir por 24 h a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se adicionaron 10 μ L de suspensión de AgNPs a concentraciones de 5.6 mM, 0.56 mM, 56 μ M y 5.6 μ M (600, 60, 6, 0.6 μ g/mL de AgNPs) por triplicado. Como control negativo se tomaron los pozos con células sin tratamiento con medio RPMI- 1640 suplementado y como control positivo de dilución se utilizaron los pozos con solución salina fisiológica (SSF). Finalmente se incuban a 37°C y 5% de CO₂ por 24 h.

Transcurrido el periodo de incubación se agregó el colorante de exclusión vital azul Tripán (Biomedics) (1 μ L de solución 1:10) y se fijan las células con 10 μ L de formaldehído al 37%.

Se realizó el conteo de las células en una cámara de Neubauer (Brigh-Line Hematocytometer, Estados Unidos) en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania) en un aumento de 10x contando las células vivas solamente. Se realiza por triplicado.

Se realizó el análisis con ayuda del programa Graphpad Prism 6.0. (Graphpad Prism, San Diego, CA) Utilizando un análisis ANOVA de dos vías seguido de un tratamiento *post hoc* de Tukey para encontrar las diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.

5.3.1 Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀)

Utilizando los datos de conteo por triplicado se realiza la determinación de la IC₅₀ con ayuda de un programa estadístico PROBIT que funciona tomando el porcentaje de células muertas a un tiempo determinado con respecto a un control negativo y graficar esta función en contra del logaritmo de la concentración linealizando esta para predecir el comportamiento de muerte para cada concentración utilizada.

5.4 Citometría de flujo

Para los ensayos de citometría de flujo se utilizaron diferentes kits, especies reactivas de oxígeno totales (CMFDA, Invitrogen, 5791 Van Allen Way Carlsbad, CA 92008 Estados Unidos), ROS en mitocondria (Mitosox, Invitrogen, Thermofisher Scientific, Estados Unidos) y marcadores de apoptosis/necrosis (Anexina V/ Yoduro de Propidio, Invitrogen Life Technologies Corporation, Estados Unidos).

5.4.1(CMFDA) Kit Ensayo para detección de Especies reactivas de Oxígeno Celulares

El ensayo para detección de especies reactivas de oxígeno se llevó a cabo de la misma manera que el ensayo de citotoxicidad, colocando 10-20,000 células/pozo con 190 µL de medio RPMI-1640, suplementado con el 10% de SFB y 0.01% de Antibiótico antimicótico.

Se estimulan a las células utilizando la IC₅₀ de AgNPs obtenida a partir de los ensayos de citotoxicidad, realizando un ensayo independiente por triplicado. Como control de ROS se utilizó un estímulo de H₂O₂ al 3%.

La tinción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen Thermofisher, Estados Unidos). Brevemente se agregó 1µL de CMFDA para una concentración final de 20µM y se incuban las células por 30 minutos a 37°C.

Una vez realizada la tinción se llevó a cabo la lectura en el citómetro de flujo (Attune NxT acoustic Focusing Cytometer, Estados Unidos) a 485/535 nm (36)

5.4.2 Detección de Especies Reactivas de Oxígeno mitocondriales (MitoSOX)

Se siguió la metodología de los ensayos de citotoxicidad utilizando como control positivo la IC₅₀ de carboplatino, medicamento antitumoral de primera elección.

La tinción de la línea celular se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen Thermofisher, Estados Unidos) agregando 1 µL de la solución de tinción de MitoSOX para una concentración final de 10 µM en condiciones de esterilidad, e incubando la placa de 96 pozos por 20 minutos a temperatura ambiente.

Ya realizada la tinción se leyó la placa con el citómetro de flujo (Attune NxT acoustic Focusing Cytometer, Estados Unidos) a una longitud de onda de 568 nm.

5.4.3 Marcadores de Apoptosis/ Necrosis (ANEXINA V/ Yoduro de Propidio)

El ensayo se realizó siguiendo el mismo procedimiento que en los ensayos de citotoxicidad. Se utilizaron como controles positivos de apoptosis 3 pozos que contenían 150 µL de la suspensión de células adicionado 50 µL de solución salina isotónica con el objetivo de inducir apoptosis por la disminución de nutrientes en el medio de cultivo suplementado.

Como control positivo se utilizaron de 50 µL con la suspensión de células y 150 µL de buffer de unión.

El ensayo se llevó a cabo a 24 h en presencia del estímulo de plata a las diferentes concentraciones, cada una por triplicado.

Para realizar la tinción con Anexina V y Yoduro de Propidio se siguieron las instrucciones del proveedor (Invitrogen Thermofisher, Estados Unidos). Se agregaron 20 µL de buffer de unión a cada uno de los pozos de la placa en una concentración de 1X e inmediatamente se agregaron los colorantes Anexina V y PI en un volumen de 1 µL cada uno. Una vez agregados se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos.

Acabado el tiempo de tinción requerido, la placa fue fijada con 20 µL de formaldehído al 37% y se realizó la lectura de las placas en el citómetro de flujo

(Attune NxT acoustic Focusing Cytometer, Estados Unidos) a 530 nm para AV y 575 nm para PI. (37)

5.5 Caracterización de las nanopartículas de plata Argovit

5.5.1 Microscopía de Transmisión Electrónica TEM

Hay que diluir una cantidad muy pequeña de muestra en un disolvente orgánico que no afecte la medición, habitualmente diclorometano o acetona. A continuación, se busca la máxima dispersión utilizando sonicación a bajas frecuencias y, al cabo de un tiempo se deposita una gota de la muestra sobre una rejilla filmada con carbono para ser observada directamente, una vez que esta se haya secado.

5.5.2 Determinación de composición por UV- vis

Se necesita realizar la calibración del espectrofotómetro y las lámparas necesitan calentarse por un periodo de alrededor de 20 min para estabilizarlos.

Llenar una celda de cuarzo con el solvente de la muestra y asegurarse de que el exterior se encuentra libre de partículas que puedan interferir con la medición. Manipular la celda procurando que las caras a ser leídas no se ensucien con ningún elemento del cuerpo o las manos. Realizar la medición y calibrar a 0 con el blanco.

Colocar las muestras de interés a diferentes concentraciones, procurando que la muestra no se observe demasiado turbia, siempre cubriendo la cubeta de cualquier fuente de luz para evitar falsos negativos o positivos. Por ultimo se debe ajustar el espectro de longitud de onda en 400-600 nm para el caso de la plata. Se deben realizar al menos 4 determinaciones a diferentes concentraciones de la muestra para tener un margen de error.

6.0 Resultados.

6.1. Cultivo celular

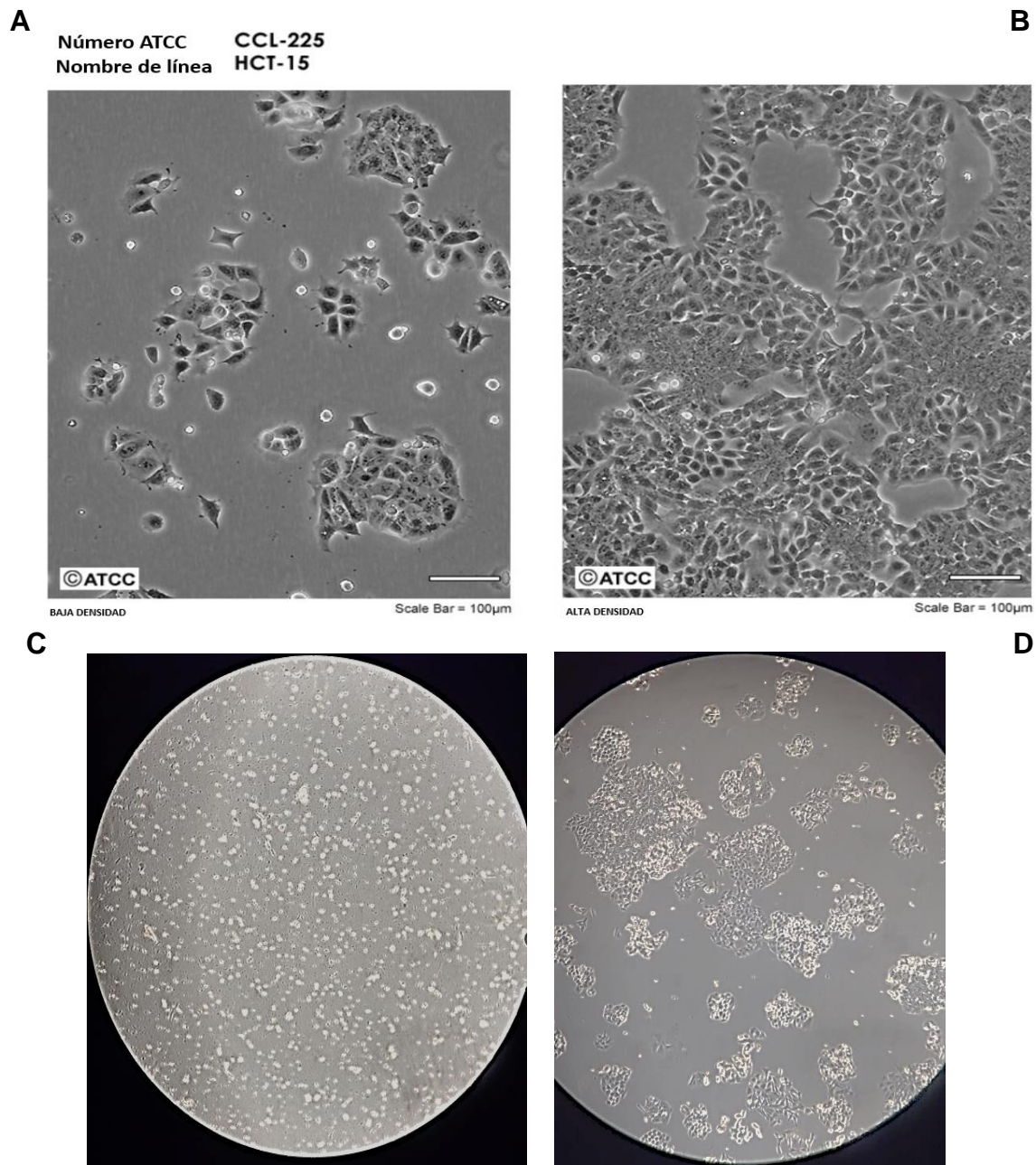


Imagen 1: A) Morfología de la línea celular HCT-15 en baja confluencia; B) Morfología de la línea celular HCT-15 en alta confluencia; C) Morfología HCT-15 experimental a 24 h de incubación; D) Morfología línea HCT-15 experimental a 48 h de incubación. Imágenes obtenidas desde HCT-15 (ATCC® CCL-225™) hoja de seguridad.

El mantenimiento de la línea celular HCT-15 se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la ATCC donde fueron adquiridas como se describe en la metodología.

En La imagen 1C y 1D, se observan células HCT-15 después de 24h y 48h de incubación a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de HR. En la imagen 1A y 1B se muestran los datos proporcionados por la ATCC, en donde se observa el crecimiento y morfología ideales de crecimiento bajo las condiciones del protocolo.

Como se puede observar en las imágenes anteriores, se tiene una morfología similar a niveles de confluencia similares entre los experimentos realizados y lo reportado por el proveedor, por lo que podemos inferir que el crecimiento se realizó de forma correcta.

6.2. Caracterización por TEM

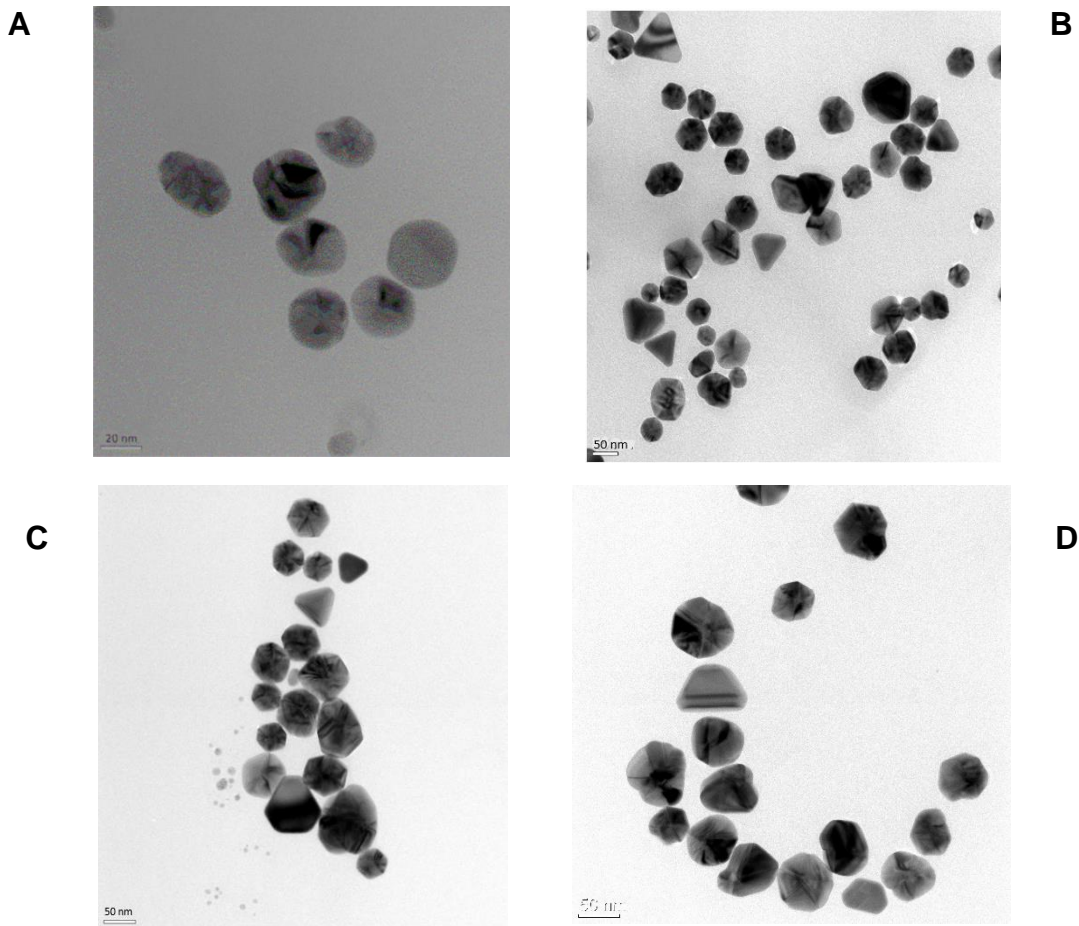


Imagen 2: Imágenes HR-TEM de las diferentes formulaciones probadas. A) Ag7, tamaño promedio de 32 ± 4 nm. B) Ag8, tamaño promedio de 70 ± 15 nm de diámetro. C) Ag9, tamaño promedio de 60 ± 16 nm. D) Ag10, tamaño promedio de 66 ± 9 nm.

Las NPs utilizadas en este trabajo presentan en su mayoría una forma semiesférica, como se muestra en la imagen 2. El tamaño de las NP se encuentra en el intervalo de 32 a 70 nm. Las NPs más pequeñas se presentan en la formulación Ag7 con un tamaño promedio de 32 ± 4 nm. El resto de las formulaciones presentan un tamaño más homogéneo. Las dimensiones de las NPs de cada formulación se obtuvieron analizando las micrográficas con el procesador de imágenes ImageJ. Los diámetros obtenidos con esta técnica sólo permiten identificar la plata metálica.

6.3 Caracterización por espectro ultravioleta

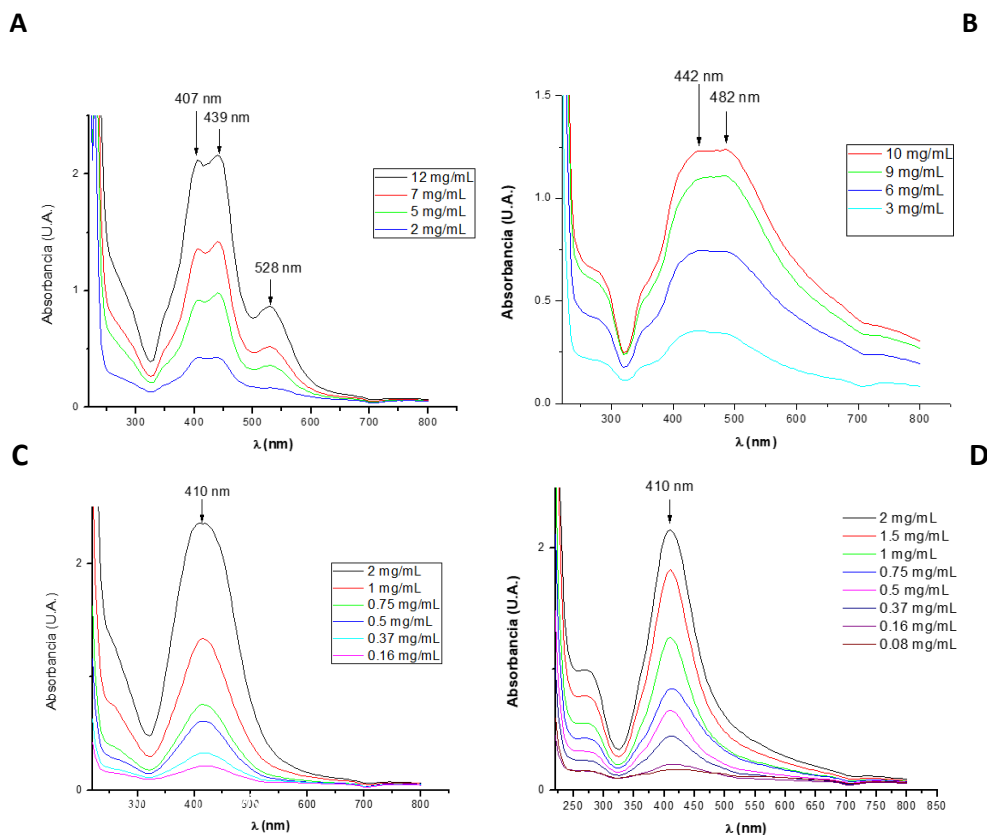


Imagen 3: Imágenes correspondientes a los espectros ultravioleta visibles para las formulaciones de nanopartículas Argovit™ obtenidos a diferentes concentraciones en agua. A) Ag7, B) Ag8, C) Ag9, D) Ag10.

Los espectros de UV-vis son una herramienta sencilla para identificar la formación de nanopartículas de plata analizando el plasmón de superficie que aparece entre los 200 y 500 nm. La imagen 3 muestra los plasmones superficiales de cada formulación. El plasmón es una huella digital de la nanopartícula que permite identificar el comportamiento de la superficie de la nanopartícula, su homogeneidad respecto a la cristalinidad en el acomo del metal. Se grafica la absorbancia obtenida en unidades de absorbancia (UA) en función de la longitud de onda (nm) a diferentes concentraciones registradas en mg/mL. El espectro UV-vis de la formulación Ag7 presenta con 3 picos máximos de absorbancia en 407, 439 y 528 nm, muy probablemente por tener una distribución con dos poblaciones de NP con tamaño diferente pero que en promedio generan los 32 nm observados en el TEM. El espectro de absorbancia de la formulación Ag8 presenta un máximo de absorbancia en 442 y otro en 482 nm. Finalmente, los espectros de las formulaciones Ag9 y Ag10 presentan un

solo máximo de absorbancia a 410 nm, lo que sugiere una homogeneidad en su superficie y una población con un tamaño muy similar como se muestra en el TEM.

6.4. Resultados de termogravimetría

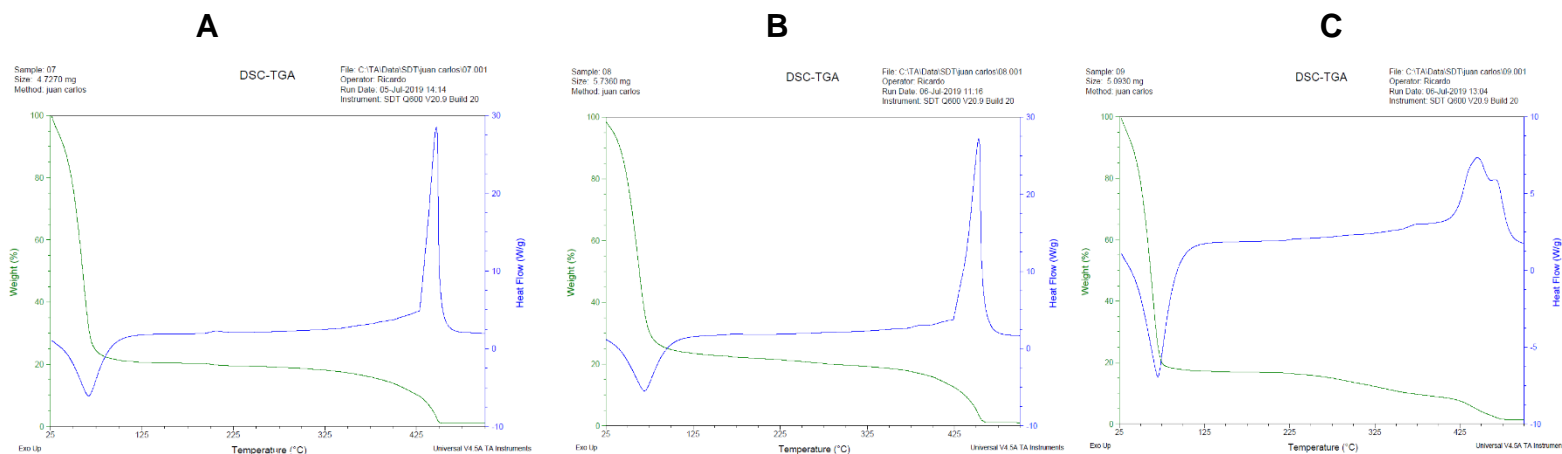


Imagen 4: Resultados de los espectros de termogravimetría de para evaluar la composición de las formulaciones de las AgNPs. En las imágenes A (Ag7), B (Ag8) y C (Ag9 y Ag10)

Los análisis termogravimétricos se realizaron para identificar la composición de diferentes formulaciones evaluadas. Los diagramas muestran en línea verde la pérdida de masa en función de la temperatura, mientras que la línea azul muestra el flujo de calor, esto, si el sistema analizado absorbe (endotérmico) o libera (exotérmico) durante el calentamiento. La evaporación del agua se presenta cerca de los 100°C en todos los casos como un proceso exotérmico. Por otro lado, la descomposición y evaporación del polímero se presenta como un proceso endotérmico (valores positivos para el flujo de calor, línea azul).

La línea verde de las tres gráficas representa la pérdida de peso en la composición de la suspensión. Se observa que el porcentaje perdido a los 100°C es de aproximadamente 80%, que se asocia a la pérdida de agua que contiene el sistema y que se evapora. A partir de esa temperatura se mantiene una meseta sin cambios aparentes en la pérdida de peso hasta llegar a 425°C en donde se da una pérdida significativa de peso hasta llegar prácticamente a 1%. Esta pérdida de peso se

asocia a la descomposición del recubrimiento de PVP el cual tiene un punto de inflamación reportado de 425°C (78). Este resultado pone en evidencia la proporción de PVP con la que cuentan las formulaciones de las nanopartículas de plata de alrededor del 19%.

Para el caso de las formulaciones Ag9 y Ag10, la pendiente de pérdida de peso con respecto a la temperatura, se puede atribuir al tipo de cadena que tienen y esto hace que el recubrimiento se desnaturalice un poco más rápido en comparación con las otras formulaciones.

6.5 Viabilidad

Para la determinación de la viabilidad después de la exposición a las AgNPs, se realizaron conteos en cámara de Neubauer y se observó que para las formulaciones las formulaciones Ag7 y Ag10, se observa una tendencia dosis- dependiente indicando una disminución de la viabilidad a medida que aumenta la concentración.

Experimentalmente se observó que en la cámara de Neubauer a las concentraciones más altas existían muchos restos de lisis coexistiendo con las células teñidas.

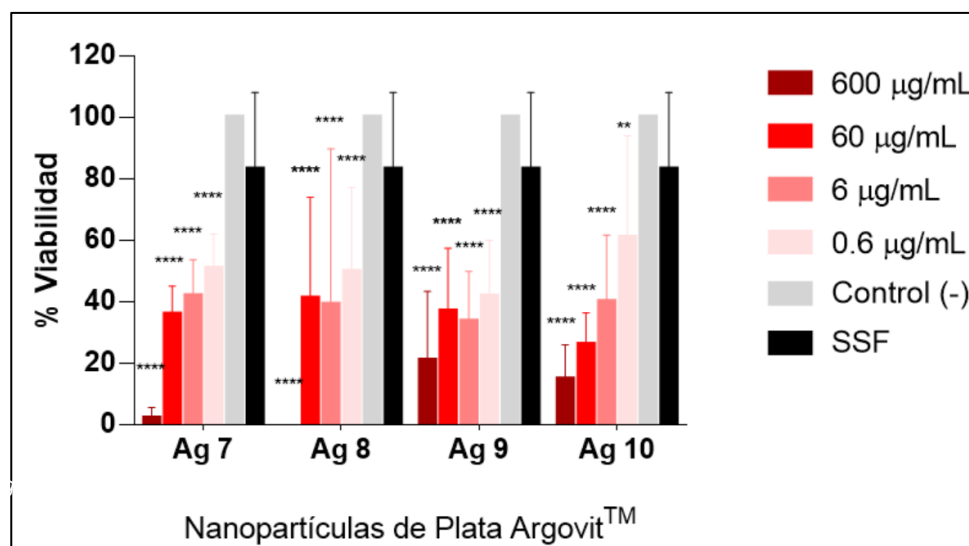


Imagen 5: Actividad antiproliferativa de nanopartículas de plata Argovit™. Los asteriscos sobre las barras representan una diferencia significativa con respecto al control negativo (Utilizando un ANOVA de dos vías y prueba *post hoc* de Tukey)

En la figura se muestran el porcentaje de viabilidad de la línea celular en eje de las abscisas mientras que en eje de las ordenadas las cuatro formulaciones probadas, a las 3 concentraciones planteadas.

Para las formulaciones Ag8 y Ag10, se observa que no se sigue un efecto de dosis dependencia en las concentraciones intermedias ya que el porcentaje de viabilidad incrementa un poco con respecto a las concentraciones de 0.6 y 600 µg/mL, sin embargo, también presentan diferencia significativa con respecto al control negativo.

Las desviaciones son asociadas directamente al operador por el conteo en la cámara de Neubauer.

6.5.1 Determinación de IC₅₀

Una vez realizadas las determinaciones de viabilidad por triplicado, se llevó a cabo la determinación de las concentraciones inhibitorias para las formulaciones Ag7 y Ag10. Debido a su comportamiento diferente a una dosis-dependencia, no fue posible determinar el IC₅₀ para las formulaciones Ag8 y Ag9.

Formulación	IC ₅₀ (µg/mL)
Ag 7	0.68
Ag 10	2.13

Tabla 2: Determinación de la IC₅₀ de las formulaciones 7 y 10. La IC₅₀ fue calculada con un programa Probit (39). En esta se puede observar que los valores de IC₅₀ obtenidos con el programa son similares a las concentraciones más bajas probadas experimentalmente.

6.6 Generación de especies reactivas de Oxígeno en cultivos de HCT-15 tratados con AgNPs

Con la información anterior, se decidió utilizar un intervalo de IC₅₀ que comprendió la mitad de la concentración inhibitoria media ($\frac{1}{2}$ IC₅₀), la IC₅₀ y dos veces la concentración inhibitoria 2 IC₅₀ para evaluar la capacidad de estas formulaciones para incrementar la concentración de especies reactivas de oxígeno.

Por los criterios anteriores, en las formulaciones Ag8 y Ag9 no se determinaron IC₅₀ por lo que para la determinación de especies reactivas se utilizaron las concentraciones de 6, 60 y 600 µg/mL.

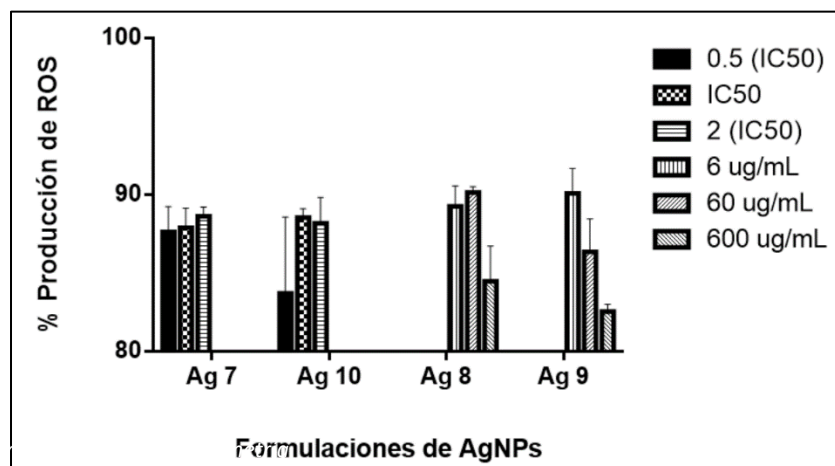


Imagen 6: En la imagen se muestran la representación de los resultados obtenidos en la determinación de ROS intracelulares, teniendo en el eje de las abscisas se encuentra el porcentaje de producción de ROS con respecto a un control positivo de peróxido de hidrógeno al 3%. En el eje de las ordenadas se encuentran las 4 formulaciones a las 3 nuevas concentraciones utilizadas. Las especies reactivas fueron cuantificadas con el fluoróforo CMFDA y leído con el citómetro de flujo.

En la Imagen 5 se observa un incremento de las especies reactivas en todas las formulaciones y a todas las concentraciones probadas. Se observa que el incremento de ROS es muy similar en las 3 concentraciones de la formulación Ag7, mientras que en la Ag8 la concentración de 6 µg/mL es la que provoca un menor incremento de ROS.

Se observa también que en la concentración más baja de la IC₅₀ calculada, existe uno de los incrementos más grandes de ROS de aproximadamente 90%, mientras que en las concentraciones mayores de las formulaciones 8 y 9, se tiene un decremento de la cantidad de ROS con respecto a las concentraciones menores. E incluso en el caso de Ag 9 se puede observar una dosis dependencia inversa a las concentraciones, teniendo la menor producción de ROS en la concentración más alta y la mayor producción en la menor.

6.7 Generación de especies reactivas de Oxígeno localizados mitocondria en cultivos de HCT-15 tratados con AgNPs

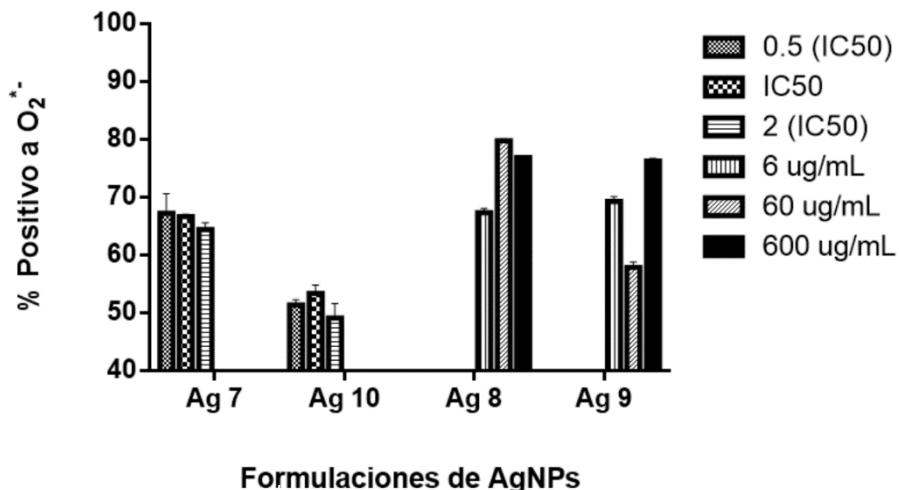


Imagen 7: En la gráfica se muestran los resultados del experimento con MitoSox para la detección del radical anión superóxido localizado en mitocondria.

Se muestran las cuatro formulaciones probadas a las 3 concentraciones determinadas. Se observa que, en todos los casos, las formulaciones logran incrementar en al menos un 50% la concentración de radical anión superóxido comparados con un control positivo de Carboplatino. La formulación Ag8 en la concentración evaluada (60 $\mu\text{g/mL}$) es la que eleva la concentración en un 80%, seguido de Ag9 en las concentraciones 6 y 600 $\mu\text{g/mL}$. La formulación Ag7 incrementa 65% aproximadamente la concentración de esta especie localizada en mitocondria con todas las concentraciones probadas. Por último, la formulación Ag10 es la que produce una menor elevación de la concentración de dicha especie al generar poco más del 50% con respecto al control positivo.

6.8 Marcadores de muerte por apoptosis y necrosis en células HCT-15 de cáncer colorrectal humano

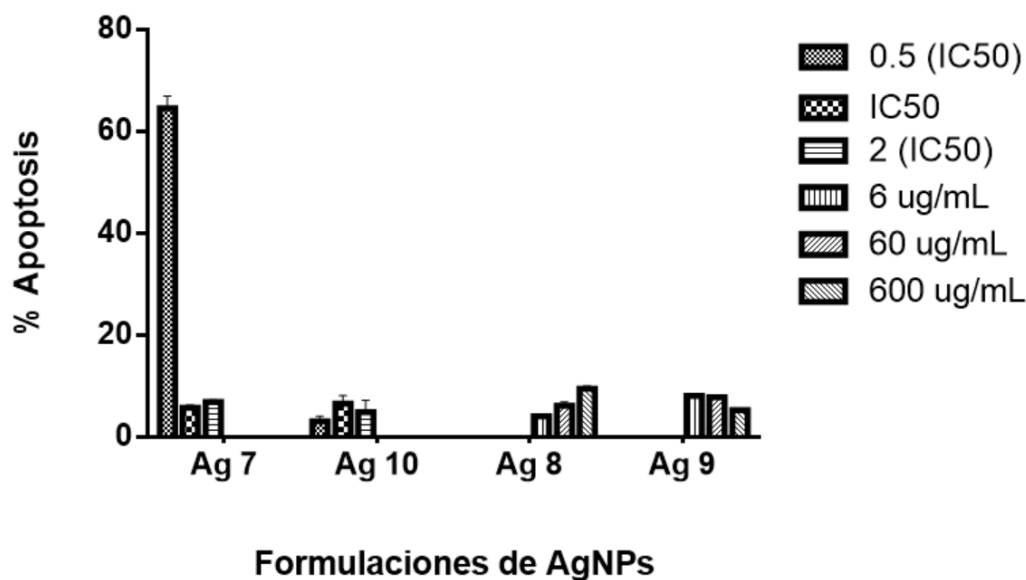


Imagen 8: Gráfica construida a partir de los resultados obtenidos a partir de la interacción de AgNPs con células HCT-15 a 24 h de exposición y teñidos con Anexina V.

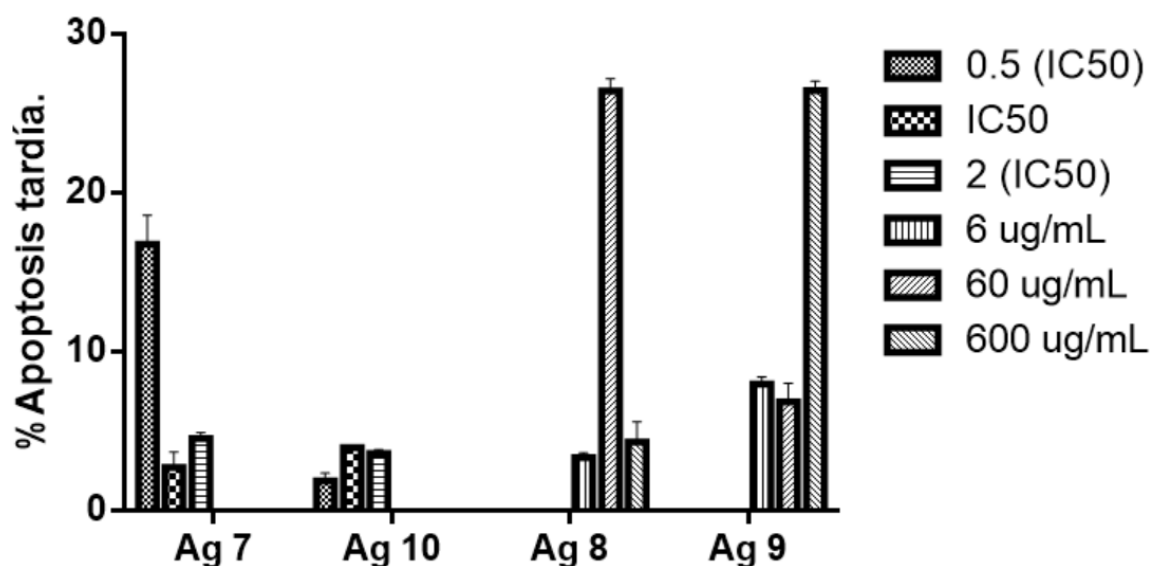
Para el caso de Ag7, se observa un incremento de más de 60% en los marcadores apoptóticos para la concentración de 0.5 IC₅₀. En las concentraciones subsecuentes se observa una disminución del porcentaje de expresión de marcadores apoptóticos en las dos concentraciones subsecuentes, siendo la concentración de 2 IC₅₀ ligeramente mayor a la IC₅₀, en las mismas condiciones experimentales.

En la formulación Ag10 se observa un incremento de marcadores apoptóticos de alrededor de 8%, siendo la IC₅₀ la concentración que más incrementa los niveles; seguido de la 2IC₅₀ y 0.5 IC₅₀, respectivamente.

Los resultados en la formulación Ag8 sugieren un comportamiento de tipo dosis-dependencia, incrementando de manera gradual la expresión de marcadores apoptóticos. En general el incremento se observó alrededor de 5-8% con respecto al control positivo.

En la formulación Ag9 se observa un comportamiento similar a dosis dependencia, pero de manera inversamente proporcional a la concentración, ya que se observa

un incremento a en la expresión de marcadores en la concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con aproximadamente 10% de expresión total; caso muy similar a la concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en donde se observa ligeramente disminuido con respecto a la concentración anterior. Sin embargo, en la concentración stock de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observa una disminución hasta aproximadamente 7% con respecto a la primera.



Formulaciones de AgNPs

Imagen 9: Gráfica creada con los resultados de células HCT-15 positivas a marcajes de apoptosis y necrosis; expuestas a diferentes formulaciones de nanopartículas de plata con diferentes concentraciones por 24 h.

Para la formulación Ag7 se observa un incremento en los marcadores de necrosis de alrededor de 18% en la concentración de 0.5 IC₅₀, mientras que para las dos concentraciones subsecuentes no se observa un incremento tan notorio como en la primera ya que IC₅₀ y 2 IC₅₀ incrementa el marcaje en aproximadamente 3 y 5% respectivamente.

De mismo modo, en todas las concentraciones probadas de la formulación Ag10 los marcadores de necrosis y apoptosis incrementan del 2-5%, no observándose un comportamiento de tipo dosis dependencia.

En la formulación Ag8 a la concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el porcentaje de células positivas a ambos marcajes incrementa en alrededor de 25% mientras que para las concentraciones de 6 y 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ incrementa alrededor de 6%.

Por último, Ag9 presenta un incremento de la expresión de marcadores en las concentraciones de 6 y 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aproximadamente 2 y 1% respectivamente. Sin embargo, para la concentración de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el porcentaje de células en apoptosis tardía es de 26%.

En esta gráfica se observa que las concentraciones de 60 y 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las formulaciones Ag8 y Ag9 son las que incrementan el número de células en apoptosis tardía.

6.9 Marcadores de necrosis en la línea celular HCT-15

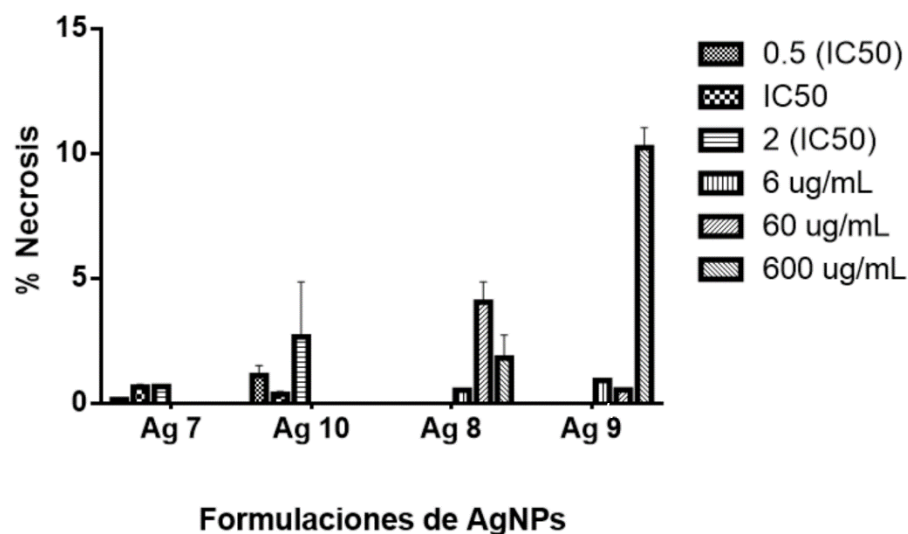


Imagen 10: Representación del promedio de la proporción de células con marcaje positivo a Yoduro de propidio (PI) de las diferentes formulaciones y concentraciones de nanopartículas de plata por 24 h de exposición.

En la imagen 10 se pueden observar los resultados de expresión de marcadores a necrosis. En la formulación Ag7 se observa que todas las concentraciones probadas incrementan un pequeño porcentaje la población de células necróticas siendo las de IC₅₀ y 2 IC₅₀ las concentraciones que produjeron alrededor de 0.5% de necrosis. Para el caso de la concentración de 0.5 IC₅₀ no se aprecia un incremento de población para las células necróticas.

Con la formulación Ag10 a la concentración 2 IC₅₀ se observa un aumento mayor de la población necrótica con respecto a las concentraciones precedentes de 6 y 60 µg/mL.

La concentración más alta promovió una expresión de necrosis en alrededor de 3%. No se encuentra una tendencia de tipo dosis dependencia.

En la formulación Ag8 se encuentra un incremento mayor de los marcadores de apoptosis con respecto a las formulaciones anteriores, ya que, a pesar de que no se observa una tendencia de tipo dosis-dependencia, en la concentración de 60 µg/mL, existe un incremento de la población celular en necrosis de aproximadamente 4%, siendo este la más alta de las tres probadas. La concentración de 600 µg/mL incrementó la población necrótica en aproximadamente 12%.

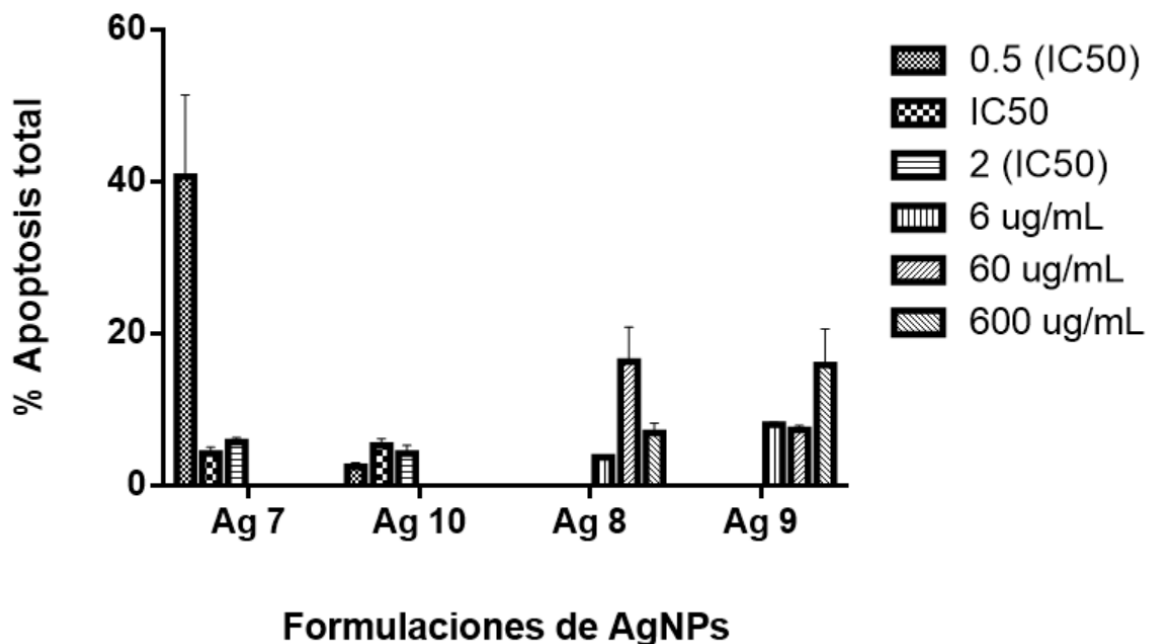


Imagen 11: Gráfica del promedio de apoptosis total, observando que la formulación que provoca un mayor índice de apoptosis es la AgNP7 en la concentración de 0.5 IC₅₀ y no se observa de una manera de dosis dependencia. Mientras que las formulaciones que causan después más índice de apoptosis son las formulaciones AgNP88 y AgNP9 en las concentraciones de 60 y 600 µg/mL respectivamente con aproximadamente 15%

7.0 Discusión de Resultados.

De acuerdo con datos de la OMS el cáncer de colon o colorrectal es el quinto tipo de cáncer más diagnosticado a nivel mundial y se encuentra dentro de los tres primeros con mayor tasa de mortalidad entre las personas de 50-65 años en ambos sexos (1). Además, es una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad y aumento de incidencia anual para la que se han desarrollado diferentes arsenales farmacéuticos tratando de encontrar una cura. Sin embargo, hoy en día muchos de estos fármacos son ineficaces en etapas avanzadas de la enfermedad, demasiado perjudiciales a la salud contribuyendo al riesgo de muerte por el cáncer de manera más rápida o bien, introducen resistencia del tejido en contra de estos. (2,3). Lo que demuestra la necesidad de generar nuevas terapias que planteen una alternativa eficaz en contra de este padecimiento.

Es por esto por lo que en el presente trabajo se evaluó la potencial actividad de diferentes formulaciones de AgNPs contra una línea tumoral de cáncer de colon humano. Con el objetivo de demostrar que las AgNPs pueden, en un futuro y tras completar las pruebas preclínicas, como una terapia alternativa y eficaz en contra del cáncer colorrectal.

7.1 Nanopartículas de plata

De acuerdo con las micrografías obtenidas por TEM, las formulaciones de nanopartículas Ag7, Ag8 y Ag9, el tamaño de las nanopartículas de estas formulaciones se encuentra en el intervalo de 32 a 70 nm (Figura1). En este sentido, se sabe por lo reportado en la literatura que, el tamaño de las nanopartículas está directamente relacionado con los efectos citotóxicos de en una línea celular.

Específicamente, las nanopartículas de plata de un tamaño entre 2-100 nm, poseen un efecto citotóxico en las líneas tumorales, además de que se sabe que las AgNPs de estos tamaños, se incorporan desde un transporte activo hasta difusión simple a través de las membranas biológicas (57). Por lo tanto, las AgNPs utilizadas, que entran en el intervalo de tamaño mencionado, deben incorporarse en las células, aunque se deben hacer estudios que demuestren la presencia de AgNPs en el interior de las células, que no es el objetivo de este trabajo.

7.2 Núcleo y Recubrimiento

Por otra parte, el recubrimiento es una característica fundamental en la formulación de las AgNPs, porque les confiere estabilidad y aporta una barrera física entre el medio y el núcleo metálico (76).

En las formulaciones utilizadas en este trabajo, polímero de recubrimiento que se utilizó fue la PVP (polivinilpirrolidona) de cadena corta (Ag7 y Ag8) y de cadena larga (Ag9 y Ag10). La diferencia entre ambas parejas que tienen el mismo polímero es la purificación de este último. El polímero utilizado para obtener las nanopartículas Ag7 y Ag9 fue purificado químicamente antes de utilizarse, mientras que el agente de recubrimiento de las formulaciones Ag9 y Ag10 se utilizó tal y como lo entrega proveedor.

La composición de plata del núcleo de las AgNPs se puede observar en las imágenes TEM (Imagen 2).

De acuerdo con la literatura, se sabe que las nanopartículas de plata esféricas tienen un plasmón de resonancia en un intervalo de 400-450 nm (Pal et al 2007, Jana et al 1999, Schönrichsen et al 2002). Esta banda de absorción del plasmón de resonancia depende de diversos factores como el tamaño, la forma geométrica, método de síntesis, tipo de recubrimiento, dispersión, etc. (72). También, se ha reportado que para las nanopartículas de plata con forma triangular o cúbicas en el espectro de absorción tiene un intervalo de entre 420-552 nm (73).

En las formulaciones utilizadas se observan de 1 a 3 máximos de absorbancia, para la Ag7.

Como se observa en la Figura 2) A, la morfología predominante en la muestra es la esférica o quasi esférica, y de acuerdo con lo observado en la Figura 3) A, se observan dos máximos de absorbancia que corresponden con lo reportado en la literatura. Sin embargo, existe un máximo más pequeño en la longitud de 528 nm que se puede justificar con un desvío en la morfología de la población de las nanopartículas.

En la formulación Ag8, en la Figura 2) B se observa un cambio de morfología con una tendencia triangular y hexagonal y sus picos máximos de absorción observados

corresponden a los de la literatura. Sin embargo, la diferencia de morfologías es más evidente.

Para el caso de las formulaciones Ag9 y Ag10 se tiene un solo pico máximo de absorción en 410 nm. De acuerdo con lo que se observa en la Figura 2) C y D, la morfología de ambas formulaciones, al igual que el tamaño observado es muy similar por lo que el espectro de absorbancia obtenido se puede justificar el resultado obtenido y equitativo.

Una vez caracterizadas las AgNPs y para cumplir con el objetivo de este trabajo se eligió la línea celular de HCT-15 de cáncer colorrectal humano que tiene un transporte de glicerol dependiente de Na^+ (75), por lo que la inhibición de la proliferación celular podría asociarse con una interacción de las AgNPs con el transporte de sodio.

La proliferación y el mantenimiento de la línea celular se llevó a cabo como se describe en la metodología completando un ciclo de crecimiento cada 48 h y utilizando las células en la fase de crecimiento exponencial.

7.3 Viabilidad celular

Los efectos citotóxicos de los nanomateriales han sido estudiados en diferentes líneas celulares expuestos a distintos tipos de nanomateriales. En particular, a las AgNPs han mostrado un mejor efecto en citotoxicidad contra líneas tumorales.

En el presente trabajo se evaluó el efecto citotóxico de AgNPs así como la vía de muerte celular y la generación de especies reactivas de Oxígeno (ROS).

Primero se evaluó el efecto citotóxico de 4 diferentes formulaciones de AgNPs en tres concentraciones diferentes en cultivos de células HCT-15 24 h post administración.

Como se observa en la Figura 5, se muestran los porcentajes de viabilidad de cada una de las formulaciones con respecto a un control negativo de medio RPMI- 1640 suplementado. Se muestra que la máxima baja de viabilidad en las 4 formulaciones es en la concentración máxima de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados de viabilidad a esa concentración son 4.5, 0, 21, 15% respectivamente. De esta manera se observa que la formulación Ag8 es la más citotóxica debido a que baja el porcentaje de viabilidad en un 100%, seguido de Ag7 con un 4.5%. De la misma forma, se observa

que la formulación Ag7 y Ag10 presentan un efecto de dosis dependencia. Sin embargo, la diferencia de viabilidad entre estas dos últimas formulaciones es de 10.5% en sus máximas concentraciones, siendo Ag7 la formulación con más efectos citotóxicos.

Por otra parte, Ag8 y Ag9 no presentan un efecto dosis dependiente ya que en ambos casos se observa un menor efecto citotóxico en la concentración de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con respecto a la de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esto es un fenómeno conocido como hormesis, describe el fenómeno en el intervalo de concentraciones.

Sin embargo, en todas las formulaciones, la concentración que tiene un mayor efecto citotóxico sobre las células HCT-15 es el stock de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se ha reportado que las líneas celulares de colon como HCT-15 presentan cambios morfológicos cuando hay situaciones desfavorables siendo uno de los más reportados la reducción de tamaño y la formación de esferas casi perfectas, respuestas a condiciones adversas del ambiente.

Con los resultados obtenidos en el experimento de viabilidad, se determinaron las IC_{50} de las formulaciones que presentaron un efecto de dosis dependiente (Ag7 y Ag10), utilizando un modelo Probit (Tabla 1).

Para las otras formulaciones se evaluaron distintas concentraciones debido a que la IC_{50} , no se puede predecir con el modelo Probit.

De acuerdo con lo reportado en la literatura (48), las IC_{50} varían dependiendo de diferentes factores ambientales y de la naturaleza de las nanopartículas, la línea celular. Sin embargo, son aproximaciones que nos permiten comparar la eficacia, selectividad y potencia con respecto a los fármacos de primera elección.

En este sentido, al comparar el efecto de las formulaciones de AgNPs con el de carboplatino (fármaco de primera elección para el tratamiento de cáncer colorrectal) se observa el mismo efecto en una concentración 10 veces menor

Esto significa que con una menor concentración de AgNPs en comparación con la de carboplatino podemos alcanzar el mismo efecto, lo que supondría una mayor efectividad del tratamiento por lo tanto, beneficios para el paciente en caso de una futura aplicación clínica. (Imágenes 6-11).

De acuerdo con diversas publicaciones, uno de los factores cruciales que afectan la viabilidad y por lo tanto la citotoxicidad de las AgNPs es el tipo de recubrimiento y la concentración en la que se encuentra.

Se sabe que mientras más estabilidad proporcione el recubrimiento a la nanopartícula, menor toxicidad por liberación de iones Plata (Ag^+) debido a que existe una interacción más débil entre la plata metálica y el disolvente que la rodea, principalmente en medios acuosos (53). Mientras más densidad electrónica pueda aportar este a la estabilización de esta, la citotoxicidad estará más relacionada con la acción de la nanopartícula total, lo que incrementará los efectos colaterales por los iones plata.

De acuerdo con expuesto en la tabla 3, el recubrimiento de citrato es un tipo de recubrimiento débil, ya que es una molécula propensa a hidrólisis que no aporta mucha densidad electrónica y su citotoxicidad es más elevada con respecto a las de un recubrimiento.

Como se observa en la tabla 3, se tienen diferentes formulaciones con diferentes tamaños que tienen como principal compuesto de recubrimiento al citrato. Estas formulaciones tienen IC_{50} 's que oscilan entre 1 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a tiempos de exposición de 12 h y 24 h.

Como se observa en esta tabla se tienen dos formulaciones que tienen el mismo tipo de recubrimiento, y un tamaño similar, sin embargo, en el primer caso (formulación 2) se tiene una IC_{50} de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; mientras que en el segundo caso (formulación 4) se tiene una IC_{50} de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo el modelo celular (T 84 y LoVo carcinoma colorrectal respectivamente) el parámetro que cambia. Esto pone en evidencia que el modelo celular con el que se trabaja es fundamental para el estudio de las nanopartículas.

En la formulación 1, se tiene un recubrimiento de PVP con un tamaño de partícula de 35 nm aproximadamente, un tamaño similar a la formulación Ag7, utilizando un modelo biológico de HT 29 cáncer colorrectal humano, en un tiempo de exposición de 24 h. Un modelo experimental similar al presentado en este trabajo.

Como se puede observar, esta formulación tiene una IC_{50} reportada de 3.95 y 3.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 24 h de exposición.

Como se observa en la tabla 1, las IC50 calculadas para la formulación Ag7 y Ag10 son de 0.68 y 2.13 $\mu\text{g/mL}$, siendo la primera 5 veces menor a la reportada con nanopartículas de características similares.

Por último, se muestran las formulaciones con recubrimientos de origen natural como proteínas fúngicas como el quitosano, coberturas proteicas y flavonoides.

En estas tres formulaciones, aparte del tipo de recubrimiento, también cambia el tamaño de la nanopartícula (172, 45 y 6 nm respectivamente), pudiéndose notar una tendencia en que mientras más grande es la nanopartícula, menor es el efecto citotóxico de la misma, ya que se obtuvieron valores de 24, 8.88 y 5 $\mu\text{g/mL}$.

Respecto a los resultados obtenidos durante las etapas experimentales, se pudo determinar una citotoxicidad elevada en las células de cáncer de colon humano.

Tamaño (nm)	DH (nm)	Contenido de Ag (%m/m)	Polímero de recubrimiento	Potencial ζ (mV)	Modelo celular	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de exposición (h)	Evaluaciones de citotoxicidad	Referencia
35	70	1.2	PVP	-15	HT 29 colon cancer	4.73, 3.43; 3.95, 3.05	12 y 24	Cometa, MTT, ROS (microscopía confocal, citometría, Anexina V/PI)	Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of AgNPs on human cervix and breast cancer
10, 75, 110	17.43, 74.35, 104.3	1.0	Citrato	-34.86; -46.13; -43.96	T 84 human colorectal carcinoma	20 y 100	24	AO/Bromuro de etidio, Expresión de genes diferencial	Size and dose dependent effects of AgNPs exposure on intestinal permeability in an in vitro model of the human epithelium
172.6	222	1.5	Quitosano	---	HT 29 colon cancer	24	12, 24	LDH, Anexina V/PI, Expresión génica por rt-qPCR, Potencial de membrana mitocondrial, ROS	Induction of apoptosis in cancer cells at low AgNPs concentrations using Chitosan Nanocarriers concentrations using Chitosan carrier
20, 100	---	---	Citrato	-37, -57	LoVo human colon carcinoma	10	24	Western blot, rt-qPCR, ROS	Insights into the Cellular Response Triggered by AgNPs using Quantitative Proteomics
10, 20, 50, 70, 100	13.7, 26.9, 57.9, --, 114.9	0.02 mg/mL	Citrato	-25.4, -34, -39.6, --, -34.2	LoVo human colon carcinoma	1, 10	24, 48	ROS, IL-8 ELISA, Anexina V/ PI, Ensayo de proliferación BrdU,	Exposure to AgNPs induces size- an dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells
6	--	--	NAR (flavonoide)	--	HCT 116 y HT 29 colon carcinoma	5	24	ROS, LDH, MDA, Ensayo de proliferación BrdU	Cytotoxic Potential and Molecular Pathway Analysis of AgNPs on Human Colon cancer
45.3	--	--	Peptídico	--	HT 29 colon cancer	8.88	24	Fragmentación de ADN, MTT, AO/PI, DAPI	Effect of peptide-conjugated nanoparticles on cell lines

Tabla 3: Tabla en donde se muestran diferentes rubros asociados a la citotoxicidad de diferentes formulaciones de nanopartículas de plata; tales como el diámetro, contenido de plata, tipo y naturaleza del recubrimiento, línea celular de carcinoma colorrectal, concentración inhibitoria 50, tiempos de exposición y pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad realizadas.

7.4 Apoptosis y Necrosis

En este trabajo se muestra un estudio sistemático del efecto de diferentes formulaciones de AgNPs con características fisicoquímicas similares, evaluando el efecto antiproliferativo, la vía de muerte celular y generación de ROS en cultivos de células de cáncer colorrectal. Esto sienta un precedente para la realización de ensayos in vivo y pruebas preclínicas completas para determinar la viabilidad de una terapia alternativa contra el cáncer utilizando estas AgNPs, en particular la formulación Ag7.

Como se puede observar en las Figuras 8 y 9, la formulación que presenta un mayor número de células en procesos de apoptosis, temprana y tardía, son las formulaciones Ag7 y Ag9.

Los resultados de apoptosis pueden ser atribuidas al incremento de las ROS y una posible interacción con el material genético.

Para hablar de la necrosis, en la figura 9 se muestra que la formulación Ag8 y Ag9 en las concentraciones de 60 y 600 $\mu\text{g/mL}$ presentan los porcentajes más altos de células positivas a Yoduro de propidio.

Experimentalmente en todos los casos la reducción de la viabilidad es de al menos 80%, excepto en el caso de Ag8 donde se presenta una reducción del 100%. Este dato es interesante porque experimentalmente en el microscopio no se observaban células teñidas, más bien, restos celulares esparcidos por los cuadrantes de la cámara de Neubauer, cosa contraria con otras formulaciones en donde se llegaban a observar células completas, aunque teñidas de azul. Esta observación se puede traducir como un elevado índice de células necróticas.

7.5 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

El estrés oxidativo se define como el desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos antioxidantes intracelulares. Uno de los organelos más afectados durante un periodo de estrés oxidativo es la mitocondria debido a que aquí es donde se desarrolla el proceso de cadena transportadora de

electrones, la cual durante el proceso fisiológico transfiere electrones al oxígeno de la molécula de agua como aceptor final.

Las consecuencias que tiene el aumento de especies reactivas en mitocondria, o bien, la disminución de los compuestos antioxidantes principalmente el glutatión (GSH) y los sistemas enzimáticos de superóxido dismutasa (SOD, $O_2^{\bullet-} \rightarrow H_2O_2$) y catalasa ($H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$)⁽⁷³⁾, permiten que el daño se mantenga por más tiempo. Pero, al elevar los niveles de ROS de manera crítica, los sistemas de defensa se abaten produciendo un decaimiento el GSH y SOD por la elevación en la lipoperoxidación (50).

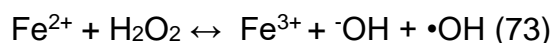
En condiciones normales, los sistemas de amortiguamiento mantienen los niveles de ROS en concentraciones de μM o nM , pero en condiciones anormales como un desarrollo de cáncer, los niveles incrementan a niveles de μM debido a la gran actividad metabólica de la célula dentro de un microambiente tumoral (77).

Si la membrana mitocondrial sufre daños irreversibles, este organelo puede elevar la concentración de Calcio de manera crítica, lo que desemboca eventualmente en procesos de muerte celular (77).

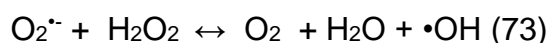
Las ROS y su incremento en presencia de nanopartículas de plata ha sido muy estudiado como un mecanismo de acción principal en los efectos citotóxicos en diversos modelos celulares (53).

Se propone que las ROS incrementan en presencia de las AgNPs debido a la naturaleza catalítica REDOX de la plata en medio acuoso. Esta propiedad fisicoquímica del metal ayuda a que las ROS dentro de la célula, principalmente en la mitocondria, interaccionen con la plata, causando que se produzcan en una mayor proporción por un fenómeno conocido como reacciones tipo Fenton Haber Weiss (73)

REACCIÓN DE FENTON:



REACCIÓN DE HABER- WEISS:



Debido a los potenciales de acción de las especies involucradas y la reacción que tienen con la plata, se propone el posible mecanismo de acción para la formación de diferentes especies reactivas de oxígeno.

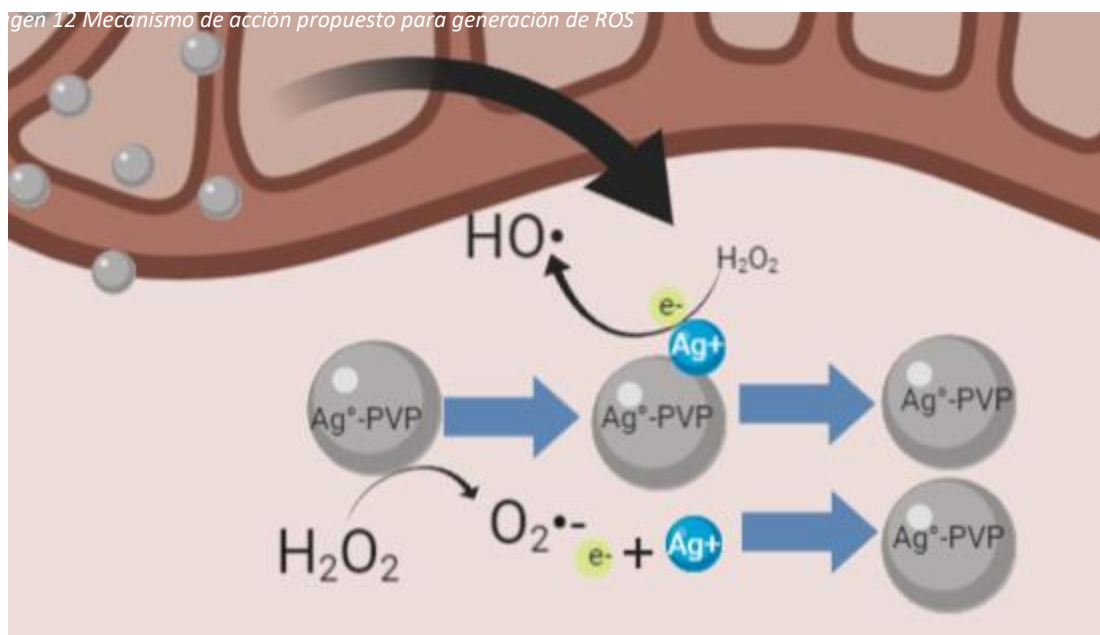


Imagen 12: Se describe el mecanismo de acción por el cual se pueden producir las ROS dentro del citosol y mitocondrias.

Se propone que el peróxido de hidrógeno producido de forma natural en la cadena transportadora de electrones, y por lo reportado en la literatura, el sistema antioxidante en condiciones de un microambiente tumoral se encuentra un ligeramente baja, al igual que el pH, debido a la alta actividad metabólica. Por lo tanto, esta especie se encuentra en concentraciones más elevadas dentro de la célula. Al entrar en contacto con las nanopartículas de plata se produce una reacción de catálisis tipo Fenton con el núcleo de plata metálica para dar como resultado la producción de radical hidroxilo, radical anión superóxido y iones plata superficiales que vuelven al su estado elemental al tener al recubrimiento de PVP como donador principal de electrones para regresar a los iones de plata superficiales al estado elemental del núcleo metálico.

Se propone que eventualmente y con el proceso repitiéndose varias veces, el recubrimiento se irá desgastando hasta dejar al desnudo el núcleo metálico.

Esto puede explicar el incremento de la concentración de radical anión superóxido detectadas por el reactivo Mitosox de los ROS mitocondriales.

Como se observa en la figura 4, los resultados de termogravimetría arrojan que el porcentaje de PVP oscila entre 18-19% de la suspensión de las AgNPs, que es muy superior en comparación con formulaciones de AgNPs comerciales. Esta característica es crucial al momento de la liberación de iones plata al medio ya que, al tener mayor cantidad de recubrimiento la liberación de iones plata al medio es muy baja o llevada a cabo de manera controlada

Como se observa en la gráfica dos, se evaluaron los niveles de ROS producidas en presencia de las nanopartículas a 24 h con las IC50's previamente determinadas.

Como es posible observar, las cuatro formulaciones son capaces de producir un incremento de las ROS en comparación de control positivo de H₂O₂.

En todas las formulaciones se dio un incremento en las concentraciones en ROS en al menos 80% lo que tiene como consecuencias diferentes irregularidades en los mecanismos celulares vitales. En las diferentes formulaciones se aprecia un comportamiento similar de acuerdo con la concentración utilizada. En este caso las nanopartículas Ag10 presentaron un comportamiento de dosis dependencia inversa ya que a menor concentración se observa un mayor efecto en el incremento de las ROS de manera contraria a todas las demás formulaciones en donde no se observó una tendencia tan clara.

Estos resultados nos permiten suponer que una menor concentración de AgNPs inducirá un mayor efecto sobre la línea tumoral.

La interacción de estas especies con macromoléculas como las proteínas membranales o citosólicas, propician que estas pierdan su conformación terciaria o cuaternaria debido a los cambios producidos en los péptidos de su esqueleto volviéndoles inservibles o poco funcionales (67).

También la interacción con el ADN genera que el dogma central de la biología molecular se vea afectado al impedir que regiones codificantes del material genético se expresen o bien, se sabe que el ADN al entrar en contacto con altas concentraciones de ROS, sufre mutaciones que en alto número no pueden ser reparados por las enzimas encargadas del mantenimiento de la supervivencia de la célula (67)

Existen diferentes vías apoptóticas, de las cuales la vía extrínseca es la más relacionada con el mecanismo de acción de las AgNPs (50).

Para saber si las ROS detectadas se producían en mitocondria o de manera general en la célula, se realizó el experimento utilizando el kit MitoSox (Thermofisher) para detección específica de radical anión superóxido.

Así se estudió el efecto de las AgNPs sobre el incremento de ROS en la mitocondria. En los cultivos tratados con las diferentes formulaciones se observó un incremento en la generación de ROS mitocondriales en al menos un 50% en comparación del control positivo de carboplatino Figura 7. En particular la formulación Ag9 es la única que presenta una tendencia de tipo dosis dependencia inversa, pero en la producción de ROS intracelulares de la Figura 6, no se ve una tendencia relacionada con la concentración.

Es importante recalcar la importancia que tiene la mitocondria en los procesos de muerte celular, ya que al ser un reservorio principal de Ca^{2+} , es vital su integridad para el buen funcionamiento de la célula.

Un incremento sustancial de ROS en esta parte de la célula conlleva a una desregularización de sus funciones y por lo tanto a un desequilibrio de las concentraciones de Ca^{2+} . Este ión al ser liberado al microambiente celular es capaz de despertar vías de muerte mediadas por cisteín-proteasas calcio dependientes como las caspasas, proteínas principales en la apoptosis por la vía clásica.

Se sabe que la plata es un elemento calcio-antagonista, ya que se ha demostrado que interfiere en el transporte de calcio a través de los canales específicos de Ca^{2+} , lo que interviene en la comunicación celular bloquea a uno de los segundos mensajeros más importantes del ciclo celular.

La inducción de ROS mitocondriales se ha asociado con una vía de muerte celular por apoptosis posiblemente por la disrupción y/o baja del potencial de la membrana mitocondrial y liberación de Ca^{2+} al citosol. Este incremento en la concentración despierta las respuestas de apoptosis mediadas por proteínas dependientes de calcio, entre ellas las Caspasas. N los tratamientos realizados en este trabajo se observó una producción elevada de ROS mitocondriales en los cultivos tratados con todas las formulaciones probadas, principalmente en la formulación Ag7 y fue en

este caso en donde se observó un 60% de incremento de apoptosis temprana en la concentración de $\frac{1}{2}$ IC₅₀, lo que confirma lo reportado en la literatura, sin embargo, este dato no nos dice que las células se encuentren en un proceso de muerte irreversible, ya que la vía de la fosfatidilserina es reversible hasta antes de la activación de las caspasas Cas 3 y Cas9. Pero es importante resaltar que la exposición es de 24h, mientras que en el caso de un posible tratamiento el tiempo de exposición será mayor, por lo que eventualmente las células en apoptosis entrarán en una etapa de apoptosis irreversible.

8.0 Conclusiones

- Todas las formulaciones de nanopartículas Argovit poseen actividad antiproliferativa contra células HCT-15 en todas las concentraciones probadas.
- Las formulaciones de AgNPs incrementan la inducción de ROS en por lo menos un 80%.
- Las formulaciones evaluadas incrementan la generación de ROS localizados en mitocondria en aproximadamente 50%.
- La formulación Ag7 con una concentración en la concentración de $\frac{1}{2}$ de IC_{50} es la que más induce marcadores apoptóticos tempranos en los cultivos tratados, mientras que las formulaciones Ag7, Ag8 y Ag9 son las que más inducen apoptosis tardía dentro de las primeras 24 h de exposición.
- Los niveles de necrosis se elevaron más con las formulaciones Ag8 y Ag9 en las concentraciones de 60 y 600 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.
- De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede postular a la formulación Ag7 como el mejor candidato para continuar las evaluaciones y en un futuro como tratamiento contra el cáncer colorrectal, debido a que es la formulación que más induce marcadores apoptóticos y no induce marcadores necróticos con respecto a los controles positivos.

9.0 Perspectivas

Las siguientes metas en el grupo de trabajo son:

- Determinar la selectividad de las AgNPs con líneas de colon humano no tumorales para evaluar la selectividad.
- Evaluar la potencia de las formulaciones como posibles tratamientos contra los tratamientos de primera elección para evaluar la potencia y posibles mecanismos de acción
- Realizar los ensayos preclínicos completos.
- Determinar el efecto genotóxico de las formulaciones para asegurar su posible uso como tratamiento alternativo contra cáncer.
- Evaluar las AgNPs en modelos vegetales para poder evaluar los efectos citotóxicos en plantas y así los daños a medio ambiente en una futura exposición a estas.

10.0 Referencias

1. <https://www.cancer.org/cancer/cancer-in-young-adults/cancers-in-young-adults.html>
2. What is cancer? American Cancer Society <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>
3. ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DIA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO). Datos Nacionales. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2/2/2018. Recuperado el 14 de marzo 2019 desde http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf
4. World Health Organization [WHO]. (2017). Recuperado el 14 de marzo del 2019 desde <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
5. American Cancer Society. Cancer that develop in young People. Recuperado desde <https://www.cancer.org/cancer/cancer-in-young-adults/cancers-in-young-adults.html> el día 17-marzo-2019.
6. ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL EN CONTRA DEL CANCER.
7. National Cancer Institute. What does cancer is? <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
8. Hanna D. y Weinberg RA. 2011.
9. Bibliografía de las imágenes. https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq#_112
10. How spreads the colon cancer https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq#_112
11. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Colorectal cancer. The Global cancer Observatory. Febrero, 2019. Recuperado desde <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>.
12. Hanahan, D., Weinberg. Robert A. (2011). Hallmarks of Cancer. The Next Generation. Cell. 144(5), 646-674. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/16j.cell.2011.02.013>
13. Guía Clínica. Diagnóstico y tratamiento; Carcinoma colorrectal. Fundación MM, Investigación médica (2007.) Oncosur Fundación Médica Mutua Madrileña.
14. Morgan G Silva A., y Sat D. Colorectal risk factors (2008). Gaceta Mexicana de oncología. 7; 12-15.
15. Distribución de las aldehído deshidrogenasas ADH1 y ADH4 en el cuerpo humano. Obtenido desde <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3482/semr02de15.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
16. Durko L., Malecka-Panas E., Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. (2014) Current colorectal Cancer reports.

17. Carmen Jochem and Michael Leitzmann. Obesity and Colorectal Cancer. (2016) Spriger International Publishing. 208. DOI: 10.1007/978-3-319-42542-9_2.
18. Urrutia Ortega Ismael. Inestabilidad Genómica por exposición a Nanopartículas de óxido de Titanio en un modelo de cáncer de colon. (2016). Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 10-14.
19. World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer. (2017). 8-111.
20. Boffetta P and Hashibe M. alcohol and cancer. *The Lancet Oncology*. (2006). 7:149-156.
21. Giovannucci E. Insulin, Insulin-like growth factors and colon cancer: A review of the evidence. (2001). *The Journal of Nutrition*. 131; 3109-3120.
22. Rojas A., Añazco C. González I. Extracellular matrix and RGAE activation. A missing piece in the puzzle of the association between diabetes and cancer. Oxford University Press. (2018). 1-21.
23. Urrutia-Ortega. I., (2016). Inestabilidad Genómica por exposición a Nanopartículas de dióxido de titánio en un modelo de cáncer de colon (Tesis doctoral). Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
24. Glising A., ransen F., de Kok T., Goldbohm A., Shouten L., de Bruine A., van Engeland M., van den Brant P., de Goeij A., Weijenberg M. Dietary heme iron and the risk of colorectal cancer with specific mutations in K ras and APC. (2013). *Carcinogenesis*. 34; 2757-2766.
25. Al-Lahham SH., Peppelwnbosch MP., Roelosfen H., Venema k., Biological effect of propionic acid humans; metabolism, potential application and underlying mechanisms. (2010). *Biochimica et Biophysica Acta*. 18(01); 1175-1183.
26. Eric R., Vogelstein B., A genetic model for colorectal tumorigenesis. *The oncology Center*. (1990) *Cell*. 61, 759-767.
27. Vogelstein B.; Fearon ER; Hamilton SR; Kern SE; Preisinger AC; Leppert M. Genetic alterations during colorectal-tumor development. (1988). *The New England Journal of Medicine*. 319; 525-532.
28. Natali, PG.; Nicotra MR; Bigotti A; Venturo I; Slamon DJ; Fendly BM; Ulrich A. (1990) Expression of the p185 encoded by her2 oncogene in normal and transformed human tissues. *International Journal of Cancer*. 45(3), 457-461.
29. Knudson AG et al. Hereditary, oncogenes and antioncogenes. (1985). *Cancer Res*. 45(4): 1437-43.
30. Jochem C., Leitzmann M. Obesity and Colorectal cancer. (2016). Springer International Publishing. 17-36.

31. Leslie A., Carey FA., Pratt NR., Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. (2002) British Journal of Surgery. 89; 845-60.
32. Gonzalez-Gomez P., Bello M., Alonso Eva. CpG island methylation in sporadic Neurofibromatosis Typ 2- Associated Schwannomas. (2003). Clinical Cancer Research. 9; 5601-6.
33. Pratima A. Nanotechnology and its Applications in Medicine. (2015). Med Chem. 5(2); 081-089.
34. Invitrogen Thermofisher. (2006) Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents. Molecular Probes 36103
35. Invitrogen Thermofisher. (2010) FIT C Annexin V/Dead apoptosis Kit with Annexin V and PI, for flow cytometry. Molecular Probes 13242.
36. D.J. Finney (1952). Probit Analysis (2nd edition), Journal of the Institute of Actuaries, 78 (3): 388-390.
37. Radioterapia para el cáncer colorrectal. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/radioterapia.html>
38. Dávila Diego, Palacios óscar, Naranjo Camilo. Metástasis hepáticas en el cáncer colorrectal: Estrategias terapéuticas y recomendaciones actuales. Revista Colombiana de Cirugía. 2017;32:304-18.
39. Nordqvist Christian. What you need to know about chemotherapy. 2017. MedicalNews Today. Recuperado de <https://www.medicalnewstoday.com/articles/158401.php> el día 26/junio/2019
40. Chemotherapy for Colon cancer <https://www.webmd.com/colorectal-cancer/chemotherapy#1>
41. Mechanism of action “5- fluorouracil”. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00544> extraído el 11/julio/2019.
42. Longeley, D. B., Harkin, D.B.,& Johnston, P.G. (2003) 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. Nature Reviews Cancer, 3(5), 330-338.
43. Johnston, P.G. & Kayne, S. Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. Anticancer drugs 12, 639-646 (2001).
44. Liu, B., Xu, T., Xu., Cui, Y.,& Xing, X, (2018). Biglycan promotes the chemotherapy resistance of colon cancer by activating NF-kB signal transduction. Molecular and Cellular Biochemistry.
45. Li F, Sethi G. (2010) Targeting NF- kB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. BBA-Rev Cancer 1805:167-180.
46. What it is and how it work: Nanotechnology <https://www.nano.gov/nanotech-101/what>. Extraído el 12/ julio /2019.
47. Gonzalez, L., Lison, D., Kirsch-Volders, M. (2008). Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. Nanotoxicology , 2(4), 252-273.

48. Zhang, T., Wang, L., Chen, Q., Chen C. (2014) Cytotoxic Potencial of Silver Nanoparticles. *Yonsei Medical Journal*, 55(2), 283.
49. Chang BM; Pan L; Lin; Chang HC; (2019). Nanodiamond supported silvernanoparticles as a potent and safe antibacterial agents. *Scientific Reports*. 9(1).
50. Knetsch, M. L., W., Koole, L. H. (2011). New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles. *Polymers* , 3(1), 340-366
51. Halim A., Mohamed I., Soliman., Azzam M., Mostafa B. (2015). Antiparasitic activity of Silver Nanoparticles and copper oxide against *Entamoeba histolytica* and *Cryptosporidium parvum* cysts. *J. Egypt. Soc. Parasitol*, 45(3), 593-602.
52. Juárez.Moreno, K., Mejía-Ruiz, C. H., Díaz F., Reina-Verdugo, H., Re, A. D., Vázquez- Felix, E. F., Bogdanchikova N. (2017). Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response and survival of juvenile white shrimp *Litopenaus vannamei*. *Chemosphere*, 169, 716-724.
53. Álvaroz Fúnez, A., Isabel Haza, A., Mateo, D., Morales, P. (2013). IN vitro evaluation of silver nanoparticles on human tumoral and normal cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(3), 153-160.
54. Zhang, X.-F., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines: An in Vitro Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1603.
55. Williams, K. M., Gokulan, K., Cerniglia, C. E., & Khare, S. (2016). Size and dose dependent effects of silver nanoparticle exposure on intestinal permeability in an in vitro model of the human gut epithelium. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1).
56. Singh, S., Nalwa, H.S, Nanotechnology and health safety: Toxicity and risk assesements of nanostructured materials on human health. *Journal of Nnoscience and Nanotechnology*. 2007, 7, 3048-3070.
57. Panzarini, E., Mariano, S., Carata, E., Mura, F., Rossi, M., & Dini, L. (2018). Intracellular Transport of Silver and Gold Nanoparticles and Biological Responses: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1305.
58. Zhao, F. Zhao, Y., Chen , C., Zhao, Y. Cellular uptake , intracellular trafficking and cytotoxicity of nanomaterials. *Small*. (2011), 7, 1322-1337.
59. Conner, S. D.; Schmid, S.L. Regulated portals of entry into cell. *Nature* (2003), 422, 37-44.
60. Guo, X., Li, Y., Yan, J., Ingle, T., Jones, M., et al. (2016). Size and coating-dpendent cytotoxicity of silver nanoparticles evaluated usingin vitrostandard assays. *Nanotoxicology*, 10899, 1373-1384.

61. Decuzzi, P., Godin, B; Tanaka. Size and Shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *Journal Control. Release* (2010), 141, 320-327.
62. Zhu, T., Lawler, D., Chen, Y., Lau, B. L. T. Effects of natural organic matter and sulfidification on the flocculation and filtration of silver nanoparticles. *Environmental Science: Nano*, 3(6), 1436-1446.
63. Fu, P. P., Xia, Q., Hwang, H.-M., Ray, P. C., Yu, H. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: Generation of active oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 64-75.
64. Fan Z, Lu JG. Zinc oxide nanostructures: Synthesis and properties. *Journal of Nanosciences and Nanotechnology*. 2005;5: 1561-1573.
65. Gurunathan, S., Qasim, M., Park, C., Yoo, Kim, J.-H., y Hing, K. (2018) Cytotoxic Potential and Molecular Pathways analysis of Silver nanoparticles in Human Colon Cancer Cells HCT116. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2269.
66. Zhang T, Wang L, Chen Q, Chen C. (2014).Cytotoxic potential of Silver Nanoparticles. *Yonsei Medical Journal*; 55(2): 283-91.
67. Simon H-U, Haj-Yehia A, Levi-Schafler F. Role of reactive oxygen species in cell signaling. *American Physiological Lung Cells Molecular Physiology*. (2000); 279(6); 1005-1028.
68. Saifi, M.A., Khan , W., y Godugu, C. (2018). Cytotoxicity of Nanomaterials: Using Nanotoxicology to Address the Safety Concerns of Nanoparticles. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 6(1), 3-16.
69. Nikalje, A. P. (2015) Nanotechnology and its applications in Medicine. *Medical Chemistry*, 5(2).
70. Verano-Braga, T., Miethling-Graff, R., Wojdyla, K., Rogowska-Wrzesinska, A., Brewer, J. R., Erdmann, H., & Kjeldsen, F. (2014). Insights into the Cellular Response Triggered by Silver Nanoparticles Using Quantitative Proteomics. *ACS Nano*, 8(3), 2161–2175.
71. Gallo J., Ossa Orozco P. (2019). Fabricación y Caracterización de nanopartículas de plata con potencial uso en el tratamiento del cáncer de piel. *Ingeniería y desarrollo*, 37(1), 88-104.
72. R. Hidalgo (2010). *Structure and Functional Properties of Colloidal Systems*. USA: CRC Press.
73. He, D., Miller, C. J., & Waite, T. D. (2014). Fenton-like zero-valent silver nanoparticle-mediated hydroxyl radical production. *Journal of Catalysis*, 317, 198–205.
74. Sistemas amortiguadores de estrés oxidantes
75. *Drug metab Pharmacokinet*. 22(3): 195-198 (2007).
76. Guo, X., Li, Y., Yan, J., Ingle, T., Jones, M. Y., Mei, N., ... Chen, T. (2016). Size- and coating-dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver

nanoparticles evaluated using in vitro standard assays. *Nanotoxicology*, 10(9), 1373–1384.

77. Hayashi, G., & Cortopassi, G. (2015). Oxidative stress in inherited mitochondrial diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 10–17.
78. Catálogo de materias primas Solkem. Ficha de datos de seguridad de polivinilpirrolidona. Buenos Aires, Argentina. Obtenido desde <http://solkem.com.ar/wp-content/uploads/POLIVINILPIRROLIDONA-PVP-FDS.pdf>