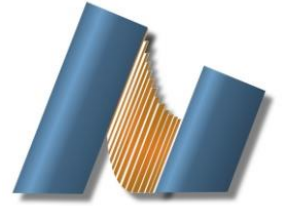




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA
BIONANOTECNOLOGÍA

ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN EL
TRATAMIENTO DE CÁNCER DE COLON

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
OMAR ULISES CRUZ RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS
DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA ENERO 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.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Omar Ulises Cruz Ramírez

Agradecimientos

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CNyN-UNAM).

A UNAM-UABC-CNyN-International Bionanotechnology Network-CONACyT.

A mi directora de tesis Dra. Yanis Toledano Magaña.

Al Dr. Juan Carlos García Ramos.

A la Dra. Nina Bogdanchikova.

A mis sinodales:

Dra. María Evarista Arellano García

Dr. Sergio Andrés Águila Puentes

Dr. Hugo Alejandro Borbón Nuñez

A la técnico de laboratorio M.C. Ana Linda Misquez Mercado.

Al laboratorio de Nanomedicina: todos mis compañeros de licenciatura de CNyN y UABC.

A Alberto Blanco Salazar por su asistencia en el laboratorio de Nanomedicina.

A Juan Antonio Huerta Salcedo por su apoyo en la parte experimental de este trabajo.

A Alejandra Guadalupe Mendieta León por su hospitalidad durante la redacción de este trabajo.

A mi familia y amigos.

Resumen

La nanotecnología ha desarrollado herramientas de relevancia biomédica mediante la síntesis de nanomateriales con características específicas que les confieren propiedades muy específicas. En especial, las nanopartículas de plata (AgNPs) destacan por sus excelentes propiedades antimicrobianas y en los últimos años se ha investigado su potencial como agente anticancerígeno. No obstante, los métodos tradicionales para la síntesis de nanopartículas confieren un carácter citotóxico al producto, cuyo efecto en aplicaciones biomédicas, no discrimina células sanas. Con el fin de producir nanopartículas más biocompatibles se han desarrollado métodos de síntesis limpios, los cuales se basan en la reducción de metales por métodos libres de precursores tóxicos.

Las formulaciones comerciales conocidas como Argovit®, consisten en AgNPs derivadas de síntesis limpia y estabilizadas con polivinilpirrolidona. En estudios previos, algunas formulaciones de Argovit® han mostrado efectos antiproliferativos en distintas líneas tumorales. Además, su uso en dispositivos médicos con aplicaciones veterinarias y humanas está aprobado en países de la ex Unión Soviética. Por lo anterior, en el presente trabajo se investigó el potencial antiproliferativo, la vía de muerte celular y la generación de especies reactivas de oxígeno de cinco formulaciones de Argovit® en la línea celular HCT-15 de cáncer de colon. Así mismo se examinó su citotoxicidad en cultivos primarios de células de sistema inmune de ratones BALB/c.

Las formulaciones de Argovit® exhibieron un efecto antiproliferativo e indujeron apoptosis en cultivos de células HCT-15. Sin embargo, esta muerte celular no fue directamente promovida por la generación de ROS. Se encontró una gran cantidad de restos celulares en los tratamientos con la concentración más alta de AgNPs. Aunado a esto, la diferencia en el efecto antiproliferativo registrado por citometría y los conteos celulares, sugieren la posible inducción de autofagia como un mecanismo de muerte celular adicional.

Los tratamientos de mayor acción antiproliferativa en la línea tumoral resultaron en una ligera citotoxicidad en el modelo de células sanas. Es necesario evaluar la citotoxicidad en modelos más complejos para confirmar la selectividad.

Contenido

	Página
Agradecimientos.....	I
Resumen.....	II
Lista de figuras.....	V
Lista de tablas.....	VII
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
3. Marco teórico	
3.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	5
3.2. Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	7
3.2.1. Potencial zeta (ζ).....	9
3.3. Espectroscopía UV-Vis.....	10
3.4. Espectroscopía de Fluorescencia.....	12
3.5. Viabilidad Celular: ensayo de exclusión vital con azul tripano.....	13
3.6. Citometría de Flujo.....	13
3.7. Tinción Anexina V / Ioduro de Propidio.....	15
3.8. Fragmentación del ADN.....	16
3.9. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	17
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos	
5.1. Objetivo General.....	19
6.1. Objetivos Específicos.....	19
6. Metodología	
6.1. Formulaciones de AgNPs.....	20
6.2. Caracterización de las AgNPs.....	20

Contenido (continuación)

	Página
6.3. Cultivo Celular.....	21
6.4. Ensayo de Viabilidad.....	21
6.5. Vía de Muerte Celular.....	23
6.6. Ensayo TUNEL.....	24
6.7. Especies Reactivas de Oxígeno Mitocondriales.....	26
6.8. Modelo Celular Sano.....	27
6.8.1. Cultivo Primario.....	27
6.8.2. Ensayo de Viabilidad.....	28
6.9. Análisis Estadístico.....	28
7. Resultados	
7.1. Caracterización.....	28
7.2. Viabilidad Celular.....	32
7.3. Vía de Muerte Celular.....	34
7.4. Análisis de Apoptosis por Microscopía de Fluorescencia.....	38
7.5. Especies Reactivas de Oxígeno Mitocondriales.....	40
7.6. Viabilidad de Modelos Celulares Sanos.....	41
8. Discusión.....	42
9. Conclusiones.....	64
Referencias.....	65
Anexos.....	74

Lista de Figuras

Figura	Página
1. Diagrama A) de los componentes del TEM y B) de rayos para la formación de imagen con electrones transmitidos. Imagen adaptada de Williams <i>et al.</i> [36].....	6
2. Tipos de dispersión de electrones de una muestra A) delgada y B) en bulto. Imagen adaptada de Williams <i>et al.</i> [36].....	7
3. Diagrama de técnica DLS. Imagen adaptada de Róz <i>et al.</i> [40].....	8
4. Potencial z. Adaptado de Park <i>et al.</i> [42].....	9
5. Espectros de absorción teóricos de nanopartículas de plata de varios diámetros. Imagen adaptada de Saion <i>et al.</i> [49].....	11
6. Diagrama óptico simplificado de un espectrofluorímetro. Imagen adaptada de Ceroni <i>et al.</i> [50].....	12
7. Esquema general de funcionamiento de un citómetro de flujo.....	14
8. Relación entre la dispersión de la luz con el tamaño/estructura de la célula.....	14
9. Tinción de célula A) apoptótica y B) necrótica con yoduro de propidio y anexina V. Abreviaciones IP: yoduro de propidio y FS: fosfatidilserina.....	16
10. Esquema de reacción TUNEL.....	16
11. Oxidación de MitoSOX Red™ al interior de la mitocondria.....	18
12. Esquema del montaje de ensayo de viabilidad.....	22
13. Esquema del ensayo de exclusión vital con azul tripano.....	22
14. Esquema del montaje de ensayo con yoduro de propidio y anexina V.....	24
15. Esquema del montaje de ensayo con MitoSOX.....	26
16. Esquema de elaboración de cultivo primario y análisis de citotoxicidad de las formulaciones de AgNPs.....	27
17. Micrografías de TEM no representativas y distribución de tamaños de Argovit®. Barra = 20 nm en A) NP1. Barra = 50 nm en formulaciones B) NP2, C) NP3, D) NP4 y E) NP5.....	29
18. Caracterización de AgNPs por espectrofotometría UV-Vis. Espectros de absorción de las formulaciones de Argovit® diluidas en agua desionizada: A)–E), NP1 a NP5 respectivamente.....	30
19. Espectros de emisión mediante excitación a A) 351 nm, B) 405 nm y C) de excitación para emisión a 710 nm. Las mediciones se realizaron con las AgNPs a concentración de 10 mg/mL de AgNPs disueltas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de SBF y 0.1% de antibiótico.....	32
20. Vista de la cámara de Neubauer. Tratamiento representativo. Con flechas azules células teñidas (muertas) y con flecha naranja célula intacta (viable). Imagen obtenida a 40x en el microscopio Zeiss Axio Lab.A1.....	33

Lista de Figuras (continuación)

Figura	Página
21. Viabilidad celular determinada por conteos en cámara de Neubauer de las tinciones con azul tripano. Las células consideradas viables son aquellas que no presentan tinción. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Significancia * $p \leq 0.05$ respecto al control.....	33
22. Células HCT-15 tras 24 h de exposición a 10 mg/mL de NP5. Con flechas naranja células intactas y con flechas verdes células teñidas. Imagen obtenida a 40x con contraste de fase del microscopio Zeiss Axio Observer.A1.....	34
23. Gráfico de densidad representativo de la tinción con AV/IP de células HCT-15 tratadas 24 h con Argovit®. Análisis de la población celular por intensidad de la señal de yoduro de propidio (VL3-A) y anexina V (BL1-A). Fracción de células viables (-/-), apoptóticas tempranas (+/-), apoptóticas tardías (++) y necróticas (-/+).	35
24. Mecanismos de muerte celular inducidos tras 24 h de exposición a Argovit®. La tinción AV/IP se realizó para determinar el porcentaje de células apoptóticas tempranas (AV+/IP -), apoptóticas tardías (AV+/IP+) y necróticas (AV-/IP+). Los resultados representan la media de tres ensayos independientes por cada tratamiento.....	36
25. Porcentaje de células A) apoptóticas, B) viables y C) con aumento en la producción de superóxido mitocondrial tras 24 h de exposición a Argovit®. Los resultados representan la media de tres mediciones por cada tratamiento. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$ y todas las diferencias * están indicadas con respecto a la concentración de 10 mg/mL.....	37
26. Ensayo TUNEL. Campos representativos de cada tratamiento. Imágenes obtenidas a 40x con la configuración de epifluorescencia del microscopio Zeiss Axio Observer.A1.....	39
27. Gráfico de densidad representativo de la tinción con MitoSOX de células HCT-15 tratadas 24 h con Argovit®. Análisis de la población celular por tamaño (forward scatter FSC-A) e intensidad de la señal de fluorescencia (VL4-A). Fracción de células positivas para $O_2^{\cdot-}$ en cuadrantes -/+ y +/+.....	40
28. Viabilidad celular de cultivos primarios de ratón BALB/c tratados con Argovit®. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres ensayos independientes. El análisis estadístico se realizó en comparación con células no tratadas y con significancia * $p \leq 0.05$	41

Lista de Tablas

Tabla	Página
1. Efecto de distintas formulaciones de AgNPs en líneas tumorales.....	4
2. Solución DNAsa I.....	24
3. Mezcla de reacción TdT.....	25
4. Mezcla de reacción Click-iT.....	25
5. Características fisicoquímicas de las AgNPs usadas en este trabajo.....	31
6. Relación diámetro metálico / diámetro hidrodinámico de diferentes formulaciones de AgNPs.....	43
7. Exposición de líneas celulares de cáncer de colón a AgNPs por 24 h.....	55
8. Viabilidad monocitos/macrófagos expuestos a AgNPs por 24 h.....	61

Anexo

Figura	Página
S1. Micrografías de TEM representativas de las formulaciones de AgNPs. Barra = 20 nm en NP1; 50 nm en NP2, NP3 y NP4; 100 nm en NP5.....	74
S2. Distribución de diámetros de nanopartículas por intensidad con DLS. Formulaciones A) NP1 – E) NP5.....	75
S3. Viabilidad celular determinada por A) conteos en cámara de Neubauer de las tinciones con azul tripano y B) citometría de flujo utilizando la tinción con AV/IP. Las células consideradas viables son aquellas que no presentan tinción. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Significancia * $p \leq 0.05$ respecto al control.....	76
S4. Comparación de las respuestas celulares con cada formulación de AgNPs. Fracción con producción de superóxido, apoptótica, viable, y muerta de la población celular luego de 24 h de exposición.....	77

1. Introducción

La nanotecnología contribuye al tratamiento de diversas enfermedades mediante el diseño de herramientas capaces de atravesar barreras biológicas y actuar como agentes terapéuticos de forma directa. Un ejemplo de estas herramientas son los aglomerados de átomos o moléculas, con longitud menor que 100 nm en sus tres dimensiones, denominadas nanopartículas [1, 2]. Estos materiales poseen características atractivas como su gran área superficial, propiedades ópticas distintas a las que presenta el material en bulto, relativa facilidad para su síntesis con tamaño y forma modificables, así como la posibilidad de funcionalizar o recubrir sus superficies [3].

Desde la antigüedad la plata ha sido utilizada como antibiótico y hoy en día su forma nanoestructurada o coloidal ha encontrado muchas más aplicaciones en la medicina. Las nanopartículas de plata (AgNPs) poseen excelentes propiedades antimicrobianas, con efectividad comprobada contra bacterias, hongos y virus resistentes a múltiples fármacos [4]. Además, en los últimos años se ha incrementado el interés en el estudio de su actividad antiproliferativa contra diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, su aplicación biomédica se ha visto limitada porque, a pesar de sus atractivas propiedades los métodos empleados para la síntesis de AgNPs confieren toxicidad inherente al producto final [3]. En este sentido, existen alternativas para la producción de nanomateriales con mayor biocompatibilidad con síntesis más limpias, así como la aplicación de recubrimientos de superficie [5].

El cáncer es una enfermedad multifacética, extremadamente variable en su aparición y desarrollo, caracterizada por el crecimiento y división celular descontrolados. Es causado por una combinación compleja de factores genéticos, fisiológicos y ambientales. Las células cancerosas son autosuficientes en términos de señales de crecimiento y si el sistema inmune no logra controlar este crecimiento desmedido, la enfermedad progresa con la aparición de tumores y posteriormente se produce metástasis [6].

El cáncer de colon es un problema significativo alrededor el mundo, pues es el tercer tipo de cáncer más común y se estima que 700 mil personas mueren al año a causa de esta enfermedad. El cáncer es la tercera causa de muerte en México después de complicaciones de la diabetes *mellitus* y enfermedades cardiovasculares. También, de

acuerdo con estadísticas la Organización Mundial de la Salud, en 2018 el cáncer de colon registró ser el tercer tipo de cáncer más común en México [7, 8].

En conjunto con el recto, el colon conforma el intestino grueso, cuya pared se compone de cuatro capas. La capa llamada mucosa, es el revestimiento interno del tracto y está unida a una capa de tejido fibroso llamada submucosa. Posterior a la submucosa se encuentra una capa muscular gruesa denominada muscularis y todo el tubo está rodeado finalmente por una capa de tejido conectivo llamada serosa, que cubre la mayor parte del colon pero no el recto [9]. Antes de originarse el cáncer de colon, usualmente ocurre un crecimiento de tejido desde la mucosa hacia la luz intestinal, llamado pólipo. Estos tumores benignos (adenoma) son producidos por defectos en la proliferación celular, diferenciación o apoptosis en las células de esta capa. El 95% de los cánceres de colon son adenocarcinomas y surgen de pólipos que tienen potencial de transformación a tumores malignos [10-12].

Los tratamientos convencionales para el cáncer de colon tienen una efectividad limitada y producen diversos efectos secundarios. Además, el cáncer de colon puede reaparecer aun cuando el tejido canceroso haya sido eliminado por completo durante una cirugía inicial [13, 14]. Un tratamiento adyuvante posterior a la cirugía, cuyo propósito es destruir células cancerosas remanentes, es la quimioterapia.

La quimioterapia consiste en la administración de medicamentos directamente en el torrente sanguíneo, o por vía oral, los cuales alcanzan todas las áreas del cuerpo [11]. El fármaco más común para el tratamiento de cáncer de colon es el 5-fluorouracilo (5-FU), sin embargo este posee un tiempo de vida media muy corto (20 min) y una amplia distribución hacia tejidos sanos. Además, debido a su alta citotoxicidad en células no tumorales, produce graves efectos secundarios como mucositis, diarrea, alteración de la microbiota intestinal, adelgazamiento del cabello, deficiencia severa de médula ósea, alteración hematológica y reacciones cutáneas [15-18]. Otros fármacos comunes son el oxaliplatino, cuyo tratamiento está limitado debido a sus efectos secundarios neurotóxicos, y el fármaco irinotecán. Sin embargo, cuando estos fármacos son empleados como monoterapia, la tasa general de respuesta favorable de los pacientes con cáncer de colon es de menos del 40% [19, 20].

En general, no existe un modelo de tratamiento definitivo a seguir y que sea totalmente efectivo. Por ejemplo, en el tratamiento inicial de cáncer colorrectal metastásico se usan

varias combinaciones de protocolos de quimioterapia, las cuales comprenden al menos dos de los tres medicamentos comunes mencionados previamente [14]. Es por ello que en los últimos años se han examinado alternativas, entre ellas la incorporación de nanopartículas al tratamiento de cáncer. Actualmente se desarrollan nanopartículas de plata con nuevas formulaciones con el objetivo de disminuir su toxicidad sobre las células sanas e incrementar a su vez, el efecto antiproliferativo en células cancerosas [21-24].

Entre las principales ventajas de usar AgNPs como agentes terapéuticos contra el cáncer destacan su reactividad química comparablemente baja, su capacidad de lograr acción sinérgica en conjunto con pequeños volúmenes de fármacos, así como en conjunto con quimioterapia [24]. Al mismo tiempo, una de las principales rutas de exposición a nanopartículas es la ingestión. Se estima que la persona promedio en países desarrollados es expuesta a 10^{12} – 10^{14} partículas finas (0.1–1 μm) a ultra finas (<100 nm) cada día [25]. Por ello, el uso de un modelo de cáncer de colon resulta además relevante para estudiar cómo influye la función intestinal (absorción) en la respuesta celular a las AgNPs.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa de las nanopartículas de plata Argovit[®] en la línea tumoral HCT-15 correspondiente a cáncer de colon. La preparación comercial de nanopartículas de plata Argovit[®] posee actividad antimicrobiana, así como efectos antivirales y antiinflamatorios aparentes [26]. Así mismo el uso de Argovit[®] está aprobado en Rusia para dispositivos médicos con aplicaciones veterinarias y humanas [27-30]. Por ello, con el objetivo de valorar su posible aplicación médica como agente anticancerígeno, fue preciso examinar los mecanismos de muerte celular inducidos y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, para vincular los efectos observados en el modelo tumoral con las propiedades fisicoquímicas del nanomaterial, se caracterizaron las AgNPs por medio de dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis). Finalmente se estudió la toxicidad de las nanopartículas de plata en un modelo celular sano, para lo cual se emplearon cultivos primarios de linfocitos y monocitos de bazo de ratones BALB/c.

2. Antecedentes

Distintos autores reportan actividad antiproliferativa propia de las nanopartículas frente a diferentes líneas tumorales. Buttacavoli *et al.* reportan el uso de AgNPs obtenidas de *Klebsiella oxytoca* en la línea celular SKBR3 de cáncer de mama. Tras la exposición, encontraron que la muerte celular ocurre principalmente por apoptosis y autofagia inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS) [31].

Verano Braga *et al.* evaluaron la actividad antiproliferativa de las nanopartículas comerciales NanoXact™ con recubrimiento de citrato, de 20 y 100 nm de diámetro, en la línea tumoral LoVo correspondiente a carcinoma de colon humano. A partir de los resultados encontraron que las nanopartículas de menor tamaño generan una mayor concentración de ROS intracelular [32]. Por otra parte, Sahu *et al.* evaluaron las nanopartículas comerciales Biopure® de 20 nm en la línea celular Caco2 de adenocarcinoma colorrectal humano y observaron que, en ausencia de estrés oxidativo, existe una mayor citotoxicidad debido a daños en el ADN y lesiones mitocondriales [4]. Juárez-Moreno *et al.* analizaron la citotoxicidad de las nanopartículas Argovit® con recubrimiento de polivinilpirrolidona en diferentes líneas tumorales, entre ellas la DLD-1 y HT-29 de carcinoma colorrectal humano. En estos estudios se encontró un efecto citotóxico mediado por ROS dependiente del tiempo y la dosis [33]. El efecto de estas y otras formulaciones en líneas tumorales, se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Efecto de distintas formulaciones de AgNPs en líneas tumorales.					
AgNPs	Tamaño (nm)	[AgNPs]	Línea tumoral	Mecanismo de acción	Ref.
Obtenidas de <i>Klebsiella oxytoca</i>	NA	NA	SKBR3. Cáncer de mama.	Apoptosis y autofagia inducida por ROS	31
NanoXact™. Recubrimiento de citrato.	20 y 100	0.02 mg/mL	LoVo. Carcinoma de colon.	AgNPs de 20nm generaron más ROS que las de 100nm, las cuales no pueden ingresar a la célula.	32
BioPure® estabilizadas con citrato	20	1 mg/mL	Caco2. Adenocarcinoma colorrectal	Aumento de la citotoxicidad, daño al ADN y lesiones mitocondriales, en ausencia de estrés oxidativo	4

Síntesis con extracto de plantas	20	NA	HTC116. Carcinoma colorrectal.	Apoptosis inducida por las AgNPs fue un proceso dependiente de p53, que involucra la producción de ROS y cascadas de JNK.	34
Argovit® Recubrimiento de PVP	35 ± 15	12 mg/mL	DLD-1, HT-29. Carcinoma colorrectal	Efecto citotóxico mediado por ROS, dependiente del tiempo y la dosis.	33
Síntesis con naringenina .	6	NA	HCT116, HT-29. Carcinoma colorrectal	Daño mitocondrial y en ADN mediado por ROS, que condujeron a la muerte celular.	35
BioPure® Estabilizadas con citrato	20, 30 y 60	1 mg/mL	Caco2. Adenocarcinoma colorrectal	Las NPs fueron absorbidas y disueltas intracelularmente. Respuestas celulares inducidas por iones Ag ⁺ liberados de las NPs. Citotoxicidad dependiente del tiempo y concentración, pero no del tamaño. Estrés oxidativo.	25

3. Marco teórico

3.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Históricamente, ante la limitada resolución de imagen que ofrecen los microscopios ópticos, la cual está impuesta por la longitud de onda de la luz visible, se desarrollaron los microscopios electrónicos. El microscopio electrónico de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) permite visualizar componentes de muestras cuyas dimensiones son menores a 100 nm, i.e. nanoestructuras [36]. El mecanismo de obtención de imágenes de un TEM está compuesto de distintos elementos, como se ilustra en la Figura 1.

El cañón de electrones genera el haz de electrones, que puede ser enfocado por medio de aperturas metálicas y lentes electromagnéticas al interior de la columna. Debido a la dualidad onda-partícula de los electrones, estos pueden ser desviados por campos magnéticos o eléctricos para lograr el enfoque del haz [37]. De este modo los electrones son dirigidos hacia la muestra, la cual se ubica sobre el portamuestras, también llamada rejilla de TEM. Esta consiste en un marco metálico con una película a base de carbono y

se encuentra montada en un brazo mecánico para controlar la posición y sujetar la muestra [37].

El análisis por TEM requiere que las muestras sean lo bastante delgadas para que una cantidad suficiente de electrones pueda atravesar la muestra y ser transmitida, para generar una imagen interpretable en un tiempo razonable (Figura 2). Es por ello que, generalmente, el grosor de la muestra debe estar dentro de los 100 nm. Nanomateriales 1D, como monocapas (grafeno o pozos cuánticos), nanotubos y nanoalambres, puntos cuánticos y nanopartículas son lo suficientemente delgados para ser analizados por TEM sin realizar modificaciones en la preparación de la muestra [36].

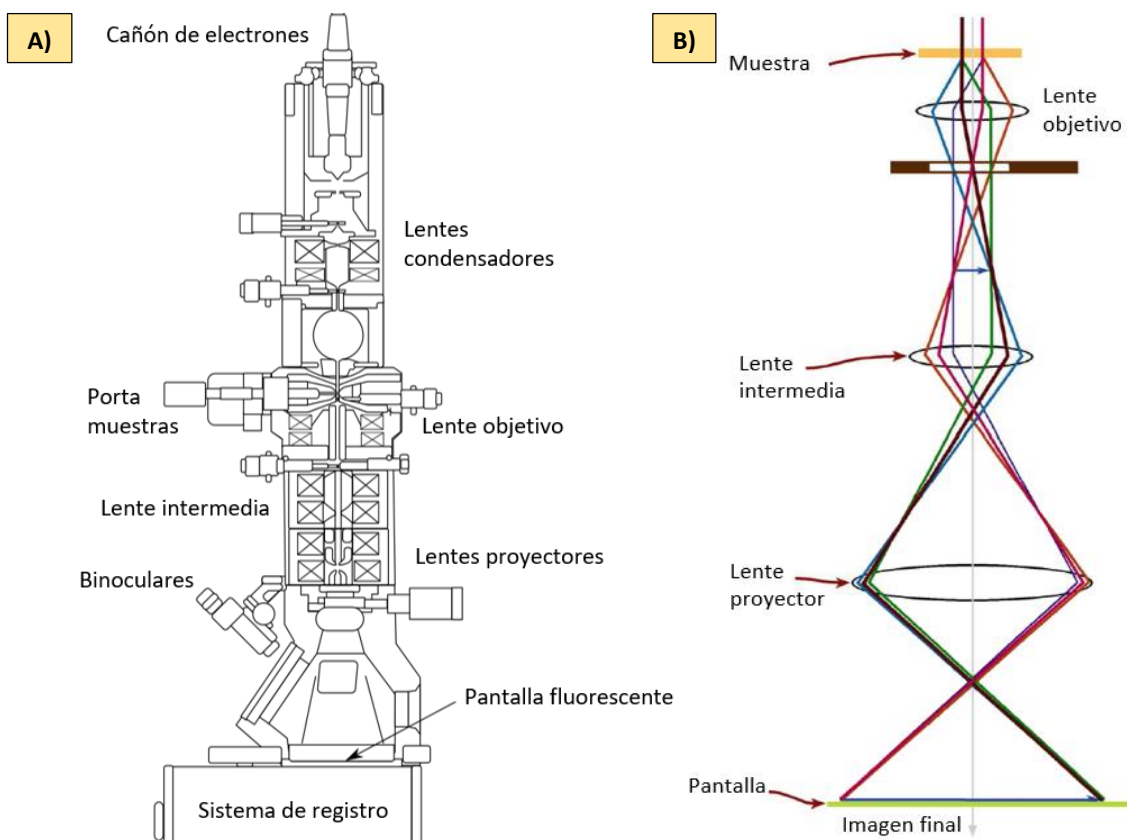


Figura 1. Diagrama A) de los componentes del TEM y B) de rayos para la formación de imagen con electrones transmitidos. Imagen adaptada de Williams *et al.* [36].

Características como la densidad o la composición de la muestra, influyen en la transmisión de los electrones. Generalmente la intensidad de la señal de electrones transmitidos es función de la energía del electrón y del número atómico (Z) promedio en la muestra [36].

Luego de incidir en la muestra, los electrones transmitidos son enfocados de vuelta y luego magnificados por un sistema de lentes electromagnéticas ubicados justo después de

la muestra, llamados lentes objetivos (Figura 1). A lo largo del sistema de obtención de imágenes, la dirección de emisión de los electrones puede ser modificada con lentes electromagnéticas como condensadores y lentes proyectoras [38].

Al final de su trayecto, los electrones llegan a una pantalla, dispositivo de carga acoplada (CCD), o placa fotográfica. Este elemento convierte la intensidad de los electrones a intensidad de luz. Finalmente la imagen puede ser almacenada de forma digital [37].

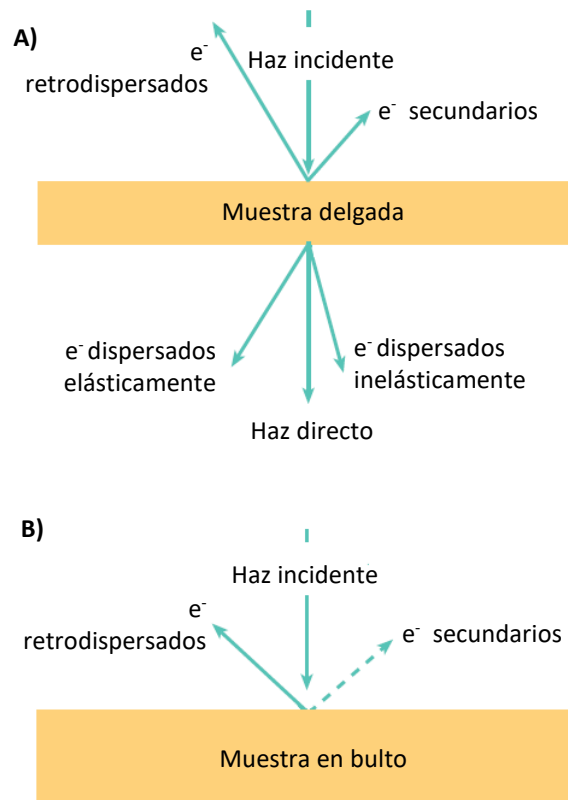


Figura 2. Tipos de dispersión de electrones de una muestra A) delgada y B) en bulto. Imagen adaptada de Williams *et al.* [36].

3.2. Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Una técnica para estudiar sistemas coloidales es la dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés). Una de las principales aplicaciones de esta técnica es la determinación del tamaño de nanopartículas.

En la Figura 3 se muestra un arreglo típico de la técnica DLS. Un haz de luz monocromática atraviesa una solución que contiene las nanopartículas y ocurren eventos de dispersión. Cuando el tamaño de las partículas dispersas es $<1/10$ de la longitud de

onda de la luz incidente (i.e. $\lambda/10$), la luz dispersada tendrá la misma energía (dispersión elástica) de la luz incidente, y es independiente del ángulo (uniforme en todas direcciones) [39].

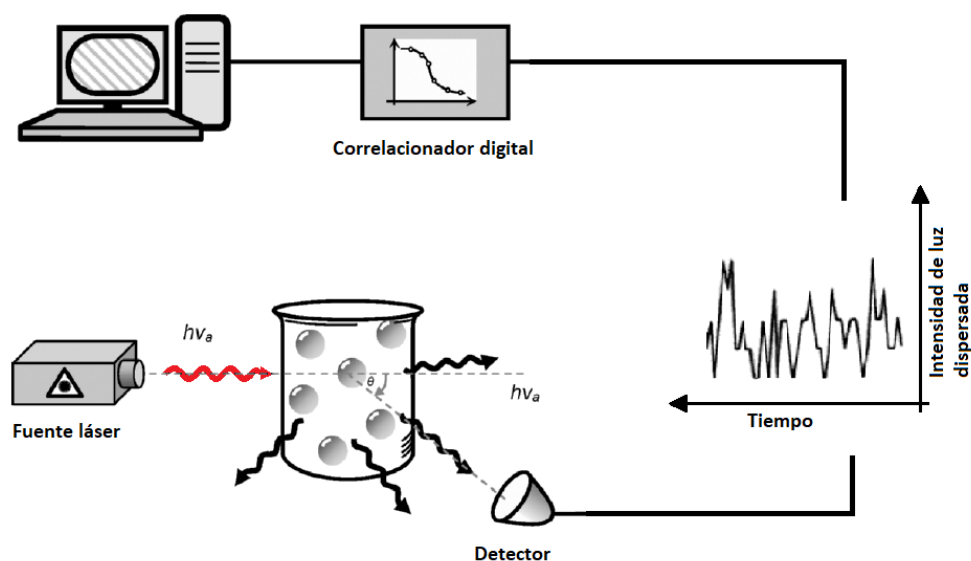


Figura 3. Diagrama de técnica DLS. Imagen adaptada de Róz *et al.* [40].

Las partículas en solución se mueven en pequeños patrones aleatorios debido a las colisiones con moléculas de disolvente que lo rodean (movimiento Browniano). A temperatura constante las partículas pequeñas se difunden a mayor velocidad que partículas grandes [41]. Sin embargo, con DLS se miden billones de partículas que sufren difusión aleatoria en una solución, por lo que sus posiciones con respecto al detector (y el número de fotones detectados) están cambiando constantemente. Por tal razón, tendremos una intensidad promedio de luz dispersada que llega al detector, la cual fluctúa sobre escalas de tiempo muy corto (de micro-a nanosegundos).

Tales fluctuaciones dependientes del tiempo se relacionan con la velocidad de movimiento de las nanopartículas por medio de una función de autocorrelación. La función de autocorrelación se analiza ajustando numéricamente los datos mediante cálculos basados en distribuciones de tamaño de partícula supuestas [41].

Con el análisis de la fluctuación dependiente del tiempo se obtiene el coeficiente de difusión de las partículas. De esta manera, por medio de la relación *Stokes-Einstein*, se puede conocer el diámetro de una partícula esférica si se conoce la viscosidad de la solución. En este sentido, partículas grandes registrarán un menor número de fluctuaciones en un mismo periodo de tiempo, que partículas pequeñas [40].

Esta técnica es especialmente útil para estudiar la monodispersidad de nanopartículas y determinar pequeños cambios en el diámetro medio luego de la adsorción de moléculas/capas, cuando se aplica un recubrimiento [40]. Sin embargo, es importante considerar que una suposición clave en los cálculos de DLS es que las moléculas o partículas analizadas deben ser esféricas [41]. En otras palabras, el diámetro hidrodinámico (d_H) es el diámetro de una esfera dura hipotética que se difunde a la misma velocidad que la partícula que se está midiendo [39].

3.2.1. Potencial zeta (ζ)

Debido a que no existe una técnica satisfactoria para medir la carga superficial de nanopartículas en solución, una práctica común es medir el potencial zeta (ζ). En la Figura 4 se muestra una nanopartícula con carga superficial positiva, por lo que iones de carga opuesta presentes en la solución son fuertemente adsorbidos. Esta capa de iones opuestos permanece unida rígidamente y recibe el nombre de capa de Stern.

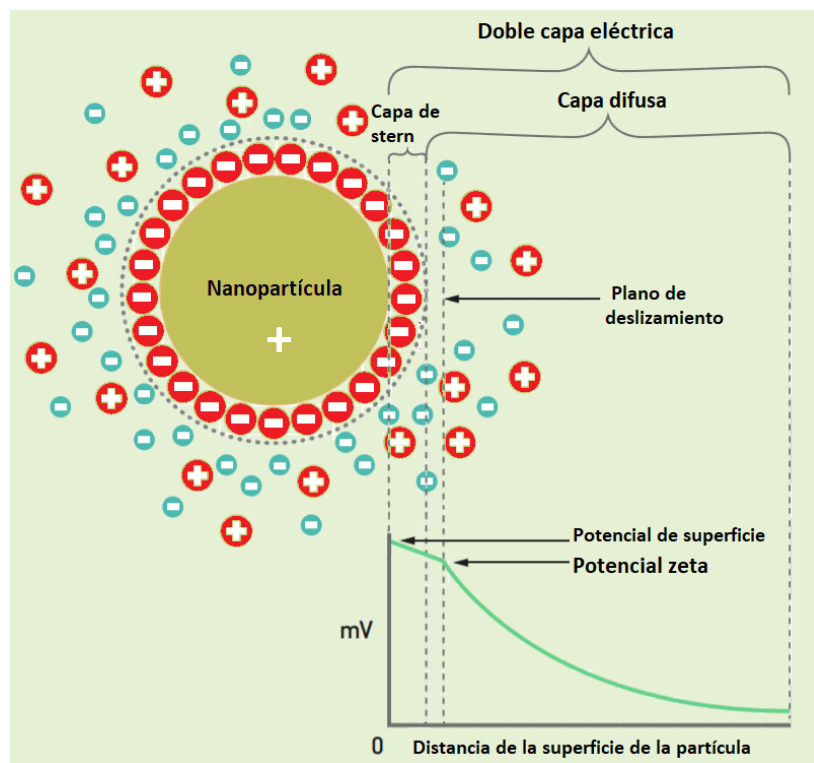


Figura 4. Potencial z. Adaptado de Park *et al.* [42].

Fuera de la capa de Stern hay una capa difusa en la que los iones positivos superan a los iones negativos y equilibran el exceso en la capa de Stern. La composición de la capa difusa es dinámica y varía de acuerdo como varios factores, p.e., pH, concentración y fuerza iónica [39]. El potencial electrostático en la superficie de las partículas disminuye conforme se incrementa la distancia, a través de la capa de Stern y se aproxima a cero al final de la capa difusa, donde se encuentra la mayor parte de la solución. En conjunto, la capa de Stern y la capa difusa conforman lo que se conoce como doble capa eléctrica. Estas son importantes para determinar las fuerzas entre las partículas coloidales [43].

Cuando se aplica un campo eléctrico a la suspensión, las partículas cargadas se mueven hacia el electrodo opuesto (electroforesis). Dentro de la capa difusa existe un plano hipotético que actúa como la interface entre las partículas en movimiento y la capa de dispersante a su alrededor durante la electroforesis. Este plano hipotético es el plano de deslizamiento característico y el potencial zeta corresponde al potencial en esta interfase partícula-fluido. El potencial zeta se puede medir rastreando la velocidad de una partícula cargada negativa o positivamente que se mueve a través de este campo eléctrico [43].

La relación entre el potencial zeta y la estabilidad coloidal no es tan clara como es descrita a menudo. Con frecuencia se afirma que valores de ζ cercanos a 0 mV corresponden a suspensiones de partículas inestables, mientras que un valor de ± 30 proporciona estabilidad [44].

3.3. Espectroscopía UV-Vis

Cuando se hace incidir un haz de luz (radiación electromagnética) sobre una sustancia en disolución, una fracción de la luz atraviesa la muestra (se transmite), mientras que otra fracción es absorbida. La espectroscopía UV-vis es una técnica empleada para medir cuánta luz absorbe una muestra en disolución. Esto se logra midiendo la intensidad de luz que logra atravesarla, basado en la ley de Beer-Lambert [45].

En átomos y moléculas hay niveles de energía discretos y la diferencia de energía entre estos niveles es también un valor discreto. Es decir que, para excitar un átomo/molécula de un estado basal E_1 a un estado excitado E_2 debe absorber una cantidad específica de energía. Generalmente los estados excitados son de corta duración y los átomos regresan

a su estado basal con la emisión de energía (E_{21}). La diferencia de energía entre ambos estados corresponde a una cierta longitud de onda λ (o frecuencia) de radiación electromagnética y esto dependerá del tipo de transición. Por ejemplo, en la región ultravioleta-visible (UV-vis) del espectro electromagnético, ocurren transiciones electrónicas [45].

Cuando un átomo o molécula absorbe radiación ultravioleta ($\lambda = 100\text{-}380\text{ nm}$) o visible ($\lambda = 380\text{-}760\text{ nm}$), la energía de esta radiación provoca una redistribución de electrones de los estados de energía más bajos, hacia estados de mayor energía. Visto de otra forma, los átomos y moléculas absorben energía y son desestabilizados temporalmente [46].

Una de las aplicaciones de la espectroscopía UV-vis en la caracterización de nanomateriales es estudiar la resonancia de plasmón superficial localizada. Los plasmones consisten en oscilaciones colectivas de electrones libres en materiales metálicos. En nanopartículas metálicas, estas oscilaciones ocurren en un volumen finito limitado por las dimensiones de la partícula y son promovidas por una cierta frecuencia de radiación electromagnética (frecuencia de resonancia) [47]. En este sistema, la longitud de onda de la luz incidente es mucho mayor que el diámetro de las partículas ($d \ll \lambda$). Cuando los electrones libres de una nanopartícula metálica son promovidos por el campo eléctrico incidente para oscilar colectivamente a la frecuencia resonante, la luz es absorbida por la nanopartícula [48] (Figura 5). La intensidad, grosor y ubicación de la banda de plasmón en espectro de absorción dependerá de la forma, tamaño y composición (elementos químicos) de la nanopartícula [40, 47].

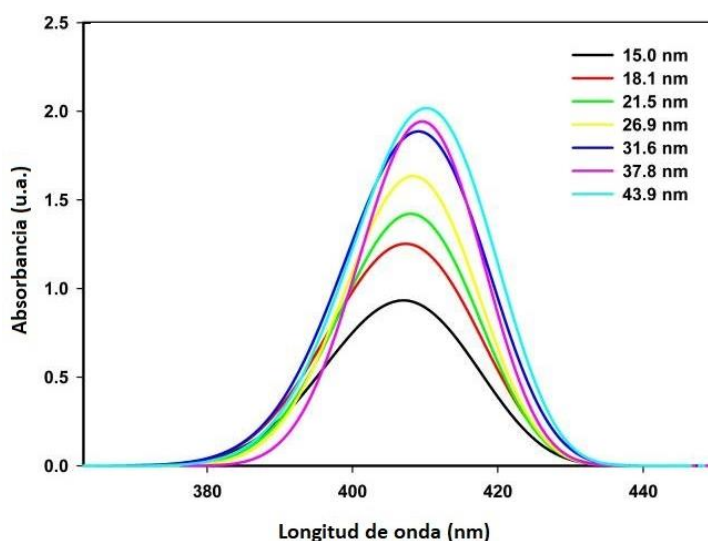


Figura 5. Espectros de absorción teóricos de nanopartículas de plata de varios diámetros. Imagen adaptada de Saion *et al.* [49].

3.4. Espectroscopía de Fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia o espectrofluorimetría se emplea para analizar la fluorescencia emitida por una muestra. En la Figura 6 se muestra el diagrama de bloques de un espectrofluorímetro. La fuente de luz es necesaria para excitar la muestra de interés, para generar los estados excitados cuya emisión queremos observar al explotar la fotoluminiscencia. Convencionalmente se utiliza una lámpara de xenón como fuente de luz. Con el monocromador de excitación M1 se selecciona la longitud de onda de la fuente, que excitará la muestra. A su vez, el monocromador de emisión M2, selecciona la longitud de onda emitida por la muestra que será enviada al detector. La fluorescencia es medida en un ángulo de 90° para minimizar la cantidad de luz de excitación que llega al detector [50].

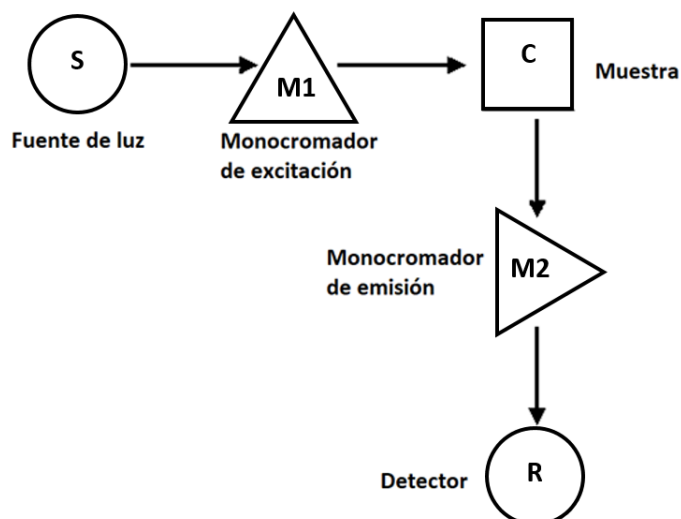


Figura 6. Diagrama óptico simplificado de un espectrofluorímetro. Imagen adaptada de Ceroni *et al.* [50].

Para registrar un espectro de emisión, se fija en el monocromador M1 la longitud de onda que excitará la muestra, λ_{Ex} , mientras que el monocromador M2 examina un intervalo de longitudes de onda. De esta forma se mide cómo varía la intensidad de luminiscencia con la longitud de onda de emisión λ_{Em} [50].

De manera contraria, para registrar un espectro de excitación es necesario fijar el monocromador M2 a una cierta longitud de onda λ_{Em} , mientras que el monocromador M1 de excitación se varía para analizar el intervalo espectral al cual la muestra absorbe [50].

3.5. Viabilidad Celular: ensayo de exclusión vital con azul tripano

Cuando se estudia la citotoxicidad de una sustancia es necesario medir parámetros celulares que reflejen la viabilidad de una población. Uno de los métodos más sencillos es el ensayo de exclusión del colorante vital azul tripano. La membrana celular es impermeable a este colorante, por lo que solamente puede penetrar en células cuya membrana ha sufrido rupturas. De esta manera el citoplasma de dichas células se colorea de azul debido a la unión del colorante con proteínas intracelulares [51]. Por medio de conteos en el microscopio se puede determinar el número de células vivas, las cuales se muestran pequeñas y redondas, mientras que las células muertas lucirán hinchadas y de color azul oscuro.

3.6. Citometría de Flujo

La citometría de flujo es una técnica empleada para detectar y medir simultáneamente múltiples parámetros de células individuales en una suspensión. Estos parámetros abarcan la granularidad citoplásmica, tamaño celular (propiedades físicas), contenido de ADN-ARN, antígenos citoplásmicos, nucleares y de la superficie de la membrana. Los antígenos de superficie, citoplásmicos y nucleares, se consideran propiedades extrínsecas de la célula debido a que su detección requiere de anticuerpos conjugados con fluoróforos. Por otro lado, las propiedades físicas de la célula son propiedades intrínsecas porque no se requieren reactivos exógenos para su detección. Estos parámetros se miden gracias a los sistemas que componen a un citómetro de flujo: el sistema de transporte de fluidos, el sistema óptico, el sistema electrónico y el sistema informático [52].

El sistema de transporte de fluidos comienza con un área de recepción de muestras donde se colocan las microplacas o tubos de ensayo. La suspensión celular es transportada por presión de aire en un sistema de tubería que conduce a la cámara de flujo, la cual es una boquilla cónica (Figura 7). En la cámara de flujo la muestra está rodeada por una corriente de fluido de enfoque libre de células, lo que produce una configuración de flujo laminar. El fluido de enfoque exterior obliga a las células de la muestra a alinearse en una sola fila. Posteriormente en la zona de detección, el flujo de células se encuentra con un láser en el punto de intercepción de la luz y genera una señal óptica [52, 53].

Los láseres pueden emitir luz intensa, coherente (ondas de luz paralelas y unidireccionales), monocromática (un único color o longitud de onda), dando como resultado una baja divergencia y un alto brillo de las señales generadas [52].

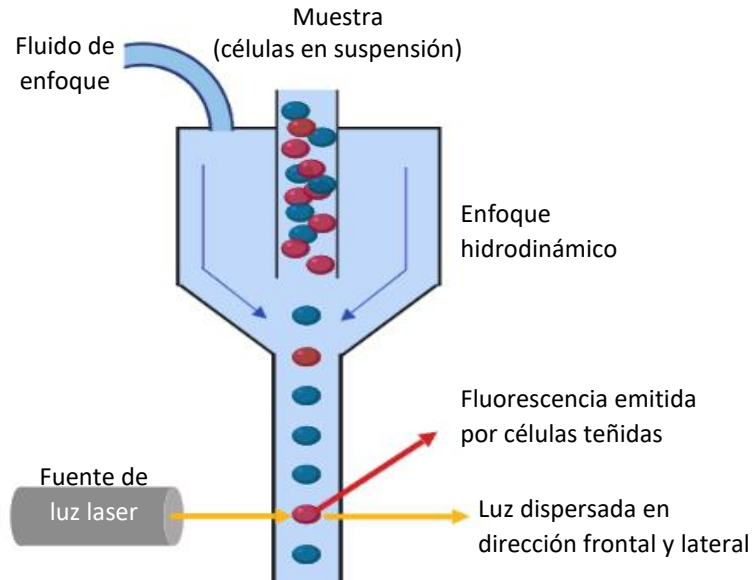


Figura 7. Esquema general de funcionamiento de un citómetro de flujo.

Las señales ópticas más comunes son la dispersión de la luz en ángulo hacia adelante (2 a 10 grados) y en ángulo recto (Figura 8). La primera es proporcional al tamaño de la célula, y la segunda se relaciona con las características de la célula, como la granularidad citoplásmica y la configuración nuclear.

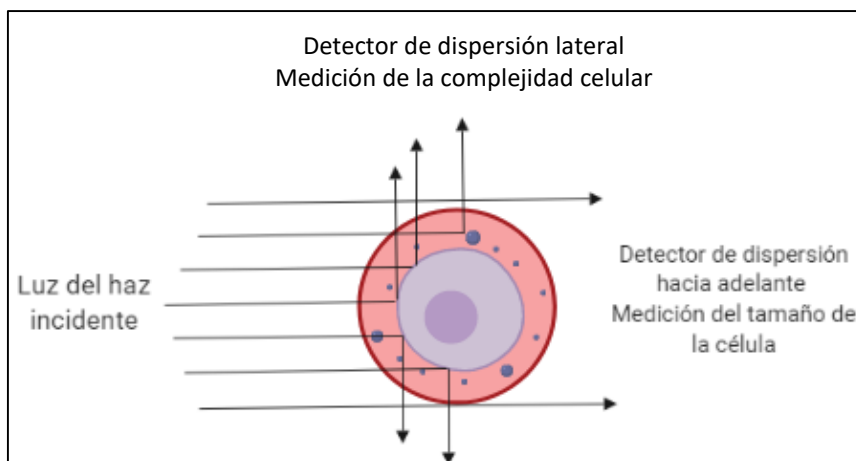


Figura 8. Relación entre la dispersión de la luz con el tamaño/estructura de la célula.

Por otro lado, la detección de antígenos citoplásmicos, nucleares y de la superficie de la membrana, así como el contenido de ARN-ADN, requiere de otro tipo de señal óptica distinta: la señal de fluorescencia. Las señales fluorescentes son generadas con

anticuerpos o moléculas marcadas con fluoróforos que reaccionan de forma específica con diferentes antígenos celulares. Para el caso de ácidos nucleicos, estos pueden teñirse directamente por la unión con agentes intercalantes, que generan una señal fluorescente. Las células etiquetadas con fluoróforos absorben la luz del láser incidente y emiten una longitud de onda mayor, lo que se denomina fluorescencia [52, 53].

Una serie de dispositivos ópticos son utilizados para dirigir la luz incidente, la luz reflejada y la fluorescencia hacia los detectores. En los detectores, los fotones de luz inciden y se convierten en electrones (efecto fotoeléctrico). Finalmente, el sistema informático se encarga del almacenamiento de datos, la selección y la visualización gráfica en una pantalla [52].

3.7. Tinción Anexina V / Ioduro de Propidio

La apoptosis es un proceso de muerte celular cuidadosamente regulado, donde los restos celulares son ingeridos y reutilizados por células vecinas. Se diferencia de la necrosis, por cambios morfológicos y bioquímicos característicos como la compactación y fragmentación de la cromatina nuclear, la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, contracción del citoplasma y la exteriorización de fosfatidilserina. La fosfatidilserina es un fosfoglicérido constituyente de la membrana plasmática, el cual, en células viables se encuentra con mayor abundancia en la cara citosólica de la membrana. Sin embargo, en células apoptóticas la fosfatidilserina es traslocada hacia la cara exoplásmica y el aumento de su exposición es reconocido por células fagocíticas [54, 55].

La anexina V es una proteína (35.8 kDa) de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} , la cual tiene una alta afinidad por fosfatidilserina. Los conjugados de anexina V con fluoróforos, luego de unirse a moléculas de fosfatidilserina, proveen una señal fluorescente que permite identificar células apoptóticas. No obstante, la anexina V también puede pasar a través de la membrana comprometida de células muertas y unirse a las moléculas de fosfatidilserina al interior de la célula. Este inconveniente puede solucionarse por medio de una contratinción, por ejemplo, incorporando ioduro de propidio (Figura 9). El ioduro de propidio es un agente intercalante capaz de teñir el ADN en el núcleo de células dañadas, lo que permite discriminar las células apoptóticas de las células necróticas [55, 56].

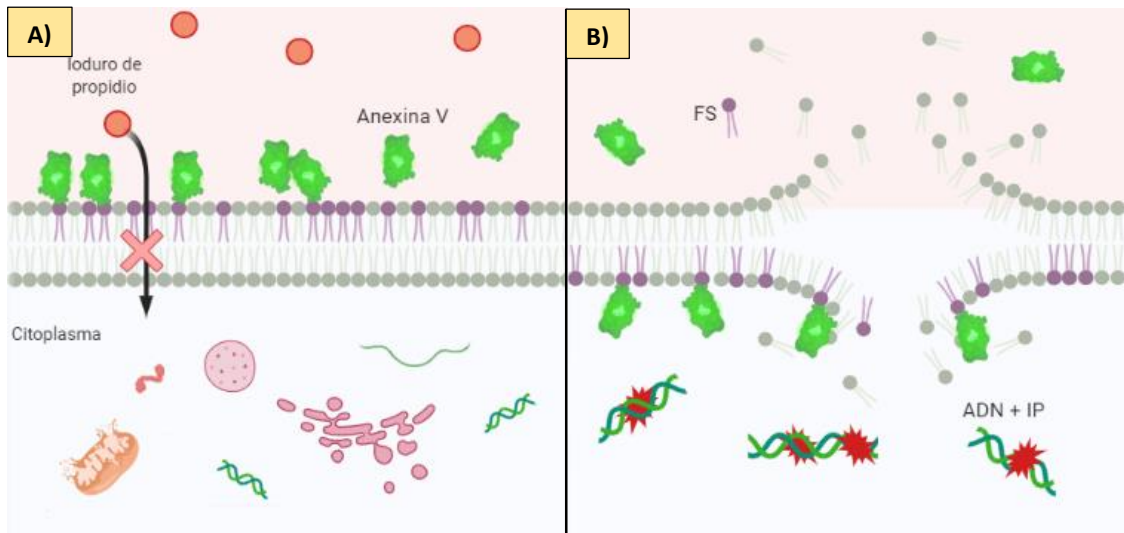


Figura 9. Tinción de célula A) apoptótica y B) necrótica con ioduro de propidio y anexina V. Abreviaciones IP: ioduro de propidio y FS: fosfatidilserina.

3.8. Fragmentación del ADN

La degradación del ADN por endonucleasas es un rasgo bioquímico característico de la apoptosis y la detección de rupturas en su estructura de doble hélice (extremos romos) es una técnica común para estudiar dicho proceso de muerte celular. La detección de los fragmentos, de tamaño 180-200 pb, es posible mediante el marcaje de los extremos 3-OH' expuestos, usando el nucleótido desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP) modificado con fluoróforos (Figura 10).

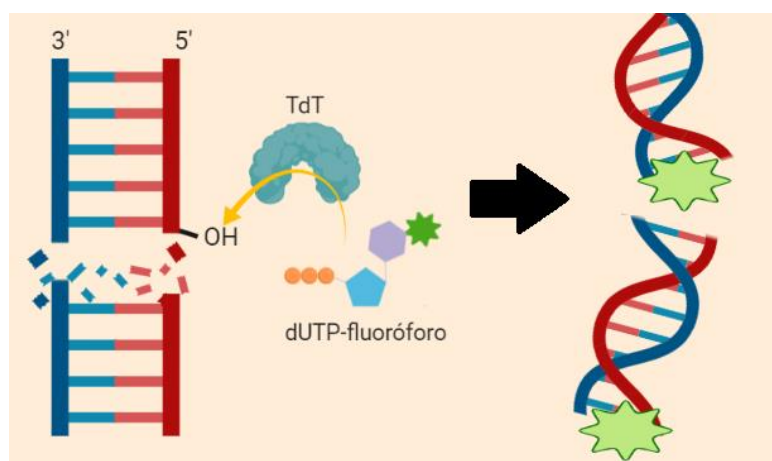


Figura 10. Esquema de la reacción TUNEL.

Esta reacción se conoce como TUNEL (por sus siglas en inglés “Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling”) y es catalizada por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) [57]. La señal fluorescente resultante de esta unión puede ser visualizada por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo y existen kits comerciales disponibles para su ejecución.

3.9. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

En condiciones fisiológicas normales, un pequeño porcentaje del oxígeno metabolizado (1-2%) por organismos aeróbicos, es reducido parcialmente al radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Un radical es un átomo, molécula o ion con uno o más electrones de valencia desapareados. Casi todos los radicales son químicamente muy reactivos, modificando la estructura de las moléculas con las que reaccionan y, por lo tanto, sus propiedades. A menudo los productos de estas reacciones son otros radicales y puede propagar una reacción en cadena que altera muchas más moléculas [58].

El superóxido y otras moléculas altamente reactivas que contienen oxígeno, tanto radicales (radical hidroxilo $OH^{\bullet-}$) y no radicales (p.e. peróxido de hidrógeno H_2O_2) son llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Niveles homeostáticos y fisiológicos de ROS son necesarios para regular diferentes procesos celulares, incluida la función de transportadores/canales iónicos, activación de proteína quinasa/fosfatasa, expresión genética y otros procesos de señalización intracelular [59]. Sin embargo, niveles altos de ROS intracelulares pueden provocar la oxidación inmediata de biomoléculas cercanas [60, 61], despojándolas de sus funciones normales. Además la sobreproducción de ROS genera un desbalance en el ambiente redox celular, cuyos efectos resultan altamente tóxicos, lo que se denomina estrés oxidativo [54]. Existen muchos mecanismos para la generación de ROS en las células. Sin embargo su mayor fuente en células eucariotas es la cadena de transporte de electrones (CTE) en mitocondria, siendo el anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ la ROS primaria generada.

Entre los mecanismos de defensa usados, por la mitocondria, para proteger contra la toxicidad de las ROS está el uso de enzimas que inactivan el superóxido convirtiéndolo primero en H_2O_2 por la superóxido dismutasa (SOD) y luego a H_2O por la catalasa u otras

enzimas. Así mismo, las moléculas antioxidantes como la vitamina E y el ácido α -lipoico protegen contra el estrés oxidativo [54, 59].

La producción celular de ROS se mide comúnmente con sondas fluorogénicas, es decir, compuestos que se vuelven fluorescentes tras la interacción con ROS. Uno de estos compuestos es la hidroetidina (HE) o dihidroetidio. Esta molécula posee una débil fluorescencia azul y puede atravesar la membrana plasmática. Al ser oxidado por ROS, genera el compuesto 2-hidroxi-etidio (E^+) de fluorescencia roja. Este producto es retenido en el núcleo, donde se intercala en la doble hélice del ADN, lo que incrementa su fluorescencia [61-63].

La HE ha sido utilizada para la detección de superóxido mitocondrial, aunque su derivado MitoSOX Red™ se desarrolló para proporcionar una localización más específica de este organelo. MitoSOX Red™ contiene un sustituyente catiónico de trifenilfosfonio que dirige selectivamente esta sonda hacia mitocondrias respirando activamente, donde se acumula debido al potencial de membrana mitocondrial (Figura 11). Al interior de este organelo es oxidado específicamente por superóxido a 2-hidroxi-etidio y se une posteriormente al ADN mitocondrial [63].

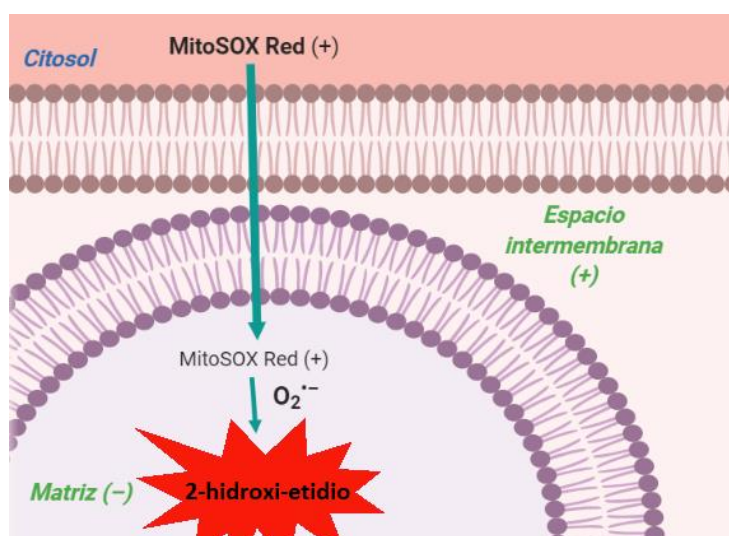


Figura 11. Oxidación de MitoSOX Red™ al interior de la mitocondria.

Durante la activación de vías apoptóticas, la mitocondria desempeña un papel fundamental. La permeabilización de la membrana mitocondrial, y la subsecuente liberación de factores pro-apoptóticos, puede ser desencadenada por incrementos en la producción de ROS. Por esta razón las sondas HE y MitoSOX utilizadas para estudiar la generación de superóxido mitocondrial y la ejecución de apoptosis [64].

4. Hipótesis

Distintas formulaciones de nanopartículas de plata Argovit® tienen un efecto antiproliferativo mediado por especies reactivas de oxígeno (ROS) contra células de cáncer de colon humano, así como un carácter inocuo en cultivos primarios de linfocitos y monocitos de ratones BALB/c.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antiproliferativa de nanopartículas de plata Argovit® en una línea tumoral de cáncer de colon humano (HCT-15), así como su posible toxicidad en un modelo celular sano.

5.2. Objetivos Específicos

Caracterizar las formulaciones de AgNPs por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), espectroscopía UV-vis y Dispersión de Luz Dinámica (DLS).

Evaluar por medio del ensayo de exclusión vital con azul tripano, la viabilidad celular de la línea HCT-15 luego de 24 h de exposición a cinco formulaciones distintas de AgNPs.

Determinar la vía de muerte celular inducida por la exposición a las AgNPs, mediante la tinción con Anexina V / Ioduro de propidio.

Examinar de manera cualitativa la inducción de apoptosis, estudiando la fragmentación de ADN mediante ensayo TUNEL.

Analizar la generación de especies reactivas de oxígeno mitocondriales por medio de la tinción con MitoSox™.

Estudiar por citometría de flujo, la viabilidad celular de cultivos primarios de linfocitos y monocitos de bazo de ratones BALB/c, luego de 24 h de exposición a las formulaciones de AgNPs.

6. Metodología

6.1. Formulaciones de AgNPs

Las cinco formulaciones de nanopartículas de plata Argovit® fueron donadas por el centro científico y de producción Vector-Vita Ltd® (Novosibirsk, Rusia). La preparación de Argovit® posee 12 mg/mL de plata metálica estabilizada con 188/mL de polivinilpirrolidona (PVP). Así mismo, las formulaciones contienen 200 mg/mL de AgNPs dispersas en agua y fue con base a esta concentración que se prepararon diluciones con agua inyectable. Para las cinco formulaciones se optó por evaluar cuatro concentraciones (20 tratamientos en total): 0.01, 0.1, 1 y 10 mg/mL de AgNPs.

6.2. Caracterización de las AgNPs

La morfología de las 5 formulaciones de nanopartículas fue analizada por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM) utilizando un microscopio JEM-2010 (JEOL©), a un voltaje de aceleración de 200 kV. A partir de las micrografías de TEM, con el software ImageJ se determinó el diámetro de los núcleos metálicos de las AgNPs y se elaboraron histogramas de la distribución de tamaños (n=150). El potencial zeta (ζ) y diámetro hidrodinámico (d_H) fueron determinados por dispersión dinámica de luz (DLS) con el equipo Zetasizer Nano Ns modelo DTS 1060 (Malvern Instruments®). Así mismo las AgNPs se caracterizaron por espectroscopía UV-Vis en el rango de 200-800 nm con un espectrofotómetro modelo JENWAY 6705 UV/Vis (Cole-Parmer®), para lo cual se prepararon diluciones de las AgNPs en agua desionizada. Todas las caracterizaciones se

efectuaron en las dispersiones acuosas de las formulaciones de Argovit[®] (agua como medio dispersante). Finalmente las formulaciones de nanopartículas se analizaron por espectrofotometría de fluorescencia. Se analizaron muestras de 10 mg/mL de AgNPs en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal y 0.01% de antibiótico-antimicótico, con el espectrofluorímetro Cary Eclipse (Agilent Technologies[©]).

6.3. Cultivo Celular

Para este trabajo se utilizó la línea celular de adenocarcinoma colorrectal HCT-15, adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC[®]). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Biowest[©]) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Biowest[©]) y 0.01% de antibiótico-antimicótico (Biowest[©]). Las células se proliferaron y mantuvieron de acuerdo con las recomendaciones de la ATCC en placas Petri con medio de cultivo, en condiciones de incubación a 37°C con 5% de dióxido de carbono (CO₂); las células se observaron diariamente con un microscopio invertido Axio Observer.A1 (Carl Zeiss[©]). El medio de cultivo se reemplazó cada 2 días y se efectuaron pases luego de alcanzar 80% de confluencia en la placa.

6.4. Ensayo de Viabilidad

Para conocer el efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad celular se utilizó el ensayo de exclusión de azul tripano. En placas de 96 pozos, se añadieron 190 µL de suspensión celular con una densidad de 10,000–20,000 células por pozo y 10 µL de AgNPs. Para cada tratamiento se realizaron tres experimentos independientes (Figura 12), por triplicado.

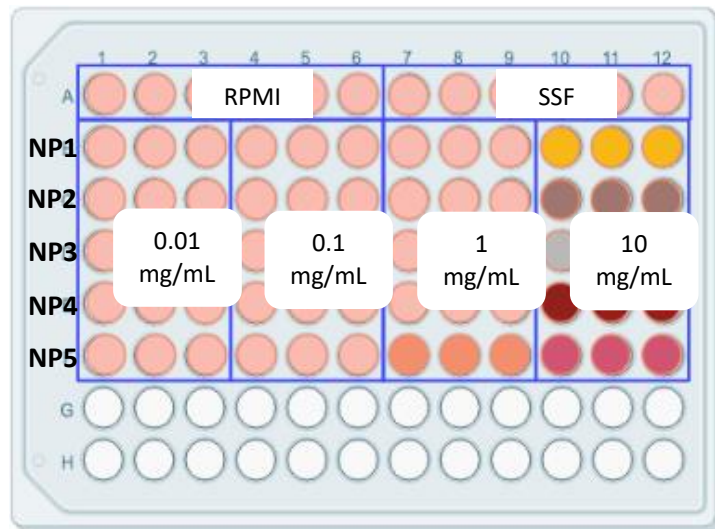


Figura 12. Esquema del montaje de ensayo de viabilidad.

Se añadió un control negativo de medio RPMI-1640 suplementado y un control positivo con solución salina fisiológica (SSF). Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 24 h.

Posterior a la incubación, se añadieron 2 µL de azul tripano al 4% en cada pozo (Figura 13) y se fijaron las células con 20 µL de formaldehído al 37% (concentración final 3.7%).

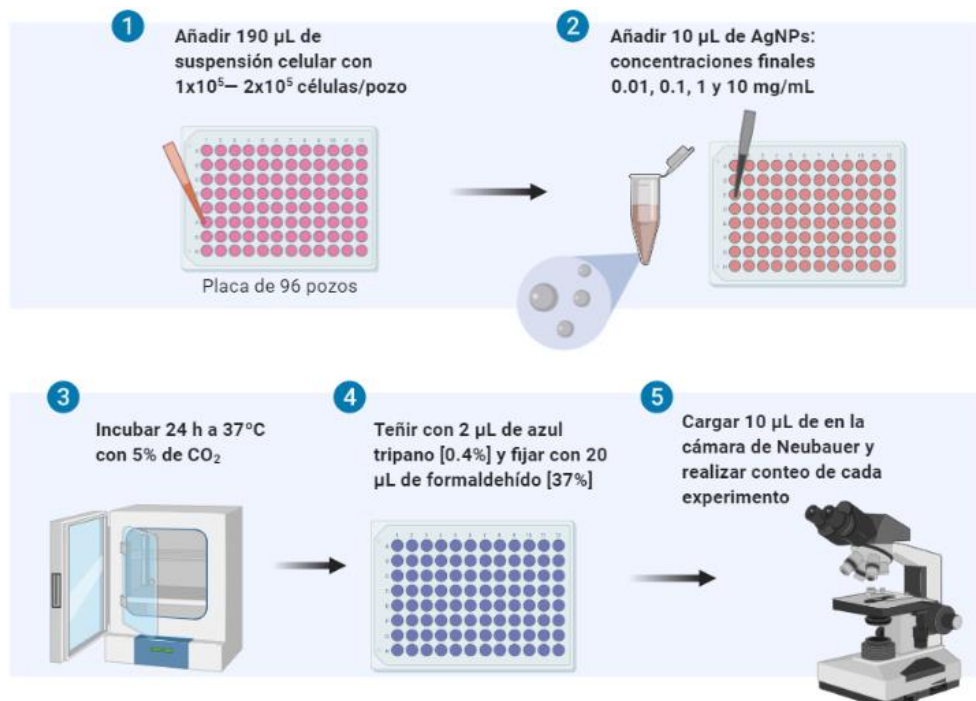


Figura 13. Esquema del ensayo de exclusión vital con azul tripano.

El número de células viables en cada pozo, se determinó por medio de conteos en una cámara de Neubauer, con un microscopio óptico. Para ello se resuspendió cada pozo

(experimento) y se cargaron 10 μL de suspensión celular en la cámara; se consideró como viables aquellas células que permanecieron sin teñir.

El promedio de células viables en los pozos de control negativo se designó como el 100% de viabilidad. De esta manera, el porcentaje de viabilidad celular de cada experimento independiente se calculó como sigue:

$$\% \text{ viabilidad}_{\text{pozo}} = \frac{\text{no. cel viab/pozo}}{\text{prom cél viables control negativo}} \times 100\%$$

Finalmente, el porcentaje de viabilidad del tratamiento en cuestión se obtuvo calculando el promedio de los tres experimentos independientes. Este procedimiento se realizó para cada placa del triplicado.

6.5. Vía de Muerte Celular

Con el objetivo de estudiar el mecanismo de muerte celular inducido por las AgNPs, se utilizó el kit Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis (invitrogen®). Antes de comenzar se ajustó la suspensión celular para colocar 25,200 células por pozo. Para montar el ensayo se incluyó un control negativo (CST: 200 μL de suspensión celular en medio suplementado), así como también un control positivo para anexina V (CAV: 150 μL de suspensión celular en medio sin suplementar y 50 μL de H_2O_2) y uno para ioduro de propidio (CIP: 100 μL de suspensión celular con medio suplementado y 100 μL de agua inyectable). Se añadieron los diferentes estímulos (10 μL de AgNPs en 190 μL de suspensión celular) y se incubó a 37°C con 5% de CO_2 durante 24 h.

Una vez concluido el tiempo de exposición, se añadieron 5 μL de la solución amortiguadora 5X de unión a anexina (suministrado por el proveedor) y 1 μL de anexina V a cada pozo del control CAV. Para el control CIP se añadió 1 μL de ioduro de propidio (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a cada pozo y finalmente para cada uno de los tratamientos se añadieron 1 μL de anexina V y 1 μL de ioduro de propidio. Las células se incubaron a 37°C durante 15 minutos y posteriormente se analizaron 10,000 eventos (células) con el citómetro de flujo Attune® NxT (Life Technologies). La fluorescencia de la anexina V se detectó a 530/30 nm con un filtro en el canal BL1 y la del ioduro de propidio a 603/48 nm con un filtro en el canal VL3.

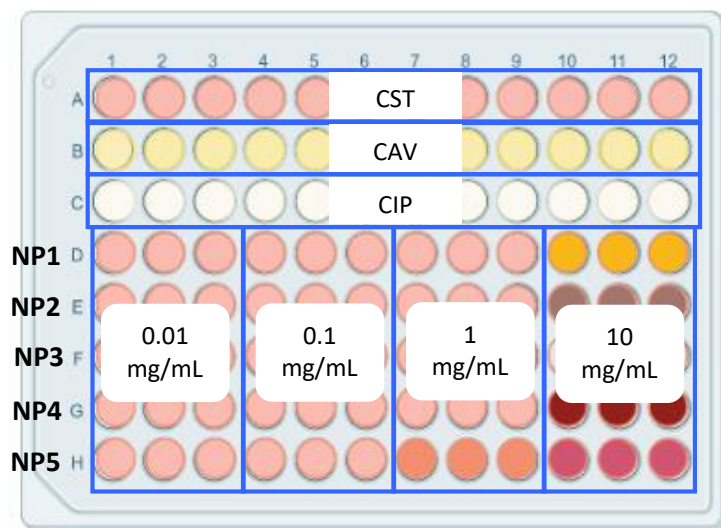


Figura 14. Esquema del montaje de ensayo con ioduro de propidio y anexina V.

6.6. Ensayo TUNEL

Para estudiar la fragmentación del material genético ante la exposición a las AgNPs se realizó un ensayo TUNEL, para lo cual se utilizó el kit Click-iT TUNEL Alexa Fluor® (Invitrogen®). Luego de la incubación con AgNPs se retiró el medio de los pozos y se lavaron con PBS. Se añadieron 100 μL de formaldehído al 3.7% y se incubaron las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posterior a los 15 minutos se retiró el formaldehído y se añadieron 100 μL etanol al 70% a cada pozo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y los pozos se lavaron dos veces con agua desionizada. Se preparó un control positivo con una solución de ADNasa I de acuerdo con la Tabla 2 y se agregaron 100 μL a los pozos control. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Tabla 2. Solución DNasa I	
Componente de reacción	Cantidad por pozo [μL]
Agua desionizada	89
Solución amortiguadora ADNasa I (Componente H)	10
ADNasa (Componente G)	1
Volumen total	100

Se agregaron 50 μL de solución amortiguadora de reacción TdT a cada pozo permitiendo que la solución se expandiera completamente sobre la superficie y se incubaron las placas

a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se retiró la solución amortiguadora de reacción TdT y se preparó la mezcla de reacción de acuerdo con las especificaciones de la Tabla 3. Se añadieron 50 μL de la mezcla de reacción a cada pozo y se incubaron a 37° C durante 1 h. Luego de la incubación se lavaron los pozos dos veces con BSA al 3% en PBS durante 2 min cada uno.

Tabla 3. Mezcla de reacción TdT	
Componente de reacción	Cantidad por pozo [μL]
Solución amortiguadora de reacción TdT (Componente A)	47
EdUTP (Componente B)	1
TdT* (Componente C)	2
Volumen total	50

Para preparar una solución madre de la solución amortiguadora aditiva de reacción Click-iT se le agregaron 625 μL de agua desionizada y con esta se elaboró la mezcla de reacción Click-iT conforme a las especificaciones de la Tabla 4.

Tabla 4. Mezcla de reacción Click-iT	
Componente de reacción	Cantidad para dos pozos [μL]
Solución amortiguadora reacción Click-iT (Componente D)	97.5
Solución amortiguadora aditiva de reacción Click-iT	2.5
Volumen total	100

Una vez preparada la mezcla de reacción, inmediatamente se añadieron 50 μL de la misma a cada pozo y las placas se incubaron a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 30 minutos. Se retiró la mezcla de reacción y se lavó cada pozo con BSA al 3% en PBS 1X durante 5 minutos.

Finalmente se examinaron los pozos con el microscopio Axio Observer.A1 (Carl Zeiss©) en la configuración de contraste de epifluorescencia y se obtuvieron imágenes representativas de los tratamientos.

6.7. Especies Reactivas de Oxígeno Mitocondriales

La generación de superóxido mitocondrial se evaluó utilizando el reactivo MitoSOX™ Red (invitrogen©). Para preparar una solución madre 5 mM de MitoSOX™ Red (PM = 759 g/mol) se disolvió el contenido de uno de los viales (50 µg) suministrados por el proveedor, con 13 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente se diluyó la solución madre para preparar una solución de trabajo cuya concentración estuviera a 43 µM. Para el ensayo se emplearon ~10,065 células por cada pozo. Como control positivo se utilizó el inductor de ROS H₂O₂ (170 µL de suspensión celular y 30 µL de H₂O₂). Se emplearon medio RPMI suplementado y solución salina fisiológica como controles negativos (190 µL de suspensión celular y 10 µL del control). Luego de añadir los estímulos (10 µL de AgNPs en 190 µL de suspensión celular) se incubaron las células durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂.

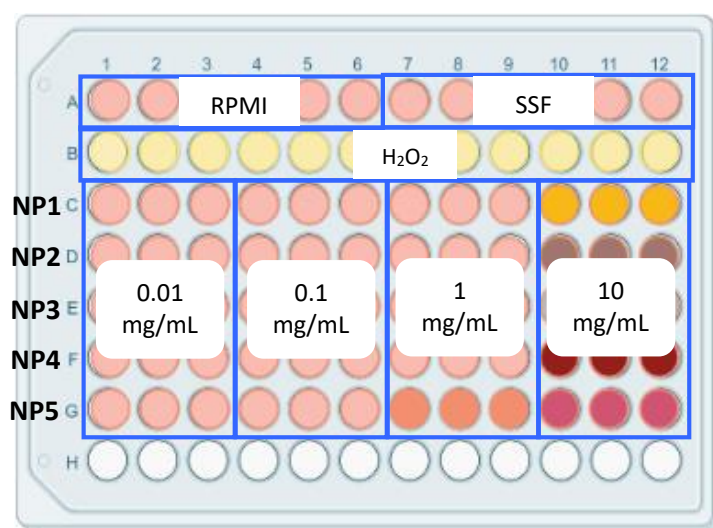


Figura 15. Esquema del montaje de ensayo con MitoSOX.

Luego del periodo de exposición, se añadieron 2 µL de la solución de trabajo MitoSOX a cada pozo (concentración final 0.42 µM) y se incubó a 37°C por 10 minutos. Finalmente las muestras se analizaron mediante citometría de flujo, donde se consideraron 10,000 eventos. La fluorescencia de MitoSOX se detectó a 580 nm con un filtro en el canal VL4 (710/50) y se analizó con respecto al tamaño celular (dispersión hacia delante).

6.8. Modelo Celular Sano

6.8.1. Cultivo Primario

Para evaluar la citotoxicidad de las formulaciones de AgNPs en un modelo celular sano, se realizaron cultivos primarios de monocitos y linfocitos aislados de bazo de ratones BALB/c sanos. Este experimento se realizó con la aprobación del comité de ética de la Universidad Autónoma de Baja California, Valle de las Palmas, con número de expediente 001/2019, siguiendo la norma NOM-062-ZOO-1999 (Figura 16).

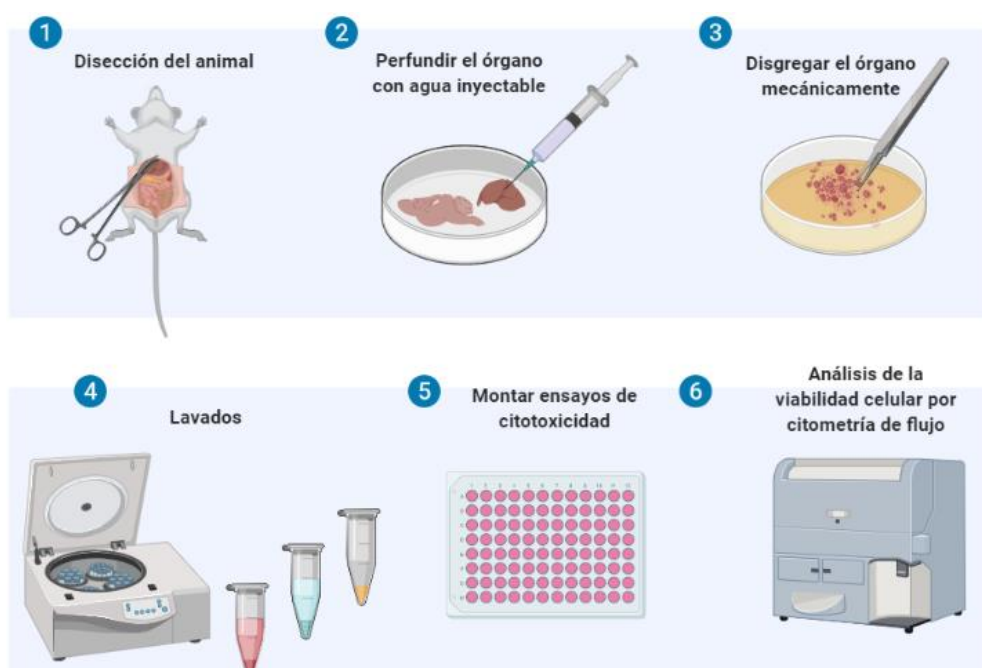


Figura 16. Esquema de elaboración de cultivo primario y análisis de citotoxicidad de las formulaciones de AgNPs.

Para el aislamiento del bazo, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y disecados. Cada bazo recolectado fue perfundido con agua inyectable y disgregado mecánicamente con pinzas de disección. Las células de bazo se lavaron con solución salina 0.9% y se lisaron los eritrocitos restantes con solución salina hipertónica. Finalmente, las células se lavaron 3 veces y se sembraron en placas Petri con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de antibiótico-antimicótico. Se mantuvieron en incubación a 37°C con 5% de CO₂.

6.8.2. Ensayo de Viabilidad

Para conocer el efecto de nanopartículas sobre la viabilidad celular se sembraron 2×10^5 linfocitos o monocitos de bazo de ratón BALB/c por pozo en placas de 96 pozos en presencia de las diferentes concentraciones de AgNPs (0.01, 0.1, 1 y 10 mg/mL) (Figura 12). Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado. Se consideraron 2 controles negativos, uno con medio RPMI-1640 suplementado y otro con solución salina fisiológica. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 h.

Posterior a la incubación, los experimentos se analizaron por citometría de flujo, donde se determinó la viabilidad celular por tamaño y granularidad comparando contra los controles negativos.

6.9. Análisis Estadístico

Los resultados de los ensayos de exclusión de azul tripano, Anexina V / Ioduro de propidio y MitoSOX se analizaron estadísticamente usando el software Prism versión 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y pruebas post-hoc de Bonferroni o Tukey según se indica. Se consideró el nivel de significancia * $p \leq 0.05$.

7. Resultados

7.1. Caracterización de las AgNPs

Las micrografías de TEM (Figura 17) revelaron la morfología principalmente esferooidal de los núcleos metálicos, aunque partículas triangulares también se observaron (Figura 17.D) de manera poco frecuente.

El diámetro promedio (d_{Ag}) de las partículas metálicas fue de 16.4 ± 8.0 nm, 25.4 ± 13.2 nm, 19.0 ± 9.3 nm, 16.4 ± 8.1 nm y 30.6 ± 23.2 nm para las formulaciones NP1–NP5, respectivamente. Sin embargo la distribución de tamaños indica la presencia de

nanopartículas de distintas dimensiones, donde predominan diámetros en el intervalo de 10–20 nm (marca de clase 15), por lo que las cinco formulaciones son polidispersas.

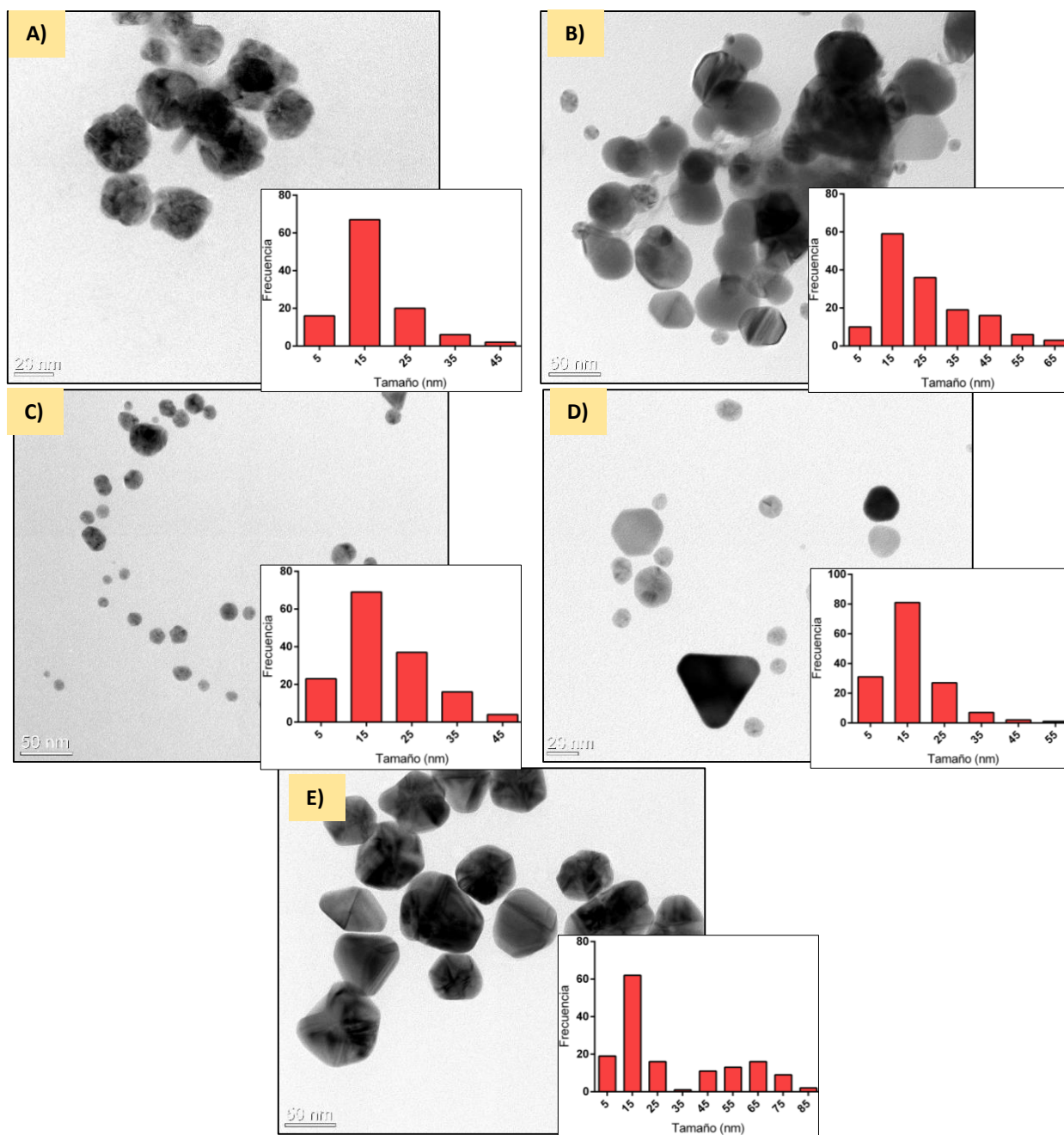


Figura 17. Micrografías de TEM no representativas y distribución de tamaños de Argovit[®]. Barra = 20 nm en A) NP1. Barra = 50 nm en formulaciones B) NP2, C) NP3, D) NP4 y E) NP5.

Las micrografías de TEM presentadas en la Figura S1 (sección Anexos) son representativas de las muestras de AgNPs y ofrecen una visión más precisa del tamaño y aglomeración.

Los espectros de absorción de las formulaciones de AgNPs se determinaron a diferentes concentraciones, como se muestra en la Figura 18.

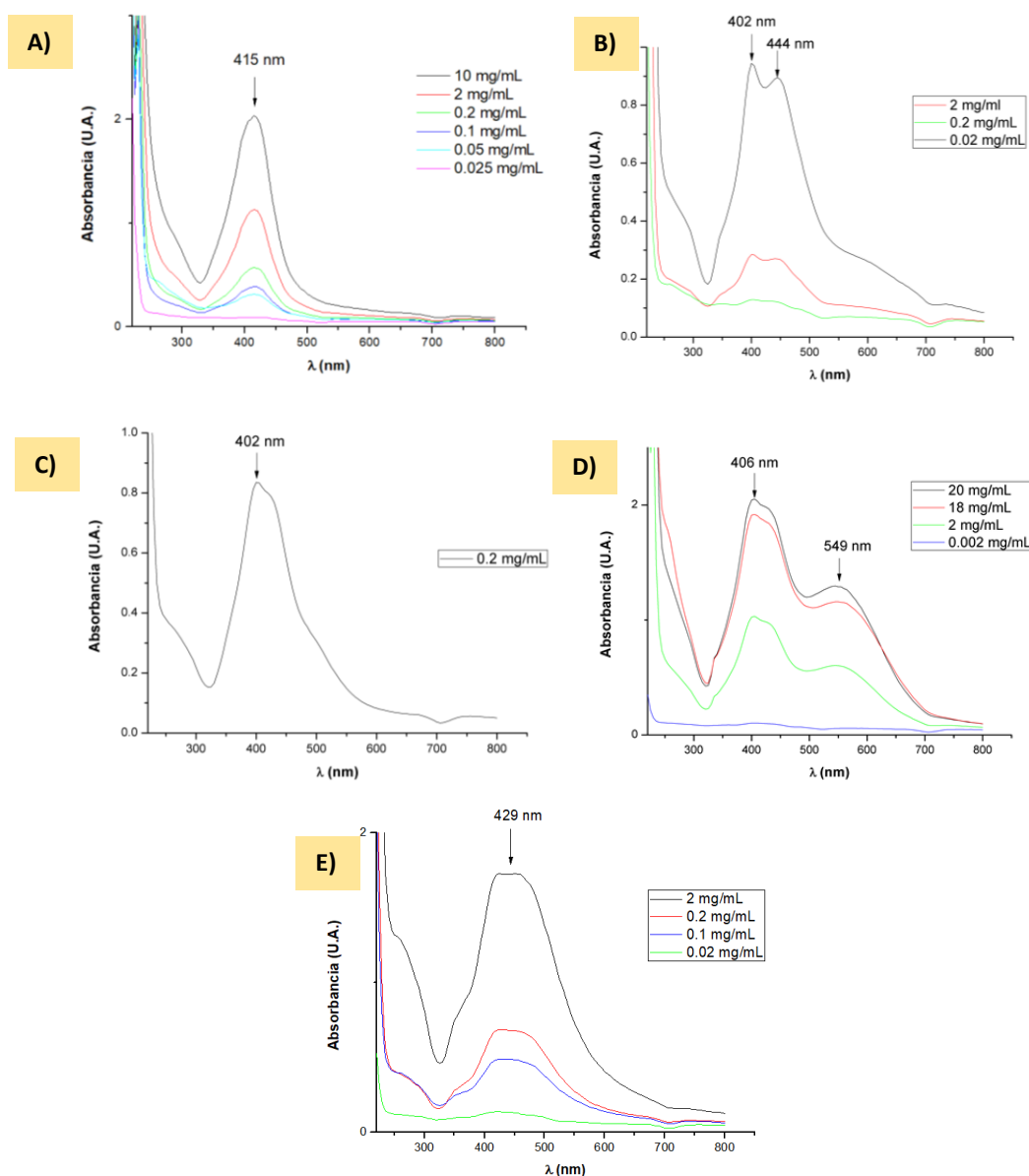


Figura 18. Caracterización de AgNPs por espectrofotometría UV-Vis. Espectros de absorción de las formulaciones de Argovit® diluidas en agua desionizada: A) – E), NP1 a NP5 respectivamente.

Las formulaciones NP1 a NP4 exhiben un pico de absorción a longitudes de onda entre 400–415 nm mientras que, para la formulación NP5 (Figura 18.E) no se observa un pico definido, ni siquiera con la concentración de 2 mg/mL, sino una distribución de tipo “meseta”. Este pico, común entre las formulaciones, corresponde a la resonancia de plasmón superficial característica de la plata nanométrica [65]. Además, las formulaciones 2 y 4 exhiben un segundo pico de menor intensidad. La aparición de dos o más picos de plasmón superficial (Figura 18.B) y el ensanchamiento de los mismos (Figura 18.D) se debe a la presencia de partículas irregulares (no esféricas), por ejemplo

del tipo triangular como las que se aprecian para la micrografía de la NP4 (Figura 17.D) [66].

El diámetro hidrodinámico (d_H) y potencial zeta (ζ) de las nanopartículas suspendidas en agua se resumen en la Tabla 5. De acuerdo con los bajos valores de ($\zeta \ll |30|$ mV), las formulaciones mostraron ser poco estables en este dispersante, lo que aumenta la tendencia de las nanopartículas de formar agregados (Figura S1) [67]. Respecto al índice de polidispersidad, los valores de las formulaciones NP2 y NP5 corresponden a soluciones monodispersas ($PdI < 0.4$). Sin embargo, de la Figura 17 vemos que las cinco formulaciones son de carácter polidisperso [39].

Tabla 5. Características fisicoquímicas de las AgNPs usadas en este trabajo.					
Propiedades	NP1	NP2	NP3	NP4	NP5
Diámetro promedio de las partículas metálica d_{Ag} (nm)	16.4±8.0	25.4±13.2	19.0±9.3	16.4±8.1	30.6±23.2
Distribución de tamaño TEM (nm)	5–40	5–60	5–40	5–40	5–80
d_H (nm): plata metálica + PVP	448.7	90.4	43.8	483.2	121.1
Índice de polidispersidad	0.813	0.270	0.433	0.555	0.280
ζ (mV)	-0.872	-4.56	5.13	-0.464	-1.46
Morfología	Esferoidal				
Contenido de plata metálica	12 mg/mL				
Contenido de PVP	188 mg/mL				
Resonancia de plasmón superficial (λ nm)	415	402, 444	402	406, 549	429

Con el objetivo de determinar si las nanopartículas poseen fluorescencia basal que pudiera generar una contribución durante la detección de los fluorocromos por citometría de flujo, se analizaron por espectrofotometría de fluorescencia los tratamientos a la concentración de 600 $\mu\text{g/mL}$. En la Figura 19 se aprecian los espectros de emisión y excitación. En esta se registró una emisión de intensidad significativa a 710 nm cuando se excita con una longitud de onda de 351 nm (λ_{EX}). Sin embargo, esta señal no corresponde a las formulaciones de AgNPs sino a la placa de 96 pozos puesto que el comportamiento se mantuvo cuando se leyó un pozo vacío. Además, el citómetro de flujo posee sólo dos láseres de excitación con longitudes de onda de 405 nm y 488 nm, por lo que se realizó una lectura con $\lambda_{EX} = 405$ nm (Figura 19.B) con lo cual se obtuvo una señal de emisión de muy baja intensidad y sin picos de emisión definidos.

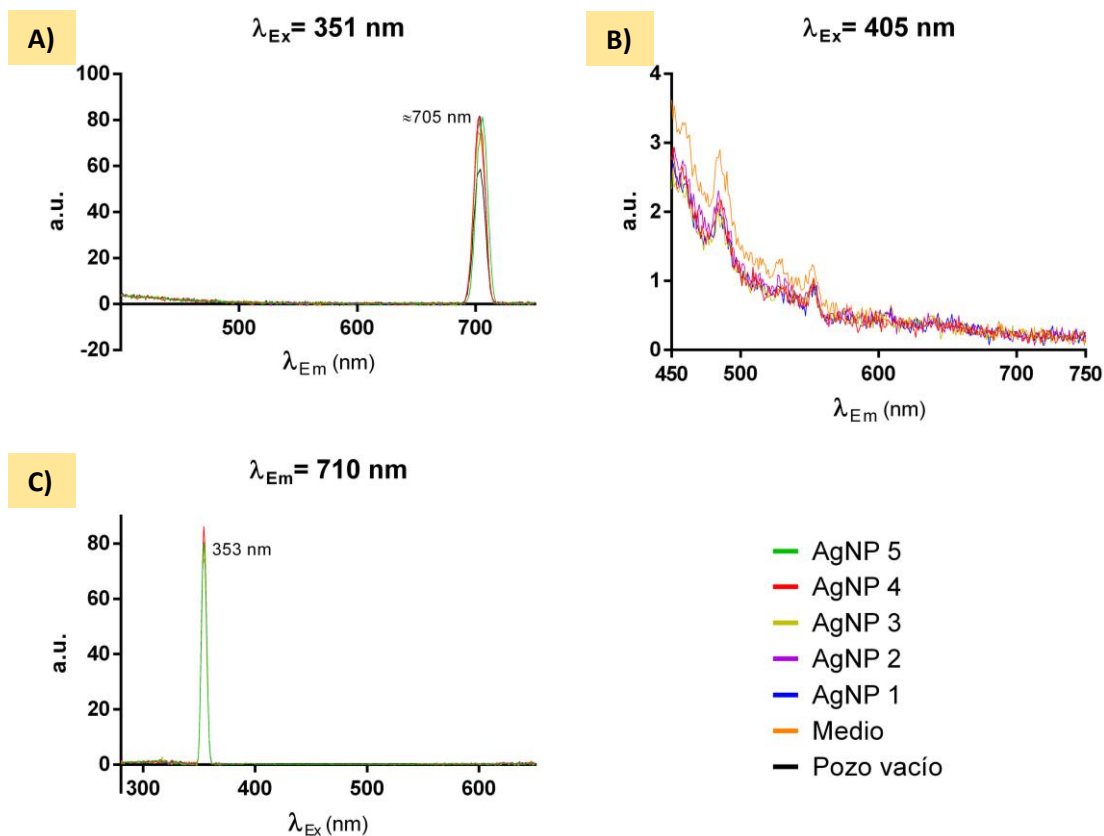


Figura 19. Espectros de emisión mediante excitación a A) 351 nm, B) 405 nm y C) de excitación para emisión a 710 nm. Las mediciones se realizaron con las AgNPs a concentración de 10 mg/mL de AgNPs disueltas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de SBF y 0.1% de antibiótico.

7.2. Viabilidad Celular

La actividad antiproliferativa de las AgNPs se evaluó con el colorante de exclusión vital azul tripano después de 24 h de exposición a las diferentes formulaciones de AgNPs a 4 concentraciones. En todos los casos se observaron células muertas (teñidas) solamente en las dosis más elevadas (1 y 10 mg/mL). Así mismo, los tratamientos con 10 mg/mL de AgNPs exhibieron una cantidad considerable de restos celulares y aglomerados, con excepción de las formulaciones NP3 y NP5. Con 0.01 y 0.1 mg/mL de AgNPs, la presencia de restos y aglomerados en los cuadrantes de la cámara de Neubauer fue prácticamente nula durante los conteos.

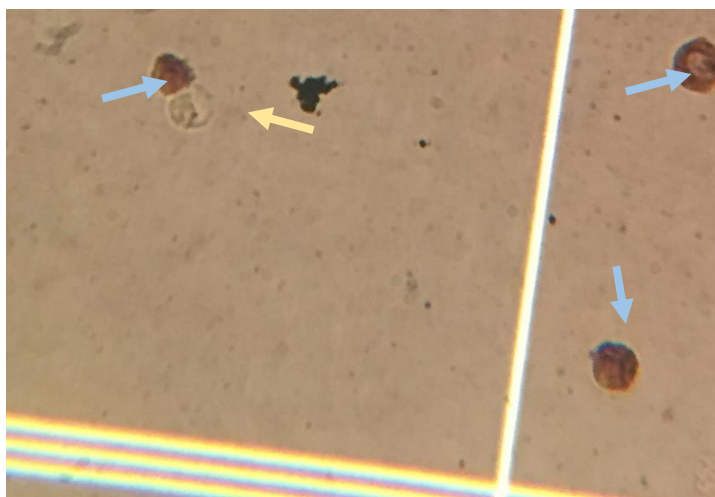


Figura 20. Vista de la cámara de Neubauer. Tratamiento representativo. Con flechas azules células teñidas (muertas) y con flecha naranja célula intacta (viable). Imagen obtenida a 40x en el microscopio Zeiss Axio Lab.A1.

Para analizar los datos, se graficaron los porcentajes de viabilidad celular de los cultivos tratados durante 24 h con AgNPs en comparación con el control negativo (Figura 21). El análisis de varianza muestra que, el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad de la línea HCT-15 depende exclusivamente de la dosis de nanopartículas utilizada. Así mismo la prueba post-hoc de Bonferroni reveló aquellos tratamientos cuyo efecto difiere significativamente con respecto al control. De esta manera, se encontró que la exposición a 10 mg/mL de AgNPs disminuyó de forma significativa la viabilidad celular.

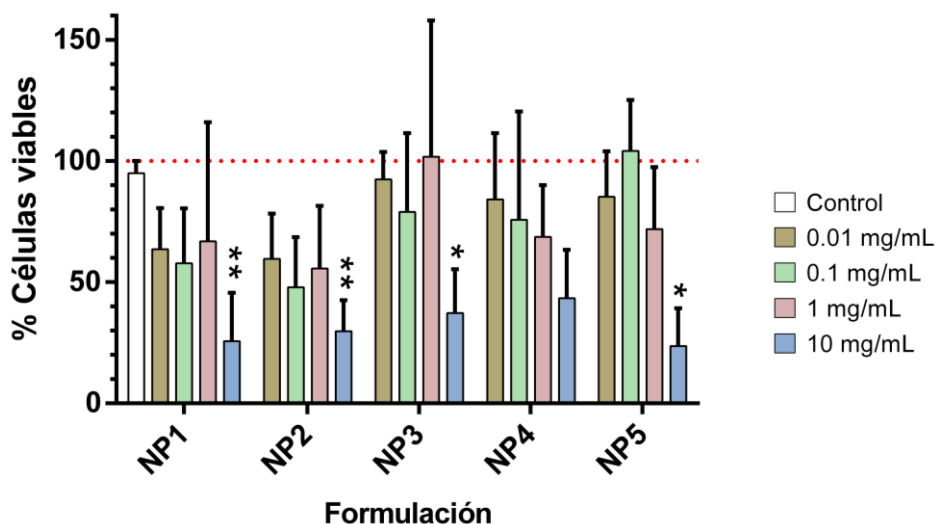


Figura 21. Viabilidad celular determinada por conteos en cámara de Neubauer de las tinciones con azul tripano. Las células consideradas viables son aquellas que no presentan tinción. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Significancia $*p \leq 0.05$ respecto al control.

Así mismo, para analizar posibles efectos sobre la morfología celular se obtuvieron imágenes de los ensayos luego del periodo de exposición a Argovit®. En la Figura 22 se muestra un campo representativo de los tratamientos con 1 mg/mL de AgNPs. En esta se distinguen claramente células teñidas y células intactas, así como pocos restos celulares.

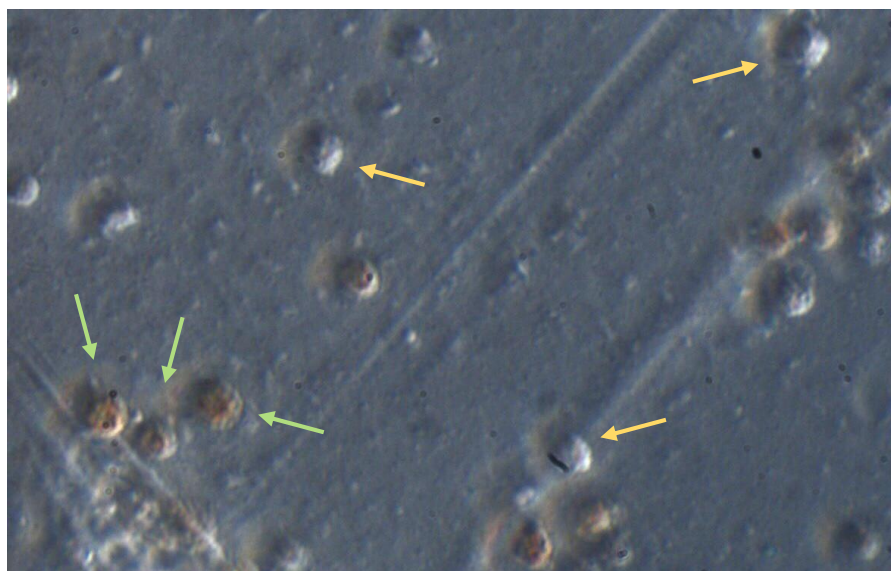


Figura 22. Células HCT-15 tras 24 h de exposición a 1 mg/mL de NP5. Con flechas naranja células intactas y con flechas verdes células teñidas. Imagen obtenida a 40x con contraste de fase del microscopio Zeiss Axio Observer.A1.

7.3. Vía de Muerte Celular

Los mecanismos de muerte celular inducidos por las AgNPs se estudiaron por citometría de flujo mediante la tinción con anexina V y yoduro de propidio. Como se observa en el gráfico de densidad (Figura 23), la población celular se separó en 4 grupos: células viables (sin teñir), apoptóticas tempranas (teñidas con Anexina V), apoptóticas tardías (teñidas con IP y Anexina V) y necróticas (teñidas con IP).

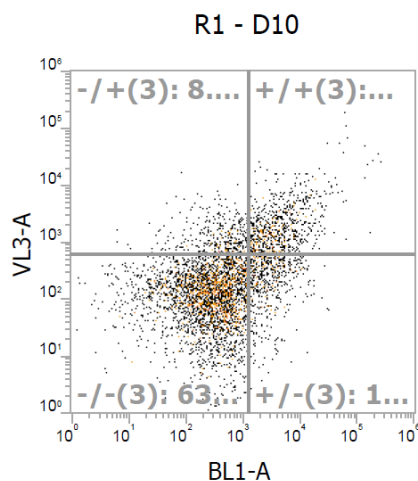


Figura 23. Gráfico de densidad representativo de la tinción con AV/IP de células HCT-15 tratadas 24 h con Argovit®. Análisis de la población celular por intensidad de la señal de yoduro de propidio (VL3-A) y anexina V (BL1-A). Fracción de células viables (-/-), apoptóticas tempranas (+/-), apoptóticas tardías (++) y necróticas (-/+).

A partir del porcentaje de eventos registrados en cada cuadrante, se elaboraron gráficas poligonales para las diferentes formulaciones (Figura 24). Se observó de forma más abundante una vía de muerte celular en los cultivos de HCT-15 por apoptosis, principalmente por un proceso de apoptosis tardía. En menor proporción (menos del 10% en todos los casos) se registró muerte celular por necrosis. Sin embargo, ningún tratamiento resultó tener diferencias significativas con respecto al control de muerte celular ($5 \pm 5\%$ del total de eventos).

Ya que el ensayo no incluyó controles específicos para apoptosis tardía y temprana, los porcentajes correspondientes de estos grupos se expresó como “células apoptóticas” (apoptóticas tempranas + apoptóticas tardías), para el análisis estadístico (Figura 25.A).

En este sentido, todos los tratamientos exhibieron una diferencia altamente significativa (****) con respecto al control CAV+ de apoptosis ($95 \pm 5\%$ del total de eventos). De acuerdo con el análisis de varianza de dos factores, la concentración de las nanopartículas resultó ser el factor con mayor influjo sobre la inducción de apoptosis como vía de muerte celular. Sabiendo esto, se efectuó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para identificar aquellas concentraciones con mayor influencia sobre la respuesta. Todas las diferencias obtenidas resultaron ser significativas * con respecto a la dosis de 10 mg/mL.

Ensayo AV/IP

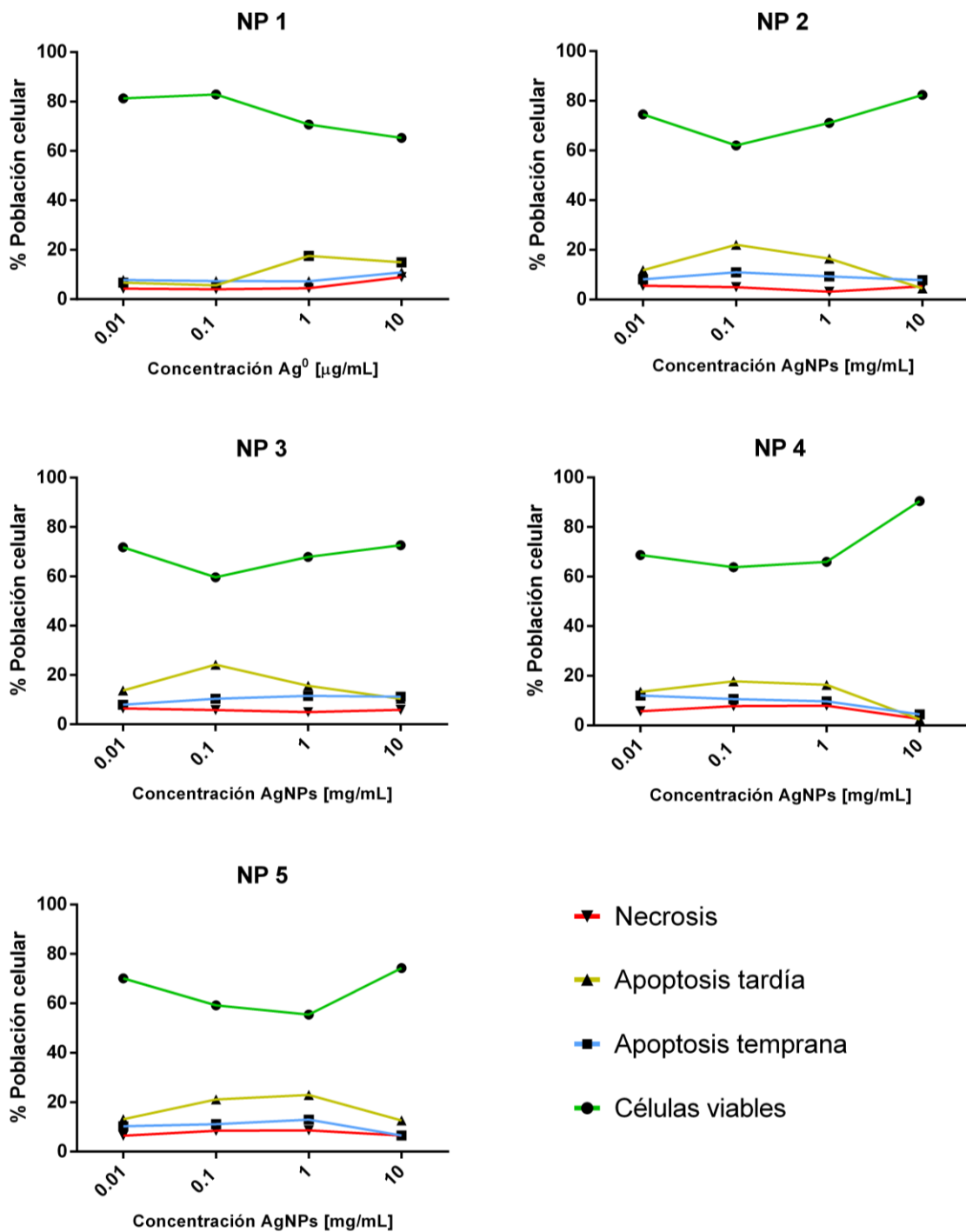


Figura 24. Mecanismos de muerte celular inducidos tras 24 h de exposición a Argovit®. Porcentaje de células apoptóticas tempranas (AV^+/IP^-), apoptóticas tardías (AV^+/IP^+) y necróticas (AV^-/IP^+). Los resultados representan la media de tres ensayos independientes por cada tratamiento.

Parámetros celulares

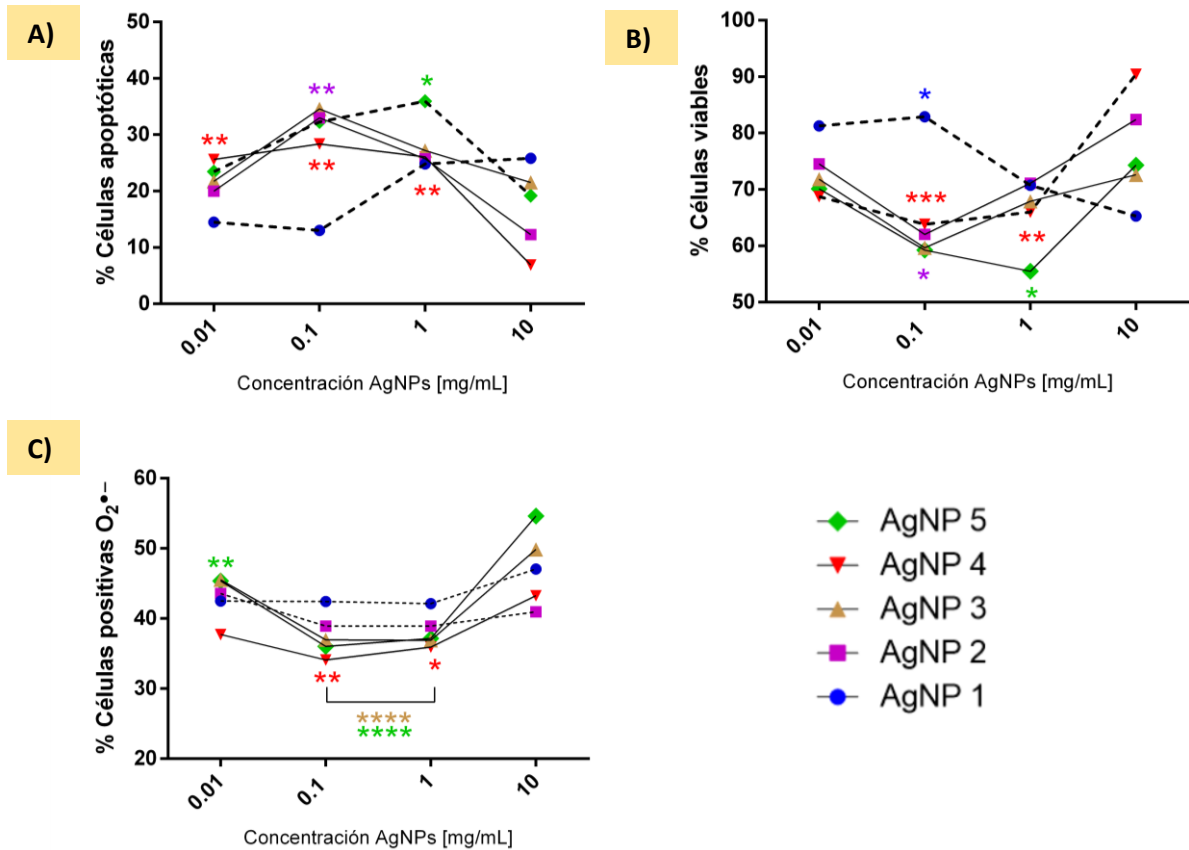


Figura 25. Porcentaje de células A) apoptóticas, B) viables y C) con aumento en la producción de superóxido mitocondrial tras 24 h de exposición a Argovit®. Los resultados representan la media de tres mediciones por cada tratamiento. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$ y todas las diferencias * están indicadas con respecto a la concentración de 10 mg/mL.

En los tratamientos con NP1, el mayor porcentaje apoptosis se indujo con la concentración más alta de nanopartículas, sin embargo, al igual que con la formulación NP3, no existen diferencias significativas en la cantidad de apoptosis inducida con las diferentes concentraciones de AgNPs. En otras palabras, su efecto permaneció invariable en el intervalo de concentraciones evaluadas.

Las formulaciones NP2, NP4 y NP5 registraron los menores porcentajes de apoptosis con la concentración de 10 mg/mL, mientras que la mayor cantidad de apoptosis se indujo con 0.1–1 mg/mL de AgNPs. Particularmente, el efecto de la formulación NP4 permaneció invariable (~26% de apoptosis) antes de disminuir significativamente (6.9% de apoptosis) en los ensayos con la concentración más alta de nanopartículas.

7.4. Análisis de Apoptosis por Microscopía de Fluorescencia

Para respaldar de manera cualitativa la inducción de apoptosis se efectuó un ensayo TUNEL de las células de adenocarcinoma colorrectal expuestas a Argovit[®]. Se obtuvieron imágenes de microscopía de epifluorescencia, en las que se capturaron tres campos distintos de cada tratamiento evaluado. Las imágenes revelaron un número significativo de células marcadas positivamente (brillantes), haciendo evidente la fragmentación del ADN. Los campos más representativos se muestran en la Figura 26. Con las concentraciones más altas se observaron pocas células apoptóticas, mientras que los restos celulares y aglomerados (visualizados como manchas oscuras) fueron predominantes, lo que confiere un aspecto turbido a las imágenes. Por el contrario, a concentraciones bajas se observan campos más despejados con células definidas, algunas de estas brillantes.

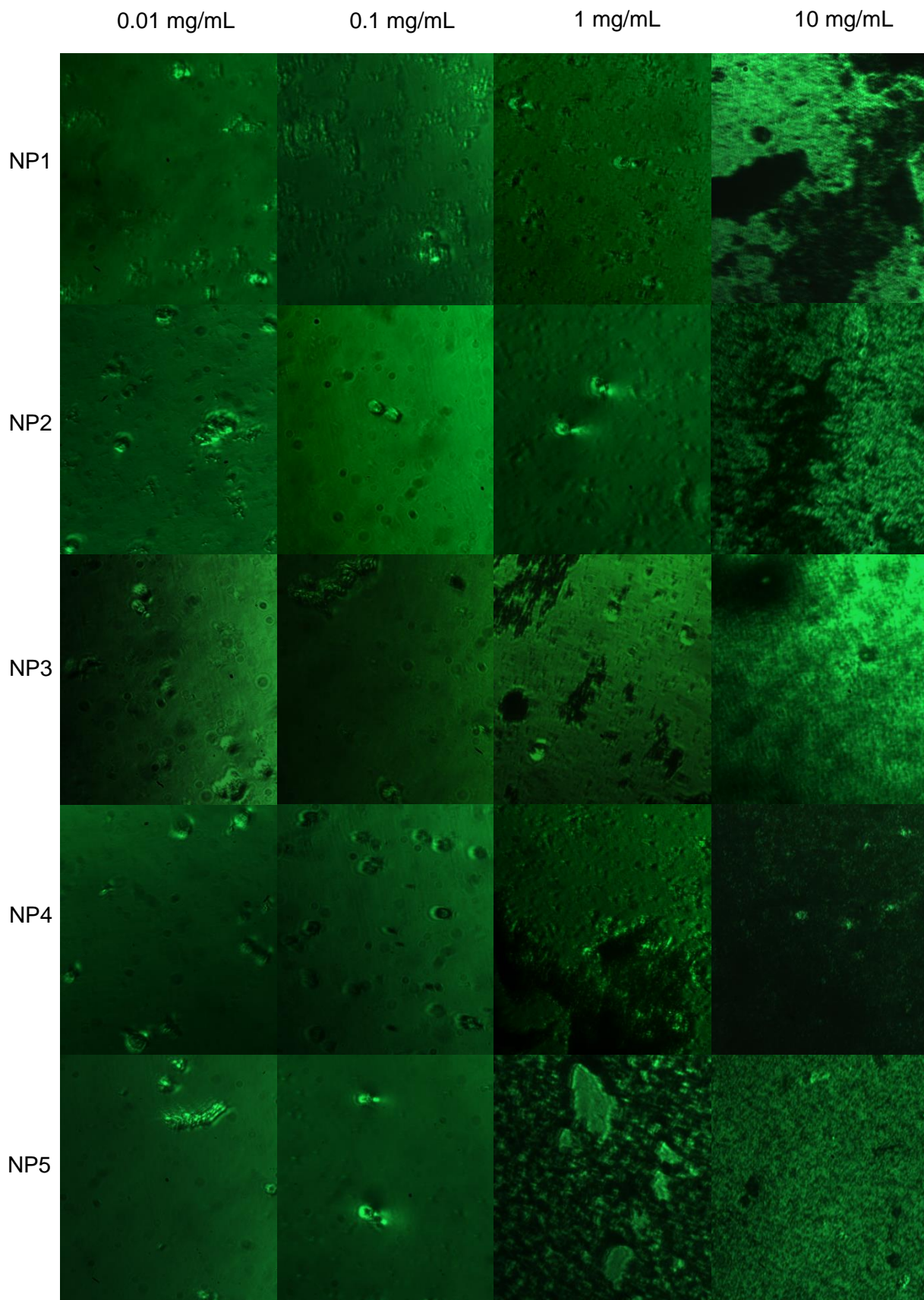


Figura 26. Ensayo TUNEL. Campos representativos de cada tratamiento. Imágenes obtenidas a 40x con la configuración de epifluorescencia del microscopio Zeiss Axio Observer.A1.

7.5. Especies Reactivas de Oxígeno Mitocondriales

La generación de superóxido mitocondrial en células HCT-15 tratadas con diferentes formulaciones de AgNPs se evaluó como se describe en la metodología. Por medio de citometría de flujo se identificó aquella porción de la población cuya intensidad de fluorescencia superara la intensidad registrada por el control negativo (producción basal de superóxido mitocondrial), eventos tomados como positivos para la generación de superóxido mitocondrial. En la Figura 27, tales células con producción de ROS mitocondriales corresponden a los eventos registrados por encima del valor del control positivo de intensidad 10^3 .

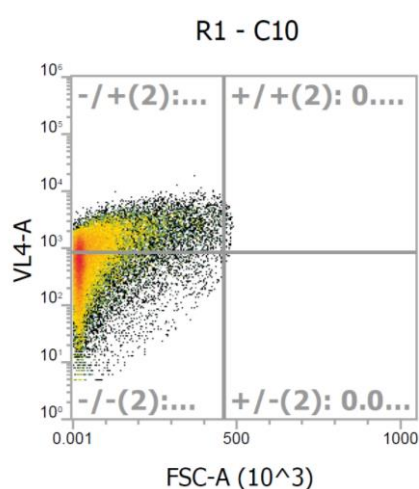


Figura 27. Gráfico de densidad representativo de la tinción con MitoSOX de células HCT-15 tratadas 24 h con Argovit®. Análisis de la población celular por tamaño (forward scatter FSC-A) e intensidad de la señal de fluorescencia (VL4-A). Fracción de células positivas para $O_2^{\bullet-}$ en cuadrantes $-/+$ y $+/+$.

A partir del porcentaje de eventos positivos para generación de ROS mitocondriales, se elaboró una gráfica poligonal con los resultados de exposición a las diferentes formulaciones (Figura 25.C). De acuerdo con el ANOVA de dos factores, el efecto de la concentración de las AgNPs (****) sobre la generación de ROS en mitocondria resulta significativamente mayor que el efecto de la formulación (***) o de la interacción entre ambos factores (**). Cabe mencionar que en todos los tratamientos, la producción de $O_2^{\bullet-}$ fue significativamente menor (****) que el control positivo ($95 \pm 5\%$) con peróxido de hidrógeno.

Por medio de la prueba post-hoc de Tukey, para cada formulación de nanopartículas se identificaron las concentraciones cuyos efectos sobre la producción de $O_2^{\bullet-}$ exhibieron diferencias significativas entre sí. Las formulaciones NP1 y NP2, no registraron

variaciones importantes en el número de eventos positivos a las diferentes concentraciones de AgNPs, por lo que sus efectos son en esencia constantes. El resto de formulaciones exhibieron diferencias significativas con respecto a 10 mg/mL, concentración a la cual registran su mayor porcentaje de células $O_2^{\bullet-}$ positivas. En general los efectos las formulaciones NP3–5 describen comportamientos muy similares e incluso coinciden en las concentraciones 0.1 y 1 mg/mL, con las cuales se registró la menor cantidad de células con producción de $O_2^{\bullet-}$ (~36%).

7.6. Viabilidad de Modelos Celulares Sanos

Con el objetivo de estudiar la citotoxicidad de Argovit[®] en células sanas, se realizaron cultivos primarios de linfocitos y monocitos de bazo de ratones BALB/c y se sometieron a los distintos tratamientos con AgNPs. En la Figura 28 se muestran las respectivas gráficas de viabilidad elaboradas a partir de los datos de citometría.

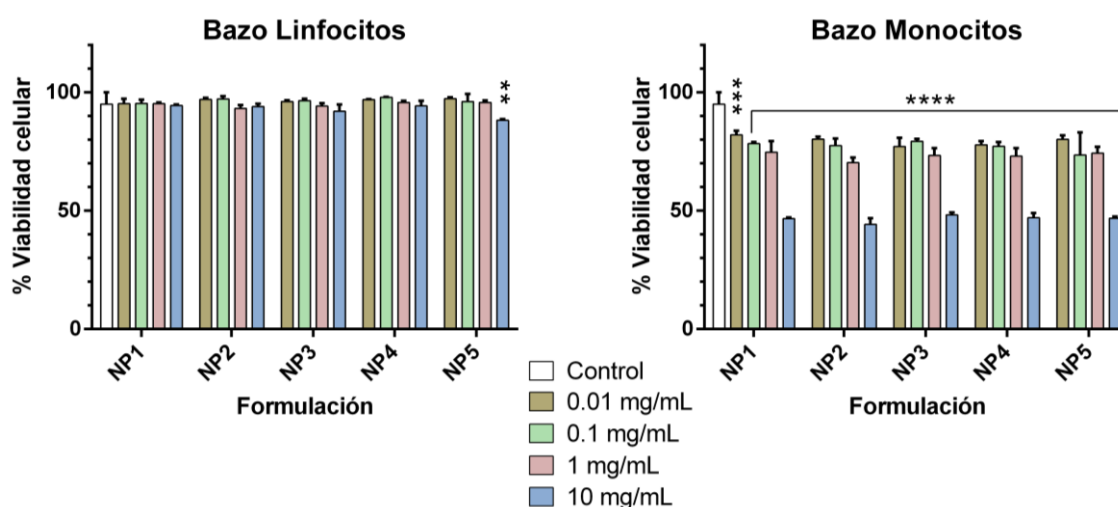


Figura 28. Viabilidad celular de cultivos primarios de ratón BALB/c tratados con Argovit[®]. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres ensayos independientes. El análisis estadístico se realizó en comparación con células no tratadas y con significancia * $p \leq 0.05$.

Se puede apreciar que las formulaciones fueron prácticamente inocuas en linfocitos, mientras que en monocitos exhibieron una citotoxicidad importante. En este último sistema los tratamientos con 0.01, 0.1, y 1 mg/mL de AgNPs registraron viabilidad entre 70-80%. Al incrementar la dosis a 10 mg/mL la viabilidad disminuyó abruptamente a ~46%, efecto que superó incluso la máxima toxicidad registrada en el modelo tumoral

(55.48% de viabilidad celular con 1mg/mL de NP5). En este sentido, con las cinco formulaciones, el efecto de la concentración más alta de nanopartículas resultó significativo (****) respecto a las demás concentraciones. A su vez, el efecto de todos los tratamientos sobre la viabilidad de los monocitos fue significativo con respecto al control como se muestra.

8. Discusión

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el potencial antiproliferativo de las formulaciones de nanopartículas de plata Argovit[®] en la línea celular HCT-15 de adenocarcinoma colorrectal humano. Se presentan resultados de una primera aproximación en la determinación de su desempeño como posible agente terapéutico en el tratamiento de cáncer de colon.

La caracterización por medio de TEM, UV-vis, y DLS de las formulaciones de AgNPs utilizadas como insumo en los experimentos celulares que aquí se exponen, posibilita su contraste con otras formulaciones y representa un avance en las estrategias metodológicas para garantizar la reproductibilidad de este tipo de estudios.

Posteriormente, se realizaron diferentes ensayos biológicos para determinar viabilidad celular, vías de muerte celular y generación de especies reactivas de oxígeno. Los tratamientos consistieron en la exposición de las células a cinco diferentes formulaciones de AgNPs durante 24 h. Con el uso de tinciones de exclusión vital, marcadores moleculares y citometría de flujo se cuantificó la proporción de células viables, apoptóticas y necróticas, así como de células con sobreproducción de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) mitocondrial. Finalmente se estudió la citotoxicidad de Argovit[®] en un cultivo celular sano. Para tal fin se realizaron cultivos primarios de linfocitos y monocitos de bazo de ratón BALB/c.

En las micrografías obtenidas por TEM se observa que las formulaciones contienen núcleos metálicos de tamaños que van desde 5 nm hasta 40 nm, e incluso hasta los 60 u 80 nm en algunos casos. La presencia de nanopartículas con diámetros tan

variados favorece la formación de aglomerados de AgNPs en las formulaciones (Figura S1) [39].

Por otro lado, la determinación del diámetro hidrodinámico que incluye la capa de polímero y la primera capa de solvatación, será siempre mayor que el núcleo metálico determinado en alto vacío por TEM [68]. Esta característica se puede apreciar para las diferentes formulaciones reportadas en la literatura, algunas de las cuales se resumen en la Tabla 6. No obstante, de manera similar a este trabajo, algunos autores reportan valores mucho mayores de diámetro hidrodinámico (en comparación con el diámetro del núcleo metálico).

Tabla 6. Relación diámetro metálico / diámetro hidrodinámico de diferentes formulaciones de AgNPs.				
Formulación	Diámetro promedio de partícula metálica (nm)	Diámetro hidrodinámico (nm)	Medio dispersante para DLS	Ref.
Argovit®	35	70	Agua	33
BioPure®. Estabilizadas en buffer de citrato.	20.4	27.3	NaCl 2.0 mM	4
BioPure®. Estabilizadas en buffer de citrato.	18.8 ± 4.9	40 ± 4	Medio de cultivo DMEM	25
	29.5 ± 5.8	43 ± 1		
	58.3 ± 4.2	88 ± 2		
	106.5 ± 4.3	135 ± 6		
NanoXact™. Estabilizadas en buffer de citrato.	19.2 ± 2.2	20.6 ± 1.7	Buffer de citrato 2 mM	32
	99.4 ± 7.0	93.1 ± 3.8		
nanoComposix© Estabilizadas buffer de citrato de sodio.	8.8 ± 1.8	429.9 ± 75.9	Agua grado cultivo celular	69
	20.1 ± 2.3	28.1 ± 4.0		
	44.5 ± 4.3	83.0 ± 14.7		
	95.9 ± 3.8	98.0 ± 0.8		
Recubiertas con PVP	70 ± 20	75 ± 20	Agua estéril ultrapura	68
nanoComposix©. Estabilizadas en buffer de fosfato	20.3 ± 1.9	27.0 ± 10.8	Agua desionizada	108
	79.8 ± 5.1	79 ± 25.2		
	112.6 ± 7.8	111.6 ± 29.9		
Sintetizadas por reducción de AgNO ₃ con ácido gálico.	24.4 ± 9	27.1 ± 2.3	Agua	109
NanoAmor. Recubiertas con PVP	69 ± 3	118	Solución Stock	114

Butler *et al.* determinaron un diámetro hidrodinámico de 429.9 ± 75.9 nm para una formulación comercial de AgNPs de 10 nm según las especificaciones del producto, y cuyo valor confirmado por TEM fue de 8.8 ± 1.8 nm (Tabla 6). De acuerdo con los autores esto se debió a la presencia de aglomerados en la solución de AgNPs [69]. De la misma manera, el análisis de las concentraciones stock de Argovit® registró valores muy grandes de diámetro hidrodinámico (Tabla 5) en casi todas las formulaciones (con excepción de NP3), las cuales también exhibieron severa aglomeración.

De acuerdo con la literatura, las técnicas de dispersión de luz no pueden resolver partículas individuales que han sido aglomeradas, sino que estos conjuntos de nanopartículas son detectados como una única partícula, lo que resulta en un diámetro calculado mayor (Figura S2). [39, 69]. Además, la poca estabilidad de las formulaciones, de acuerdo con los valores de potencial zeta obtenidos, aumenta aún más la tendencia de las nanopartículas a formar aglomerados [67, 70]. En combinación, estos resultados de caracterización proporcionan evidencia de que las nanopartículas utilizadas fueron polidispersas y poco estables en agua.

Por añadidura, en un medio biológico complejo como el medio de cultivo RPMI 1640 (rico en proteínas, sales, vitaminas y azúcares), esta estabilidad tiende a disminuir aún más [71]. Tras la interacción con las biomoléculas disueltas en el medio, estas son adsorbidas a la superficie de la nanopartícula y crean una corona proteica, lo que incrementa aún más el d_H de la partícula efectiva que finalmente tendrá interacción con la célula. Incluso el ambiente rico en sales y electrolitos podría modificar la carga superficial de las NP y por lo tanto ζ , lo que promueve la desestabilización del coloide [72]. Por tal motivo resulta crucial caracterizar las nanopartículas en el medio de interés de acuerdo con el experimento, y estudiar su estabilidad en el mismo.

Cabe señalar que, en la gran mayoría de los trabajos consultados en la literatura, además del tiempo de exposición y la concentración, la respuesta celular también es influida por el tamaño de las AgNPs. Como consecuencia de su pequeño tamaño, una de las propiedades más atractivas de los nanomateriales en general, es su gran área superficial.

Para ilustrar la importancia de esta propiedad, a pesar de administrar una misma concentración en masa de nanopartículas (mg/mL), las AgNPs de 10 nm presentarán un área superficial y cantidad de nanopartículas (no. de AgNPs/mL) mucho mayores que

AgNPs de 50 nm por ejemplo. Esto aumenta la posibilidad de interacción con biomoléculas y con la célula misma, lo que puede originar respuestas celulares completamente distintas. Así, en un estudio con células de pulmón humano, independiente del recubrimiento (citrato o PVP), AgNPs de 10 nm resultaron ser tóxicas mientras que aquellas de 40 y 74 nm no lo fueron [73].

No obstante, las AgNPs utilizadas en este trabajo mostraron ser polidispersas, lo que dificulta el análisis de los efectos de las formulaciones las células HCT-15. Por tal motivo, no resultaría apropiado atribuir los efectos observados en este trabajo directamente con el diámetro promedio de las nanopartículas cuando las formulaciones presentan amplios intervalos de tamaño.

Con respecto al efecto antiproliferativo de las nanopartículas, los resultados del ensayo de exclusión vital con azul tripano muestran que todas las formulaciones registraron su mayor actividad (porcentajes de viabilidad ~30%) con la concentración más alta evaluada.

Bajo el microscopio, la morfología y color de las células permaneció inalterada con los tratamientos más diluidos (0.01 y 0.1 mg/mL de AgNPs). En el conteo de estos ensayos se observaron exclusivamente células viables. Hasta la concentración de 1 mg/mL se pudo apreciar un número reducido de células teñidas en los cuadrantes de la cámara de Neubauer (Figura 20).

Al examinar los ensayos con 10 mg/mL de AgNPs el número de células sin teñir disminuyó considerablemente (hasta un 70% comparado con los controles) en las retículas de la cámara, mientras que aumentó, de manera cualitativa, el número de restos celulares y aglomerados. A excepción de los tratamientos con NP4, la disminución de la viabilidad celular no fue lineal, es decir, el efecto antiproliferativo de las AgNPs no fue proporcional con la concentración administrada.

Los ensayos con NP2 exhibieron los menores porcentajes de viabilidad con respecto a las demás formulaciones, sin embargo el ANOVA mostró que el efecto del factor formulación sobre la viabilidad celular de HCT-15 no fue significativo. Así mismo, la prueba post-hoc de Tukey (datos no mostrados) reveló diferencias significativas solo entre los tratamientos con NP3 y NP5.

El efecto de la concentración más alta de AgNPs (la mayor citotoxicidad), fue significativo con relación a 1 mg/mL (*) de NP3, y con respecto a 0.01 (*) y 0.1 mg/mL (***) de NP5, tratamientos que resultaron en altos porcentajes de viabilidad, incluso por encima del 100%. En este sentido, dichas formulaciones parecen haber ejercido un efecto estimulante o proliferativo a bajas concentraciones, y un efecto tóxico con altas concentraciones de AgNPs.

En toxicología esta respuesta bifásica (estimulación o efecto benéfico a bajas concentraciones e inhibición o toxicidad a concentraciones altas) de sistemas biológicos se denomina hormesis [74]. De manera similar, la exposición a una formulación de Argovit® exhibió un efecto hormético sobre la multiplicación y longitud de los brotes de caña de azúcar en un estudio previo [75]. Ante tal comportamiento, con el fin de evitar promover el crecimiento de tumores y el progreso de la enfermedad en modelos experimentales más complejos, será fundamental estudiar y delimitar el posible intervalo de concentraciones de NP3 y NP5 cuyo efecto sea proliferativo.

El carácter antiproliferativo de las AgNPs en células cancerosas es una cualidad deseable en la valoración de su potencial terapéutico. No obstante, su aplicación no será conveniente si su efecto desencadena una respuesta inmune en modelos más complejos. Por ello, con el fin de determinar el mecanismo de muerte celular inducido por las formulaciones de AgNPs, se llevó a cabo la tinción fluorescente con AV/IP.

El hecho de que las formulaciones de Argovit® inducen muerte celular predominantemente vía apoptosis, lo cual fue además corroborado con el ensayo TUNEL (Figura 26), resulta conveniente para su uso en aplicaciones biomédicas. En todos los tratamientos con Argovit®, a las 24 h de exposición se registró de manera predominante apoptosis tardía, mientras que la contribución por necrosis se mantuvo por debajo del 10% (Figura 24).

Si bien, la muerte celular mediada por apoptosis (que no origina procesos inflamatorios) es preferible sobre la necrosis, se ha reportado que de manera equivalente, las células apoptóticas en una etapa tardía liberan patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), como por ejemplo productos de degradación del ADN.

La incubación de macrófagos o células dendríticas con estos DAMPs resultó en la liberación de citocinas pro-inflamatorias [76, 77]. Así mismo, se ha estudiado la respuesta pro-inflamatoria de células de cáncer de colon expuestas a AgNPs. Miethling-Graff *et al.*

reportaron un incremento significativo en la liberación de la citocina IL-8 al sobrenadante de células LoVo tratadas con solo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AgNPs con tamaño de 10, 20, 40, 60 y 100 nm [78]

Sin embargo, esto podría no representar un inconveniente en modelos *in vivo*, puesto que las células apoptóticas en etapa temprana pueden ser fagocitadas por las células vecinas a la neoplasia, lo que ofrece un sistema de limpieza oportuno. Además, si la apoptosis tardía persiste o es masiva en el tumor, el aumento en la expresión de citocinas inducen la inmunidad adaptativa, ofreciendo una actividad inmune eficiente alrededor de la zona a tratar.

En 2005 Casares *et al.* informaron que la implantación subcutánea de células CT26 de carcinoma de colon tratadas con doxorrubicina en ratones BALB/c singénicos inmunocompetentes, induce una respuesta anticancerígena del sistema inmune adaptativo. En dicho trabajo se inocularon células CT26 vivas en un costado y células tratadas previamente con el fármaco anticancerígeno (24–48 h) en el costado opuesto de los animales. Al momento de su inoculación, las células tratadas se encontraban en etapa de apoptosis tardía y lograron reducir el desarrollo de tumores hasta en un 45% en el día 30 y en un 30% en el día 120. Curiosamente la implantación de células cancerosas necróticas, o células que fueron tratadas con doxorrubicina junto con el inhibidor de caspasas zVAD (inhibidor de apoptosis), no indujeron esta respuesta inmune protectora [79].

En la línea Caco2 de cáncer de colon humano, Sahu *et al.* reportaron un descenso en el contenido de ADN de doble hebra (íntegro) dependiente de la concentración, con AgNPs de 20.4 nm, tamaño similar al de las nanopartículas utilizadas en este trabajo, estabilizadas con citrato. El daño creciente en ADN se observó en el intervalo de concentraciones de 1–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [4].

En muchos casos el tipo y/o la cantidad de estímulo determina si una célula muere por apoptosis o necrosis. Por ejemplo, a bajas dosis muchos fármacos anticancerígenos inducen apoptosis, mientras que a dosis altas pueden resultar en necrosis [80]. En el presente estudio se mostró que, independientemente de la dosis, cada formulación indujo prácticamente la misma proporción de necrosis en la línea HCT-15, mientras los ensayos con 10 mg/mL de AgNPs registraron una disminución de la apoptosis total con respecto de las demás concentraciones (con excepción de la formulación NP1).

Luego de analizar los resultados de ambas técnicas, a pesar tener principios distintos, los porcentajes de viabilidad obtenidos por citometría de flujo describen un efecto antiproliferativo distinto de aquel determinado por el ensayo de exclusión de azul tripano (Figura S3). Como se señaló anteriormente la mayoría de las formulaciones mostraron una mayor citotoxicidad con la concentración más alta evaluada (10 mg/mL) en los ensayos con azul tripano. Sin embargo, esto no se observó en el ensayo AV/IP, el cual usa marcadores moleculares específicos que revelan la muerte celular por apoptosis o necrosis de una población celular.

Al examinar las imágenes de contraste de fases (ejemplo en Figura 22), las células que resultaron teñidas luego de la exposición, la tinción y fijación, no exhiben cambios morfológicos (con respecto a las no teñidas) característicos de muerte celular [51, 54]. Es por esto que sugerimos que una de las causas de esta diferencia significativa sea que, la tinción de algunas células consideradas no viables pueda no corresponder al colorante azul tripano, sino que se trate de células vivas que pudieron haber internalizado las AgNPs. Con las evaluaciones realizadas en este trabajo no se puede determinar la internalización de las AgNPs.

Sin embargo, la internalización celular de nanopartículas de diferente composición y tamaño en líneas tumorales es una característica reportada en la literatura. Miethling-Graff. *et al.* estudiaron la internalización celular de AgNPs estabilizadas con citrato, con núcleo metálico de 20 nm en células LoVo de adenocarcinoma colorrectal. Encontraron que a diferencia de tamaños mayores (40, 60 y 100 nm), nanopartículas de 20 nm (cerca a los tamaños promedio de las formulaciones de Argovit[®]) mostraron una mayor internalización y se detectaron en citosol tanto de manera individual como en aglomerados de varios micrómetros de diámetro [78]. Como resultado de una alta internalización de AgNPs Argovit[®] las células HCT-15 podrían adoptar la coloración del coloide, algo similar a lo observado por Hainfield *et al.* En dicho trabajo, luego de 17 h de exposición a nanopartículas de oro (AuNPs), las células B7-474 de cáncer de mama exhibieron el color rojo característico de las nanopartículas en suspensión usadas, haciendo evidente su internalización [81].

Aunado a esta razón, otro hecho que contribuye a esta diferencia es que, por medio del ensayo de exclusión vital con azul tripano resulta imposible diferenciar entre células que murieron por apoptosis y/o necrosis. Solo podrían ser teñidas poblaciones en etapas muy avanzadas donde la apoptosis ya es irreversible pero la célula conserva su membrana [51,

82]. En este sentido se estaría sobreestimando la viabilidad y se obtendrían casos con porcentajes mayores del 100% (101.8% con 1 mg/mL de NP3 y 104.2% con 0.1 mg/mL de NP5) y altos valores de desviación estándar ($\pm 49.3\%$ y $\pm 56.2\%$ con 1 mg/mL de NP1 y NP3 respectivamente).

Aunado a estas razones, una posible opción para observar diferencias significativas entre la viabilidad determinada con azul tripano y por citometría de flujo con el ensayo de AV/IP es que, la vía de muerte celular no sea solo por apoptosis o necrosis.

En un trabajo previo realizado por Castro-Gamboa *et al.* se sugirió la inducción de una respuesta autofágica citoprotectora en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón C57BL/6, ante la exposición a una formulación de Argovit®. En dicho trabajo se determinó la viabilidad celular por medio del ensayo con calceína AM (actividad metabólica), así como por medio de la tinción con AV/IP, luego de 12 h de exposición a 0–1.0 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs. Con el ensayo AV/IP los autores no encontraron un efecto citotóxico importante (viabilidad celular $> 95\%$ en todos los tratamientos): solo con la concentración más alta de AgNPs (1.0 $\mu\text{g/mL}$) observaron una ligera contribución por apoptosis temprana, mientras que ninguna concentración mostró un impacto por apoptosis tardía. No obstante, la exposición a 1.0 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs causó una disminución significativa de la viabilidad basada en la actividad metabólica. Por tal motivo los autores sugieren que la viabilidad basada en la actividad metabólica estuvo afectada probablemente debido a la pérdida de constituyentes citoplasmáticos (proteínas, organelos dañados) por efecto de autofagia inducida por las AgNPs [83].

Con una formulación distinta de AgNPs, Han *et al.* estudiaron los efectos de la exposición (25 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h) en la línea celular murina TM4 (células sertoli) por TEM. En las micrografías observaron numerosos autofagosomas conteniendo material celular en degradación [84]. Por su parte Buttacavoli *et al.*, al no observar un porcentaje significativo de muerte por apoptosis ni fragmentación del ADN en células SKBR3 (cáncer de mama) expuestas a AgNPs (5 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h), investigaron la inducción de autofagia como mecanismo de muerte celular. Por medio de tinciones específicas para actividad lisosomal/vacuolar, así como el análisis de la expresión de marcadores autofágicos con Western blot, reportaron un mecanismo de muerte celular autofágica prominente [31].

Durante la privación de nutrientes a la célula, la autofagia proporciona componentes citoplásmicos a los lisosomas por medio de vesículas de doble membrana, llamadas autofagosomas. Esto para su degradación y reciclaje, con lo cual se sintetizan nuevas proteínas y organelos, o se metabolizan para suministrar energía [85].

Sin embargo, su activación excesiva (macroautofagia), puede conducir a la muerte celular al destruir grandes porciones del citoplasma, en situaciones donde la célula no es capaz de activar la apoptosis canónica. En este sentido, la célula se “canibaliza” [80, 85, 86].

En efecto, existe evidencia de mecanismos de evasión de apoptosis en cáncer de colon, mediante la sobreexpresión de genes y proteínas anti-apoptóticas, así como la reducción en la expresión de genes pro-apoptóticos [86]. En el trabajo realizado por Van der zande *et al.* se reportó que, luego de 24 h de exposición a AgNPs de 20 nm (25 µg/mL), entre los procesos biológicos regulados de manera dominante, se encontró una fuerte regulación positiva de vías anti-apoptóticas [25].

De acuerdo con la literatura, un mecanismo clave para la evasión de apoptosis en células de cáncer de colon es la mutación de la proteína supresora tumoral p53. En células sanas p53 es un factor de transcripción que se activa luego de un ligero daño al ADN [54]. Su activación provoca la detención del ciclo celular en fase G1 para permitir la reparación del ADN. Si el daño es grave y no puede ser reparado con éxito, la proteína p53 desencadena la apoptosis mediante la liberación de Bax y supresión de Bcl-2 [86].

La p53 mutada se ha encontrado en más del 50% de todos los tipos de cáncer humano y específicamente en aproximadamente 80% de los tipos de cáncer colorrectal. Esta pérdida en la función de p53 disminuye la sensibilidad a daño en ADN y facilita la evasión de apoptosis mediada por p53 en células cancerosas, lo que ofrece resistencia a diferentes fármacos quimioterapéuticos [86].

También se ha reportado que en células HCT116 con p53 mutada, la apoptosis inducida por 5-FU y oxaliplatino se redujo significativamente con respecto a la actividad de p53 natural [87]. Así mismo, la exposición con AgNPs de 20 nm sintetizadas con extracto de *Catharanthus roseus*, provocó un aumento de la producción de ROS, activación de la cascada de señalización JNK y disminución en el potencial de membrana mitocondrial en células HCT116, pero no en HCT116 *p53^{-/-}*. Con estos resultados Satapathy *et al.* sugirieron que la inducción de apoptosis por efecto de dichas AgNPs derivadas de plantas es un proceso dependiente de p53 [34]. Gurunathan *et al.* encontró que la expresión de

distintos genes involucrados en la ruta de señalización de p53 sufrieron tanto regulación positiva como negativa, tras la exposición a AgNPs de 6 nm (2-10 µg/mL por 24 h). Esta regulación aberrante de las proteínas efectoras p53 provocó además arresto del ciclo celular [35].

En caso de estar frente a un mecanismo de evasión de apoptosis en HCT-15 provocado por la persistencia del estímulo, i.e. una gran cantidad de AgNPs presentes tanto en el ambiente extracelular como intracelular, es posible que las células puedan estar experimentando un proceso masivo de autofagia que conduce a su muerte. Sin embargo, las células no viables por autofagia no tendrían interacción ni con la AV ni con el IP en etapas tempranas de muerte celular.

De esta manera, el descenso significativo de la apoptosis con 10 mg/mL de AgNPs de algunas formulaciones, así como el aumento de restos celulares y aglomerados observado durante los conteos de dichos ensayos en el microscopio, podrían ser el resultado de la muerte por autofagia de porciones considerables de células.

Frente a la posibilidad de que, bajo estas condiciones experimentales, algunas formulaciones de Argovit® induzcan la muerte celular de HCT-15 por un proceso desproporcionado de autofagia, las determinaciones realizadas por azul tripano y AV/IP no tendrían una coincidencia en cuanto al número de células viables.

Por estas razones, sería adecuado complementar estos resultados mediante el estudio del flujo autofágico y la generación de vacuolas con los distintos kits comerciales para la tinción dual de autofagia/citotoxicidad, así como por microscopía electrónica de transmisión. Incluso, para componer un panorama de las respuestas celulares a lo largo del tiempo total de exposición (24 h), resultaría conveniente evaluar estas concentraciones de AgNPs con tiempos de exposición más cortos. De esta forma se elucidarían efectos tempranos y se tendrían puntos de referencia de los efectos de Argovit® en células HCT-15.

Luego de identificar las posibles razones para observar diferencias entre la viabilidad determinada con cada tinción, resulta imprescindible considerar los parámetros celulares en los que se basan los distintos ensayos para medir la citotoxicidad y seleccionar el más adecuado para los objetivos de nuestro diseño experimental.

El principal interés en la determinación de la vía de muerte celular fue determinar si las AgNPs inducía una vía de muerte celular por apoptosis o necrosis, ya que esta última se ha asociado con procesos inflamatorios y de necrosis en tejido cuando se escala a experimentos *in vivo*. Así mismo, uno de los propósitos de este estudio es examinar la relación de la vía de muerte celular con la generación de ROS y la fragmentación de ADN, como se ha descrito en otros trabajos [35, 78, 88-93]. Por esta razón, a partir de este punto y a lo largo del presente trabajo, se tomará como referencia la viabilidad celular determinada mediante citometría de flujo.

Con excepción de NP1, el efecto de las formulaciones en la viabilidad celular describe comportamientos similares: se registra una viabilidad inicial de ~70% en los ensayos con la dosis más diluida de AgNPs (0.01 mg/mL), seguido de porcentajes por debajo de este valor inicial con las siguientes dos concentraciones (dosis mayores en uno y dos órdenes de magnitud) y finalmente un singular incremento de la viabilidad (significativo en al menos tres de las cuatro formulaciones que exhiben esta condición) en los ensayos con 10 mg/mL de AgNPs, que supera los valores iniciales de viabilidad.

Con base en este comportamiento observado, el 50% de viabilidad celular debería alcanzarse a una dosis comprendida entre 0.1 y 1 mg/mL de AgNPs, intervalo donde se registra la mayor actividad antiproliferativa. En tal caso, dichas concentraciones serían mucho mayores que la concentración inhibitoria media (IC₅₀) de los fármacos de primera elección para el tratamiento de cáncer de colon, reportadas en la literatura.

En el trabajo realizado por Cheng *et al.* se determinó una IC₅₀ de 2.102×10^{-3} mg/mL del fármaco 5-fluorouracilo en células SW480, es decir, apenas un quinto de la dosis más baja estudiada en este trabajo [94]. Además, de acuerdo Mohammadian *et al.* el profármaco conocido como capecitabina (P.M. 359.35 g/mol), el cual es activado por las células tumorales a 5-FU, registró valores de IC₅₀ de 1.175×10^{-3} y 5.857×10^{-4} mg/mL en las líneas tumorales HT-29 y HCT116 respectivamente [95, 96]. En estas mismas líneas celulares, se determinó una IC₅₀ de 1.827×10^{-3} mg /mL (HT-29) y 6.913×10^{-4} mg/mL (HCT116) para el fármaco oxaliplatino (P.M. 397.3 g/mol) [95, 97].

Por otra parte, Jang *et al.* reportaron una IC₅₀ de 0.04 mg/mL en células HT-29 tratadas por 24 h con el fármaco irinotecán [98, 99]. En este trabajo, NP4 causó la muerte del 31% de la población celular con la cuarta parte de esa concentración. Por este motivo, con el fin de identificar la máxima actividad antiproliferativa de las formulaciones NP2 a NP4,

resultaría conveniente estudiar concentraciones ligeramente mayores (puesto que la mayor citotoxicidad se encuentra desplazada hacia 0.1 mg/mL) esperando obtener una IC₅₀ menor que la de este fármaco.

Con respecto a la formulación NP5 la mayor citotoxicidad se concentra en 1 mg/mL, experimento que registró el mayor efecto antiproliferativo de los 20 tratamientos evaluados. En general resulta clara la necesidad de evaluar el efecto de un espectro más amplio de concentraciones, especialmente aledañas a las concentraciones de mayor actividad antiproliferativa. De este modo, al reunir más datos se podría calcular una IC₅₀ con mayor precisión con un modelo matemático adecuado.

En relación con el comportamiento observado en los tratamientos con NP1 (Figura S3.B), su toxicidad parece depender de la dosis administrada. De este modo, con 10 mg/mL apenas se alcanza una viabilidad de 65%, por lo que se esperaría un mayor efecto citotóxico a concentraciones más elevadas que no pueden ser evaluadas bajo estas condiciones experimentales. Lo anterior debido a que la máxima concentración de AgNPs proviene de la suspensión stock de Argovit®.

A pesar las altas concentraciones de Argovit® necesarias para generar un efecto *in vitro* equiparable al de algunos fármacos de primera elección (0.1–1 mg/mL contra 6×10^{-4} – 1×10^{-3} mg/mL), es importante reflexionar acerca de los graves efectos secundarios, así como el desarrollo de mecanismos de resistencia de algunos tipos de cáncer frente a los fármacos comunes.

Más aún, en el trabajo realizado por Was *et al.* se demostró que las células de cáncer de colon HCT116 y SW480 experimentan senescencia (arresto irreversible del ciclo celular), y algunas adquieren varias características de células madre luego del tratamiento con 5-FU o irinotecán. La acumulación de células cancerosas senescentes se ha asociado con la resistencia a fármacos, mientras que la presencia de células madre cancerosas promueve la reaparición del cáncer luego de completar la intervención terapéutica [14].

Es por esto que, con el fin evitar la resistencia a fármacos y la recurrencia de tumores en experimentos *in vivo*, así como potenciar la actividad anticancerígena de los tratamientos con Argovit®, la aplicación combinada de estos agentes (AgNPs + fármaco) podría representar una alternativa adecuada.

En efecto, muchos modelos terapéuticos para cáncer de colon implican la administración de dos o más de estos fármacos en conjunto para lograr una respuesta más eficaz. Uno de los tratamientos más comunes implica el uso de 5-FU en combinación con leucovorina (ácido folínico), la cual incrementa el efecto del primero mediante la inhibición de la timidilato sintasa [14, 100, 101].

En cáncer colorrectal avanzado o metastásico, se utiliza la combinación de los fármacos irinotecán y 5-FU [98, 102, 103]. Se ha sugerido que la respuesta óptima de esta combinación depende de la secuencia de administración, duración de la exposición y la frecuencia de administración de cada uno de los fármacos [104]. Así mismo, el tratamiento multiquimioterápico conocido como FOLFIRINOX comprende el uso de los cuatro fármacos 5-fluorouracilo, leucovorina, irinotecán y oxaliplatino.

En este sentido, de lograr una sinergia aditiva con Argovit® y fármacos de primera elección la cantidad requerida de cada agente se vería reducida, en el mejor de los casos de manera significativa, así como los severos efectos secundarios.

Se ha reportado que nanopartículas de oro cargadas con 5-FU incrementan el efecto citotóxico hasta dos veces en células de cáncer de colon obtenidas de un tumor humano [15]. Brown *et al.* unieron el componente activo de oxaliplatino a AuNPs funcionalizadas con una monocapa de polietilenglicol (PEG), mejorando la entrega y la actividad antiproliferativa del fármaco en líneas celulares de cáncer de colon luego de 72 h de exposición. En células HCT116 resultaron ser igual de activas que el control de oxaliplatino, mientras que en células RKO, HCT-15 y HT-29 demostraron ser 1.3, 4.6 y 5.6 veces más citotóxicas respectivamente [23].

Por su parte Tumala *et al.* también reportaron la actividad antitumoral de oxaliplatino al encapsularlo en AuNPs (Ox-AuNPs). En células HCT116, las AuNPs por sí solas resultaron ser prácticamente inocuas en todas las concentraciones estudiadas (0.5-10 μ M) mientras que con Ox-AuNPs la viabilidad se redujo significativamente. Además esta conjunción fármaco-NP presenta una citotoxicidad *in vitro* ligeramente mayor que el fármaco puro, lo que fue consistente con una mayor reducción del tamaño del tumor en un modelo *in vivo* con ratones BABL/c [24].

De esta manera la cantidad necesaria de cada agente en Ox-AuNPs, así como los efectos secundarios, se vieron reducidos en el modelo *in vivo* [24]. Teniendo esto en cuenta, la administración combinada de Argovit® con el fármaco o la síntesis del conjugado

fármaco-Argovit® podría mejorar su eficacia terapéutica, por lo que valdría la pena evaluar la actividad antiproliferativa como una primera aproximación.

En este sentido Sánchez-Navarro *et al.* reportan un método sencillo para la síntesis verde de AgNPs y funcionalización con 5-FU mediante el uso de extracto de guanábana, *Annona muricata*, el cual funge simultáneamente como agente reductor y de funcionalización durante la síntesis. El tamaño promedio de las nanopartículas resultantes fue de 16.46 nm, similar al diámetro promedio de las formulaciones NP1, 3 y 4 de Argovit® [66].

Además de valorar la eficacia de las formulaciones de Argovit® con respecto a los fármacos de primera elección en líneas celulares de cáncer de colon, resulta apropiado también comparar su desempeño con el efecto antiproliferativo de otras formulaciones de AgNPs. En la Tabla 7 se compila el efecto de distintas formulaciones sobre la viabilidad celular de líneas de cáncer de colon.

Tabla 7. Exposición de líneas celulares de cáncer de colón a AgNPs por 24 h.						
Línea celular	Formulación AgNPs		Tamaño (nm)	Conc. [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Viabilidad (%)	Ref.
HCT116	Sin recubrimiento		6	2	~80	35
HT-29				10	~10	
			6	2	~75	
LoVo				NanoXact™ estabilizadas con citrato		
	20	~66				
	60	~85				
HCT-15	Argovit® Estabilizadas con PVP	NP1	16.4 ± 8.0	10	81.26	Presente trabajo
		NP2	25.4 ± 13.2		74.51	
		NP3	19.0 ± 9.3		71.80	
		NP4	16.4 ± 8.1		68.72	
		NP5	30.6 ± 23.2		70.10	
Caco2	BioPure® estabilizadas con citrato		20.4	1	~83	4
				10	~52	
				20	~34	
Caco2	BioPure® estabilizadas con citrato		20.3 ± 1.9	5	~79	25
				25	~77	
			34.4 ± 3.4	5	~72	
				25	~94	
			61.2 ± 5.3	5	~72	
				25	~77	
DLD-1	Argovit® Estabilizadas con PVP		35	2.5	~63	33
				5	~49	
				10	~5	
HT-29			35	2.5	~63	
				5	~43	
				10	~4	

Cabe mencionar que en los trabajos consultados se evaluaron intervalos de concentraciones pequeñas (por debajo de las concentraciones aquí evaluadas), por lo que se consideró adecuado comparar sus efectos respecto de la concentración inmediata de Argovit® (0.01 mg/mL). De esta manera, algunos trabajos reportaron mayor eficacia con concentraciones ligeramente por encima y debajo de 0.01 mg/mL de AgNPs.

Asimismo, en vista de las bajas concentraciones de los fármacos de primera elección que tienen un efecto importante sobre la viabilidad celular, sería conveniente evaluar dosis más diluidas de AgNPs. Esto con el fin de elucidar mejor el espectro de actividad antiproliferativa de Argovit® y escudriñar posibles tratamientos que proporcionen mayor eficiencia.

En vista del potencial antiproliferativo las formulaciones Argovit® en HCT-15 y de la inducción predominante de muerte celular vía apoptosis, es preciso reflexionar sobre los mecanismos moleculares implicados en la activación de esta vía.

Se sabe que uno de los factores que contribuyen a la inducción de apoptosis es el aumento de los niveles de ROS y los efectos derivados (daño mitocondrial y en ADN, inactivación de proteínas, peroxidación de lípidos) [57].

Si bien el fenotipo canceroso implica una condición de niveles elevados de ROS intracelulares, que promueven su crecimiento y proliferación, al mismo tiempo estas células son más sensibles a un incremento de ROS que las células sanas. Por tal motivo, el uso de agentes que induzcan ROS para atacar cáncer, es uno de los mecanismos de acción de algunos fármacos. Ejemplo de ello son los fármacos basados en quinonas, como doxorubicina, geldanamicina, y mitoxantrona, por mencionar algunos [57]. De manera similar se ha reportado que la producción de ROS y el subsecuente estrés oxidativo desempeñan un papel clave en la citotoxicidad de las AgNPs, promoviendo la activación de vías de muerte celular dependientes de la mitocondria [88-93].

En un estudio previo Juárez-Moreno *et al.* reportaron un incremento de la producción de ROS y de células apoptóticas con la línea HeLa de cáncer cervicouterino y las líneas MDA-MB-231 y MCF7 de cáncer de mama, luego de 24 h de exposición a una formulación de Argovit®. Este aumento mostró ser dependiente de la dosis de AgNPs, en el intervalo de concentraciones de 1.25–10 µg/mL [33].

Un estudio molecular detallado sobre la citotoxicidad de AgNPs en la línea de cáncer de colon HCT116 fue realizado por Gurunathan *et al.* En dicho estudio la exposición a AgNPs (2–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 h) provocó la pérdida de potencial en la membrana mitocondrial, lo cual se asoció con la creciente acumulación de ROS que originó el descenso de la viabilidad celular. De acuerdo con los autores, la despolarización de la membrana mitocondrial aumenta luego la producción de ROS, que es el principal factor que activa las rutas intrínsecas de apoptosis. Además, como podría esperarse, el daño mitocondrial menguó la producción de ATP. En general el efecto de las AgNPs sobre todos estos parámetros exhibió una relación lineal con la concentración de las mismas [35].

Miethling-Graff estudió los efectos de AgNPs recubiertas con citrato, en células LoVo de cáncer de colon humano. Con 24 h de exposición, encontró que el aumento del número de células apoptóticas y necróticas, así como de los niveles de ROS intracelulares, dependía del tamaño (40, 20 y 10 nm) y de la concentración de las nanopartículas (intervalo de concentraciones de 2.5–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). De este modo, con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ las AgNPs más pequeñas indujeron el mayor número de células apoptóticas y necróticas, así como la mayor cantidad de ROS a las 24 h de exposición [78]. Además, en dicho trabajo se llevó a cabo un estudio proteómico cuantitativo de las células expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AgNPs de 20 nm. La proteína peroxoredoxin-1 implicada en la regulación del ambiente redox celular, mostró gran regulación positiva, lo que sugiere el incremento en los niveles de peróxidos por efecto de las AgNPs. En este estudio además se determinó que las nanopartículas indujeron cambios estadísticos en la “vía de disfunción mitocondrial”. Entre las proteínas reguladas negativamente se encontraron componentes del complejo I, III IV y V de la cadena de transporte de electrones, lo que probablemente atenúa la producción de ATP [78].

De acuerdo con nuestros datos (Figura 25), la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en una porción de la población celular no exhibe una correlación con la porción de células apoptóticas (o con la muerte celular en general) necesariamente en todo el intervalo de concentraciones evaluadas. Con excepción de NP1, todas las formulaciones mostraron porcentajes de eventos positivos para $\text{O}_2^{\bullet-}$ y apoptosis muy próximos (diferencia de menos de 15%) entre sí, a las concentraciones 0.1 y 1 mg/mL (Figura S4). NP4 mostró además correlación en la frecuencia de estos dos grupos con 0.01 mg/mL de AgNPs.

En este sentido, algunos autores reportan que la despolarización de la membrana mitocondrial por efecto de las nanopartículas, agudiza a su vez la producción de ROS en cáncer de colon [35]. Por tal motivo, con el fin de ganar un mejor entendimiento del papel de la mitocondria en la citotoxicidad ejercida por las AgNPs, sería conveniente medir el efecto de estas concentraciones en el potencial de membrana mitocondrial.

Por otro lado, con la concentración más baja de nanopartículas se registró una menor cantidad (~23%) de eventos apoptóticos que de eventos $O_2^{\bullet-}$ positivos. Una posible razón de dicha diferencia es que, a pesar de inducir una cantidad importante de ROS mitocondriales con 0.01 mg/mL de AgNPs, los niveles intracelulares no sean lo suficientemente altos como para romper el equilibrio redox y desencadenar apoptosis.

Es por ello que, con el fin de complementar estas evaluaciones y determinar si las células con los tratamientos que indujeron apoptosis experimentan además estrés oxidativo, se sugiere el empleo de ensayos capaces de medir los niveles de ROS de la población celular (liberación al medio de cultivo) o marcas características de estrés oxidativo como la carbonilación de proteínas o la generación de malondialdehído (MDA) [32].

El MDA es el producto final de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, por lo que representa un marcador biológico de estrés oxidativo. Se han desarrollado muchos métodos con los cuales por medio de la medición de los niveles de esta molécula se puede cuantificar el estrés oxidativo *in vitro* e *in vivo* [105].

Otra posible razón es que la acumulación de ROS mitocondriales no sea el principal factor que desencadene muerte celular en los cultivos de células HCT-15 expuestas a 0.01 mg/mL de Argovit®. Con esta misma concentración (10-20 μ g/mL), y nanopartículas de tamaño similar (20.4 nm), los resultados de Sahu *et al.* tampoco soportan una relación directa del estrés oxidativo con la citotoxicidad de las AgNPs en células Caco2. A pesar de registrar una disminución (de ~40%) significativa en la viabilidad, el potencial de membrana y el contenido de ADN intacto, los autores no detectaron ningún aumento en los niveles de ROS intracelulares [4].

Algo similar ocurrió en los tratamientos con la concentración más alta (10 mg/mL). Curiosamente, con esta cantidad de nanopartículas se registró el incremento en el número de células $O_2^{\bullet-}$ positivas y la disminución de células apoptóticas, ambos eventos significativos. Esta divergencia apoya la idea de la activación masiva de la autofagia, sugerida anteriormente en esta discusión.

Desde 1998 se había observado que las mitocondrias despolarizadas, un elemento característico de la apoptosis, eran eliminadas rápidamente por autofagia en hepatocitos primarios. Así, al eliminar las mitocondrias dañadas las células previenen la liberación de componentes pro-apoptóticas de este organelo para evitar la apoptosis [80]. Incluso, en el tratamiento de casos avanzados de cáncer colorrectal, algunas intervenciones buscan la inhibición farmacológica de la autofagia como estrategia para mejorar la eficacia de las terapias [106].

La autofagia misma no representa una vía de muerte celular, sino una estrategia de la célula en su intento por sobrevivir en condiciones de estrés, como el que se induce por terapia [106]. Es solo cuando la célula falla en este intento de sobrevivir con procesos masivos de vacuolización (degradación de porciones importantes del citoplasma), que la autofagia conduce a la muerte de la célula. De esta forma se tendrían células HCT-15 con niveles de ROS mitocondriales elevados que evitan morir, y células que mueren por la activación masiva de autofagia y cuya muerte no puede ser detectada por los ensayos de viabilidad utilizados en este trabajo.

Para realizar una valoración preliminar íntegra de las formulaciones de Argovit® como posibles agentes terapéuticos, además de investigar su actividad antiproliferativa en un modelo tumoral resulta preciso estudiar su citotoxicidad en un modelo celular sano.

Previamente en este trabajo, se señaló el carácter inocuo de Argovit® en cultivos de linfocitos de bazo de ratones BALB/c. Sin embargo, en el modelo de monocitos, los cuales constituyen una de las primeras líneas de defensa contra patógenos y agentes extraños, las AgNPs presentaron una citotoxicidad significativa con una clara dosis-dependencia en las cinco formulaciones.

Existe poca información acerca del efecto de AgNPs en cultivos primarios de monocitos/macrófagos de ratón, sin embargo hay reportes de la citotoxicidad en líneas celulares humanas y murinas. Carlson *et al.* reportan la toxicidad tamaño- y dosis-dependiente en macrófagos alveolares de rata tratados con AgNPs de 15, 30 y 55 nm por 24 h, donde las partículas más pequeñas exhibieron un efecto citotóxico mayor. En este estudio además se reportan valores de IC₅₀ de 27.87 ± 12.23 , 33.38 ± 11.48 y >75 µg/mL respectivamente [107].

En el trabajo de Park *et al.* se estudió el efecto de la formulación comercial nanoComposix de AgNPs de 20, 80 y 133 nm en la línea RAW 264.7 de macrófagos de ratón. En este

modelo las nanopartículas disminuyeron considerablemente la actividad metabólica luego de 24 h de exposición, siendo las de 20 nm las que indujeron una mayor reducción. Con 4 h de exposición sólo las nanopartículas de 20 nm en concentración de 100 µg/mL exhibieron un incremento significativo en la producción de ROS, mientras que las otras solo registraron un efecto mínimo [108]. En este artículo, también se midió la liberación de marcadores de inflamación con 24 h de exposición a AgNPs (IL1 α , IL1 β , IL6, MIP1 α , MIP1 β , MIP2, GCSF y TNF α). La exposición a los tres tamaños de nanopartículas resultó en la liberación de marcadores de inflamación; todos fueron inducidos en mayor medida por las AgNPs de 20 nm.

Martínez-Gutierrez *et al.* trataron la línea celular THP-1 de monocitos humanos (leucemia monocítica) activados con forbol miristato acetato (PMA) y tratados con AgNPs de 24 nm, durante 24 h. Ellos reportan la secreción de las citocinas inflamatorias IL-6 y TNF- α con concentraciones ≥ 10 µg/mL [109]. Butler *et al.* reportan que bajas concentraciones de AgNPs recubiertas con citrato de sodio, de 10 nm (15 µg/mL) y 20 nm (20 µg/mL) indujeron la generación de micronúcleos en este mismo modelo. Además las AgNPs produjeron rupturas en la cadena de ADN debido a la liberación de iones de plata (Ag⁺) tras la endocitosis por las células THP-1 [69].

En la Tabla 8 se concentran datos de viabilidad celular en monocitos humanos/murinos de esta y otras fuentes. En todas estas referencias el efecto citotóxico fue dependiente de la dosis y del tamaño de las partículas. De acuerdo con este comportamiento, en la tabla se aprecian las minúsculas concentraciones (10–50 µg/mL) de otras AgNPs capaces de matar a una fracción significativa de monocitos, mientras que 1000 µg/mL de las formulaciones de Argovit[®] apenas disminuyen en un ~30% la población de monocitos. Este hecho refleja el carácter tóxico de otras formulaciones de nanopartículas contra el bajo efecto citotóxico de Argovit[®], lo que pone en evidencia su potencial aplicación biomédica.

Un detalle destacable en este trabajo, es el hecho de que los tratamientos con Argovit[®] resultaran prácticamente inocuos en linfocitos primarios de ratón y considerablemente nocivos para monocitos. Este evento es consistente con lo descrito por Greulich *et al.* en monocitos y linfocitos T aislados de sangre periférica humana. De manera similar estas células primarias se expusieron a AgNPs de 70 nm recubiertas con PVP durante 24 h. Luego de la exposición se registró un efecto tóxico importante en monocitos mientras que

en las poblaciones de linfocitos T no hubo efecto significativo. Esto estuvo directamente relacionado con la presencia de aglomerados de AgNPs en el citoplasma de los monocitos (detectado por microscopía óptica, citometría de flujo y microscopía electrónica de barrido), de lo cual no se encontró evidencia en linfocitos incluso luego de 7 días de exposición [68]. Además, Zolnik *et al.* reportaron que las nanopartículas son a menudo tomadas primero por los fagocitos del sistema inmunitario como los monocitos [110].

Tabla 8. Viabilidad monocitos/macrófagos expuestos a AgNPs por 24 h.					
Célula	Formulación AgNP	Tamaño (nm)	Conc. [$\mu\text{g/mL}$]	Viabilidad (%)	Ref.
Macrófagos primarios de rata	Sin recubrimiento	15	27.87	50	107
		30	33.38		
		55	>75		
RAW 264.7 Macrófagos de ratón	Sin recubrimiento	44-106	2.5	74.3	113
			5	37.5	
			10	5.5	
THP-1 Monocitos humanos activados con PMA.	Sin recubrimiento	24	2	98.7	109
			5	92.3	
			6.25	91	
			12.5	66.7	
			50	41.5	
THP-1 Monocitos humanos	nanoComposix. Estabilizadas en buffer de citrato.	100	0-50	No tóxico	69
		50	0-50		
		20	25	~ 80.35	
			30	~ 77.62	
			40	~ 69.20	
			50	~ 64.19	
		10	25	~ 67.80	
			30	~ 53.26	
			40	~ 47.0	
			50	~ 38.24	
Monocitos humanos primarios	Recubiertas con PVP	70	20	~ 88.47	68
			25	~ 76.38	
			30	~ 56.66	
Monocitos primarios de ratón BALB/c	Argovit® Estabilizadas con PVP	NP1	16.4±8.0	1000	Presente trabajo
		NP2	25.4±13.2		
		NP3	19.0±9.3		
		NP4	16.4±8.1		
		NP5	30.6±23.2		
					74.80
					70.33
					73.38
					73.10
					74.38

En este sentido el proceso de incorporación, y subsecuente citotoxicidad, de las AgNPs está profundamente relacionado con el papel que desempeñan estas células del sistema inmunitario durante la respuesta a agentes extraños. Los monocitos forman parte del sistema inmunológico, específicamente están involucrados en la respuesta fagocítica, una vez diferenciados a macrófagos tienen la capacidad de ingerir cuerpos extraños y destruir el agente invasor. Por su parte los linfocitos, que carecen de esta capacidad fagocítica,

desempeñan la función de reconocimiento de antígenos [111]. Por ello, al no poder los linfocitos identificar antígenos en las nanopartículas, no resulta extraño observar una mayor respuesta en los cultivos primarios de monocitos, como consecuencia de la diferenciación promovida por las AgNPs y probablemente el aumento de fagocitosis [112].

El análisis del mecanismo de muerte celular inducido por las AgNPs en monocitos, es otro punto importante a discutir en la valoración de Argovit[®] como agente terapéutico. Orłowski *et al.* probaron AgNPs (2.5, 5 y 10 µg/mL) altamente polidispersas (tamaños de 44-106 nm) estabilizadas con citrato en macrófagos RAW 264.7 de ratón durante 24 h de exposición. Con solo 5 µg/mL de AgNPs la viabilidad se redujo a más de la mitad ($37.5 \pm 6.5\%$). Además de la considerable citotoxicidad, la muerte celular inducida por los tratamientos ocurrió de manera predominante por necrosis, superando con creces (diferencias de 80 y 90% con 5 y 10 µg/mL respectivamente) el porcentaje de células apoptóticas. Así mismo detectaron la activación de caspasa-1, lo que promovería una respuesta inflamatoria ante la presencia de las AgNPs [113].

También Foldbjerg *et al.* reportaron que AgNPs de ~70 nm recubiertas con PVP, indujeron la producción de ROS, apoptosis y necrosis en la línea THP-1 [114]. Teniendo esto en cuenta, resulta primordial efectuar el ensayo con AV/IP con monocitos y determinar las vías de muerte celular inducidas por las AgNPs utilizadas en este trabajo, así como su posible relación con la producción de ROS.

Cabe destacar que los tratamientos más tóxicos en monocitos primarios fueron aquellos con 10 mg/mL de nanopartículas, mientras que la mayor citotoxicidad en HCT-15 se registró con concentraciones menores. Por ello podemos suponer que con la diferenciación de los monocitos de ratón BALB/c hacia macrófagos, estos últimos pueden internalizar incluso los aglomerados de AgNPs (más frecuentes a concentraciones altas) que las células tumorales no pueden. En otras palabras, las concentraciones de interés (las de mayor actividad antiproliferativa) en HCT-15 son distintas de aquellas que resultan ser tóxicas en los modelos de células sanas, con excepción de la formulación NP1.

Lo anterior resulta conveniente para realizar investigaciones complementarias, pues al administrar estos tratamientos específicos en sistemas más complejos (p.e. modelos *in vivo*) se esperaría que fueran nocivos en células cancerosas e inocuos (o ligeramente tóxicos) en células sanas, lo cual supone una ventaja hacia una aplicación terapéutica. De

manera análoga, estudios previos han mostrado que Argovit posee actividad antimicrobiana a concentraciones que no resultaron ser tóxicas para células y tejidos de mamíferos, como diferentes órganos de ratones y experimentos *in vivo* en ratas [115-117].

De este modo, administrar la formulación y dosis adecuada de AgNPs en modelos tumorales más complejos (p.e. cultivos celulares 3D, ensayos *in vivo*, entre otros) podría comprometer ligeramente (o incluso no hacerlo) la integridad de células sanas. Por otro lado, con la intención de disponer formulaciones con alta actividad antiproliferativa y acción específica entre células sanas y cancerosas, la NP1 no parece ser buen candidato para posteriores investigaciones contra el cáncer de colon.

Un aspecto de gran interés en torno a la respuesta celular, es si la citotoxicidad suscitada por diferentes formulaciones de AgNPs es producto de la interacción de la maquinaria celular con la propia partícula, o con los iones Ag^+ que pueden ser liberados del nanomaterial.

van der Zande *et al.* evaluaron el efecto de AgNPs (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 20, 30, 60 y 110 nm estabilizadas con citrato), así como de AgNO_3 , en células Caco-2 (adenocarcinoma colorrectal) y MCF7 (cáncer de mama). El análisis transcriptómico reveló una gran similitud entre las respuestas de expresión genética a la plata en forma iónica y nanoparticulada. También se demostró la internalización y degradación intracelular de las AgNPs, lo que apoya el mecanismo “caballo de Troya”; los autores consideraron que los efectos observados se deben únicamente a la exposición crónica a Ag^+ como consecuencia de la disolución intracelular de estas AgNPs, en lugar de mecanismos más complejos y específicos para nanopartículas [25].

En un modelo distinto, células de leucemia mieloide aguda (línea celular SHI-1) fueron tratadas con AgNPs recubiertas con PVP y iones de plata. En dicho trabajo, la administración conjunta de vitamina C pudo revertir por completo las ROS inducidas por AgNPs, pero no pudo prevenir los cambios en el potencial de membrana mitocondrial, el daño en ADN ni apoptosis. Esto mostró que, si bien el aumento en los niveles de ROS juega un papel importante en la citotoxicidad de las AgNPs, no es el único mecanismo por el cual las nanopartículas ejercen su toxicidad. Así mismo, las células expuestas a AgNPs exhibieron niveles de ROS similares a los de las células tratadas con iones Ag^+ , sin embargo, los iones mostraron una mayor toxicidad que las nanopartículas [118].

De manera distinta, Verano-Braga *et al.* reportaron que las nanopartículas de plata (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NanoXact™ de 20 y 100 nm recubiertas con citrato) y los iones de plata (en cantidades equivalentes) influyen en la expresión de conjuntos diferentes de proteínas, y que un mayor número de proteínas fue regulado por las nanopartículas que por los iones Ag^+ en células LoVo (adenocarcinoma colorrectal). Esto reveló que las nanopartículas desempeñan un papel clave en la inducción del estrés celular. Particularmente la administración de nanopartículas de 20 nm provocó una mayor producción de ROS (30% más) que la cantidad equivalente de iones Ag^+ [32].

Por este motivo, sería interesante evaluar concentraciones equivalentes de sales de plata, p.e. AgNO_3 , e investigar si generan efectos similares en HCT-15 cuando se efectúan las mismas determinaciones. De esa manera podremos conocer si el recubrimiento de PVP, así como la aglomeración de las AgNPs, permite o dificulta la liberación de iones Ag^+ del núcleo metálico.

9. Conclusiones

Las formulaciones de Argovit® exhibieron un efecto antiproliferativo e indujeron apoptosis en cultivos de células HCT-15. Es necesario evaluar el efecto a concentraciones próximas a las de mayor eficacia para determinar la IC50.

Se observó una generación de ROS mayor a 40% en los cultivos tratados con 10 mg/mL de NP3–NP5, aunque estos tratamientos no fueron los que presentaron mayor apoptosis. Por lo tanto, la inducción de apoptosis en la línea tumoral no fue promovida directamente por la generación de ROS. Debido a las diferencias de viabilidad observadas entre la tinción por citometría de flujo y por exclusión vital y debido a lo reportado en la bibliografía se sugiere la posibilidad de una muerte celular causada por macroautofagia.

Los tratamientos de mayor acción antiproliferativa en la línea tumoral resultaron en una ligera citotoxicidad en el modelo de células sanas. Es necesario evaluar la citotoxicidad en modelos más complejos para confirmar la selectividad.

Referencias

1. Poole, C. & Owens, F. (2007). *Introducción a la nanotecnología*. Barcelona, España: Editorial Reverte.
2. van de Voorde, M., Werner, M. & Fecht, H. (2015). *The nano-micro interface. bridging the micro and nano worlds*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag.
3. Padinjarathil, H., Joseph, M. M., Unnikrishnan, B. S., Preethi, G. U., Shiji, R., Archana, M. G., Sreelekha, T. T. (2018). *Galactomannan endowed biogenic silver nanoparticles exposed enhanced cancer cytotoxicity with excellent biocompatibility*. International Journal of Biological Macromolecules, 118, 1174–1182.
4. Sahu, S. C., Zheng, J., Graham, L., Chen, L., Ihrle, J., Yourick, J. J., & Sprando, R. L. (2014). *Comparative cytotoxicity of nanosilver in human liver HepG2 and colon Caco2 cells in culture*. Journal of Applied Toxicology, 34(11), 1155–1166.
5. Kumar, P., Yuvakkumar, R., Vijayakumar, S., Vaseeharan, B. (2018). *Cytotoxicity of phloroglucinol engineered silver (Ag) nanoparticles against MCF-7 breast cancer cell lines*. Materials Chemistry and Physics, 220, 402–408.
6. Cameron, S., Hosseinian, F., & Willmore, W. (2018). *A Current Overview of the Biological and Cellular Effects of Nanosilver*. International Journal of Molecular Sciences, 19(7), 2030.
7. García-Osogobio, S., Téllez-Ávila, F., Méndez, N., & Uribe-Esquivel, M. (2015). *Results of the first program of colorectal cancer screening in Mexico*. Endoscopia, 27(2), 59-63.
8. The global Cancer observatory. (2019). *Mexico fact sheets*. Diciembre 1, 2019, de World Health Organization Sitio web: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
9. Kierszenbaum, A. & Tres, L. (2016). *Histology and cell biology: an introduction to pathology*. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders.
10. Engin, O. (2015). *Colon polyps and the prevention of colorectal cancer*. Cham: Springer.
11. Macarulla, T., Élez, E., Capdevila, J. & Tabernero, J. (2011). *Cáncer de colon y de recto*. Barcelona, España: Editorial Amat
12. Rozman, C. (2006). *Compendio de medicina interna*. Madrid: Elsevier.
13. Tsikitis, V. L., Larson, D. W., Huebner, M., Lohse, C. M., & Thompson, P. A. (2014). *Predictors of recurrence free survival for patients with stage II and III colon cancer*. BMC Cancer, 14(1).
14. Was, H., Czarnecka, J., Kowalczyk, A., Barszcz, K., Bernas, T., Piwocka, K., & Kaminska, B. (2017). *Some chemotherapeutics-treated colon cancer cells display a specific phenotype being a combination of stem-like and senescent cell features*. Cancer Biology & Therapy, 2017, 1–39.
15. Li, P., Wang, Y., Peng, Z., She, M. F., & Kong, L. (2010). *Physicochemical property and morphology of 5-fluorouracil loaded chitosan nanoparticles*. International Conference on Nanoscience and Nanotechnology, 2010, 248-250.

16. Singh, S., Kotla, N., Tomar, S., Maddiboyina, B. Webster, T., Sharma, D., & Sunnapu, O. (2015). *A nanomedicine-promising approach to provide an appropriate colon-targeted drug delivery system for 5-fluorouracil*. International Journal of Nanomedicine, 10, 7175-7182.
17. Tummala, S., Kuppusamy, G., Kumar, S., Praveen, T., & Wadhvani, A. (2016). *5-Fluorouracil enteric-coated nanoparticles for improved apoptotic activity and therapeutic index in treating colorectal cancer*. Drug Delivery, 23 (8), 2902-2910.
18. Sánchez-Navarro, M., Ruiz-Torres, C., Niño-Martínez, N., Sánchez-Sánchez, R., Martínez-Castrañón, G., Alba-Montero, I., & Ruiz, F. (2018). *Cytotoxic and Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles Obtained by Green Synthesis Method Using Annona muricata Aqueous Extract and Functionalized with 5-Fluorouracil*. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2018, 1-8.
19. Sharma, R., & Smith, T. (2008). *Colorectal Tumor Cells Treated with 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan, and Cetuximab Exhibit Changes in 18F-FDG Incorporation Corresponding to Hexokinase Activity and Glucose Transport*. Journal of Nuclear Medicine, 49(8), 1386-1394.
20. Jang, H., Hong, E., Jang, J., Choi, J., Park, S., Byun, H., Koh, D., Choi, M., Kae, S., & Lee, J. (2016). *Synergistic Effects of Simvastatin and Irinotecan against Colon Cancer Cells with or without Irinotecan Resistance*. Gastroenterology Research and Practice, 2016, 1-9.
21. Malik, P. & Mukherjee, T. K. (2018). *Recent advances in gold and silver nanoparticle based therapies for lung and breast cancers*. International Journal of Pharmaceutics, 553, 483–509.
22. Safwat, M.A., Soliman, G.M., Sayed, D., & Attia, M.A. (2016). *Gold nanoparticles enhance 5-fluorouracil anticancer efficacy against colorectal cancer cells*. International Journal of Pharmaceutics, 513, 648-658.
23. Brown, S., Nativo, P., Smith, J., Stirling, D., Edwards, P., Venugopal, B., Flint, D., Plumb, J., Graham, D., & Wheate, N. (2010). *Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin*. Journal of the American Chemical Society, 132, 4678-4684.
24. Tummala, S., Kumar M., & Pindiprolu S. (2016). *Improved anti-tumor activity of oxaliplatin by encapsulating in anti-DR5 targeted gold nanoparticles*. Drug Delivery, 23(9), 3505-3519.
25. van der Zande, M., Undas, A., Kramer, E., Monopoli, M., Peters, R., Garry, D., Fernandes, E., Hendriksen, P., Marvin, H., Peijnenburg, A., & Bouwmeester, H. (2016). *Different responses of Caco-2 and MCF-7 cells to silver nanoparticles are based on highly similar mechanisms of action*. Nanotoxicology, 10(10), 1431-1441.
26. Borrego, B., Lorenzo, G., Mota-Morales, J., Almanza-Reyes, H., Mateos, F., López-Gil, E., Losa, N., Burmistrov, V., Pestryakov, A., Brun, A. & Bogdanchikova, N. (2016). *Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 12, 1185–1192.

27. Burmistrov VA, Pestryakov AN, Odegova GV, Burmistrov IV, Burmistrov AV, Bogdanchikova NE. Complex drug to prevent and treat intestinal infections. RU patent 2519659 2014.
28. Burmistrov VA, Pestryakov AN, Odegova GV, Burmistrov IV, Burmistrov AV, Bogdanchikova NE. Method of prevention and treatment of gastritis, stomach and duodenal ulcer. RU patent 2549975 2015.
29. Blagitko EM, Rodionov PP, Bugaichewenko NV, Shorina GN, Ilina VN, Minina AV, Mikhailov YI, Burmistrov VA, Odegova GV, Polunina OA, Mikhailov YK, Bogdanchikova NE, B. Avalos M, Antonov AR, Rodionov AP. Mean Argovit for treating the infected wounds. RU patent 2245151 2005.
30. Voronzova NA, Rodionov PP, Burmistrov VA, Blagitko EM, Mikhailov YI, Odegova GV, Bogdanchikova NE, B. Avalos M, Polunina OA, Mikhailov KY, Dmitrieva LA, Bernvald SA. Method of treatment of ear, throat and nose diseases. RU patent 2307657 2007.
31. Buttacavoli, M., Albanese, N.N., di Cara, G., Alduina, R., Faleri, C., Gallo, M., Pizzolanti, G., Gallo, G., Feo, S., Baldi, F., & Cancemi, P. (2018). *Anticancer activity of biogenerated silver nanoparticles: An integrated proteomic investigation*. *Oncotarget*, 9, 9685–9705.
32. Verano-Braga, T., Miethling-Graff, R., Wojdyla, K., Rogowska-Wrzesinska, A., Brewer, J., Erdmann, H., & Kjeldsen, F. (2014). *Insights into the Cellular Response Triggered by Silver Nanoparticles Using Quantitative Proteomics*. *ACS Nano*, 8 (3), 2161-2175.
33. Juarez-Moreno, K., Gonzalez, E., Girón-Vazquez, N., Chávez-Santoscoy, R., Mota-Morales, J., Perez-Mozqueda, L., Bogdanchikova, N. (2016). *Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines*. *Human & Experimental Toxicology*, 36(9), 931–948.
34. Satapathy, S., Purusottam, M., Das, D., Siddhart, S., & Kundu, C. (2014). *The Apoptotic Effect of Plant Based Nanosilver in Colon Cancer Cells is a p53 Dependent Process Involving ROS and JNK Cascade*.
35. Gurunathan, S., Qasim, M., Park, C., Yoo, H., Kim, J., & Hong, K. (2018). *Cytotoxic Potential and Molecular Pathway Analysis of Silver Nanoparticles in Human Colon Cancer Cells HCT116*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1-19.
36. Williams, D. & Carter, C. (2009). *Transmission electron microscopy: a textbook for materials science*. New York: Springer
37. Tang, C.Y. & Yang, Z. (2017). *Transmission Electron Microscopy*. En *Membrane Characterization* (145-159). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
38. Fultz, B. & Howe, J. (2013). *Transmission electron microscopy and diffractometry of materials*. Heidelberg New York: Springer.
39. Bhattacharjee, S. (2016). *DLS and zeta potential – What they are and what they are not?*. *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351.
40. Róz, A., Ferreira, M., Leite, F. & Oliveira, O. (2017). *Nanocharacterization techniques*. Cambridge, MA: William Andrew.

41. Kalantar-zadeh, K. (2007). *Nanotechnology-enabled sensors*. New York London: Springer.
42. Park, S. & Seo. (2011). *Interface science and composites*. Amsterdam: Academic Press.
43. Albright, L. (2009). *Albright's chemical engineering handbook*. Boca Raton: CRC Press.
44. Chung, E., Leon, L., & Rinaldi C. (2019). *NANOPARTICLES FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS* Fundamental Concepts, Biological Interactions and Clinical Applications. S.I: ELSEVIER.
45. Anderson, R., Bendell, D. & Groundwater, P. (2004). *Organic spectroscopic analysis*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
46. Vitha, M. (2018). *Spectroscopy: principles and instrumentation*. Hoboken, NJ: Wiley.
47. Kumar, C. (2013). *UV-VIS and photoluminescence spectroscopy for nanomaterials characterization*. Berlin London: Springer.
48. Alarcon, E., Griffith, M. & Udekwu, K. (2015). *Silver nanoparticle applications: in the fabrication and design of medical and biosensing devices*. Cham: Springer.
49. Saion, E., Gharibshahi, E. & Naghavi, K. (2013). *Size-Controlled and Optical Properties of Monodispersed Silver Nanoparticles Synthesized by the Radiolytic Reduction Method*. International Journal of Molecular Sciences, 14(4), 7880–7896.
50. Ceroni, P. (2012). *The exploration of supramolecular systems and nanostructures by photochemical techniques*. Dordrecht New York: Springer.
51. Dhawan, A. & Kwon, S. (2017). *In vitro toxicology*. London: Academic Press, an imprint of Elsevier.
52. Sun, T. (2012). *Flow cytometry, immunohistochemistry, and molecular genetics for hematologic neoplasms*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
53. Radbruch, A. (2000). *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
54. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. & Martin, K. (2016). *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman-Macmillan Learning.
55. Langdon, S. (2004). *Cancer cell culture: methods and protocols*. Totowa, N.J: Humana
56. Vallabhajosula, S. (2009). *Molecular imaging: radiopharmaceuticals for PET and SPECT*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
57. Kyrlykova, K., Kyryanchenko, S., Leid, M., & Kioussi, C. (2012). *Detection of Apoptosis by TUNEL Assay*. Odontogenesis, 41–47.
58. Dharmaraja, A. (2017). *Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Therapeutics and Drug Resistance in Cancer and Bacteria*. Journal of Medicinal Chemistry, 60, 3221-3240.
59. Wang, W., Fang, H., Groom, L., Cheng, A., Zhang, W., Liu, J., Wang, X., Li, K., Han, P., Zheng, M., Yin, J., Wang, W., Mattson, M., Kao, J., Lakatta, E., Sheu,

- S.-S., Ouyang, K., Chen, J., Dirksen, R., & Cheng, H. (2008). *Superoxide Flashes in Single Mitochondria*. *Cell*, 134, 279–290
60. Dhawan, A., Anderson, D. & Shanker, R. (2017). *Nanotoxicology: experimental and computational perspectives*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
 61. Kadish, K., Smith, K. & Guilard, R. (2010). *Handbook of porphyrin science: with applications to chemistry, physics, materials science, engineering, biology and medicine*. Singapore Hackensack, NJ: World Scientific.
 62. Mitochondria. Pon, L. & Schon, E. (2007). *Mitochondria*. Amsterdam Boston: Elsevier/Academic Press.
 63. Robinson, J. & Cossarizza, A. (2017). *Single cell analysis: contemporary research and clinical applications*. Singapore: Springer.
 64. Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Haskó, G., Hawkins, B., Madesh, M., & Pacher, P. (2007). *Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy*. *Nature Protocols*, 2(9), 2295–2301.
 65. Juarez-Moreno, K., Mejía-Ruiz, C., Díaz, F., Reyna-Verdugo, H., Re, A., Vazquez-Felix, E., Sánchez-Castrejón, E., Mota-Morales, J., Pestryakov, A., & Bogdanchikova, N. (2017). *Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei**. *Chemosphere*, 169(2017), 716-724.
 66. Sánchez-Navarro, M., Ruiz-Torres, C., Niño-Martínez, N., Sánchez-Sánchez, R., Martínez-Castañón, G., DeAlba-Montero, I., & Ruiz, F. (2018). *Cytotoxic and Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles Obtained by Green Synthesis Method Using *Annona muricata* Aqueous Extract and Functionalized with 5-Fluorouracil*. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018, 1-8.
 67. Grumezescu, A. (2017). *Multifunctional systems for combined delivery, biosensing and diagnostics*. Amsterdam: Elsevier.
 68. Greulich, C., Diendorf, J., Gessmann, J., Simon, T., Habijan, T., Eggeler, G., Schildhauer, T. A., Epple, M. and Köller, M. (2011) *Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles*. *Acta Biomater.*, 7, 3505–3514.
 69. Butler, K., Peeler, D., Casey, B., Dair, B., & Elespuru, R. (2015) *Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity*. *Mutagenesis*, 30 (4), 577-591.
 70. Gibson, J., Khanal, B., & Zubarev, E. (2007). *Paclitaxel-Functionalized Gold Nanoparticles*. *Journal of the American Chemical Society*, 129 (37), 11653-11661
 71. Wu, M., Guo, H., Liu, L., & Xie, L. (2019). *Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles*. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4247-4259.
 72. Moore, T. L., Rodriguez-Lorenzo, L., Hirsch, V., Balog, S., Urban, D., Jud, C., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M., & Petri-Fink, A. (2015). *Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions*. *Chemical Society Reviews*, 44(17), 6287–6305.

73. Gliga, A. R., Skoglund, S., Odnevall Wallinder, I., Fadeel, B., & Karlsson, H. L. (2014). *Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release*. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1), 11.
74. Mattson, M. & Calabrese, E. (2010). *Hormesis: a revolution in biology, toxicology, and medicine*. New York: Springer.
75. Bello-Bello, J. J., Chavez-Santoscoy, R. A., Lecona-Guzmán, C. A., Bogdanchikova, N., Salinas-Ruíz, J., Gómez-Merino, F. C., & Pestryakov, A. (2017). *Hormetic Response by Silver Nanoparticles on In Vitro Multiplication of Sugarcane (Saccharum spp. Cv. Mex 69-290) Using a Temporary Immersion System*. *Dose-Response*, 15(4), 1-9.
76. Sachet, M., Liang, Y., & Oehler, R. (2017). *The immune response to secondary necrotic cells*. *Apoptosis*, 22(10), 1189-1204.
77. Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., & Han, J. (2017). *Plasma membrane changes during programmed cell deaths*. *Cell Research*, (2017), 1-13.
78. Miethling-Graff, R., Rumpker, R., Richter, M., Verano-Braga, T., Kjeldsen, F., Brewer, J., Hoyland, J., Rubahn, H., & Erdmann, H.. ((2014)). *Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells*. *Toxicology in Vitro*, 28, 1280-1289.
79. Casares, N., Pequignot, M. O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., Schmitt, E., Hamai, A., Hervas-Stubbs, S., Obeid, M., Coutant, F., Métivier, D., Pichard, E., Aucouturier, P., Pierron, G., Garrido, C., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2005). *Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death*. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(12), 1691–1701
80. Elmore, S. (2007). *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516.
81. Hainfeld, J., O'Connor, M., Dilmanian, F., Slatkin, D., Adams, D., & Smilowitz, H. (2011). *Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions*. *The British Journal of Radiology*, 84, 526-533.
82. Cummings, B., & Schnellmann, R. (2004). *Measurement of Cell Death in Mammalian Cells*. *Current Protocols in Pharmacology*, 25, 12.8.1-12.8.22.
83. Castro-Gamboa, S., Garcia-Garcia, M., Piñon-Zarate, G., Rojas-Lemus, M., Jarquin-Yañez, K., Herrera-Enriquez, M., Fortoul, T., Toledano-Magaña, Y., Garcia-Iglesias, T., Pestryakov, A., Castell-Rodriguez, A., & Bogdanchikova N. (2019). *Toxicity of silver nanoparticles in mouse bone marrow-derived dendritic cells: Implications for phenotype*. *Journal of Immunotoxicology*, 1-9.
84. Han, J.W., Jeong, J.-K., Gurunathan, S., Choi, Y.-J., Das, J., Kwon, D.-N., Cho, S.-G., Park, C., Seo, H.G., Park, J.-K., & Kim, J-H. (2015) *Male- and female-derived somatic and germ cell-specific toxicity of silver nanoparticles in mouse*. *Nanotoxicology*, 10, 361–373.
85. Yonekawa, T., & Thorburn, A. (2013). *Autophagy and Cell Death*. *Essays Biochem*, 55, 105-117.

86. Hu, T., Li, Z., Gao, C., & Cho, C. (2016). *Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies*. *World Journal of Gastroenterology*, 22(30), 6876-6889.
87. Boyer, J., McLean, EG, Aroori, S., Wilson, P., McCulla, A., Carey, PD, Longley, DB, Johnston, PG. (2004) *Characterization of p53 wild-type and null isogenic colorectal cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan*. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2158-2167.
88. AshaRani, P., Low Kah Mun, G., Hande, M., Valiyaveetil, S. (2009) *Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells*. *ACS Nano*, 3, 279–290.
89. Choi, Y.-J., Park, J.-H., Han, J., Kim, E., Jae-Wook, O., Lee, S., Kim, J.-H., Gurunathan, S. (2016) *Differential Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles in Human Ovarian Cancer Cells and Ovarian Cancer Stem Cells*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2077.
90. Jin, C.-Y., Zhu, B.-S., Wang, X.-F., & Lu, Q.-H. (2008). *Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells*. *Chemical Research in Toxicology*, 21, 1871–1877.
91. Liu J., Sonshine, D.A., Shervani, S., & Hurt, R.H. (2010) *Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces*. *ACS Nano*, 4(11), 6903–6913.
92. Xia, T., Kovoichich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J., Wiesner, M., & Nel, A. (2006). *Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm*. *Nano Letters*, 6, 1794–1807.
93. Colvin, V.L. (2003). *The potential environmental impact of engineered nanomaterials*. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1166–1170.
94. Cheng, M., He, B., Wan, T., Zhu, W., Han, J., Zha, B., Chen, H., Yang, F., Li, Q., Wang, W., Xu, H., & Ye, T. (2012). *5-Fluorouracil Nanoparticles Inhibit Hepatocellular Carcinoma via Activation of the p53 Pathway in the Orthotopic Transplant Mouse Model*. *PLoS ONE*, 7(10), e47115.
95. Mohammadian, M., Zeynail, S., Azarbaijani, A., Khadem, M., & Kheradmand, F. (2017). *Cytotoxic effects of the newly-developed chemotherapeutic agents 17-AAG in combination with oxaliplatin and capecitabine in colorectal cancer cell lines*. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(6), 517-525.
96. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Capecitabine, CID=60953, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Capecitabine> (accessed on Oct. 17, 2019)
97. Alcindor, T., & Beauger, N. (2011). *Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy*. *Current Oncology*, 18(1), 18-25.
98. Jang, H., Hong, E., Jang, J., Choi, J., Park, S., Byun, H., Koh, D., Choi, Min, Kae, S., & Lee, J. (2016). *Synergistic Effects of Simvastatin and Irinotecan against Colon Cancer Cells with or without Irinotecan Resistance*. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016, 1-9.

99. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. CID=23581792, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Irinotecan-hydrochloride-hydrate> (accessed on Oct. 17, 2019).
100. Lee, P.P., & Schilsky, R.L. (1990) *Inhibition of thymidylate synthase by the diastereoisomers of leucovorin*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 26(4), 273-277.
101. Makizumi, R., Yang, W., Owen, R., Sharma, R., & Ravikumar, T. (2008). *Alteration of Drug Sensitivity in Human Colon Cancer Cells after Exposure to Heat: Implications for Liver Metastasis Therapy using RFA and Chemotherapy*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 1(2), 117-129.
102. Haug, K., Kravik, K., & De Angelis, P. (2008). *Cellular Response to Irinotecan in Colon Cancer Cell Lines Showing Differential Response to 5-Fluorouracil*. *Anticancer Research*, 28, 583-592.
103. Fujita, K., Kubota, Y., Ishida, H., & Sasaki, Y. (2015). *Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer*. *World Journal of Gastroenterology*, 21(43), 12234-12248.
104. Xu, J., Azzariti, A., Tommasi, S., Lacalamita, R., Colucci, G., Johnston, P., Church, S., & Paradiso, A. (2002). *Combination of 5-Fluorouracil and Irinotecan on Modulation of Thymidylate Synthase and Topoisomerase I Expression and Cell Cycle Regulation in Human Colon Cancer LoVo Cells: Clinical Relevance*. *Clinical Colorectal Cancer*, 2(3), 182-188.
105. Del Rio, D., Stewart, A., & Pellegrini, N. (2005). *A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress*. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 15, 316–328.
106. Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). *Mechanism and medical implications of mammalian autophagy*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 349-364.
107. Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Hess, K.L., Jones, R.L., & Schlager, J.J. (2008). *Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species*. *J. Phys. Chem. B* 2008, 112, 13608–13619.
108. Park, M., Neigh, A., Vermeulen, J., de la Fonteyne, L., Verharen, H., Briedé, J., Loveren H., & de Jong, W. (2011). *The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles*. *Biomaterials*, 32, 9810–9817.
109. Martínez-Gutierrez, F., Thi, E., Silverman, J., de Oliveira, C., Svensson, S., Hoek, A., Morales, E., Reiner, N., Gaynor, E., Pryzdial, E., Conway, E., Orrantia, E., Ruiz, F., Av-Gay, Y., & Bach, H. (2012) *Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8 (2012), 328-336.
110. Zolnik BS, Gonzalez-Fernandez A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. (2010) *Nanoparticles and the immune system*. *Endocrinology*. 151, 458–65.
111. Brunner, L. & Smeltzer, S. (2010). *Brunner & Suddarth's textbook of medical-surgical nursing*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

112. Choi MR, Stanton-Maxey KJ, Stanley JK, Levin CS, Bardhan R., Akin D., Badve. S., Sturgis, J., Robinson JP, Bashir R., Halas NJ, & Clare, SE. (2007). *A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors*. Nano Letters, 7(12), 3759–3765.
113. Orłowski, P., Krzyżowska, M., Winnicka, A., Chwalibóg, A., & Sawosz, E. (2012) Toxicity of silver nanoparticles in monocytes and keratinocytes: potential to induce inflammatory reactions. Central European Journal of Immunology, 32(2), 123-130
114. Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D., Hoffmann, H., & Autrup H. (2009) *PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes*. Toxicology Letters, 190, 156-162.
115. Podkopaev, D.O., Shaburova, L.N., Balandin, G.V., Kraineva, O.V., Labutina, N.V., Suvorov, O.A., & Sidorenko, Y.I. (2014) *Comparative evaluation of antimicrobial activity of silver nanoparticles*. Nanotechnologies in Russia, 9(1-2), 93–97.
116. Kalmantaeva, O.V., Firstova, V.V., Potapov, V.D., Zyrina, E.V., Gerasimov, V.N., Ganina, E.A., Burmistrov, V.A. & Borisov, A.V. (2014) *Silver-nanoparticle exposure on immune system of mice depending on the route of administration*. Nanotechnologies in Russia, 9, 571–576.
117. Kreysberg, G.N., Gracheva, I.E., Kibrik, B.S., Golikov I.V. (2011) *Antituberculous effect of silver nanoparticles*. Journal of Physics: Conference Series, 291, 012030.
118. Guo, D.; Zhu, L.; Huang, Z.; Zhou, H.; Ge, Y.; Ma, W.; Wu, J.; Zhang, X.; Zhou, X.; Zhang, Y.; Zhao, Y. & Gu, N. *Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions*. Biomaterials 2013, 34, 7884–7894.

Anexos

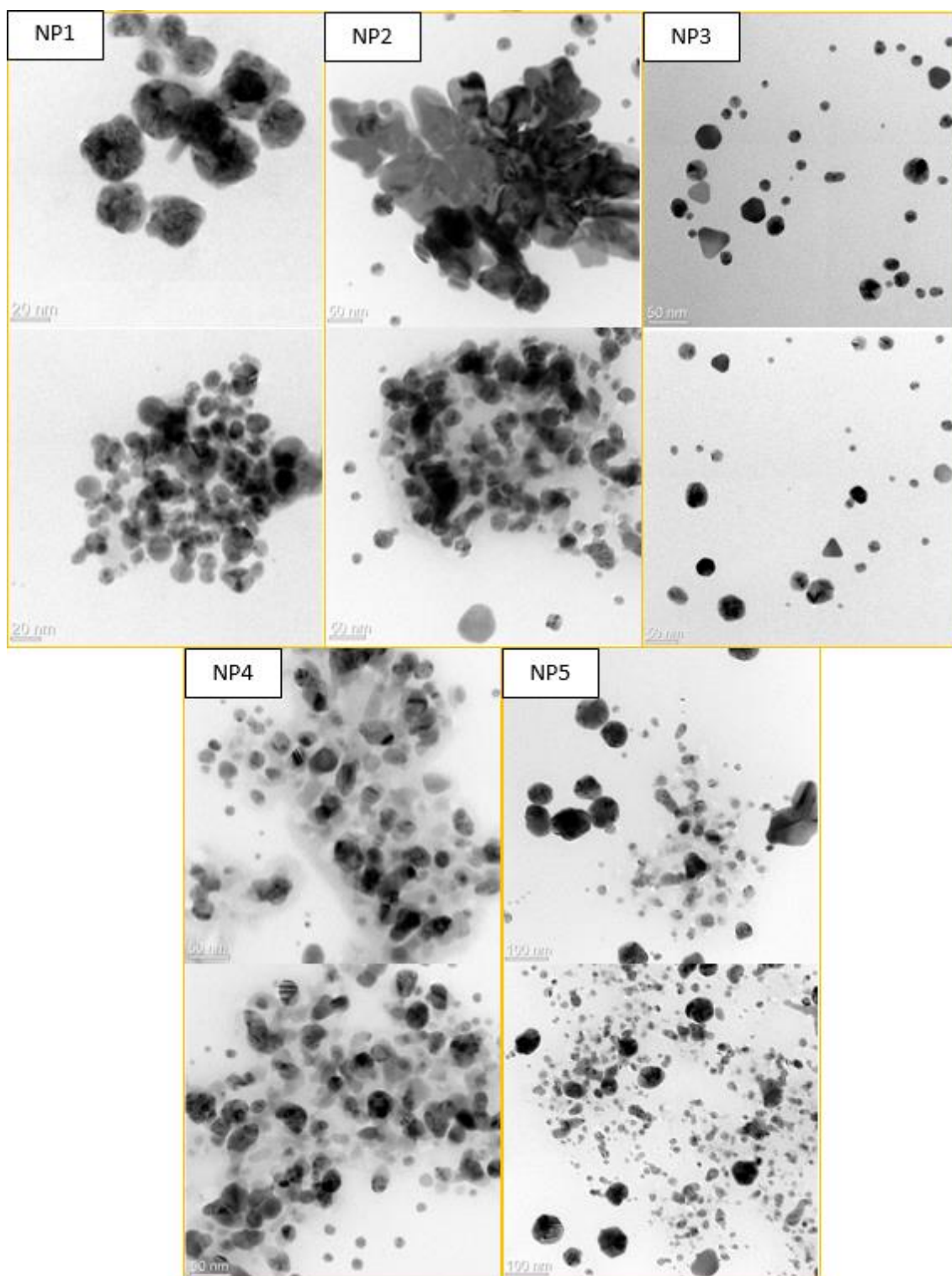


Figura S1. Micrografías de TEM representativas de las formulaciones de AgNPs. Barra = 20 nm en NP1; 50 nm en NP2, NP3 y NP4; 100 nm en NP5.

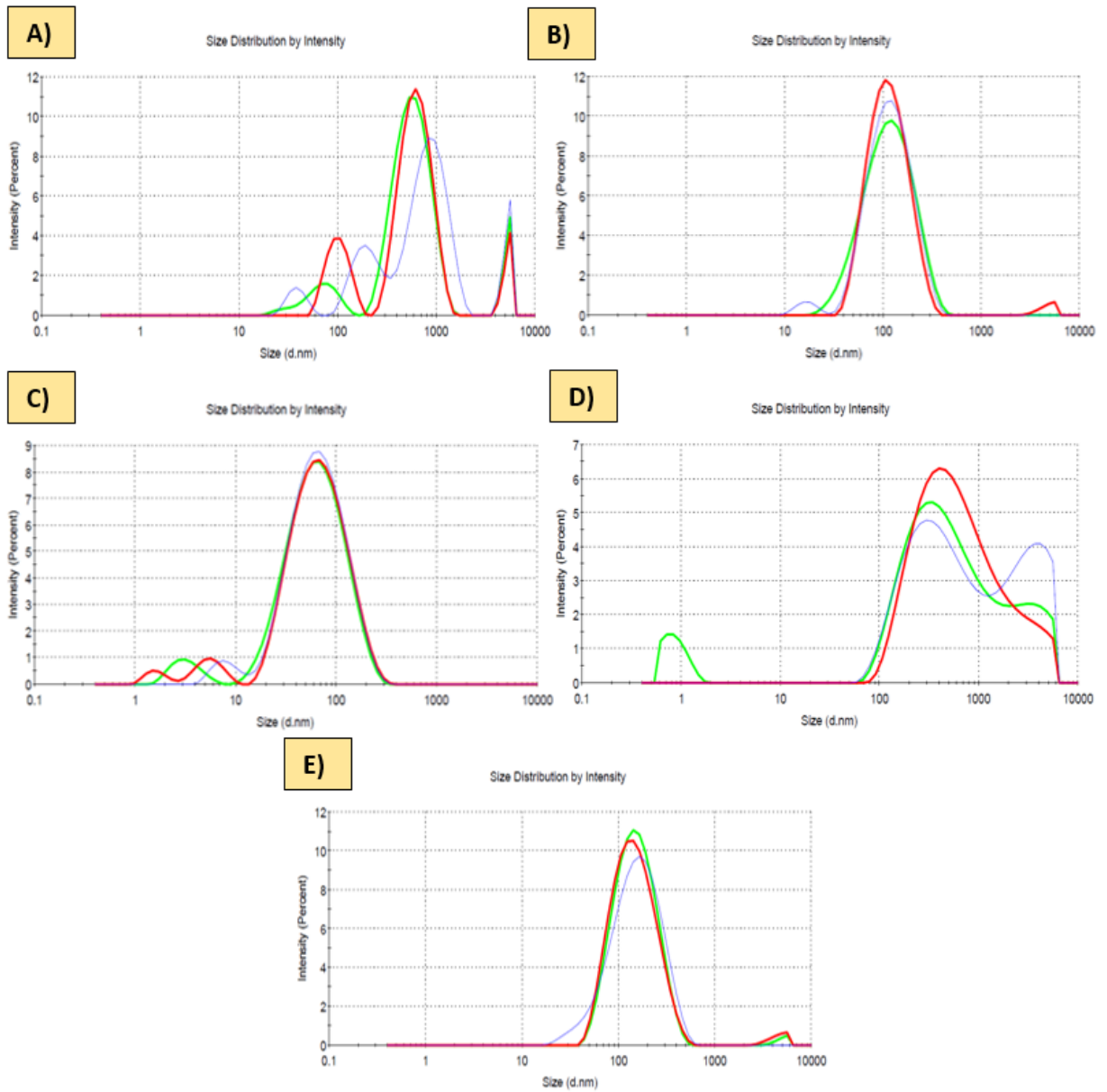


Figura S2. Distribución de diámetros de nanopartículas por intensidad con DLS. Formulaciones A) NP1 – E) NP5.

Viabilidad Celular

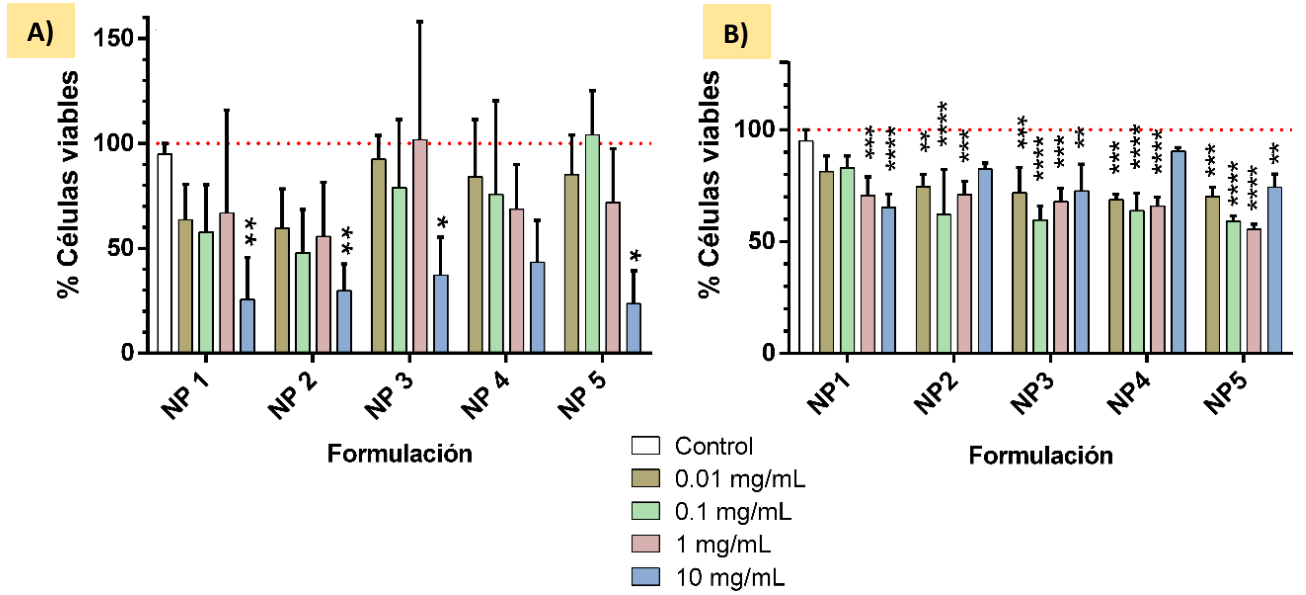


Figura S3. Viabilidad celular determinada por A) conteos en cámara de Neubauer de las tinciones con azul tripano y B) citometría de flujo utilizando la tinción con AV/IP. Las células consideradas viables son aquellas que no presentan tinción. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres ensayos independientes por triplicado. Significancia $*p \leq 0.05$ respecto al control.

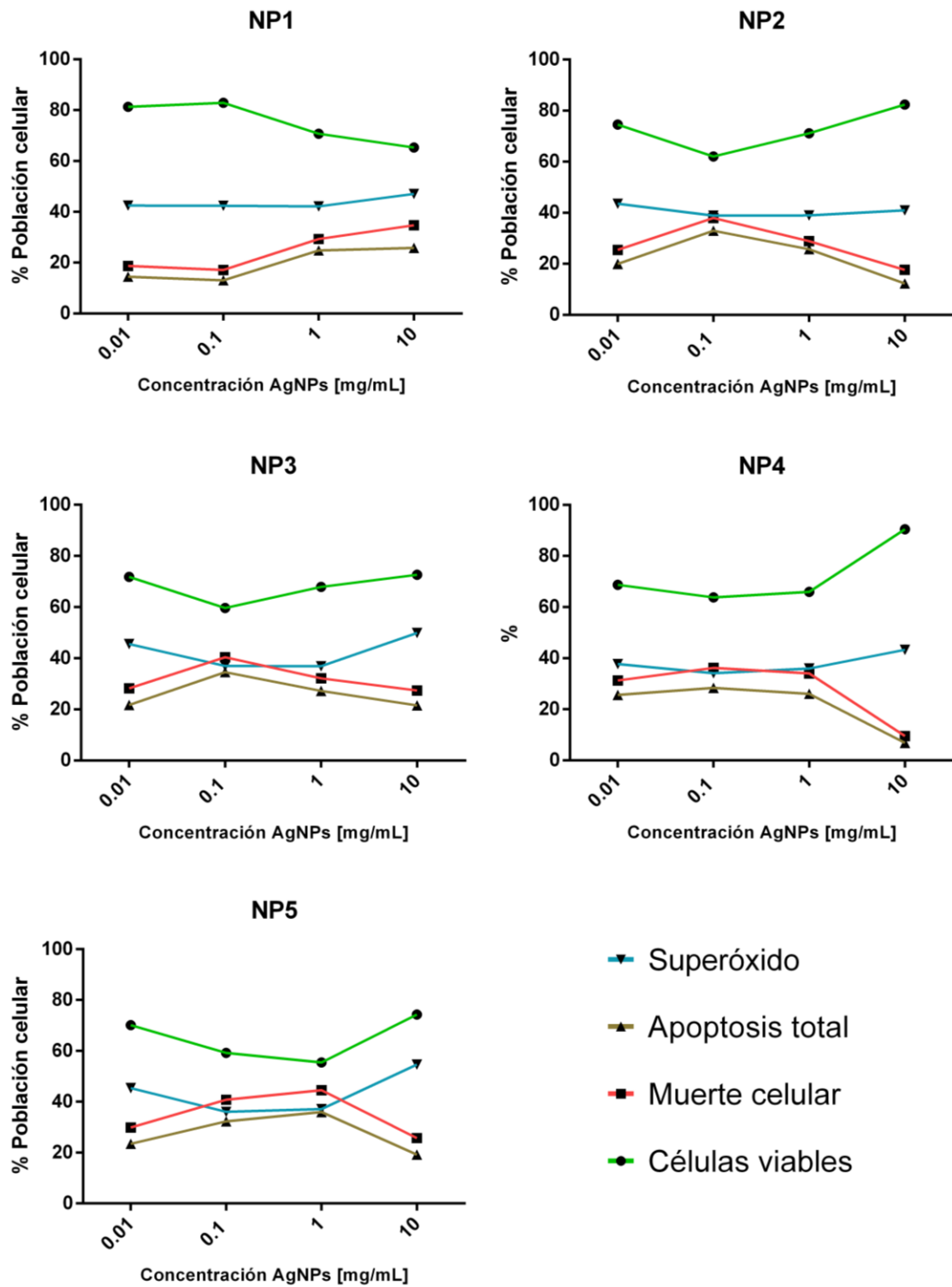


Figura S4. Comparación de las respuestas celulares con cada formulación de AgNPs. Fracción con producción de superóxido, apoptótica, viable, y muerta de la población celular luego de 24 h de exposición.