



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**CENTRO DE NANOCIENCIAS Y
NANOTECNOLOGÍA**

**NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO POTENCIALES AGENTES
PARA EL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA**

T E S I S

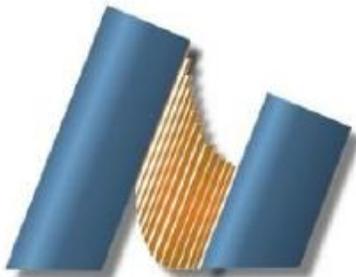
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A :

LUIS RICARDO RODRIGUEZ MARINO

**TUTOR DE TESIS:
DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA**

Ensenada Baja California a mayo 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

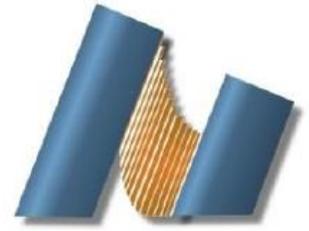
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA
EJE DE BIOTECNOLOGÍA

NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO POTENCIALES
AGENTES PARA EL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA

TESIS

QUE OPTA POR EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

LUIS RICARDO RODRÍGUEZ MARINO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MAYO 2021

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. obtenidos 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.

Luis Ricardo Rodríguez Marino

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 por siempre creer en mí y apoyarme cuando lo necesité.

Al Dr. Juan Carlos García Ramos.

A la Dra. Nina Bogdanchikova.

A Laura Stephany Hernández por su apoyo incondicional, amor y paciencia.

A mis compañeros y amigos que siempre creyeron en mí y me motivaron.

A mi gran guerrera y apoyo por siempre, mi hermosa madre.

A mi brazo que me ha dado todo lo que ha podido siempre, mi padre.

A mi hermana por estar siempre conmigo.

Contenido

Capítulo 1. Introducción	5
1.1 Cáncer: un problema de salud pública.....	5
1.2 Leucemia.....	13
1.3 Tratamientos actuales contra el cáncer.	21
1.4 Nanotecnología	26
1.5 Nanotecnología en aplicaciones médicas.....	28
1.6 Nanopartículas de plata.....	32
1.7 Modelos para la evaluación de la viabilidad celular	35
1.8 Cultivo celular.....	36
1.9 Tipos de muerte celular.....	37
Capítulo 2. Antecedentes.....	39
2.1 Uso de nanopartículas de plata como antitumorales	39
2.2 Uso de nanopartículas de plata como agentes contra leucemia.....	40
2.3 Citotoxicidad de nanopartículas de plata.....	41
2.4 Modelos para evaluación de viabilidad celular	42
Capítulo 3. Pertinencia y relevancia en el área de estudio	44
Capítulo 4. Justificación.....	46
Capítulo 5. Hipótesis	47
Capítulo 6. Objetivos y metas.....	48
6.1 Objetivo general	48
6.2 Objetivos específicos.....	48
6.3 Metas	48
Capítulo 7. Materiales	49
7.1 Formulaciones de nanopartículas utilizadas y línea celular	49
7.2 Tinciones y kits.....	49
7.3 Sistemas de detección.....	49
7.4 Software.....	49
Capítulo 8. Metodología.....	50
8.1 Procedimientos realizados	50
8.1.1 Cultivo celular	50
8.1.2 Ensayo de viabilidad celular: exclusión vital por colorante azul tripano	50
8.1.3 Análisis estadístico	52
8.2 Perspectivas metodológicas.....	52
8.2.1 Mecanismo de muerte celular: Anexina V/ Ioduro de propidio	52
8.2.2 Detección de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	55
Capítulo 9. Resultados.....	57
9.1 Ensayo de viabilidad celular por tinción con azul tripano.....	57
9.2 Análisis estadístico	58
9.2.1 Determinación de diferencias significativas entre formulaciones y concentraciones	58
9.2.2 Cálculo de IC50.....	59
Capítulo 10. Discusión.....	61
Capítulo 11. Conclusiones.....	63
Capítulo 12. Bibliografía.....	64

Índice de figuras

Figura	Página
1. Mapa global que presenta la clasificación nacional del cáncer como causa de muerte en edades inferiores a 70 años en 2016.....	6
2. Gráficos de incidencia y mortalidad a nivel mundial de distintos tipos de cáncer en ambos sexos y todas las edades.....	7
3. Gráficos de incidencia y mortalidad de distintos tipos de cáncer en hombres y mujeres de todas las edades a nivel mundial.....	9
4. Gráficos de casos estimados de incidencia y mortalidad en México en 2018 de distintos tipos de cáncer.....	10
5. Gráficos de incidencia y mortalidad de distintos tipos de cáncer para hombres y mujeres en México en 2018.....	11
6. Esquema de diferenciación celular en sangre.....	13
7. Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 0 a 17 años según sexo. Periodo de 2011 a 2016.....	16
8. Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 18 a 29 años según sexo. Periodo de 2011 a 2016.....	18
9. Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 30 a 59 años según sexo. Periodo de 2011 a 2016.....	19
10. Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 60 años y más según sexo. Periodo de 2011 a 2016.....	20
11. . Resultados de viabilidad celular en células de bazo, hígado, riñón, corazón, médula ósea y aorta.....	42
12. Esquema de la placa de 96 pozos.....	51
13. Resultados de ensayos de viabilidad celular en células L1210 con AgNPs.....	57
14. Gráfica de resultados de concentración vs viabilidad celular para la AgNP 8.....	59
15. Gráfica de resultados de concentración vs viabilidad celular para la AgNP 3.....	60

Abreviaturas

OMS: Organización Mundial de la Salud

IDH: Índice de Desarrollo Humano

GLOBOCAN: Global Cancer Observatory

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

LLA: Leucemia Linfoide Aguda

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

LLC: Leucemia Linfoide Crónica

LMC: Leucemia Mieloide Crónica

ROS: Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)

AgNPs: Nanopartículas de plata

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

TCRV: Virus Tacaribe

VHV: Hepatitis B

VCR: Virus Respiratorio Sincitial Recombinante

MNV: Norovirus Murino

ATP: Adenosín Trifosfato

PVP: Poli-vinil pirrolidona

Cis-Pt: Cis Platino

MTT: Ensayo celular colorimétrico

XTT: Ensayo celular colorimétrico

SPH: Sangre Periférica Humano

ATCC: American Type Cell Culture

h: hora

ANOVA: Análisis de varianza

IP: Yoduro de Propidio

PBS: Tampón Fosfato Salino

RNS: Reactive Nitrogen Species

Capítulo 1. Introducción

1.1 Cáncer: un problema de salud pública

El cáncer se define como un amplio grupo de enfermedades que puede afectar a cualquier parte del organismo, refiriéndose principalmente a “tumores malignos” o “neoplasias malignas”. El cáncer es producido por una transformación de las células normales a células cancerosas por medio de un proceso en varias etapas que desencadena la formación de tumores malignos [1].

Esta patología se asocia con la interacción entre factores genéticos de la persona y algunos agentes externos, tales como: carcinógenos físicos, como las radiaciones de tipo ultravioleta y ionizantes; carcinógenos químicos, como el asbesto, los componentes de cigarrillos, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos), el arsénico, y carcinógenos biológicos, como ciertos virus, bacterias y parásitos [2].

Además, el cáncer en edades de 30 a 69 años es la primera o segunda causa principal de muerte prematura, en 134 de 183 países, y ocupa el tercer o cuarto lugar en otros 45 países más. En México, el cáncer se ubica en la segunda posición como principal causa de muerte de la población.

En cuanto a la incidencia, que se define como el número de casos nuevos de una enfermedad en una población y en un periodo determinados y puede expresarse como el número absoluto de casos nuevos en un año o como tasas (número de casos nuevos por 100.000 personas por año) [3]. Se estima que la incidencia de cáncer a nivel mundial excederá los 27 millones de nuevos casos por año para 2040, un aumento del 50% en los 18.1 millones estimados en 2018. De los 15.2 millones de muertes prematuras por enfermedades no transmisibles en todo el mundo en 2016, 4.5 millones (29.8%) se debieron a cáncer [2,4].

Según las estimaciones de la OMS (Organización Mundial de la Salud), en el 2016 en edades de 70 a 91 años se identificó al cáncer como la primera o segunda causa de muerte en 172 países, y ocupa el tercer o cuarto lugar en 22 países adicionales (Figura 1) [5].

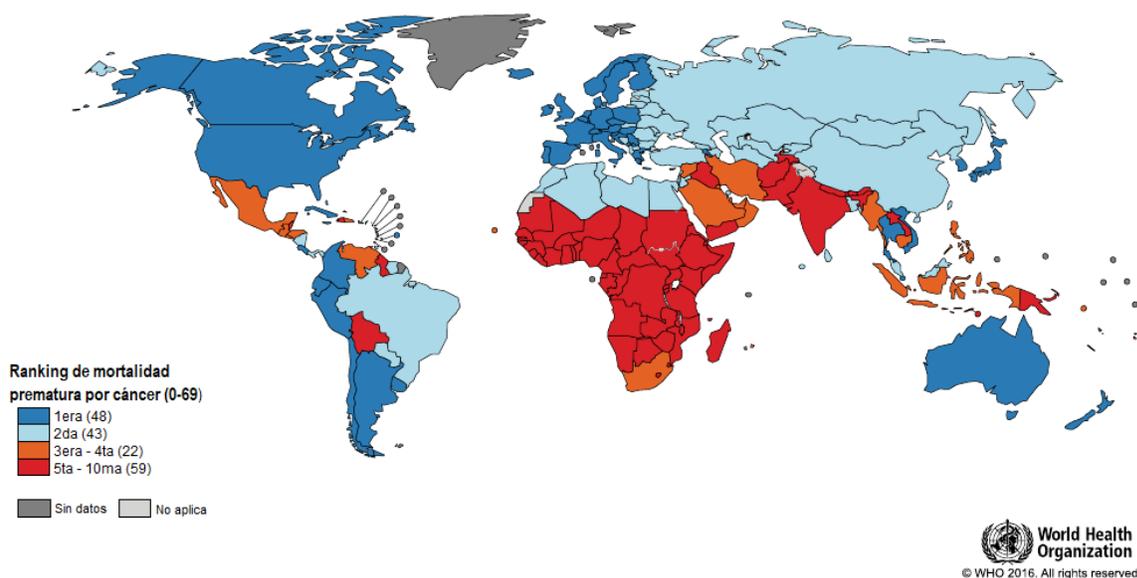


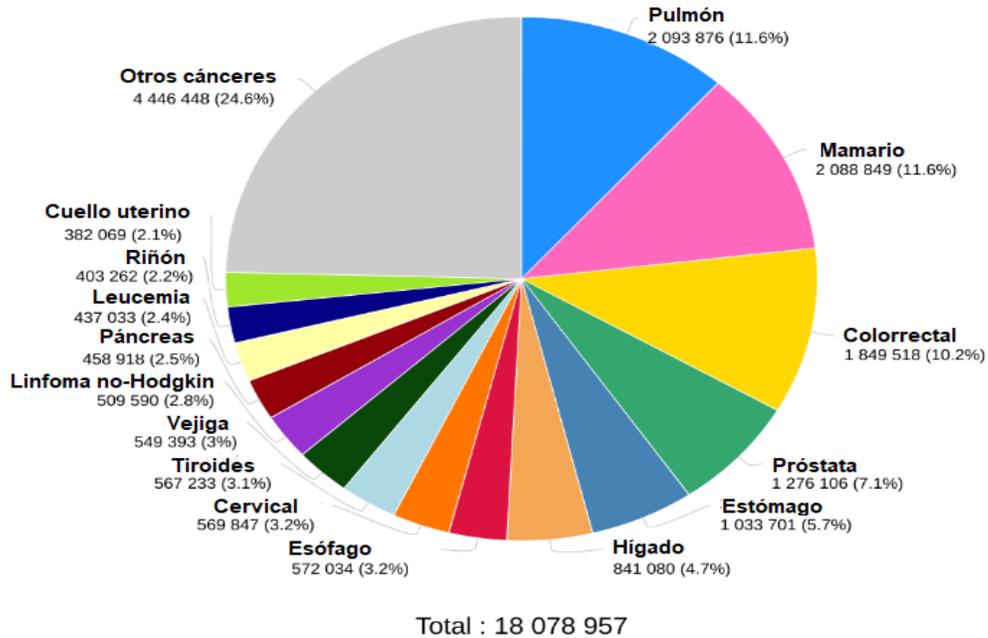
Figura 1. Mapa global que presenta la clasificación nacional del cáncer como causa de muerte en edades inferiores a 70 años en 2016. El número de países representados en cada grupo de clasificación se incluye en la leyenda entre paréntesis. Los colores de la gráfica representan la posición del cáncer como causa de muerte en los países marcados. Fuente: Organización Mundial de la Salud. Adaptado de: “Global Map Presenting the National Ranking of Cancer as a Cause of Death at Ages Below 70 Years in 2016”.

Específicamente, el cáncer es actualmente la causa principal de muerte prematura en la mayoría de los países con IDH (Índice de Desarrollo Humano) alto o muy alto, incluido Canadá y los Estados Unidos, en América del Norte; Argentina y Chile en América del sur, la mayoría de los países de Europa (incluidos Francia, Alemania y el Reino Unido), Australia y Nueva Zelanda en Oceanía, y Japón, la República de Corea, y Singapur en Asia [5].

Al ser una enfermedad compleja, los patrones y tendencias en mortalidad varían notablemente entre países y a través de tipos específicos de cáncer. Estas variaciones son debidas a las diferencias en los estilos de vida cambiantes y otros factores locales.

Número de casos nuevos estimados en 2018, a nivel mundial, ambos sexos, todas las edades

A



Número de muertes estimadas en 2018, a nivel mundial, ambos sexos, todas las edades

B

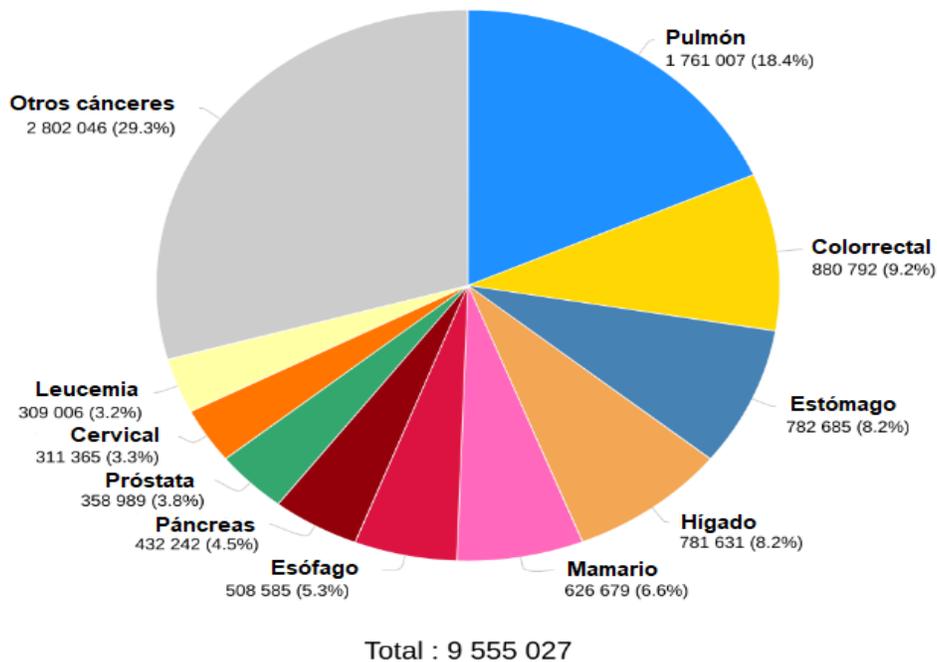


Figura 2. Gráficos de incidencia y mortalidad a nivel mundial de distintos tipos de cáncer en ambos sexos y todas las edades. A) En el caso de la incidencia se muestran los cánceres con mayor número de casos diagnosticados en 2018. B) La mortalidad se presenta con el número de defunciones y porcentaje de estas en los 10 cánceres con más número de muertes. Fuente: GLOBOCAN

La última versión de la base de datos GLOBOCAN (septiembre de 2018) incluye estimaciones de la incidencia, mortalidad y prevalencia de 36 tipos de cáncer para 185 países del mundo. La figura 2 muestra gráficos con la incidencia y la mortalidad de los principales cánceres a nivel mundial en ambos sexos y todas las edades. Se identificó al cáncer de pulmón como el cáncer con mayor incidencia (11.6%) y mortalidad (18.4%). Los datos estiman un total de 18 078 957 casos nuevos de todos los tipos de cáncer, registrando un total de 9 555 027 muertes, el 52.8% de los casos nuevos totales en ese año [5].

La figura 2B muestra distintos tipos de cáncer con la mayor mortalidad a nivel mundial en todas las edades y ambos sexos. Los 10 cánceres con mayor mortalidad se presentan en el siguiente orden, por número de muertes y porcentaje: 1. Pulmón (1 761 007/18.4%), 2. Colorrectal (880 792/9.2%), 3. Estómago (782 685/8.2%), 4. Hígado (781 631/8.2%), 5. Mamario (626 679/6.6%), 6. Esófago (508 585/5.3%), 7. Páncreas (432 242/4.5%), 8. Próstata (358 989/3.8%), 9. Cervical (311 365/3.3%) y 10. Leucemia (309 006/3.2%) [5].

El cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad del mundo, con aproximadamente 18,1 millones de casos nuevos en el mundo en el año 2018 (últimos datos disponibles a nivel mundial estimados dentro del proyecto GLOBOCAN). Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos aumentará en las dos próximas décadas hasta 30 millones al año en 2040 [5].

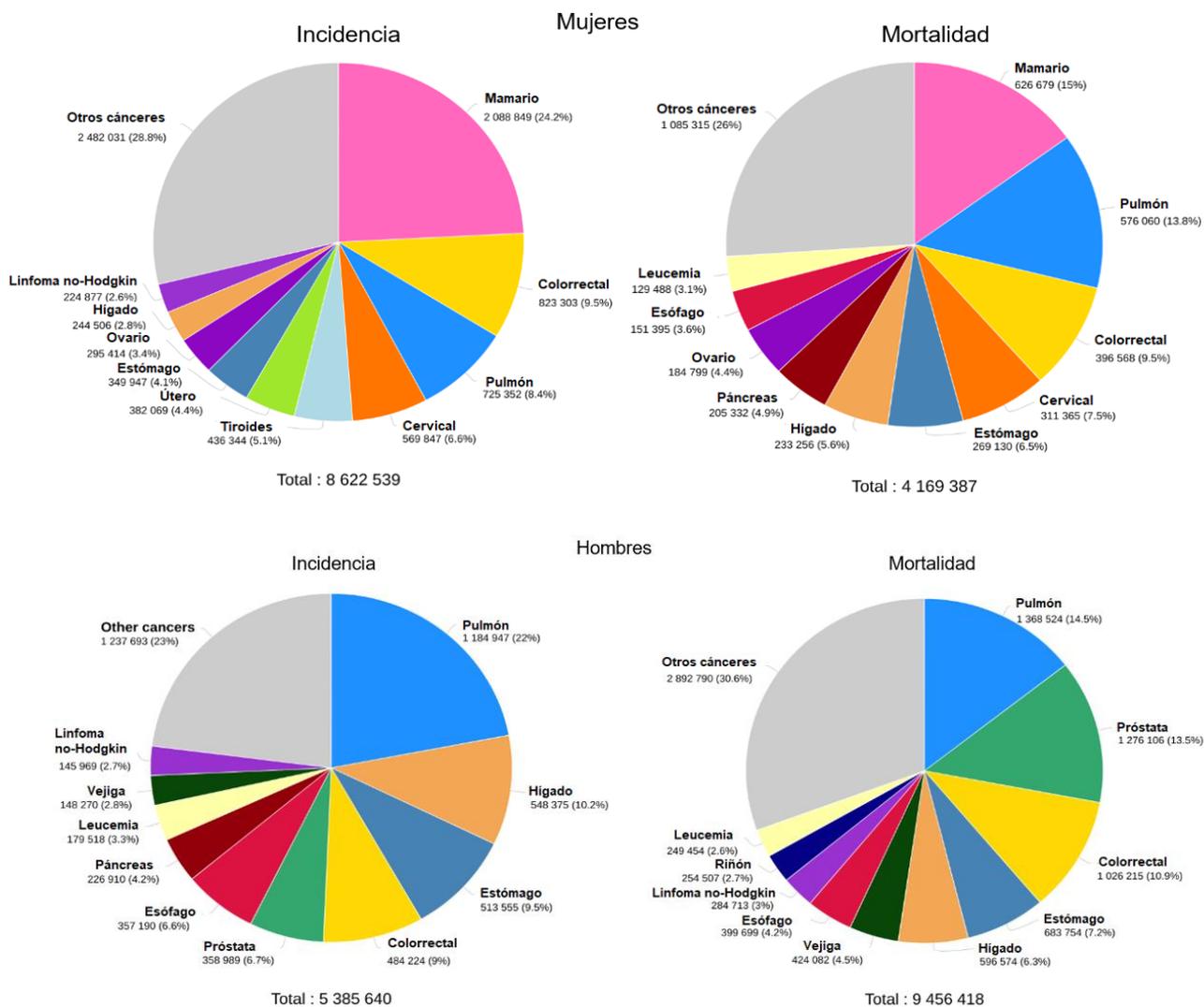


Figura 3. Gráficos de incidencia y mortalidad de distintos tipos de cáncer en hombres y mujeres de todas las edades a nivel mundial. Los gráficos demuestran los tipos de cáncer con más incidencia y mortalidad en hombres y mujeres. Obtenido de: OMS, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN

Si bien es cierto que el cáncer afecta a toda la población en general, existen factores que determinan el tipo de cáncer que más afecta a hombres y mujeres en distintas edades. Se observa en la figura 3 que el cáncer de mayor incidencia en mujeres es el cáncer de mama con 2 088 849 de casos reportados en 2018, representado el 24.2% de los casos totales, con un total de 626 679 (15%) de defunciones reportadas por este cáncer. Mientras tanto en hombres, se reporta al cáncer de pulmón con un total de 1 184 947 (22%) casos diagnosticados y un total de 1 368 524 (14.5%) de defunciones en 2018, volviéndolo el cáncer de mayor incidencia y mortalidad en hombres de todas las edades.

En el caso específico de la leucemia, se observa en la figura 3, en el gráfico de mortalidad de mujeres por cáncer, un total de 129 488 (3.1%) defunciones, posicionándolo como el décimo cáncer más mortal en mujeres. En hombres, la leucemia es el octavo cáncer más incidente, con un total de 179 518 (3.3%) casos diagnosticados, y el décimo lugar en cuestión de mortalidad con un total de 249 464 (2.6%) defunciones totales registradas en 2018.

Cáncer en México

La magnitud de los efectos del cáncer en la salud de México no es muy diferente al panorama mundial, pues es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. En 2018 representó el 14.7% de las defunciones totales en el país [6].

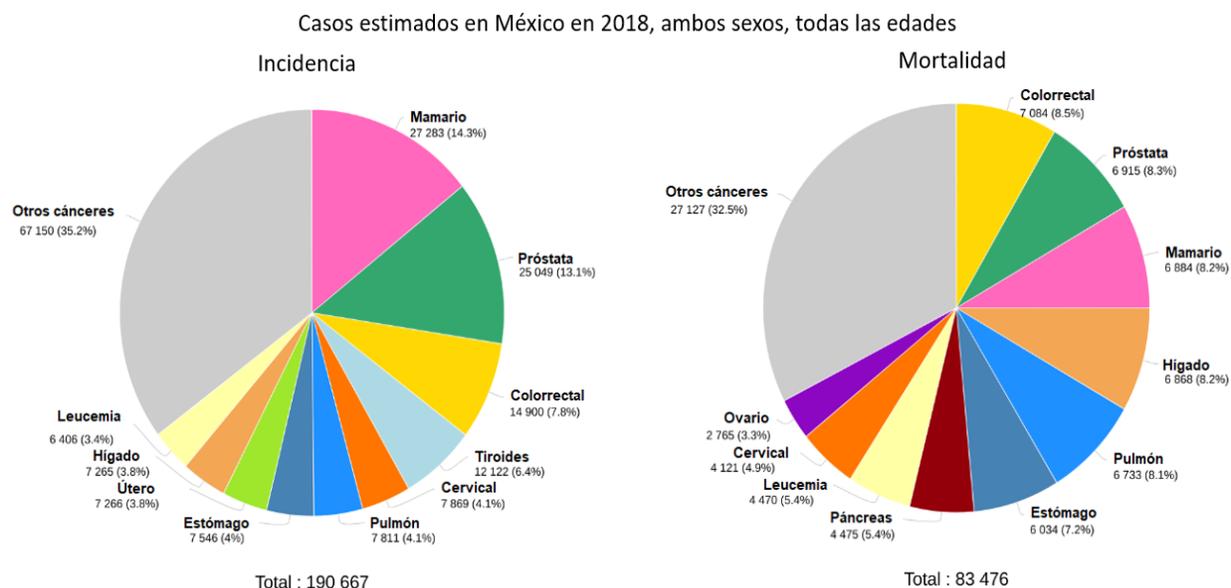


Figura 4. Gráficos de casos estimados de incidencia y mortalidad en México en 2018 de distintos tipos de cáncer. Los gráficos muestran los totales de casos diagnosticados, defunciones y el porcentaje que estos representan en el total. Fuente: GLOBOCAN

En México en 2018 se diagnosticaron un total de 190 667 casos de cáncer, con un total de 83 476 muertes, representando el 43.8% de los casos totales confirmados, lo que representa un problema de salud pública.

Aproximadamente la mitad de todas las muertes por cáncer fueron resultado de tumores pulmonares, gástricos, hepáticos, de próstata, de mama o colorrectales, como se puede observar en la figura 4. Sin embargo, existen otros cánceres que representan un alto número de incidencia y mortalidad en México, como páncreas, útero, cervicales y leucemia [6].

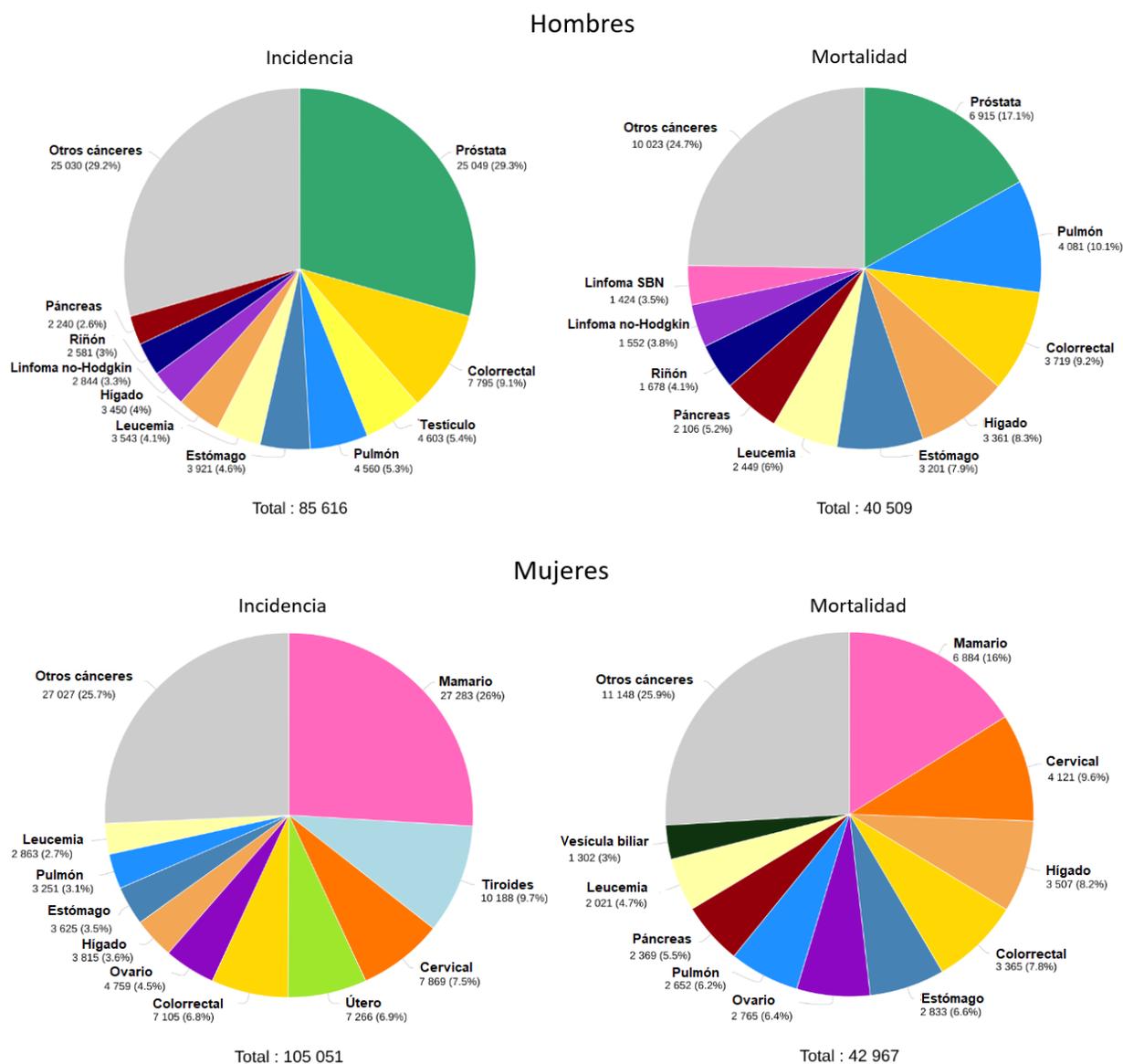


Figura 5. Gráficos de incidencia y mortalidad de distintos tipos de cáncer para hombres y mujeres en México en 2018. Los gráficos muestran los cánceres más incidentes y mortales por género. Fuente: INEGI

En México, el cáncer de próstata tiene la mayor incidencia (25 049 casos) y mortalidad (6 915 defunciones) en hombres. Así mismo, en mujeres el cáncer de mama cuenta con la mayor incidencia (27 283 casos) y mortalidad (6 884 defunciones) (Figura 5). También se observan diferencias en cuanto al número de casos diagnosticados según el género, siendo en hombres de 85 616, mientras que en mujeres hubo un total de 105 051 casos nuevos. En cuanto a la mortalidad, fallecieron un total de 40 509 hombres y 42 967 mujeres [6].

La leucemia es un cáncer que se posiciona en los 10 más incidentes y mortales en hombres y mujeres a nivel mundial y en México. Tan solo en México en 2018 se diagnosticaron 3 543 casos en hombres y 2 863 casos en mujeres, así mismo se contabilizaron un total de 2 440 hombres fallecidos y 2 021 mujeres fallecidas por leucemia en ese periodo. Estos números suponen que fallece el 68.8% de hombres diagnosticados y el 70.5% de mujeres respecto al total de diagnósticos de leucemia en México en 2018. Por lo mismo, se debe tener en cuenta este padecimiento como una de las principales razones de muerte a nivel nacional y mundial, ya que afecta tanto a hombres como mujeres de todas las edades y tiene una alta mortalidad [6].

1.2 Leucemia

La leucemia es un tipo de cáncer cuyo origen es en la médula ósea, el tejido blando central de los huesos donde se forman las células sanguíneas. La leucemia involucra a los glóbulos blancos, los cuales son componentes de la sangre que ayudan en el combate de infecciones y se dividen y diferencian de manera organizada a medida que el cuerpo los requiera. Sin embargo, en las personas con leucemia se producirán una cantidad mayor de glóbulos blancos anormales que no funcionarán correctamente [7].

En la figura 6 se muestra un esquema de diferenciación celular en la sangre, comenzando por células madre contenidas en la médula ósea, continuando con la formación de lo que serán los precursores hematopoyéticos y, por lo tanto, precursoras de leucemias.

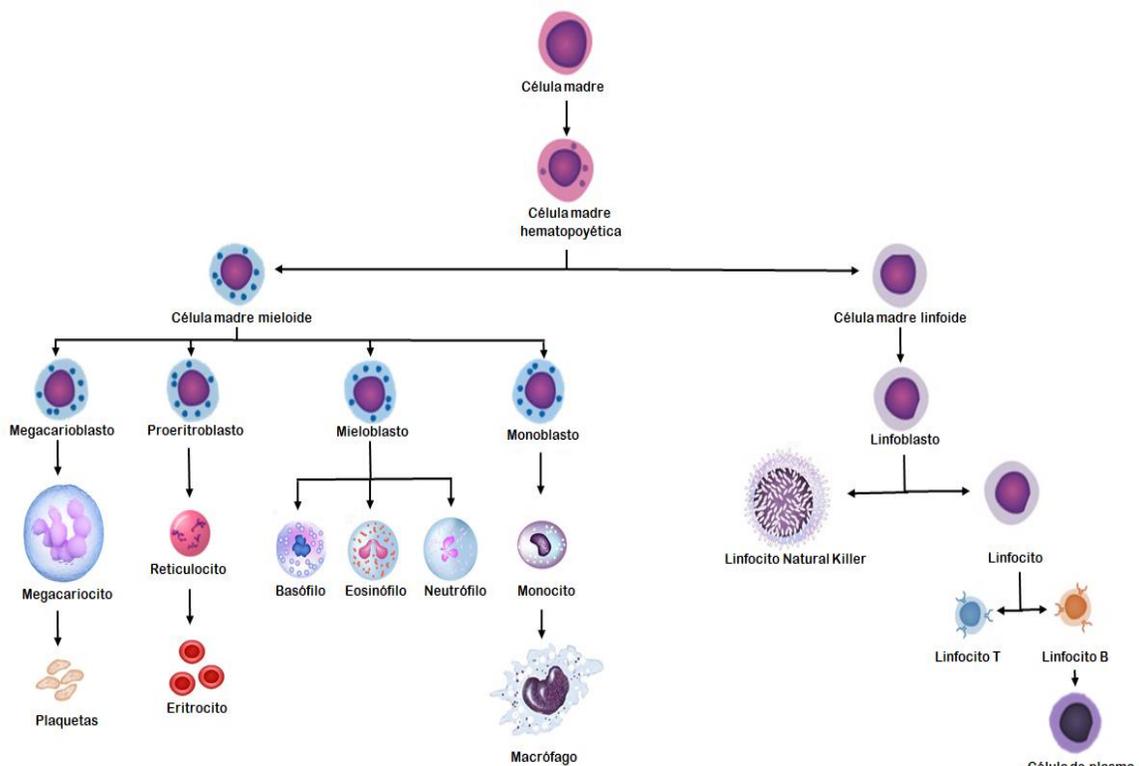


Figura 6. Esquema de diferenciación celular en sangre. De manera general, las células madre contenidas en la médula ósea darán lugar a la maduración de células linfoides o mieloides. Estas células serán precursoras de todas las células que la sangre contendrá. Una proliferación no organizada de estas células generará los distintos tipos de leucemia: linfocítica o mieloide.

La causa principal de la leucemia es desconocida, sin embargo, se presentan a los factores genéticos y ambientales como los principales causantes de la enfermedad. La leucemia puede aparecer cuando existe una mutación en el ADN [3,8].

Su clasificación se da en función de la velocidad de evolución y de los tipos de células involucrados, como se mencionó anteriormente. El primer tipo de clasificación se centra en la velocidad de desarrollo de la leucemia [8]:

- Leucemia aguda: es un tipo de leucemia en donde las células inmaduras no cumplen con sus funciones y se multiplican anormalmente rápido, causando un deterioro más acelerado. Requiere de un tratamiento agresivo y oportuno. Es más común en la población infantil.
- Leucemia crónica: en este caso las células se acumulan lentamente y pueden funcionar con normalidad durante un tiempo, sin embargo, se desarrollan tumores malignos. Esta leucemia se genera mayormente en pacientes de edades adultas o mayores.

El segundo tipo de clasificación toma en cuenta el glóbulo blanco que afecta:

- Leucemia linfocítica: afecta a células linfocíticas (linfocitos) que forman parte del sistema inmune.
- Leucemia mieloide: afectan a células mieloides, que participan en la formación de plaquetas y glóbulos rojos.

Los síntomas más comunes en los niños son: moretones, piel pálida, fiebre y un agrandamiento del bazo o hígado.

En esta patología, la médula ósea se ve comprometida debido al desplazamiento de células normales con la proliferación de un mayor número de glóbulos blancos inmaduros, lo que da como resultado la falta de plaquetas sanguíneas, que son importantes en el proceso de coagulación de la sangre. Esto significa que las personas con leucemia se pueden lesionar fácilmente, sangrar en exceso o desarrollar lesiones hemorrágicas (petequias) [8].

Los glóbulos blancos, que participan en la lucha contra los patógenos, pueden estar suprimidos o ser disfuncionales. Esto podría causar que el sistema inmunológico de la persona no pueda combatir una infección simple o comenzar a atacar otras células del cuerpo. Debido a que, la leucemia impide que el sistema inmunitario funcione normalmente, algunas personas experimentan infecciones frecuentes, que van desde amígdalas infectadas, llagas en la boca o diarrea, hasta neumonía potencialmente mortal o infecciones oportunistas. Finalmente, la deficiencia de glóbulos rojos conduce a anemia, que puede causar disnea y palidez [8,9].

La leucemia es uno de los cánceres más comunes y la principal causa de mortalidad por cáncer en niños. La leucemia linfocítica aguda (LLA) es el tipo más común de esta enfermedad en niños, representando el 73% de todos los casos de leucemia en niños, mientras que la leucemia mieloide aguda (LMA) es el tipo de enfermedad más común en personas de edad entre 20 a 40 años, y la leucemia linfocítica crónica (LLC) y leucemia mieloide crónica (LMC) son más observados en adultos mayores [9].

La incidencia de la leucemia varía considerablemente según la geografía y el subtipo, según un análisis de las bases de datos sobre el cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sin embargo, es el cáncer infantil más común y abarca el 30% de padecimientos de cáncer en menores de 15 años [10].

Leucemia en México

En México, así como en el mundo, se reporta a la leucemia como el cáncer con mayor incidencia y mortalidad en infantes. El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) realizó un estudio en 2018 en el que evidencia que en México durante el periodo de 2011 a 2016, aproximadamente el 50% de las muertes por tumores malignos en la población de 0 a 17 años se deben a cáncer en órganos hematopoyéticos (mayormente leucemia). La figura 7 demuestra los porcentajes de defunciones atribuidos a los cinco principales tumores malignos registradas en un periodo de 2011 a 2016 para niños con edades entre 0 y 17 años [6].

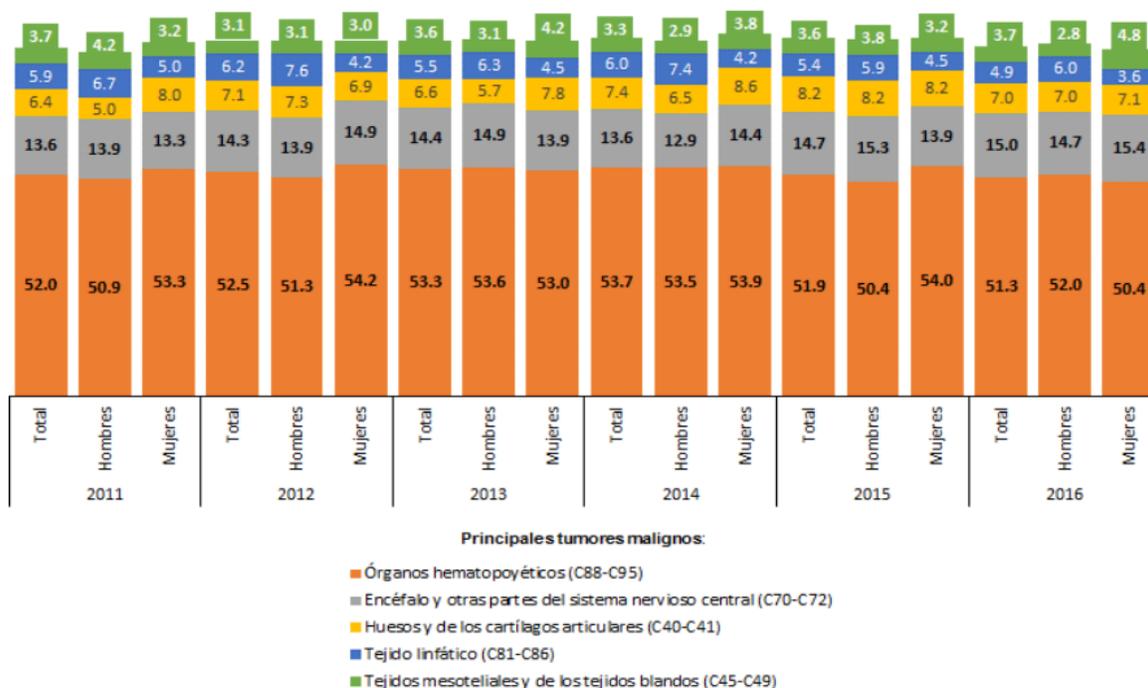


Figura 7. Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 0 a 17 años según sexo. Periodo de 2011 a 2016. El estudio excluye defunciones de personas con residencia en el extranjero y edad no especificada. Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10). Fuente: INEGI

Las gráficas de la figura 7 posicionan a la leucemia y otros tumores en órganos hematopoyéticos en México como la principal causa de muerte por tumores malignos en

menores de edad, abarcando un aproximado 50% de las defunciones totales en el periodo 2011-2016. Se observa una diferencia mínima entre sexos [6].

La tasa de mortalidad en el caso específico de los tumores malignos en órganos hematopoyéticos expone que dos de cada 100 000 personas de 0 a 17 años fallecen debido a esta causa. La proporción en mujeres y hombres es la misma en tasa de mortalidad.

El cáncer en adultos jóvenes no es muy común, sin embargo, existen distintos tipos que se desarrollan en este periodo de la vida. Los cánceres infantiles están relacionados generalmente a cambios celulares en el ADN presentes en el desarrollo del embrión o en los primeros años de vida, en cambio, en los adultos jóvenes se ve fuertemente influenciado por su estilo de vida [2,6].

Los cánceres más comunes en jóvenes menores de 25 años son la leucemia (un tipo de cáncer de órgano hematopoyético) y los linfomas (una de las formas de cáncer de tejido linfático), por otro lado, en edades de 26 a 29 años la incidencia incrementa en cáncer cervical, de mama y colon.

En México, la población de 18 a 29 años presenta una alta mortalidad en cáncer de órganos hematopoyéticos en el periodo de 2011 a 2016, con un intervalo de 27.1% a 30.9%, un porcentaje menor en comparación con los porcentajes de muertes en infantes debido a esta enfermedad. La figura 8 muestra los porcentajes de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 18 a 29 años durante el periodo de 2011 a 2016 [6].

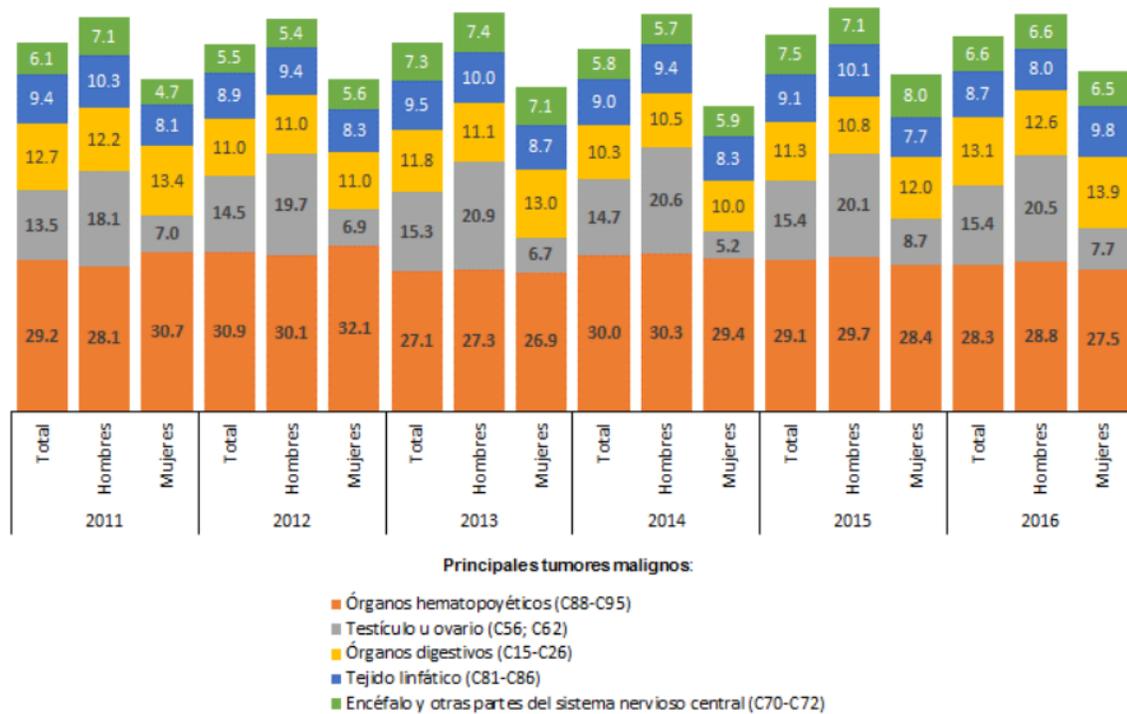


Figura 8. Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 18 a 29 años según sexo. Periodo de 2011 a 2016. El estudio excluye defunciones de personas con residencia en el extranjero y edad no especificada. Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10). Fuente: INEGI

Las tasas de mortalidad de esta población (18 a 29 años) en ese periodo (2011 a 2016) alcanzan un promedio en hombres de tres muertes por cada 100 000 y dos muertes en mujeres por cada 100 000 para el caso del cáncer en órganos hematopoyéticos.

Al calcular las tasas de mortalidad para las cinco principales causas de muerte por tumores malignos en jóvenes de 18 a 29 años, se observan diferencias para hombres y mujeres: mientras tres de cada 100 000 varones de 18 a 29 años fallecen por esta causa en ese rango de edad, en ellas se presentan dos fallecimientos de cada 100 000 mujeres del mismo grupo de edad [6].

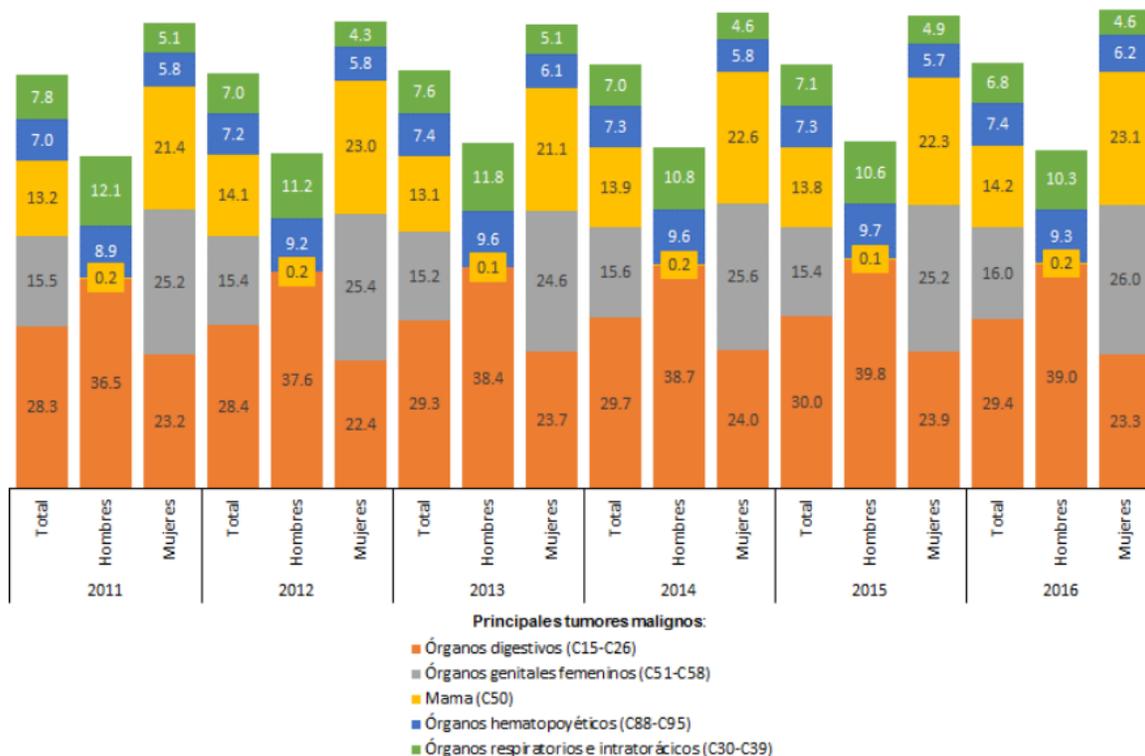


Figura 9. Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 30 a 59 años según sexo. Periodo de 2011 a 2016. El estudio excluye defunciones de personas con residencia en el extranjero y edad no especificada. Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10). Fuente: INEGI

En la población de 30 a 59 años se presenta al cáncer de órganos digestivos como el cáncer con mayor porcentaje de mortalidad en ese periodo, sin embargo, se encuentra al cáncer de órganos hematopoyéticos como el cuarto porcentaje de mortalidad en cánceres para esa población, con un promedio de 7.3% en ambos sexos. La incidencia de cáncer de órganos hematopoyéticos en estas edades disminuye respecto a los anteriores grupos, pero se mantiene en los primeros 5 con más muertes, siendo desplazado por cánceres de órganos genitales, digestivos y de mama [6].

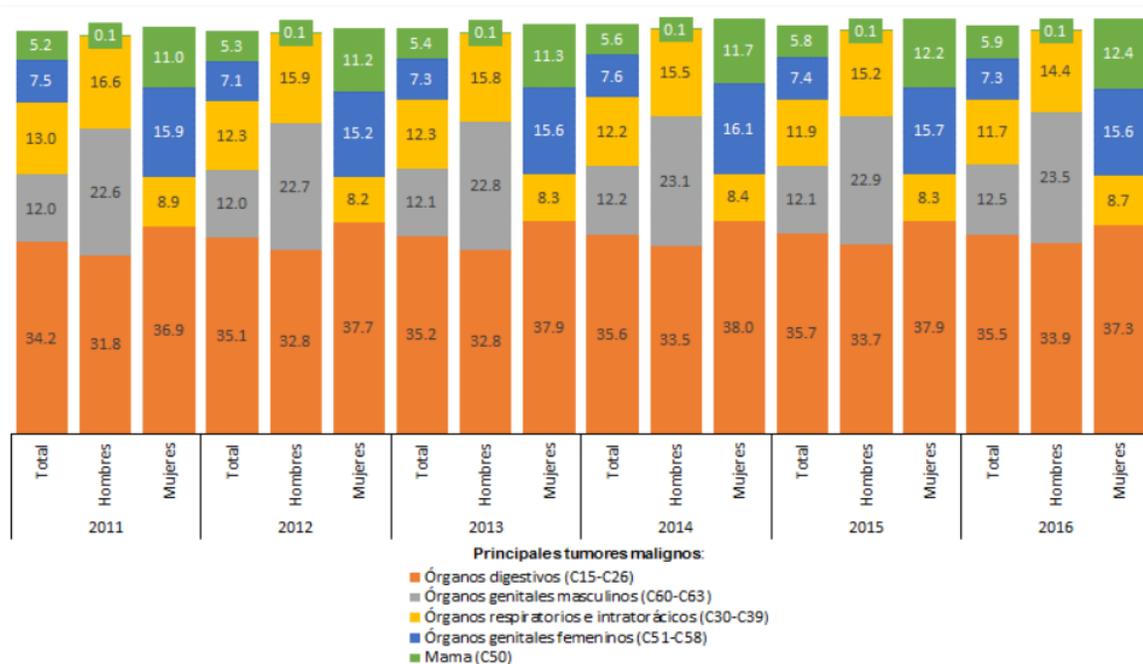


Figura 10. Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 60 años y más según sexo. Periodo de 2011 a 2016. El estudio excluye defunciones de personas con residencia en el extranjero y edad no especificada. Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10). Fuente: INEGI

Por último, se hizo un estudio en las personas mayores de 60 años fallecidas por cáncer, donde se encuentra al cáncer de órganos digestivos como la principal causa de muerte por cáncer en esta edad y en el periodo establecido entre 2011 y 2016. Seguido a este cáncer, se encuentran los de órganos genitales masculinos, respiratorios e intratorácicos y los de órganos genitales masculinos y de mama. El cáncer de órganos hematopoyéticos no figura en estas edades como los más mortales, sin embargo, si llega a causar muertes rondando el 1% en esta lista [6,10].

1.3 Tratamientos actuales contra el cáncer.

En la actualidad existen más de 100 tipos diferentes de cáncer. Algunos tumores resultan inofensivos (benignos), y a menudo suelen tratarse fácilmente con cirugía o en algunos casos con radioterapia para disminuir su reproducción y propagación. Los tumores cancerígenos dañinos (malignos) representan un problema mayor a las personas que los presentan ya que se multiplican con mayor rapidez [11].

En etapas iniciales, el cáncer se denomina tumor primario. Al esparcirse a otras partes del cuerpo, es un tumor secundario o metástasis [12].

Los tratamientos convencionales contra el cáncer incluyen:

- **Cirugía:** Operación para cortar y extirpar tejido canceroso.
- **Quimioterapia:** Medicamentos especializados en reducir o eliminar células cancerosas.
- **Radioterapia:** Uso de rayos de alta energía (similares a los rayos X) para matar las células cancerosas.
- **Terapia hormonal:** Las células cancerígenas no obtienen hormonas que necesitan para crecer.
- **Inmunoterapia:** Trabaja con el sistema inmunitario del paciente para ayudarlo a combatir células cancerígenas y a controlar efectos secundarios.
- **Trasplante de células madre (trasplante de médula ósea):** Generalmente empleado en tratar cánceres de la sangre, como la leucemia y de los ganglios linfáticos. Reemplaza las células de la médula ósea que se pierden debido a dosis muy altas de quimioterapia o radioterapia [11,12].

Se dice que un tratamiento tiene una respuesta completa al producirse la desaparición de todos los síntomas de la enfermedad, y que tiene una respuesta parcial si existe una disminución significativa de las lesiones que la enfermedad genera en el individuo. Existen tratamientos curativos o paliativos. Dada la incapacidad actual de la ciencia para curar los tipos de cáncer más agresivos en estados avanzados de evolución, en algunas ocasiones es

preferible aplicar un tratamiento paliativo que proporcione el menor grado posible de malestar y conduzca a una muerte digna [13,14].

Por otra parte, se denomina un tratamiento experimental contra el cáncer a las terapias médicas destinadas a tratar el cáncer, mejorando, suplementando o reemplazando los métodos convencionales ya mencionados anteriormente. Generalmente se busca una disminución de los efectos secundarios de los tratamientos convencionales que en ocasiones pueden ser muy severos, incluso causando la muerte del paciente [14,15].

Los tratamientos convencionales contra el cáncer suelen tener muchos efectos secundarios, estos ocurren cuando el tratamiento daña a las células sanas del portador, pueden ser distintos en cada persona, y variar según los distintos medicamentos y tipos de tratamiento [13].

Los efectos secundarios más encontrados en pacientes con tratamientos convencionales contra el cáncer son [13-15]:

Neutropenia: Existe una disminución de los glóbulos blancos, los cuales son las principales defensas del cuerpo. Es muy común al recibir quimioterapias, debido a que este tipo de tratamientos se especializa en matar células que se multiplican rápidamente, como los glóbulos blancos sanos. Esto genera una tendencia en el paciente a contraer una infección durante el tratamiento.

Pérdida del cabello: Es uno de los efectos secundarios más comunes en el tratamiento de cáncer por quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida y trasplante de médula ósea o células madre. Genera la caída parcial o total del cabello, una condición llamada alopecia, dañando las células que lo producen. Suele ser un efecto temporal, pero incómodo en la mayoría de los pacientes.

Náuseas y vómitos: Estos síntomas pueden manifestarse debido a muchos tratamientos contra el cáncer. Los vómitos abundantes pueden causar problemas de salud, y los vómitos graves pueden hacer que se deba abandonar el tratamiento para el cáncer. La radioterapia, quimioterapia y terapias dirigidas son los principales activadores de esta condición.

Problemas con la memoria: Los medicamentos usados para tratar el cáncer pueden hacer que algunas personas tengan problemas para concentrarse o recordar cosas. A esto se suele llamar el “*quimiocerebro*” y puede hacer más difícil que los pacientes de cáncer realicen su trabajo o las tareas cotidianas.

Coágulos sanguíneos (trombosis venosa profunda): es una afección que ocurre cuando se forma un coágulo de sangre en una vena profunda. Estos coágulos por lo general se forman en la parte inferior de las piernas, en los muslos o en la pelvis, pero también se pueden producir en los brazos. A veces se desprende un coágulo o trombo y va a los pulmones. Los pacientes con cáncer, especialmente aquellos que están recibiendo quimioterapia, tienen un riesgo mucho más alto de presentar trombosis venosa profunda que las demás personas.

Dolores agudos: El cáncer por sí mismo y sus tratamientos podrían causar dolor y este podría dificultar sus actividades cotidianas y disminuir su calidad de vida.

Los objetivos de la investigación en tratamientos contra el cáncer son: determinar si el tratamiento realmente funciona (eficacia del tratamiento) y si es lo suficientemente seguro en cuestiones de efectos secundarios y adversos para el paciente (especificidad y seguridad).

Tratamientos para leucemia

Debido a que la leucemia se desarrolla en la sangre requiere, en la mayoría de los casos, la combinación de diversas terapias para mejor control de la enfermedad, y los periodos de tratamiento son muy prolongados.

Es decisión de los médicos especialistas el tipo de tratamiento necesario para cada paciente. A continuación, se detallan todos los que se usan en la actualidad para tratar la leucemia [13-15].

Quimioterapia: Este tratamiento consiste en aplicar diversos tipos de fármacos y generalmente se utiliza una combinación de varios. Se aplica mediante distintas vías: intravenosa, oral, intratecal (en el espacio del líquido cefalorraquídeo). El subtipo de leucemia a tratar determinará la elección del compuesto o combinación de compuestos a

utilizar y la vía que se usará para aplicar. Las sustancias que se utilizan eliminan las células malignas presentes en la sangre del paciente.

Radioterapia: La aplicación de diversos fármacos y vías de administración se deben a que el tratamiento debe de ser “sistémico”, ya que, se trata de una enfermedad diseminada por la sangre. La *radioterapia*, es un tratamiento local poco utilizado y solo en algunos casos puntuales puede ser de ayuda (para controlar algún crecimiento específico en un órgano concreto) y en combinación con otras terapias.

Trasplante de células madre: Conocido generalmente como “trasplante de médula ósea”, pero en realidad se trata de un trasplante de células madre o progenitoras (o precursoras de las células de la sangre) es un tratamiento que se utiliza como terapia con finalidad curativa en algunas leucemias. Actualmente, también es conocido como trasplante de células de sangre periférica, ya que, se obtienen a partir de la extracción de sangre de la persona donante. La sangre donante pasa por un proceso de filtrado (posterior a la estimulación de la médula ósea con fármacos, para obtener una mayor cantidad de células en la sangre).

El proceso de recolección en el donante suele ser doloroso, ya que se obtienen directamente de la médula ósea. Tras recogerlas y acondicionarlas se guardan para su posterior inyección e infusión en la circulación sanguínea del receptor, para que se dirijan a la médula ósea y proliferen nuevamente.

Este tratamiento se aplica en conjunto con algún tipo de quimioterapia en dosis considerablemente altas para poder eliminar en su totalidad las células enfermas de la sangre y médula ósea. Por esto, el trasplante es un tratamiento de gran riesgo, que requiere medidas especiales de aislamiento y cuidados para prevención de complicaciones (infecciosas, hemorrágicas, etc.) a corto y medio plazo.

Cuando las células progenitoras son obtenidas del propio paciente, se denomina un *trasplante autólogo* o *autotrasplante*. En cambio, cuando se trata de una persona externa (generalmente familia cercana) es un *trasplante alogénico*. Son diversos los requerimientos para conseguir un donante compatible, entre los cuales se encuentra tener buen estado general de salud, sin enfermedades infecciosas transmisivas, etc [16].

Inmunoterapia: Este tratamiento se enfoca en bloquear puntos especiales de las células que conforman al sistema inmune del paciente, lo que permitirá que se activen otras vías y células del propio sistema de defensa del cuerpo, colaborando así con la eliminación de las células malignas, siendo reconocidas como un peligro para el paciente.

En edades infantiles y avanzadas pueden llegar a tratarse de tratamientos intolerables. De hecho, la quimioterapia intensa podría en realidad, acortar sus vidas. A menudo, el tratamiento de estos pacientes suele ser de menor intensidad o frecuencia al aplicarse, ya que, el tratamiento podría resultar incluso en una muerte prematura.

Los tratamientos de leucemia y sus efectos secundarios y baja especificidad han abierto líneas de investigación donde se buscan alternativas de tratamientos con menor riesgo, mejor eficacia y una total especificidad. La nanotecnología, como ciencia emergente ante esta problemática, ha planteado las bases para generar estas alternativas [16].

1.4 Nanotecnología

La palabra nanotecnología es usada extensivamente para definir a aquellas ciencias y técnicas dedicadas al estudio, diseño, creación, síntesis, control, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a una nano escala, es decir, a una millonésima parte de un milímetro (10^{-9} metros) y por tanto permiten trabajar y manipular de forma individual átomos y moléculas [17].

La nanotecnología abarca cinco áreas fundamentalmente:

1. Minerales y agroindustria.
2. Dispositivos médicos y salud.
3. Energía y medioambiente.
4. Materiales y fabricación.
5. Electrónica, información y comunicaciones.

Las áreas que abarcan la mayoría de la investigación hecha en nanotecnología son informática, construcción, medicina, biología, entre otras. En la actualidad, existen miles de productos registrados generados con nanotecnología, con uso mayoritario en la industria, aunque las investigaciones más avanzadas se registran en el campo de la medicina y la biología [17,18].

Desde el punto de vista sanitario, las investigaciones se centran en cómo aplicar la nanotecnología a la medicina para mejorar la capacidad de prevenir, diagnosticar, comprender y tratar las enfermedades. Esta área específica de la nanotecnología está definida como nanomedicina [17].

Durante los últimos años, la nanotecnología ha formado parte de los grandes avances científicos y tecnológicos alrededor del mundo. En México se registran importantes fortalezas, en un censo en 2018 se registraron cerca de 140 empresas de nanotecnología, un grupo aproximado de 650 investigadores especializados en la materia; más de 50 centros de investigación y universitarios dedicados a esta ciencia [17].

Diversos estudios aseguran que el mercado mundial de la nanotecnología duplicará su valor durante los próximos cinco años, superando los 290 000 millones de dólares, de los cuales 10% corresponderá a países de América Latina, destacando la participación de México y Brasil [17,19].

En la actualidad, México cuenta con más de 20 empresas que fabrican fármacos con nanotecnología y se han identificado más de 200 proyectos de investigación y desarrollo en esa área, algunos de los cuales ya se aplican, entre los que destacan: detección temprana de células cancerígenas, administración o entrega inteligente de fármacos, mejora de los métodos para la extracción y purificación del ADN y el uso de nanopartículas como potenciales agentes anticancerígenos y reparación en tejidos dañados [17,20].

El impulso a tecnologías disruptivas, como la nanotecnología, generará ventajas competitivas que permitirán destacar a México como un país con potencial para ser un gran aliado en materia de innovación en el escenario internacional [17].

1.5 Nanotecnología en aplicaciones médicas

La nanomedicina es una rama de la nanotecnología con aplicaciones directas en medicina, que está permitiendo el abordaje de las enfermedades desde el interior del organismo, a un nivel celular o molecular. De este modo, los dispositivos con un tamaño menor de 100 nm pueden entrar fácilmente en la mayoría de las células mientras que, los menores de 20 nm pueden transitar por el torrente circulatorio [20].

Existen métodos bien desarrollados para sintetizar nanomateriales, los que poseen aplicaciones reales en la práctica. Dado que las partículas son lo suficientemente pequeñas para penetrar en casi todos los espacios del cuerpo, incluidas células y organelos, estas apuntan a potenciales usos en nanomedicina. Las investigaciones se centran en cómo aplicar la nanotecnología a la medicina para mejorar la capacidad de prevenir, diagnosticar, comprender y tratar las patologías [20].

La nanomedicina ha permitido producir avances en el diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades, debido a su interacción con las biomoléculas (proteínas y ácidos nucleicos). La nanomedicina define 3 áreas principales en las que se centra su investigación para satisfacer fines médicos [21,22].

1. Liberación de fármacos e ingeniería de tejidos. Esta área se enfoca en el desarrollo de biomateriales nanoestructurados para construir sistemas que transporten y entreguen fármacos de manera controlada. De igual manera, se combina con la biología celular, en el campo de la medicina regenerativa para reparar o reemplazar tejidos u órganos dañados.
2. Diagnóstico. Esta rama de la nanomedicina se enfoca en el diseño de nano dispositivos con la finalidad de identificar una enfermedad a nivel celular o molecular por medio de nano sistemas de imagen o nano biosensores, los cuales contienen un componente biológico capaz de detectar en tiempo real y con una alta sensibilidad un compuesto determinado.

3. Terapia y diagnóstico (teranósticos). Aquí se busca diseñar y aplicar nanomateriales que identifiquen una patología y liberen moléculas terapéuticas simultáneamente y de manera controlada.

Una de las aplicaciones directas de la nanomedicina es la investigación oncológica, que ilustra muchas de las potencialidades de esta ciencia en torno a la nanotecnología. Se centra en la búsqueda de terapias y tratamientos más eficaces y con menor riesgo de complicaciones mediante el uso directo de la nanotecnología [23].

El cáncer comienza como una enfermedad localizada, que posteriormente se propaga a sitios distintos de donde empezó (metástasis), proceso que involucra una serie de cambios bioquímicos que hace del cáncer un padecimiento muy complejo. Su tratamiento recae en gran medida en la quimioterapia. El mecanismo de acción de la mayoría de los agentes quimioterapéuticos se basa en la interferencia de la proliferación celular para evitar la división celular descontrolada de las células cancerosas. Sin embargo, las células sanas también se encuentran en constante proceso de proliferación (en este caso regulada), por lo que un antineoplásico no discriminará entre una célula sana y una maligna, traduciéndose en efectos secundarios muy severos durante el tratamiento [20,21,23,24].

El desarrollo de tumores ocurre a nivel molecular cuando múltiples subgrupos de genes sufren alteraciones genéticas. Se desactivan los genes supresores de tumores o se activan oncogenes, lo que conduce a la proliferación maligna de células tumorales, infiltración de tejidos y disfunción de órganos. El microambiente tumoral tiene características particulares que pueden usarse para implementar estrategias terapéuticas basadas en las diferencias entre tejidos normales y tumorales, como son el pH, grado de oxigenación, expresión enzimática, activación/inactivación de genes y vascularización [16,21].

En la actualidad, la nanomedicina se desarrolla principalmente con estructuras llamadas nanomateriales, cuyas dimensiones son similares en tamaño a muchas moléculas biológicas. Hoy en día, los nanomateriales se utilizan mundialmente para mejorar los tratamientos y la vida de los pacientes que sufren diferentes enfermedades incluyendo diversos tipos de cáncer, afecciones renales, infecciones microbianas, colesterol elevado, síntomas menopáusicos,

esclerosis múltiple, dolores crónicos, asma y enfisema, entre otras. El éxito de los nanomedicamentos disponibles en la actualidad radica en la capacidad para superar algunas de las dificultades experimentadas por las moléculas de los fármacos [22,25].

Las nuevas aplicaciones de los nanomateriales en el campo médico son múltiples y se han basado principalmente por su actividad anti microbiana, ser moduladores de angiogénesis, producción de vacunas, por su actividad anti inflamatoria, regeneración ósea y dental, uso en biosensores y para terapia antitumoral [25].

Las nanopartículas utilizadas en la investigación nanomédica sugieren mecanismos de acción distintos a los de antibióticos tradicionales, proporcionando alternativas ante la creciente resistencia. Entre las nanopartículas que han demostrado tener propiedades microbicidas, las más importantes son las de plata, óxido de zinc, cobre y óxidos de hierro. Tres mecanismos son propuestos para la destrucción de microorganismos por parte de las nanopartículas: el estrés oxidativo, la liberación de iones metálicos y los mecanismos no oxidativos [21,23].

Debido al tamaño de las nanopartículas pueden atravesar la membrana celular y llegar al medio intracelular bacteriano, donde generan un gran desbalance oxidativo elevando los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) que degradan los componentes esenciales de las células bacterianas, responsables del mantenimiento de las funciones fisiológicas y morfológicas de las mismas, además generan daño a nivel de membrana y ADN produciendo así la muerte [23].

En el segundo mecanismo los iones metálicos son liberados de las nanopartículas y son absorbidos a través de la membrana, donde se altera el pH generando después la interacción con algunos de los grupos funcionales químicos, induciendo el daño en la actividad enzimática, cambios en la estructura celular y luego daños fisiológicos [23].

Por último, los mecanismos no oxidativos se relacionan con la cantidad de ROS asociados con las proteínas, que no se ven aumentados pero que sí provocan una disminución en el metabolismo energético de aminoácidos, carbohidratos y nucleótidos.

Las nanopartículas multifuncionales mantienen su estructura mientras circulan en el cuerpo y al llegar al sitio de acción son alteradas por estímulos celulares únicos, que conducen a la liberación eficiente de fármacos, genes, agentes de contraste y otras moléculas funcionales. Su liberación controlada, la focalización específica y la biocompatibilidad convertirán a las nanopartículas en la terapia personalizada en un futuro próximo. Sin embargo, todavía existen algunas limitaciones y se necesitan más datos para traducir los resultados obtenidos en modelos animales en aplicaciones para los seres humanos [25].

En los últimos años, las nanopartículas específicamente de plata han ganado mucho interés debido a su buena conductividad, estabilidad química y su actividad catalítica y antibacteriana. Las nanopartículas de plata (AgNPs) se están convirtiendo en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología. Su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica para el desarrollo de productos con AgNPs, actualmente, una amplia categoría de productos se encuentra disponible en el mercado [26].

1.6 Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNPs) se han convertido en los nanomateriales diseñados con el mayor grado de comercialización debido a sus actividades antimicrobianas de amplio espectro. Además, las AgNPs tienen efectos antifúngico, antiviral, antibacteriano, antiinflamatorio, antitrombótico y mejoran la cicatrización de las heridas [26].

Entre las nanopartículas de metales nobles, las AgNPs presentan una serie de características como rutas de síntesis simples, morfología adecuada y modificable, y una alta relación de superficie-volumen, sistema de administración intracelular y otras características que los hacen viables en la utilización como fármacos, biosensores, catalizadores, etc [27].

En forma de nanopartículas, la plata y otros metales nobles, muestran excelentes propiedades para aplicaciones biotecnológicas [28]. En particular, para las AgNPs se ha establecido una amplia gama de aplicaciones biomédicas, debido a su capacidad antibacteriana y toxicidad selectiva a los microorganismos [29]. Este hecho ha renovado el interés científico por este metal. Las AgNPs son ampliamente utilizadas en campos industriales para el revestimiento de catéteres venosos, fabricación de prótesis vasculares, fabricación de apósitos para el tratamiento para heridas crónicas y úlceras o como constituyente incorporado al cemento para el realineamiento de las fracturas óseas [30,31]. También se utilizan en la purificación de agua filtrada y en la pintura de las paredes para proporcionar un medio aséptico en las habitaciones de pacientes hospitalizados. Las propiedades que deben mostrar las AgNPs para aplicaciones biomédicas, incluyen eficacia prolongada, altos niveles de actividad bactericida y bacteriostática, capacidad de prevenir infecciones en un amplio espectro de bacterias, alta biocompatibilidad y baja toxicidad in vivo. En particular, la forma y la concentración de las AgNPs en disolución son factores importantes para asegurar el contacto efectivo de las partículas con las membranas bacterianas y en la determinación de la cantidad de AgNPs para inhibir eficazmente a las bacterias [32-34].

En aplicaciones virales de las AgNPs se ha demostrado que inhiben el VIH-1, el virus Tacaribe (TCRV), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus respiratorio sincitial recombinante (VSR), el virus de la viruela del mono, el norovirus murino (MNV) -1 y el

virus A / H1N1 de la gripe. El grupo de trabajo de Xiang en el 2013 demostraron que las AgNPs tienen efectos beneficiosos en la prevención de la infección por el virus de la influenza H3N2 tanto *in vitro* como *in vivo* [26,33].

Recientemente, se ha demostrado que las AgNPs tienen un gran potencial en el campo del tratamiento del cáncer porque participan de manera selectiva en la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que lleva a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y la interrupción de la síntesis de adenosina trifosfato (ATP). Se ha observado que una baja concentración de AgNPs pueden causar daños en el ADN y aberraciones cromosómicas (genotoxicidad), aunque no se ha registrado una citotoxicidad significativa. Sin embargo, otro grupo de investigadores han demostrado que no se observan efectos de genotoxicidad para diferentes células de cultivo humano tratadas con hasta 10 mg/ml de AgNPs capsuladas (diámetro 6-80 nm) [34].

Se ha creado una percepción negativa del uso de AgNPs a partir de muchos datos toxicológicos. Sin embargo, la toxicidad en sí misma puede ser útil para las terapias contra el cáncer puesto que se han logrado resultados positivos al incorporar AgNPs en tratamientos contra el cáncer. No sólo pueden interactuar pasivamente con las células, sino también mediar activamente en los procesos moleculares para regular las funciones celulares. Un ejemplo de estas aplicaciones es su uso en leucemia mieloide aguda (LMA). Diversas investigaciones han concluido que las nanopartículas de plata inducen un efecto citotóxico contra las células leucémicas, por ejemplo, contra las células de Jurkat, K562 y THP-1 [33,34].

Recientemente, el grupo de trabajo del investigador Guo en 2013 estudiaron que las AgNPs recubiertas con PVP (poli-vinil pirrolidona) pueden inhibir la viabilidad de las células de leucemia mieloide aguda (LMA), incluyendo los casos aislados de pacientes con LMA en concentraciones bajas, lo que sugiere un enfoque novedoso para el tratamiento de LMA en el futuro. En otro estudio, llevado a cabo por el mismo grupo, se ha demostrado que las AgNPs son capaces de entrar en las células K562, una línea celular de LMC (leucemia mieloide crónica), de manera dosis-dependiente y localizarse dentro de los endosomas, provocando la supresión de la proliferación de estas células [26,27,34].

Por todo lo anterior, en los nanomateriales debe existir una profunda investigación con evaluaciones sistemáticas y completas para proponerlos para aplicaciones biomédicas. Se busca trabajar en modelos estandarizados para hacer una evaluación de la viabilidad celular a partir de la aplicación del nanomaterial a diferentes concentraciones y tiempos.

1.7 Modelos para la evaluación de la viabilidad celular

Las células se encuentran en un constante proceso de cambio metabólico, lo que genera una homeostasis de esta para un buen funcionamiento. El mal funcionamiento de una o varias células en un tejido pueden causar lo que se conoce como patologías o enfermedades, por ejemplo, el cáncer [35].

Las células en el organismo están constantemente expuestas a metabolitos que generan una respuesta extrínseca celular en los distintos tejidos, sin embargo, cuando un estímulo no habitual actúa sobre ellas se genera una respuesta de adaptación o incluso la generación de una muerte celular por distintas vías [36].

En las últimas décadas se ha generado la necesidad de desarrollar nuevos compuestos o sustancias que permitan atender la alta demanda de patologías crónicas, además de aminorar los efectos adversos generados por medicamentos utilizados rutinariamente. Esto ha motivado la búsqueda de otras fuentes para nuevos compuestos.

Los ensayos basados en células a menudo se usan para seleccionar sustancias o compuestos para determinar si las moléculas a probar tienen efectos sobre la proliferación celular o muestran efectos citotóxicos directos que eventualmente conducen a la muerte celular. Los ensayos basados en células también se usan ampliamente para medir la unión al receptor y una variedad de eventos de transducción de señales que pueden involucrar la expresión de reporteros genéticos, el tráfico de componentes celulares o el monitoreo de la función de los organelos. Independientemente del tipo de ensayo basado en células que se utilice, es importante saber cuántas células viables quedan al final del experimento. Hay una variedad de métodos de ensayo que pueden usarse para estimar el número de células viables [37,38].

Un modelo experimental fundamentado ayudará a establecer modelos biológicos que permitan aislar, caracterizar y determinar mecanismos de acción, tanto *in vivo* como *in vitro*, útiles para la validación y planteamiento de nuevos compuestos que permitan atender patologías como: hipertensión, obesidad, diabetes y cáncer.

1.8 Cultivo celular

Las técnicas de cultivo celular se han perfeccionado, permitiendo el cultivo de tejidos, órganos e inclusive embriones en desarrollo. Los sistemas de cultivo celular son ampliamente usados, ya que presentan diversas ventajas [39]:

- Son económicos.
- Son relativamente fáciles de mantener.
- No necesitan mucho espacio físico.
- Incrementan la complejidad de los estudios o estrategias experimentales sobre la biología molecular de las respuestas celulares básicas.
- Permiten aislar virus, preparar antígenos virales y realizar pruebas de neutralización.
- Son convenientes para la producción de vacunas.

Los ensayos para evaluar citotoxicidad son técnicas de cultivo celular. La citotoxicidad en tejidos y células se define como una alteración de las funciones celulares básicas por efectos tóxicos de drogas, sustancias o compuestos químicos. A través de estímulos, las células pierden su equilibrio homeostático, lo cual puede causar una adaptación o sufrir un proceso de muerte celular [40].

La creación de bancos de células ha hecho posible el uso de cultivos celulares con fines experimentales. Las células se pueden mantener congeladas en nitrógeno líquido (-190°C), generando una disposición de líneas celulares hacia la comunidad científica mundial [39,41].

Para medir un efecto citotóxico en una línea celular, es necesario obtener información del estímulo que se aplica y la respuesta de la célula al mismo.

Los efectos citotóxicos se relacionan con el daño a procesos vitales que desencadenan la activación de vías que llevan a la muerte celular (apoptosis, necrosis, autofagia, piroptosis) [39].

1.9 Tipos de muerte celular

Existen distintos mecanismos de muerte celular que se generan a través de cambios regulados o abruptos fisiológicamente. Entre los 3 principales mecanismos se encuentra: la apoptosis, necrosis y autofagia, los cuales siguen distintos mecanismos fisiológicos y/o moleculares [42].

El proceso de muerte celular programada, o apoptosis, se caracteriza generalmente por distintas características morfológicas y mecanismos bioquímicos dependientes de la energía. La apoptosis ocurre normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento y como mecanismo homeostático para mantener las poblaciones de células en los tejidos. La apoptosis también ocurre como un mecanismo de defensa, como en las reacciones inmunes o cuando las células son dañadas por enfermedades o agentes nocivos [43].

La alternativa a la muerte celular apoptótica es la necrosis, que se considera un proceso tóxico en el que la célula es una víctima pasiva y sigue un modo de muerte independiente de la energía. Pero como la necrosis se refiere a los procesos degradantes que ocurren después de la muerte celular, algunos lo consideran un término inapropiado para describir un mecanismo de muerte celular [42,43].

La autofagia se describe inicialmente como un proceso de degradación para eliminar proteínas dañadas y orgánulos disfuncionales. La autofagia suele ser inducida por privación de nutrientes, hipoxia, estrés oxidativo, estrés genotóxico o altos niveles de glucosa. La autofagia comienza por la formación de autofagosomas, vesículas de doble membrana que absorben materiales citoplasmáticos.

La muerte celular necrótica o necrosis se caracteriza morfológicamente por una ganancia de volumen celular (oncosis), hinchazón de los orgánulos, ruptura de la membrana plasmática y la consiguiente pérdida de contenido intracelular. Durante mucho tiempo, la necrosis se ha considerado simplemente como una forma accidental incontrolada de muerte celular, pero se está acumulando evidencia de que la muerte celular necrótica puede estar regulada por un conjunto de vías de transducción de señales y mecanismos catabólicos [42-44].

La piroptosis es otra forma novedosa de necrosis programada. Es responsable de la lisis celular y la liberación extracelular de citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 β (IL-1 β) y la interleucina-18 (IL-18) por estimulación de altos niveles de glucosa [44].

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Uso de nanopartículas de plata como antitumorales

Mediante la investigación y desarrollo tecnológico en la búsqueda de nuevos tratamientos para cáncer, han comenzado a destacar las AgNPs. El desarrollo de estos materiales ha permitido evaluarlos como potenciales agentes antitumorales en distintos sistemas y patologías relacionadas al cáncer, mostrando efectos positivos como potenciales tratamientos.

En 2019, se demostró el efecto antitumoral y anti proliferativo de un compuesto de AgNPs recubiertas con PVP (Argovit®) en un modelo de melanoma [45]. En dicho estudio se observa una disminución de la población de células cancerígenas B16-F10 en un tiempo de solo 6 horas al tratar con AgNPs. Además de eso, se observó que, al comparar con otro tratamiento anticancerígeno ya conocido, como lo es el Cis-Platino (Cis-Pt), la respuesta apoptótica en la aplicación de AgNPs fue del doble a comparación de CisPt, demostrando una mejor reacción al tratamiento de las nanopartículas [45].

De igual manera, las nanopartículas Argovit® han demostrado efectos antitumorales en diferentes líneas tumorales, entre ellas las DLD-1 y HT-29 de carcinoma colorrectal. Se demuestra una citotoxicidad mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS) [46].

Es por esto, que las AgNPs se postulan como un potencial tratamiento anticancerígeno. Sin embargo, es necesario realizar evaluaciones completas que permitan determinar el potencial efecto anti proliferativo en cultivos de células de leucemia.

2.2 Uso de nanopartículas de plata como agentes contra leucemia

Las AgNPs también se han explorado como nanopelículas para la detección y obtención de imágenes de tumores, vectores para la administración de fármacos, así como inhibidores para suprimir la angiogénesis y el crecimiento tumoral. Además, varios investigadores han informado que las AgNPs inducen efecto citotóxico contra las células leucémicas, como las células THP-1, Jurkat y K562, principalmente a través de la elevación de especies reactivas de oxígeno; y estas partículas también podrían mostrar un efecto sinérgico contra las células leucémicas con fármacos quimioterapéuticos, como ciclofosfamida o busulfán [47].

Algunas investigaciones previas sugieren que la toxicidad de las AgNPs surge en parte de su efecto sobre el metabolismo energético celular, ya que, las AgNPs disminuyen la función mitocondrial. También se ha demostrado que la citotoxicidad de las AgNPs está asociada con el estrés oxidativo [46,47].

Recientemente, el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estado redox alterado en las células cancerosas se han convertido en una nueva estrategia terapéutica para mejorar la selectividad al cáncer sobre las células normales. Se sabe que las nanopartículas de plata (AgNPs) muestran actividad antileucémica a través de la sobreproducción de ROS [48].

En 2015, Guo et al. utilizaron N- (4-hidroxifenil) retinamida (4-HPR), un retinoide sintético, como modelo de fármaco de inducción de ROS para investigar su efecto sinérgico con las AgNPs. Los datos mostraron que las AgNPs de tamaño uniforme preparados mediante un método electroquímico podrían localizarse en los lisosomas, las mitocondrias y el citoplasma de las células SHI-1. En conjunto, estos resultados revelaron que las AgNPs combinados con fármacos que generan ROS podrían potencialmente mejorar la eficacia terapéutica contra las células leucémicas, proporcionando así una nueva estrategia para las AgNPs en la terapia de la leucemia [48,49].

En 2016, Narendran et al. investigaron el efecto anti proliferativo de AgNPs conjugadas con fenilpropanoides en células K562, donde se demostró que fueron capaces de inducir la

fragmentación del ADN en las células K562 de manera significativa en comparación con el control. La generación de ROS en las células leucémicas (K562) después de la administración de las formulaciones de AgNPs con fenilpropanoides indican que la fragmentación del ADN inducida por ROS fue la causa de la muerte celular [50].

2.3 Citotoxicidad de nanopartículas de plata

La citotoxicidad se define como la propiedad que tienen ciertas sustancias o células para dañar a otras células, tanto sanas como patógenas. Cuando se habla de un potencial tratamiento o fármaco nuevo es importante conocer el grado de citotoxicidad que se generará al aplicarse y el método que se utilizará para medir esta propiedad [51].

Medir la proliferación y supervivencia de las células es muy importante cuando se estudia la influencia de diversas sustancias en las células. Para este caso, se han estandarizado varios métodos para evaluar la viabilidad celular. Estos ensayos incluyen métodos comunes como el método de exclusión por colorimetría con tinción de azul tripano, así como métodos más complejos como MTT o XTT [51]. De igual manera se encuentran métodos complejos con herramientas más precisas como el método de evaluación por citometría de flujo. Cada uno de estos métodos tiene algunos méritos y desventajas en comparación con otros. Algunos factores como el costo, la velocidad, la sensibilidad y el equipo requerido están involucrados en la selección del procedimiento adecuado [52,53].

Existen diversos estudios previos al propuesto en este protocolo que sustentan al uso de nanopartículas Argovit® para su uso como agentes anticancerígenos en líneas celulares [54]. En 2018, el grupo de Nanomedicina, dirigido por la Dra. Nina Bogdanchikova, realizó experimentos de viabilidad celular de las nanopartículas de plata Argovit®, demostrando que presentan un efecto citotóxico nulo o no significativo en tejidos sanos, por lo que se plantean utilizarse en líneas tumorales como agente anti proliferativo. En dicha investigación se utilizó el método de exclusión con azul tripano para tinción de células y así determinar la viabilidad celular de las AgNPs Argovit® en células de tejidos sanos en un periodo de 24 horas. En la figura 11 se muestra un concentrado del trabajo realizado. Dichos resultados fueron

presentados en San Diego, California en el “*Undergraduate Research Conference*” del año 2018.

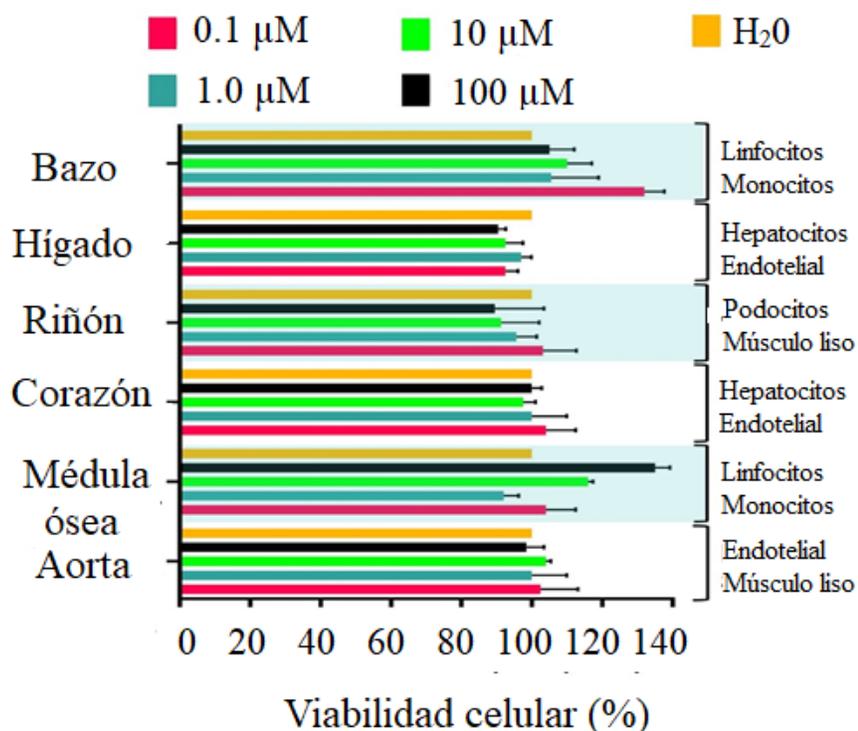


Figura 11. Resultados de viabilidad celular en células de bazo, hígado, riñón, corazón, médula ósea y aorta. Se muestran resultados de viabilidad celular de las nanopartículas de plata Argovit® en diferentes órganos, dando un preámbulo en donde no muestran efecto citotóxico en tejido sano, por lo que son viables como agentes antitumorales sin causar un daño colateral.

2.4 Modelos para evaluación de viabilidad celular

La viabilidad celular se refiere a la cuantificación del número de células vivas en un ensayo y generalmente se expresa como un porcentaje del control. Los ensayos de viabilidad son importantes cuando se siembran inicialmente las células en una placa y para estimar la citotoxicidad de las nanopartículas. La información sobre la citotoxicidad de las nanopartículas o la eficacia de liberación de los sistemas de administración de fármacos contra el cáncer se obtiene mediante ensayos de viabilidad [52].

Para los ensayos de viabilidad celular, se emplean generalmente reactivos colorantes que pueden distinguir las células vivas de las especies no celulares y la integridad de la membrana celular.

Dentro de los ensayos para determinar la viabilidad celular con colorantes se encuentra la tinción por exclusión con azul tripano, que se utiliza para cuantificar células vivas marcando células muertas de forma exclusiva. Debido a que las células vivas tienen una membrana celular intacta, el azul tripano no puede penetrar la membrana celular de las células vivas y entrar en el citoplasma. En una célula muerta, el azul tripano atraviesa la membrana celular porosa y entra en el citoplasma [53].

En 2016, Alqahtani et al., utilizaron el método de tinción con azul tripano para medir la viabilidad celular en un cultivo de células MOLT-4 de leucemia linfocítica aguda. En dicho estudio, se probaron nanopartículas de plata de 7nm y 50 nm a concentraciones de 5,10, 25 y 50 μg , a 24h y 48h. Utilizando el método de exclusión por tinción con azul tripano, se pudo determinar la viabilidad celular de ambas nanopartículas a las distintas concentraciones testadas. Como resultado, se observó un mayor potencial anticancerígeno con las AgNPs de 7 nm a una concentración de 50 μg en un tiempo de 24 horas [55].

Capítulo 3. Pertinencia y relevancia en el área de estudio

A diferencia de otros tipos de cáncer, la leucemia no es un tumor sólido que un médico pueda extirpar mediante cirugía. De hecho, la médula ósea es el origen de este problema, por lo que su tratamiento es mucho más complejo que otros cánceres [56].

A nivel mundial cada año se diagnostican unos 300.000 nuevos casos de leucemia (2,8% de todos los casos nuevos de cáncer). La leucemia es la neoplasia maligna infantil más común. Representa el 30% de todos los cánceres diagnosticados en niños menores de 15 años en los países industrializados [57].

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el tipo más común de esta enfermedad en los niños, representa el 73% de todos los casos de leucemia en niños, mientras que la leucemia mieloide aguda (LMA) es el tipo de enfermedad más común en personas de 20 a 40 años, y la leucemia linfocítica crónica (LLC) y la leucemia mieloide crónica (LMC) se observa más en los ancianos [57].

Particularmente en México se estima que se presentan entre cinco y seis mil casos nuevos al año de cáncer en menores de 18 años, entre los que destacan las leucemias, que representan el 50 por ciento del total; linfomas el 15%, seguido de tumores del sistema nervioso central con el 10% [6].

El tratamiento para esta enfermedad se basa en quimioterapia, aunque algunos pacientes son candidatos a un trasplante de médula ósea. La quimioterapia por sí sola puede ser eficaz para ciertos tipos de cáncer como las neoplasias hematopoyéticas (leucemias y linfomas). El paciente que se somete a quimioterapia puede presentar inmunodeficiencias, así como anemia, sangrado, gastritis y convulsiones. Sin embargo, el tratamiento es fundamental para controlar la enfermedad.

En este sentido, las nanopartículas de plata se han desarrollado como un producto de alto crecimiento dentro de la industria de la nanotecnología gracias a sus propiedades fungicidas, antimicrobianas, antivirales o de cicatrización, que proporcionan características que

aumentan la funcionalidad de los materiales dándole un alto potencial dentro de la biomedicina [55].

Existen estudios recientes que hablan de las propiedades antitumorales de las AgNPs a diferencia de los tratamientos tradicionales que, además de combatir las células cancerígenas, afectan a todas las células del cuerpo y producen efectos secundarios como la inmunosupresión, necrosis, carcinogénesis, genotoxicidad, etc. Las AgNPs Argovit® ofrecen una solución viable, ya que, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas combaten las células cancerígenas sin inducir citotoxicidad en las células sanas. En algunos casos funcionan como sistemas de liberación controlada de medicamentos, lo que también ha contribuido a la disminución de efectos citotóxicos.

Específicamente, las AgNPs conocidas como Argovit®, han sido evaluadas en distintos sistemas y patologías relacionadas con el cáncer con resultados prometedores. Existen estudios que demuestran la efectividad de estas AgNPs como agentes antitumorales en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* [45,54].

Ante esta perspectiva, se plantea la evidente necesidad de desarrollar tratamientos alternativos contra el cáncer, específicamente contra leucemia. Por lo tanto, las AgNPs Argovit® se proponen como prometedoras para alcanzar los estándares necesarios para el desarrollo de nuevos tratamientos lo que impactaría a nivel mundial.

Capítulo 4. Justificación

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial presentando alta morbilidad y mortalidad en infantes. Los tratamientos actuales contra la leucemia suelen tener muchos efectos secundarios y no presentan una alta efectividad.

Se han desarrollado nuevas tecnologías que prometen resultados favorables como tratamientos anticancerígenos, específicamente para leucemia. La nanotecnología en conjunto con la biomedicina ha generado avances en este campo, proponiendo opciones innovadoras para tratar patologías como el cáncer.

Específicamente, han surgido tratamientos alternativos como las nanopartículas de plata, que han demostrado efectos anti proliferativos en líneas tumorales, además de sus efectos conocidos como antimicrobianos de amplio espectro.

Las AgNPs Argovit® han presentado un efecto citotóxico no significativo en tejidos sanos, así como un efecto anti proliferativo en líneas tumorales de cáncer, por lo que se plantea su utilización como un agente anti proliferativo de leucemia. Las AgNPs no han reportado efectos secundarios y presentan una alta tasa de efectividad en estudios previos, en comparación con tratamientos convencionales para tratar la leucemia, por lo tanto, se propone evaluar Argovit® como tratamiento anti proliferativo en líneas tumorales de leucemia. [58,59]

Capítulo 5. Hipótesis

Las AgNPs Argovit® tendrán un efecto anti proliferativo significativo contra células de leucemia en comparación con un modelo de linfocitos sanos aislados de sangre periférica humana.

Capítulo 6. Objetivos y metas

6.1 Objetivo general

Determinar si 3 diferentes nanopartículas de plata tienen actividad selectiva contra líneas celulares de leucemia.

6.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar las AgNPs.
2. Evaluar el efecto anti proliferativo de las AgNPs contra una línea celular de leucemia.
3. Evaluar el efecto de las AgNPs en linfocitos de Sangre Periférica Humana (SPH).
4. Identificar mecanismos de muerte celular en células evaluadas.
5. Evaluar la generación de especies reactivas de oxígeno en células con leucemia.

6.3 Metas

1. Demostrar el efecto anticancerígeno de las AgNPs.
2. Sentar las bases para proponer un tratamiento contra leucemia linfocítica con base en AgNPs.
3. Estandarizar un método de evaluación de AgNPs e identificación de muerte celular en líneas tumorales no adherentes.

Capítulo 7. Materiales

7.1 Formulaciones de nanopartículas utilizadas y línea celular

Se utilizaron dos distintas formulaciones de AgNPs Argovit® cuya diferencia radica en la longitud del polímero de recubrimiento (PVP). Estas AgNPs fueron donadas por el Dr. Vasily Burmistrov del Centro de Investigación Vector-Vita en Novosibirsk, Rusia.

Se utilizó la línea celular L1210 de leucemia linfocítica de ratón adquiridas de la American Type Culture Collection ATCC®.

7.2 Tinciones y kits

- Tinción con azul tripano.
- Kit de mecanismo de muerte celular Anexina V 488 Alexa Fluor®.
- Kit indicador mitocondrial de superóxido Mitosox™ Red.

7.3 Sistemas de detección

- Microscopio óptico
- Hematocitómetro
- Citómetro de flujo

7.4 Software

- Microsoft Excel 2019
- IC50 Calculator de AAT Bioquest (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>)

Capítulo 8. Metodología

8.1 Procedimientos realizados

8.1.1 Cultivo celular

Para este trabajo se utilizó la línea celular de leucemia linfocítica de ratón L1210, adquiridas de la American Type Culture Collection ATCC®. Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Biowest©) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Biowest©) y 0.01% de antibiótico-antimicótico (Biowest©). Se mantuvieron a las células en una incubadora de CO₂ de acuerdo con las especificaciones de la ATCC en placas petri con medio de cultivo suplementado a una temperatura de 37°C. Al obtener una confluencia mayor al 75% en las cajas petri se realizaban pases para preservar la línea celular y proliferarla con nuevo medio celular. Al tratarse de una línea celular en suspensión, se centrifugaron las células para retirarles el medio sobrante y se resuspendieron en medio totalmente nuevo y suplementado para generar los pases. El cultivo de células permitió obtener numerosas colonias de la línea celular para una posterior evaluación de las nanopartículas.

8.1.2 Ensayo de viabilidad celular: exclusión vital por colorante azul tripano

El ensayo de exclusión vital por colorante azul tripano permite una identificación y enumeración directa de células vivas (sin teñir) y muertas (azul) en una población dada. Esta identificación y conteo es posible mediante la utilización de microscopios.

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 180 µL de suspensión celular con una densidad de 100,000 células por pozo y 20 µL de AgNPs. Se añadió un control negativo de medio RPMI 1640 suplementado. Para cada tratamiento se realizaron tres experimentos independientes (Figura 12), por triplicado.

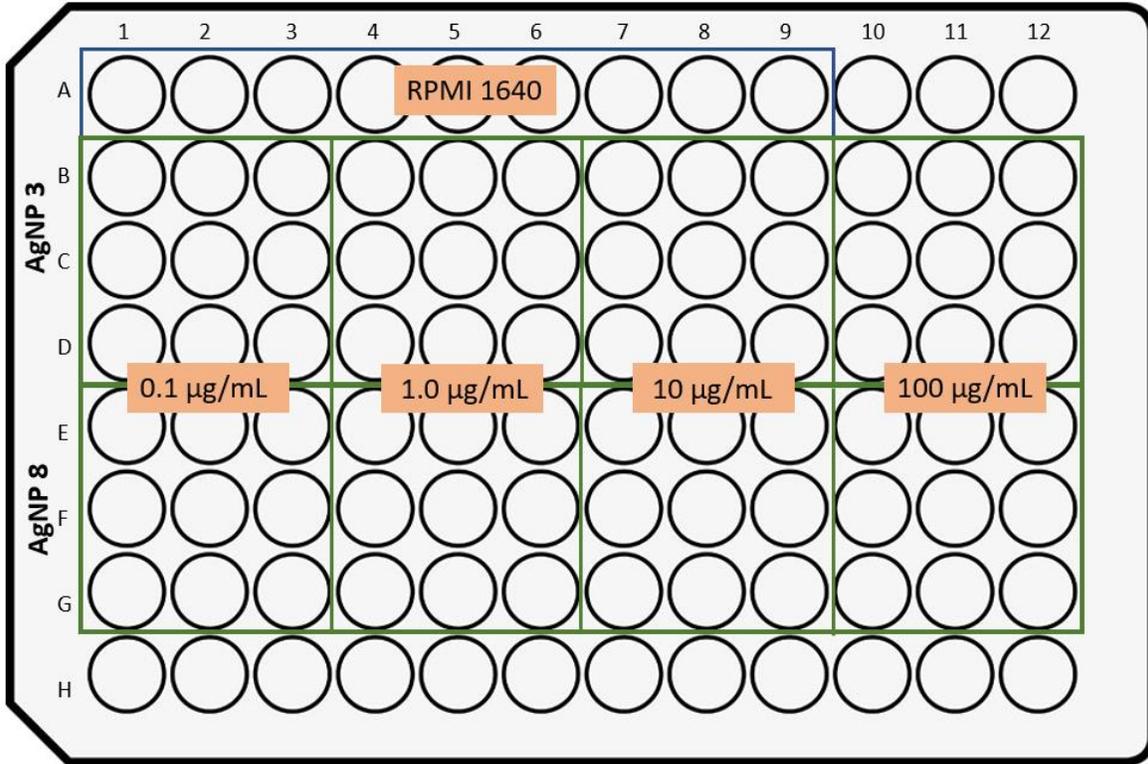


Figura 12. Esquema de la placa de 96 pozos. Se muestra la distribución de los estímulos y controles para evaluar la viabilidad de células de leucemia tratadas con AgNPs a distintas concentraciones.

Las células tratadas con AgNPs fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ por 24 h. Posterior a la incubación de 24 horas, se añadieron 2 µL de azul tripano al 4% en cada pozo y se fijaron las células con 20 µL de formaldehído al 37% (concentración final 3.7%).

Se utilizó una cámara de Neubauer para contar el número de células viables por pozo, por medio de un microscopio óptico. Se cargó la cámara de Neubauer con 10 µL del líquido resuspendido. Las células que permanecieron sin teñir fueron consideradas como viables. El promedio de células viables en los pozos de control negativo se designó como el 100% de viabilidad. La fórmula para calcular el porcentaje de viabilidad celular de cada experimento independiente es la siguiente:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\# \text{ células viables por pozo}}{\text{promedio de células viables control negativo}} \times 100\%$$

Por último, para obtener el porcentaje de viabilidad del tratamiento se calculó el promedio de los tres experimentos independientes. Se obtuvieron los resultados de cada experimento por triplicado.

8.1.3 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de dos factores (ANOVA) en el programa Excel. Se compararon las formulaciones 3 y 8 de nanopartículas Argovit® en distintas concentraciones y con base en los resultados de viabilidad celular se determinó si existe o no un efecto significativo anti proliferativo en las células L1210. Además, se efectuó una prueba post hoc de Tukey para comprobar las diferencias significativas respecto a los resultados de los experimentos. Se consideró un nivel de significancia * $p \leq 0.05$.

Por último, se calculó la concentración inhibitoria media máxima (IC50) mediante el programa *IC50 Calculator* de AAT Bioquest para determinar a qué concentración se inhibe la mitad de la población celular en los ensayos *in vitro*.

8.2 Perspectivas metodológicas

8.2.1 Mecanismo de muerte celular: Anexina V/ Ioduro de propidio

La apoptosis es un proceso de muerte celular extremadamente regulado, en donde se generan restos celulares que pueden ser aprovechados e ingeridos por células vecinas mediante la generación de cuerpos apoptóticos. En cambio, la necrosis es un tipo de muerte celular sin regulación e inmediato, donde existen cambios morfológicos como la compactación y fragmentación de la cromatina nuclear, contracción del citoplasma, pérdida de la simetría de la membrana plasmática y exteriorización de la fosfatidilserina.

La superficie de las células sanas está compuesta por lípidos que se distribuyen asimétricamente en la pared interna y externa de la membrana plasmática. Uno de estos lípidos, la fosfatidilserina, normalmente se encuentra en la pared interna de la membrana plasmática, por lo tanto, solo está expuesta al citoplasma celular. Sin embargo, durante la

apoptosis se pierde la asimetría de lípidos y la fosfatidilserina queda expuesta en la pared exterior de la membrana plasmática. La anexina V, una proteína de unión al calcio de 36 kDa, se une a la fosfatidilserina; por lo tanto, la anexina V genera una fluorescencia que se puede utilizar para detectar la fosfatidilserina que está expuesta en el exterior de las células apoptóticas. La anexina V también puede teñir las células necróticas porque estas células tienen membranas rotas que permiten que la anexina V acceda a toda la membrana plasmática. Sin embargo, las células apoptóticas se pueden distinguir de las necróticas mediante una contra tinción con yoduro de propidio, porque el yoduro de propidio entra en las células necróticas, pero se excluye de las células apoptóticas.

El kit Alexa Fluor® 488 anexina V / apoptosis de células muertas con Alexa® Fluor 488 anexina V y yoduro de propidio (IP) para citometría de flujo proporciona un ensayo rápido y conveniente para detectar apoptosis. El kit contiene anexina V recombinante conjugada con el fluoróforo muy sensible: Alexa Fluor® 488.

Además, el kit incluye una solución lista para usar del tinte de unión de ácido nucleico de IP rojo fluorescente. El IP es impermeable a las células vivas y apoptóticas, pero tiñe las células muertas con fluorescencia roja, uniéndose fuertemente a los ácidos nucleicos de la célula. Después de teñir una población celular con Alexa Fluor® 488 anexina V y IP en el tampón de unión proporcionado, las células apoptóticas muestran fluorescencia verde, las células muertas muestran fluorescencia roja y verde y las células vivas muestran poca o ninguna fluorescencia. Estas poblaciones se pueden distinguir fácilmente utilizando un citómetro de flujo ajustando la línea de 488 nm de un láser de iones de argón para la excitación.

Protocolo de detección de apoptosis por citometría de flujo.

1. Inducir la apoptosis en las células utilizando el método deseado, en este caso con el tratamiento de AgNPs de plata hacia las células L1210. Preparar un control negativo incubando las células en ausencia de agente inductor.
2. Cosechar las células después del período de incubación y lávelas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría.
3. Preparar tampón de unión a anexina 1X. Por ejemplo, para ~ 10 ensayos, agregar 1 ml de tampón de unión de anexina 5X (Componente C) a 4 ml de agua desionizada.
4. Preparar una solución de trabajo de 100 µg/ml de IP diluyendo 5 µl de la solución de stock de IP de 1 mg/ml (Componente B en 45 µl de tampón de unión a anexina 1X). Almacenar la parte no utilizada de esta solución de trabajo para experimentos futuros.
5. Centrifugar nuevamente las células lavadas (del paso 2), desechar el sobrenadante y resuspender las células en tampón de unión a anexina 1X. Determinar la densidad celular y diluir en tampón de unión a anexina 1X a ~ 1 x 10⁶ células/mL, preparando un volumen suficiente para tener 100 µl por ensayo.
6. Agregar 5 µl de Alexa Fluor® 488 anexina V (Componente A) y 1 µl de solución de trabajo de IP 100 µg / ml (preparada en el paso 4) a cada 100 µL de suspensión celular.
7. Incubar las células a temperatura ambiente durante 15 minutos.
8. Después del período de incubación, agregar 400 µl de tampón de unión a anexina 1X, mezclar suavemente y mantener las muestras en hielo.
9. Tan pronto como sea posible, analizar las células teñidas por citometría de flujo, midiendo la emisión de fluorescencia a 530 nm (por ejemplo, FL1) y > 575 nm (por ejemplo, FL3).

La población debe separarse en tres grupos: las células vivas muestran solo un nivel bajo de fluorescencia, las células apoptóticas muestran fluorescencia verde y las células muertas muestran fluorescencia roja y verde. Los resultados de la citometría de flujo se confirman observando las células bajo un microscopio de fluorescencia, usando filtros apropiados para fluoresceína (FITC) y tetrametilrodamina (TRITC) o colorante Texas Red®.

8.2.2 Detección de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

El oxígeno tiene una estructura molecular única y abunda dentro de las células. Acepta fácilmente los electrones libres generados por el metabolismo oxidativo normal dentro de la célula, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como el anión superóxido O_2^- y radical hidroxilo (HO), así como el oxidante H_2O_2 .

Las ROS sirven como moléculas de señalización celular para procesos biológicos normales, incluidos la función de transportadores/canales iónicos, activación de proteína quinasa/fosfatasa, expresión genética y otros procesos de señalización intracelular. Sin embargo, la generación de ROS en niveles altos también puede provocar daños en múltiples orgánulos y procesos celulares, que en última instancia pueden alterar la fisiología normal, esto resulta en efectos altamente tóxicos, lo que se denomina estrés oxidativo.

El indicador de superóxido mitocondrial MitoSOX™ Red es un nuevo tinte fluoro génico derivado de hidroetidina para la detección altamente selectiva de superóxido en las mitocondrias de células vivas. El reactivo MitoSOX™ Red permea las células vivas y se dirige rápida y selectivamente a las mitocondrias. Una vez en las mitocondrias, el reactivo MitoSOX™ Red es oxidado por superóxido y exhibe fluorescencia roja. El reactivo MitoSOX™ Red se oxida fácilmente por el superóxido, pero no por otros sistemas que generan ROS o especies de nitrógeno reactivo (RNS), y la superóxido dismutasa evita la oxidación de la sonda. El producto de oxidación se vuelve altamente fluorescente al unirse a los ácidos nucleicos.

Para la evaluación de la generación de superóxido mitocondrial se utiliza el reactivo MitoSOX™Red (invitrogen©). A continuación, se muestra el protocolo a seguir para la evaluación con el reactivo.

1. Se prepara una solución madre 5 mM de MitoSOX™Red (PM=759 g/mol) disolviendo el contenido de uno de los viales (50 µg) suministrados por el proveedor con 13 µL de dimetil sulfóxido (DMSO).

2. Posteriormente se diluye la solución madre para preparar una solución de trabajo cuya concentración este a 43 μM .
3. Para el ensayo se emplean una cantidad de células determinadas por pozo.
4. Se plantean tanto los controles positivos como negativos a utilizar en el ensayo de acuerdo con los estímulos y células utilizadas.
5. Se añaden los estímulos a las células y se deja incubar 24 h a 37° C con 5% de CO₂.
6. Al término de la 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.
7. Finalmente, se utiliza citometría de flujo para analizar las muestras.

Capítulo 9. Resultados

9.1 Ensayo de viabilidad celular por tinción con azul tripano

Como una primera aproximación en la determinación de la potencial aplicación de diferentes formulaciones Argovit® para el tratamiento de leucemia, se evaluó su efecto anti proliferativo en cultivos de la línea celular L1210. La determinación de viabilidad celular utilizando el colorante de exclusión vital azul tripano no mostró diferencias morfológicas en los cultivos tratados. Sin embargo, se observó un efecto dosis-dependiente, las nanopartículas de plata muestran un efecto significativo en la inhibición de la línea tumoral L1210 (Figura 12).

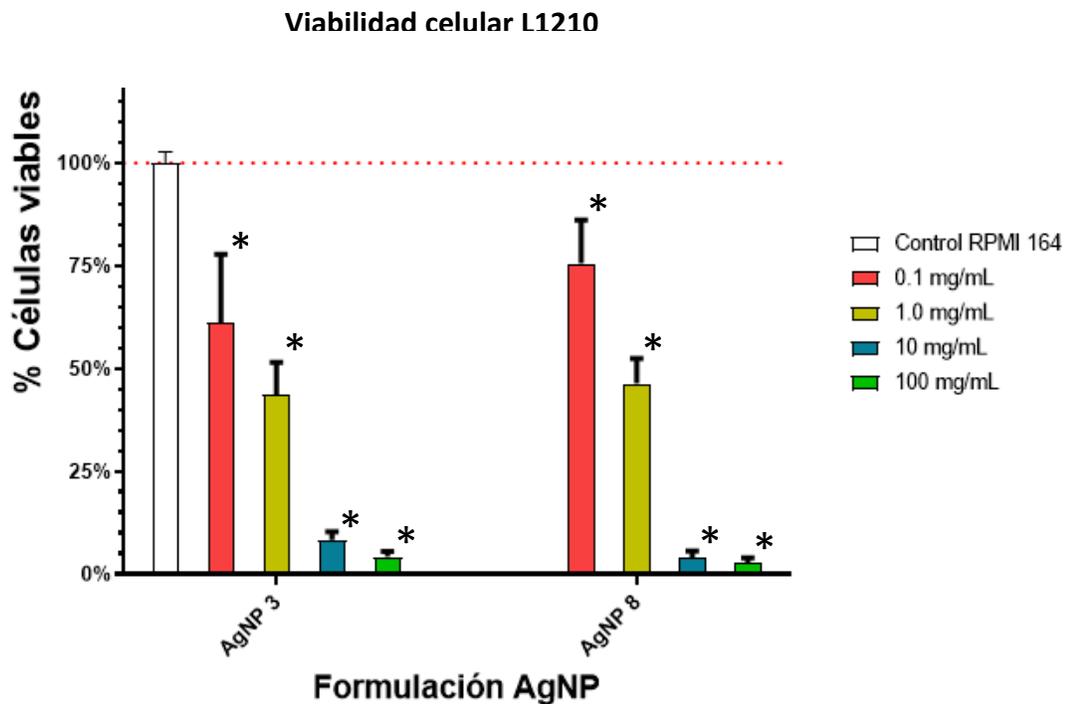


Figura 13. Resultados de ensayos de viabilidad celular en células L1210 con AgNPs. La barra de color blanco corresponde al control negativo. Las concentraciones usadas se muestran en distintos colores: rojo 0.1 mg/ml, verde oliva 1.0 mg/ml, azul 10 mg/ml y verde lima 100 mg/ml respectivamente. Las diferencias significativas se muestran en la gráfica $*p < 0.05$.

Se muestran diferencias significativas comparando las concentraciones de ambas formulaciones. En el caso de la AgNP 3, para la concentración de 0.1 mg/ml se obtuvo un 62% de viabilidad celular. Por otro lado, la AgNP 8 mostró un 76% de células viables a la misma concentración (0.1 mg/ml), lo que representa un 14% más de viabilidad en comparación con la formulación 3. En el caso de la concentración 1.0 mg/ml, la formulación 3 demostró una viabilidad del 43%, lo que representa una diferencia menor de 4% respecto al 47% de viabilidad de la formulación 8. La concentración de 10 mg/ml denotó una diferencia de 5% entre las formulaciones, a partir de un resultado de 8% de viabilidad celular para la formulación 3 y un 3% para la formulación 8. Por último, para el caso de la concentración 100 mg/ml se mostró un 3% en la formulación 3, en comparación con la formulación 8 donde se obtuvo una disminución de la mitad de población celular, es decir, 1.5%.

9.2 Análisis estadístico

9.2.1 Determinación de diferencias significativas entre formulaciones y concentraciones

Al realizar un análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo se evaluaron las hipótesis nula y alternativa. La hipótesis nula es: La concentración de AgNPs con la que se trata un cultivo de células L1210 no tiene efecto significativo sobre su citotoxicidad. Por otro lado, se define a la hipótesis alternativa como: La concentración de AgNPs con la que se trata un cultivo de células L1210 tiene un efecto significativo sobre su citotoxicidad.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Tipo de AgNP	172670138.9	1	172670138.9	24.59092595	5.50844E-06	3.990923772
Concentración	55814177083	3	18604725694	2649.603659	4.84196E-67	2.748190888
Interacción	917010416.7	3	305670138.9	43.53220423	1.87105E-15	2.748190888
Dentro del grupo	449388888.9	64	7021701.389			
Total	57353246528	71				

Tabla 1. Resultados del análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo. En la tabla se muestran los resultados del análisis estadístico realizado para determinar la significancia del estudio sobre la citotoxicidad de las dos distintas AgNPs evaluadas a diferentes concentraciones.

Se observa una p mucho menor en la fila de concentración, lo que significa que el resultado tiene diferencias significativas, por lo que se puede rechazar la hipótesis nula y aceptar la alternativa: La concentración de AgNPs con la que se trata un cultivo de células L1210 tiene un efecto significativo sobre su citotoxicidad ($*p < 0.05$ Figura 12).

9.2.2 Cálculo de IC50

Se calcularon las concentraciones inhibitorias medias (IC50) utilizando el programa *IC50 Calculator* de ATT Bioquest. Para tal efecto se calcula la ecuación de la curva resultante de graficar la viabilidad celular determinada en función de la concentración evaluada. La IC50 de la formulación 8 resultó en 0.778 mg/ml y la de la formulación 3 en 0.525 mg/ml.

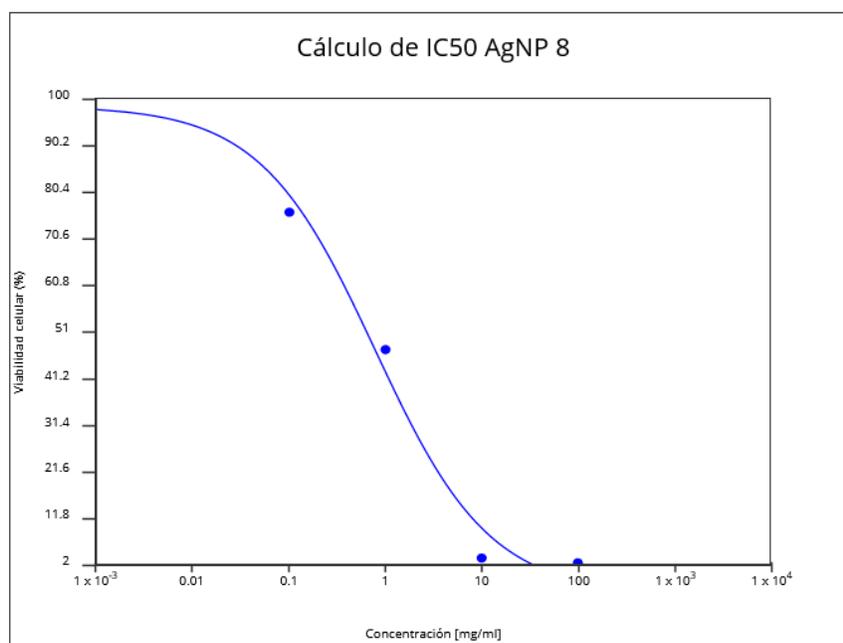


Figura 14. Gráfica de resultados de concentración vs viabilidad celular para la formulación 8. El gráfico muestra una aproximación en la curva de los resultados para posteriormente calcular la IC50.

La IC50 se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Y = Min + \frac{Max - Min}{1 + \left(\frac{X}{IC50}\right)^{Coeficiente Hill}}$$

En el caso de la formulación 8, se generó una ecuación a partir de la gráfica de concentración vs viabilidad celular, la cual dio como resultado el valor de la IC50 mediante la siguiente sustitución:

$$Y = -4.5665 + \frac{98.4747 - 4.5665}{1 + \left(\frac{X}{0.7783}\right)^{0.7281}}$$

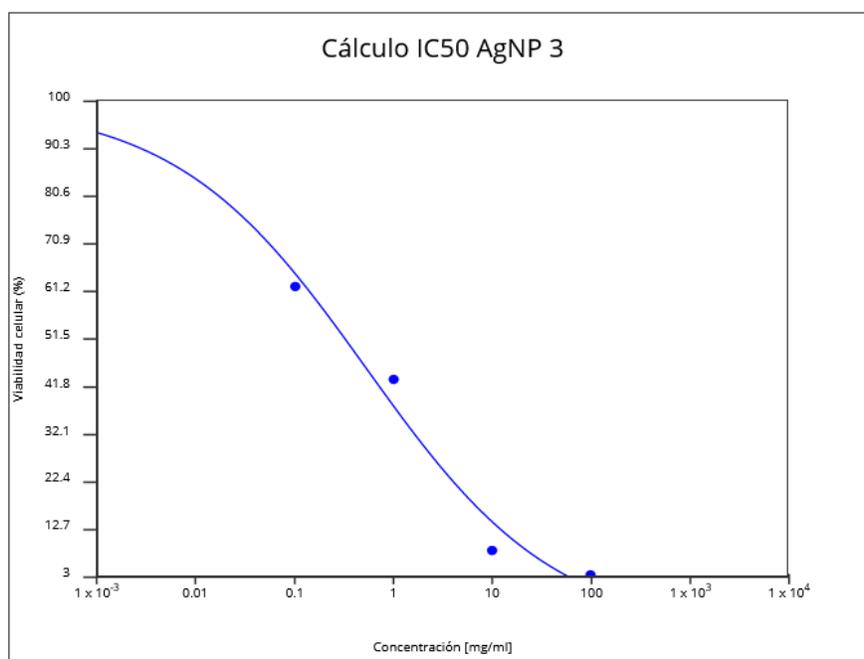


Figura 15. Gráfica de resultados de concentración vs viabilidad celular para la formulación 3. El gráfico muestra una aproximación en la curva de los resultados para posteriormente calcular la IC50.

Por otro lado, en el caso de la formulación 3, la ecuación generada para calcular la IC50 se generó de la siguiente manera:

$$Y = -8.9648 + \frac{99.5687 - 8.9648}{1 + \left(\frac{X}{0.525}\right)^{0.4487}}$$

Capítulo 10. Discusión

Las AgNPs han sido ampliamente utilizadas por sus potenciales aplicaciones en el área biomédica. Sin embargo, su uso se sigue viendo limitado por los riesgos que pueden presentar a la salud [60]. Ha sido reportada específicamente la aplicación de AgNPs como un tratamiento alternativo contra el cáncer [5].

En la literatura se reporta la efectividad de AgNPs Argovit® contra diferentes líneas tumorales como carcinoma de cuello uterino humano (HeLa), células de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF7), cáncer de pulmón (H1299 y H1437), células de cáncer de próstata (DU-145) y adenocarcinoma de colon (HT-29 y DLD-1); así como en melanoma (B16-F10) y se reportó una IC50 en las líneas celulares en un rango de 1.82 µg/ml a 4.2 µg/ml. En esta investigación se evaluaron nuevas formulaciones de Argovit® cuya variación es la longitud del polímero de recubrimiento (PVP), las cuales presentan una IC50 de 0.525 mg/ml para la formulación 3 y 0.778 mg/ml para la formulación 8, lo que representa una menor efectividad. Por lo tanto, se debe realizar una caracterización completa que permitirá definir los mejores parámetros fisicoquímicos necesarios [58,61].

En comparación con otras AgNPs reportadas para usos médicos contra cáncer, el efecto observado en el presente trabajo representa una menor efectividad, sin embargo, es fundamental evaluar el tipo de muerte celular que se induce con futuros ensayos para obtener los parámetros necesarios completos. Además, debido a que se utilizó la tinción de exclusión vital con azul tripano para cuantificar la proporción de células viables, dónde no se observó ningún cambio en la morfología de las células que pueda asociarse con un posible daño que podría afectar células sanas, se estima que estas AgNPs presenten una alta biocompatibilidad en linfocitos sanos. Esto hace relevante continuar su evaluación, en otros casos se ha reportado que las AgNPs pueden causar daños en la morfología de las células, específicamente se han evaluado células hepáticas por su implicación en el metabolismo [62].

Cabe resaltar que, aunque la efectividad de las formulaciones utilizadas para efectos de esta investigación sea menor, uno de los principales problemas de los tratamientos actuales contra

el cáncer es la toxicidad en tejidos periféricos sanos. En este caso, las formulaciones de AgNPs Argovit® propuestas han demostrado ser inocuas al aplicarse en algunos tejidos sanos [54]. Esto sugiere que la relación efectividad-efectos adversos será determinante para continuar la investigación del uso de estas formulaciones como tratamiento alternativo de leucemia.

Capítulo 11. Conclusiones

En el presente trabajo se demostró la capacidad anti proliferativa de 2 nuevas formulaciones de AgNPs Argovit® contra una línea celular de leucemia murina (L1210). La formulación 3 presentó una IC50 de 0.525 mg/ml, mientras que para la formulación 8 fue de 0.778 mg/ml. En comparación con los fármacos de primera elección para leucemia: *fludarabina*, la cual tiene una IC50 de 13.499 mg/ml y *prednisona* con una IC50 de 30.82 mg/ml, el tratamiento con AgNPs Argovit® es por lo menos 17 veces más efectivo en comparación con la primera y casi 40 veces más efectivo en comparación con la segunda [63].

Estos resultados demuestran la efectividad de las AgNPs Argovit® contra una línea celular de leucemia, lo que sugiere la factibilidad de continuar la investigación para determinar si podrían ser un tratamiento alternativo contra la leucemia. Para tal efecto sería necesario determinar el mecanismo por el cual las AgNPs producen un efecto citotóxico selectivo en líneas tumorales, así como profundizar sobre su potencial efecto tóxico en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Capítulo 12. Bibliografía

- [1] J. V. Melo and D. J. Barnes, “Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 6, pp. 441–453, Jun. 2007, doi: 10.1038/nrc2147.
- [2] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, “Global cancer statistics,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 61, no. 2, pp. 69–90, Mar. 2011, doi: 10.3322/caac.20107.
- [3] J. C. Y. Wang and J. E. Dick, “Cancer stem cells: Lessons from leukemia,” *Trends in Cell Biology*, vol. 15, no. 9. Elsevier Current Trends, pp. 494–501, Sep. 01, 2005, doi: 10.1016/j.tcb.2005.07.004.
- [4] C. P. Wild, E. Weiderpass, and B. W. Stewart, *Cancer research for cancer prevention World Cancer Report*. 2020.
- [5] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [6] INEGI, “COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 61/18 2 DE FEBRERO DE 2018 PÁGINA 1/13 ‘ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL... DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)’ DATOS NACIONALES.”
- [7] “Joinpoint Trends in Cancer Incidence Rates for Selected Sites in Two Age Groups, US, 1995-2015 35 Figure S6. Trends in Cancer Death Rates for Selected Sites,” 1975.
- [8] U. Mensaje De, J. Walter, and J. W. Presidente, “La leucemia RAY, sobreviviente de CML Contenido de este librito.”
- [9] R. D. Brunning, “Classification of acute leukemias,” *Semin. Diagn. Pathol.*, vol. 20, no. 3, pp. 142–153, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0740-2570(03)00031-5.
- [10] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2015,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 65, no. 1, pp. 5–29, Jan. 2015, doi: 10.3322/caac.21254.
- [11] “Tratamientos para el cáncer: MedlinePlus enciclopedia médica.” <https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000901.htm> (accessed Apr.

21, 2021).

- [12] “Tipos de tratamiento - Instituto Nacional del Cáncer.”
<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos> (accessed Apr. 21, 2021).
- [13] C. Pucci, C. Martinelli, and G. Ciofani, “13:961; www.ecancer.org,” 2019, doi: 10.3332/ecancer.2019.961.
- [14] T. Baudino, “Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment,” *Curr. Drug Discov. Technol.*, vol. 12, no. 1, pp. 3–20, Jul. 2015, doi: 10.2174/1570163812666150602144310.
- [15] M. Arruebo *et al.*, “Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies,” *Cancers (Basel)*, vol. 3, pp. 3279–3330, 2011, doi: 10.3390/cancers3033279.
- [16] L. Bregoli, D. Movia, J. D. Gavigan-Imedio, J. Lysaght, J. Reynolds, and A. Prina-Mello, “Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 12, no. 1. Elsevier Inc., pp. 81–103, Jan. 01, 2016, doi: 10.1016/j.nano.2015.08.006.
- [17] E. Záyago-Lau and G. Foladori, “La nanotecnología en México: un desarrollo incierto Nanotechnology in Mexico: an uncertain development,” 2010.
- [18] B. Bhushan, “Introduction to nanotechnology,” *Springer Handbooks*. Springer, pp. 1–19, 2017, doi: 10.1007/978-3-662-54357-3_1.
- [19] M. Ferrari, “Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 161–171, Mar. 2005, doi: 10.1038/nrc1566.
- [20] D. F. Emerich and C. G. Thanos, “Nanotechnology and medicine,” *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 3, no. 4. Taylor & Francis, pp. 655–663, Jul. 2003, doi: 10.1517/14712598.3.4.655.
- [21] Y. Zhang, M. Li, X. Gao, Y. Chen, and T. Liu, “Nanotechnology in cancer diagnosis: Progress, challenges and opportunities,” *Journal of Hematology and Oncology*, vol. 12, no. 1. BioMed Central Ltd., Dec. 17, 2019, doi: 10.1186/s13045-019-0833-3.
- [22] Z. Zdrojewicz, M. Waracki, B. Bugaj, D. Pypno, and K. Cabała, “Medical applications of nanotechnology,” *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, vol. 69. Polska Akademia Nauk, pp. 1196–1204, 2015, doi: 10.5604/17322693.1177169.

- [23] K. Kopeckova *et al.*, “Nanodrugs used in cancer therapy,” *Biomed. Pap.*, vol. 163, no. 2, pp. 122–131, 2019, doi: 10.5507/bp.2019.010.
- [24] V. K. Chaturvedi, A. Singh, V. K. Singh, and M. P. Singh, “Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy,” *Curr. Drug Metab.*, vol. 20, no. 6, pp. 416–429, Sep. 2018, doi: 10.2174/1389200219666180918111528.
- [25] Z. Li, S. Tan, S. Li, Q. Shen, and K. Wang, “Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review),” *Oncology Reports*, vol. 38, no. 2. Spandidos Publications, pp. 611–624, Aug. 01, 2017, doi: 10.3892/or.2017.5718.
- [26] X. F. Zhang, Z. G. Liu, W. Shen, and S. Gurunathan, “Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 9. MDPI AG, Sep. 13, 2016, doi: 10.3390/ijms17091534.
- [27] A. Ávalos, A. Haza, and P. Morales, “Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente,” *Rev. Complut. Ciencias Vet.*, vol. 7, no. 2, Dec. 2013, doi: 10.5209/rev_rccv.2013.v7.n2.43408.
- [28] S. Hackenberg *et al.*, “Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells,” *Toxicol. Lett.*, vol. 201, no. 1, pp. 27–33, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.toxlet.2010.12.001.
- [29] M. Gholami, K. Shahzamani, A. Marzban, and H. E. Lashgarian, “Evaluation of antimicrobial activity of synthesised silver nanoparticles using *Thymus kotschyianus* aqueous extract,” *IET Nanobiotechnology Res. Artic. E-First*, 2018, doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5110.
- [30] C. Dipankar and S. Murugan, “The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 98, pp. 112–119, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.04.006.
- [31] K. K. Y. Wong and X. Liu, “Silver nanoparticles - The real ‘silver bullet’ in clinical medicine?,” *Medchemcomm*, vol. 1, no. 2, pp. 125–131, Aug. 2010, doi: 10.1039/c0md00069h.
- [32] N. De, A. González-Jiménez, and A. García, “Nanopartículas de plata como agente antibacteriano en infecciones óseas = Silver nanoparticles as antibacterial agents in

- bone tissue infections,” vol. 5, no. 1, pp. 27–36, 2019, doi: 10.14201/fj2020512736.
- [33] M. Ahamed, M. S. AlSalhi, and M. K. J. Siddiqui, “Silver nanoparticle applications and human health,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 411, no. 23–24, pp. 1841–1848, Dec. 14, 2010, doi: 10.1016/j.cca.2010.08.016.
- [34] D. P. Gnanadhas, M. Ben Thomas, R. Thomas, A. M. Raichur, and D. Chakravorty, “Interaction of silver nanoparticles with serum proteins affects their antimicrobial activity in vivo,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, no. 10, pp. 4945–4955, Oct. 2013, doi: 10.1128/AAC.00152-13.
- [35] M. Serhani, H. Essaadi, K. Kassara, and A. Boutoulout, “Control by Viability in a Chemotherapy Cancer Model,” *Acta Biotheor.*, vol. 67, no. 3, pp. 177–200, Sep. 2019, doi: 10.1007/s10441-019-09344-0.
- [36] E. Vlashi and F. Pajonk, “Cancer stem cells, cancer cell plasticity and radiation therapy,” *Seminars in Cancer Biology*, vol. 31. Academic Press, pp. 28–35, Apr. 01, 2015, doi: 10.1016/j.semcancer.2014.07.001.
- [37] M. G. Rolver, L. O. Elingaard-Larsen, and S. F. Pedersen, “Assessing cell viability and death in 3d spheroid cultures of cancer cells,” *J. Vis. Exp.*, vol. 2019, no. 148, Jun. 2019, doi: 10.3791/59714.
- [38] Z. Chen *et al.*, “Anticancer activity of green synthesised AgNPs from *Cymbopogon citratus* (LG) against lung carcinoma cell line A549,” *IET Nanobiotechnology*, vol. 13, no. 2, pp. 178–182, 2019, doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5145.
- [39] P. C, H. RD, D. A, and M. RR, “Introduction to cell culture,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 806, 2012, doi: 10.1007/978-1-61779-367-7_1.
- [40] H. Jariyal, C. Gupta, V. S. Bhat, J. R. Wagh, and A. Srivastava, “Advancements in Cancer Stem Cell Isolation and Characterization,” *Stem Cell Reviews and Reports*, vol. 15, no. 6. Springer, pp. 755–773, Dec. 01, 2019, doi: 10.1007/s12015-019-09912-4.
- [41] M. Ravi, M. K. Sneka, and A. Joshipura, “The culture conditions and outputs from breast cancer cell line in vitro experiments,” *Experimental Cell Research*, vol. 383, no. 2. Elsevier Inc., Oct. 15, 2019, doi: 10.1016/j.yexcr.2019.111548.
- [42] M. S. D’Arcy, “Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy,” *Cell Biology International*, vol. 43, no. 6. Wiley-Blackwell Publishing

Ltd, pp. 582–592, Jun. 01, 2019, doi: 10.1002/cbin.11137.

- [43] G. Majno and I. Joris, “Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death,” *American Journal of Pathology*, vol. 146, no. 1. American Society for Investigative Pathology, pp. 3–15, 1995, Accessed: Apr. 28, 2021. [Online]. Available: [/pmc/articles/PMC1870771/?report=abstract](#).
- [44] A. Strasser and D. L. Vaux, “Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer,” *Molecular Cell*, vol. 78, no. 6. Cell Press, pp. 1045–1054, Jun. 18, 2020, doi: 10.1016/j.molcel.2020.05.014.
- [45] L. M. Valenzuela-Salas *et al.*, “Antiproliferative and antitumour effect of nongenotoxic silver nanoparticles on melanoma models,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2019, 2020, doi: 10.1155/2019/4528241.
- [46] M. Sengani and V. Devi Rajeswari, “Cytotoxicity and apoptotic effect of biogenic silver nanoparticles on human colorectal cell line HT-29,” *Res. J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 9, pp. 65–70, 2016.
- [47] R. A. Hamouda, M. H. Hussein, R. A. Abo-elmagd, and S. S. Bawazir, “Synthesis and biological characterization of silver nanoparticles derived from the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–17, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-49444-y.
- [48] D. Guo *et al.*, “Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 32, pp. 7884–7894, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.015.
- [49] D. Guo *et al.*, “The cellular uptake and cytotoxic effect of silver nanoparticles on chronic myeloid leukemia cells,” *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 10, no. 4, pp. 669–678, Apr. 2014, doi: 10.1166/jbn.2014.1625.
- [50] N. Rajendran, S. Subramaniam, M. R. C. Raja, P. Brindha, S. Kar Mahapatra, and A. Sivasubramanian, “Plant phenyl-propanoids-conjugated silver nanoparticles from edible plant *Suaeda maritima* (L.) dumort. Inhibit proliferation of K562-human myeloid leukemia cells,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 45, no. 7, pp. 1336–1342, Oct. 2017, doi: 10.1080/21691401.2016.1236803.
- [51] P. K. Mukherjee, “Bioassay-Guided Isolation and Evaluation of Herbal Drugs,” in *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*, Elsevier, 2019, pp. 515–537.

- [52] N. F. A.C. Wahab, T. P. Kannan, Z. Mahmood, I. A. Rahman, and H. Ismail, "Methods in Cytotoxicity Testing: A Review," *Recent Patents Mater. Sci.*, vol. 10, no. 1, Apr. 2017, doi: 10.2174/1874464810666170411105114.
- [53] Ö. S. Aslantürk, "In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages," in *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, InTech, 2018.
- [54] L. M. Valenzuela-Salas *et al.*, "New protein-coated silver nanoparticles: Characterization, antitumor and amoebicidal activity, antiproliferative selectivity, genotoxicity, and biocompatibility evaluation," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 1, pp. 1–17, Jan. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13010065.
- [55] S. Alqahtani *et al.*, "Silver nanoparticles exhibit size-dependent differential toxicity and induce expression of syncytin-1 in FA-AML1 and MOLT-4 leukaemia cell lines," *Mutagenesis*, vol. 31, no. 6, pp. 695–702, Nov. 2016, doi: 10.1093/mutage/gew043.
- [56] R. D. Brunning, "Classification of acute leukemias," *Semin. Diagn. Pathol.*, vol. 20, no. 3, pp. 142–153, 2003, doi: 10.1016/S0740-2570(03)00031-5.
- [57] H. Sung *et al.*, "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, Feb. 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [58] K. Juarez-Moreno *et al.*, "Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines," doi: 10.1177/0960327116675206.
- [59] L. M. Valenzuela-Salas *et al.*, "Antiproliferative and antitumour effect of nongenotoxic silver nanoparticles on melanoma models," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2019, 2020, doi: 10.1155/2019/4528241.
- [60] S. Marin *et al.*, "Applications and Toxicity of Silver Nanoparticles: A Recent Review," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 15, no. 16, pp. 1596–1604, Apr. 2015, doi: 10.2174/1568026615666150414142209.
- [61] L. M. Valenzuela-Salas *et al.*, "Antiproliferative and antitumour effect of nongenotoxic silver nanoparticles on melanoma models," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2019, 2020, doi: 10.1155/2019/4528241.

- [62] K. Sooklert *et al.*, “Molecular and morphological evidence of hepatotoxicity after silver nanoparticle exposure: A systematic review, in silico, and ultrastructure investigation,” *Toxicol. Res.*, vol. 35, no. 3, pp. 257–270, 2019, doi: 10.5487/TR.2019.35.3.257.
- [63] R. Silber *et al.*, “Chemosensitivity of lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia to chlorambucil, fludarabine, and camptothecin analogs,” *Blood*, vol. 84, no. 10, pp. 3440–3446, Nov. 1994, doi: 10.1182/blood.v84.10.3440.3440.