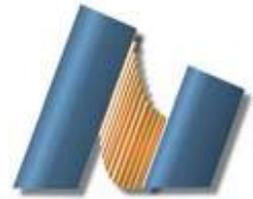




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA**



**LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA  
(AgNPs) EN CÉLULAS DE CÁNCER CERVICOUTERINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

ERICK EDUARDO BAUTISTA GONZÁLEZ

**DIRECTORA DE TESIS:**

DRA. KARLA OYUKY JUARÉZ MORENO

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

DR. ALEJANDRO HUERTA SAQUERO

DRA. NINA BOGDANCHIKOVA

**SUPLENTE:**

DR. JOSUÉ DAVID MOTA MORALES

DRA. SHAMAYIM TABITA RAMIRÉZ PUEBLA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, NOVIEMBRE 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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

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

---

*Erick Eduardo Bautista González*

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del Grupo de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno.

Este trabajo fue financiado por el Proyecto CONACYT 260409 de la Red Internacional de Bionanotecnología con impacto en Biomedicina, Alimentación y Bioseguridad bajo la responsabilidad técnica de la Dra. Nina Bogdanchikova.

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron los efectos citotóxicos de diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (AgNPs) en células de cáncer cervicouterino HeLa, durante tiempos de incubación de 12 y 24 horas. Para evaluar los efectos de las concentraciones de AgNPs, se hicieron diluciones partir de la solución Argovit™ considerando una concentración inicial de 12 µg/ml de plata metálica.

El efecto citotóxico de las nanopartículas de plata se evaluó mediante ensayos colorimétricos de viabilidad celular por MTT, rojo neutro y azul tripano. Además, la integridad morfológica de las células fue observada con ayuda de un microscopio óptico invertido.

Los ensayos de viabilidad celular por MTT y rojo neutro mostraron que la incubación con AgNPs durante 12 horas no afecta la viabilidad celular del mismo modo que la incubación durante 24 horas, la cual ocasiona la pérdida total de la viabilidad celular en concentraciones de 10 µg/ml de plata metálica. Se determinó que la dosis letal media es de aproximadamente 2.8 µg/ml de plata metálica.

A partir de este trabajo es posible concluir que existe una dependencia directamente proporcional entre el tiempo de exposición y los efectos citotóxicos que provocan las AgNPs.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de tesis nunca hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas. En estas cuantas líneas quiero agradecerles por el apoyo que me han brindado.

A mi directora de tesis, la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno, que a lo largo de estos meses me ha guiado, apoyado y tenido paciencia. A los miembros del comité tutor, por las correcciones y sugerencias que me han brindado.

A mis profesores de la licenciatura, al grupo de Bionanotecnología del CNYN, a la Red Internacional de Bionanotecnología con impacto en Biomedicina, Alimentación y Bioseguridad, así como a todas las personas que han aportado parte de su tiempo para brindarme su asesoría.

Al apoyo brindado para realizar este trabajo de investigación, a través del proyecto de CONACYT: 260409.

A mis compañeros de licenciatura, estén donde estén, por el tiempo que compartí con ellos tanto en lo académico como en las conversaciones y los ratos de diversión que tuvimos a lo largo de cuatro años.

A mi familia: hermanos, tías y abuelas que siempre me han apoyado y estado al pendiente de mí. A mis padres, gracias por el apoyo y amor incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida. Gracias por aconsejarme, escucharme y porque a pesar de la distancia siempre han estado a mi lado en todo momento. En fin, estas palabras no serán suficientes para expresar mi aprecio y agradecimientos a mi familia.

A todos ustedes, gracias.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE.....	VI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. El cáncer como problema de salud pública.....	1
1.1.1. Estadísticas mundiales del cáncer.....	2
1.1.2. Estadísticas del cáncer en México.....	3
1.2. Tratamientos convencionales contra el cáncer .....	4
1.3. La nanotecnología para el tratamiento contra el cáncer.....	5
1.4. Aspectos toxicológicos de los nanomateriales.....	6
1.5. Las nanopartículas de plata.....	8
1.5.1. Síntesis de las nanopartículas de plata .....	9
1.5.2. Aplicaciones de las nanopartículas de plata .....	10
1.5.3. Estudios sobre la toxicidad de las nanopartículas de plata .....	10
1.6. Cultivos celulares.....	12
1.6.1. Células HeLa .....	13
1.7. Justificación .....	14
1.8. Hipótesis.....	15
1.9. Objetivo general.....	15
1.10. Objetivos específicos.....	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1. Mantenimiento de la línea celular .....	16
2.1.1. Subcultivo de células HeLa (Trypsinización).....	16
2.2. Preparación de las AgNPs con diferentes concentraciones de plata metálica .....	17
2.3. Ensayos de viabilidad celular.....	19
2.3.1. Ensayo MTT .....	19
2.3.2. Ensayo por exclusión de rojo neutro.....	20
2.3.3. Ensayo por exclusión del azul tripano.....	21

3.	RESULTADOS .....	23
3.1.	Ensayo MTT .....	23
3.2.	Ensayo por exclusión del rojo neutro.....	25
3.3.	Ensayo por exclusión del azul tripano.....	27
4.	DISCUSIÓN.....	30
5.	CONCLUSIONES .....	33
6.	PERSPECTIVAS .....	34
7.	REFERENCIAS.....	35

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### Índice de Tablas

<b>Tabla I.</b> Concentraciones de AgNPs utilizadas para los ensayos MTT y rojo neutro.....	18
<b>Tabla II.</b> Concentraciones de AgNPs utilizadas para la tinción con azul tripano .....	18

### Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Porcentajes de mortalidad por cáncer en México durante el año 2010. Perfiles de país. Enfermedades no transmisibles. Organización Panamericana de la Salud (OPS/PAHO, 2012).....	3
<b>Figura 2.</b> Nanopartículas de plata Argovit. ....	18
<b>Figura 3.</b> Citotoxicidad de las nanopartículas de plata en células de cáncer cervicouterino (HeLa) después de 12 horas de exposición determinada por medio del ensayo MTT. ....	24
<b>Figura 4.</b> Citotoxicidad de las nanopartículas de Ag en células de cáncer cervicouterino (HeLa) después de 24 horas de exposición determinada por medio del ensayo de MTT.....	25
<b>Figura 5.</b> Determinación de la citotoxicidad de las AgNPs en células de cáncer cervicouterino (HeLa) después de 12 horas de exposición por medio del ensayo del rojo neutro. ....	26
<b>Figura 6.</b> Citotoxicidad de las nanopartículas de plata en células de cáncer cervicouterino (HeLa) después de 24 horas de exposición determinada por medio del ensayo del rojo neutro .....	27
<b>Figura 7.</b> Citotoxicidad de las AgNPs en células de cáncer cervicouterino (HeLa) mediante la tinción con azul tripano.....	28
<b>Figura 8.</b> Células de cáncer cervicouterino (HeLa) expuestas a AgNPs durante 12 horas Observadas por microscopía óptica.....	29
<b>Figura 9.</b> Células de cáncer cervicouterino (HeLa) expuestas a AgNPs durante 24 horas. Observadas por microscopía óptica.....	29

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El cáncer como problema de salud pública

El cáncer es un término que agrupa varias enfermedades similares. Todos los tipos de cáncer consisten en la producción sin control de células en un tejido inicial. Esta producción excesiva de células genera tumores que pueden invadir otros tejidos y órganos si no son tratados a tiempo (INEGI, 2014). El proceso de transformación de una célula normal a una tumoral se produce a través de mutaciones en el ADN de una célula, que a su vez transmite esas alteraciones a sus descendientes. Estas modificaciones suelen producirse en varias fases y consisten en la progresión de una lesión pre-cancerosa a un tumor maligno debido a la desactivación de los mecanismos de control celular (Massagué, 2008).

Generalmente las mutaciones pueden tardar varios años en desarrollarse, razón por la cual la incidencia de cáncer aumenta con la edad. Aunque las alteraciones en el ADN pueden heredarse en el momento de la concepción, hay factores externos que incrementan las probabilidades de desarrollar algún tipo de cáncer. Se pueden clasificar los factores externos en tres categorías (Hanahan, 2000):

- Carcinógenos físicos, como fuentes de radiación ionizante o ultravioleta.
- Carcinógenos químicos, como el asbesto, algunos compuestos del humo de cigarro o el arsénico.
- Carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus (Papiloma o Hepatitis B y C), bacterias (*Helicobacter pylori*) o parásitos.

Asimismo, el envejecimiento es un factor importante en la aparición de cáncer. La probabilidad de contraer algún tipo de cáncer aumenta con la edad debido al aumento de mutaciones en el ADN acumuladas durante el ciclo de vida, a la pérdida de la eficiencia en los mecanismos de reparación celular y al debilitamiento del sistema inmunológico (Jemal, 2011).

### **1.1.1. Estadísticas mundiales del cáncer**

Actualmente el cáncer se encuentra entre las principales causas de muerte a nivel mundial. Se encuentra por detrás de las enfermedades cardiovasculares en países desarrollados y de las enfermedades infecciosas en los países en desarrollo (OMS, 2012). Las estadísticas sugieren que el número de casos reportados ha aumentado debido al envejecimiento de la población, así como a la adopción de estilos de vida sedentarios y hábitos alimenticios poco saludables (Jemal, 2011). Los tipos de cáncer más frecuentes son el cáncer de pulmón, hígado, estómago, colon, mama y de esófago (Jemal, 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), indicó que en el año 2012 fallecieron aproximadamente 8.2 millones de personas debido a algún tipo de cáncer, lo cual representó el 14.6 % del total de muertes en ese año (OMS, 2014). Se estima que para el año 2030, la cifra de defunciones aumentará a 13.1 millones por año y que el cáncer será la principal causa de muerte (Jemal, 2011).

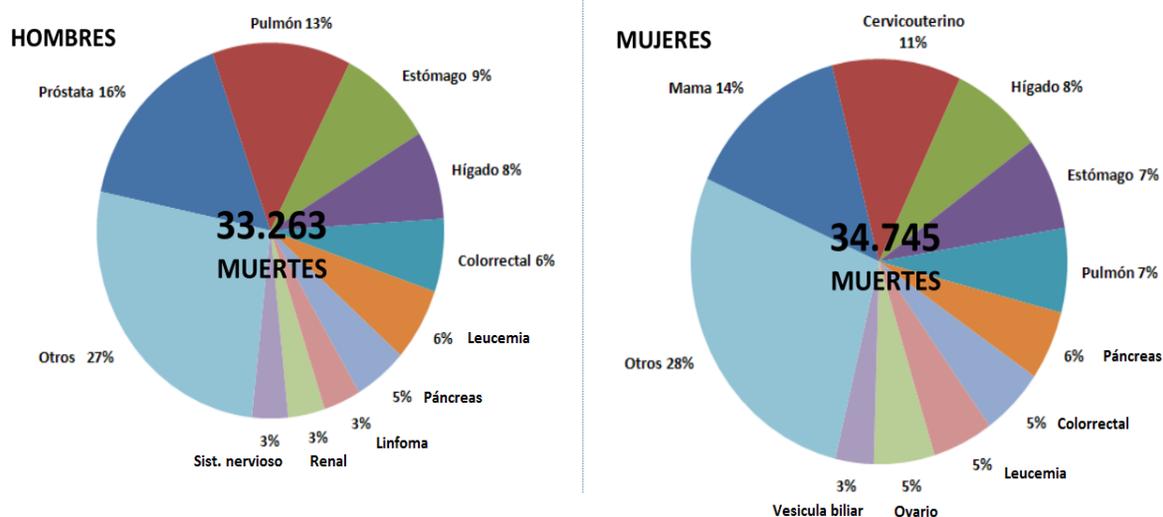
La esperanza de sobrevivida es menor en países en desarrollo debido a que el diagnóstico del cáncer se da en etapas más avanzadas de la enfermedad a diferencia de los países desarrollados, en cuyo caso el acceso a los servicios médicos es mayor y, por lo tanto, la detección se produce en etapas más tempranas de la enfermedad (Sankaranarayanan, 2010).

### 1.1.2. Estadísticas del cáncer en México

En México, el cáncer se encuentra en el tercer lugar como causa de muerte. Según datos de la Secretaría de Salud, cada año se registran más de 128,000 casos nuevos en todo el país y el 60% se detecta en etapas avanzadas de la enfermedad (Secretaría de Salud, 2013).

En la población infantil los tipos de cáncer que predominan son la leucemia, los linfomas y sarcomas mientras que en la población adulta los tipos más frecuente son el de próstata, mama, cervicouterino, pulmón y de estómago (INEGI, 2014). La figura 1 muestra los porcentajes de mortalidad para los tipos más frecuentes de cáncer de acuerdo con el sexo.

#### PERFIL DE MORTALIDAD POR CÁNCER (2010)



**Figura 1. Porcentajes de mortalidad por cáncer en México durante el año 2010. Perfiles de país. Enfermedades no transmisibles. Organización Panamericana de la Salud (OPS/PAHO, 2012)**

Aunque las instituciones de salud pública se esfuerzan por diagnosticar y atender a las personas con cáncer, muchos mexicanos mueren anualmente a causa de esta enfermedad. En el 2012 del total de muertes, el 13% fue debido a algún tipo de cáncer.

## 1.2. Tratamientos convencionales contra el cáncer

Las tasas de curación del cáncer a principios y mediados del siglo XX mediante el uso de la cirugía no fueron altas y no fue sino hasta hace unos cincuenta años que hubo un progreso significativo en la investigación del cáncer. La implementación de la quimioterapia y la radioterapia fue un gran avance para su tratamiento ya que creó nuevas posibilidades para atacar a los tumores más eficientemente en conjunto con la cirugía (Strebhardt, 2008).

Algunos de los tratamientos convencionales para el cáncer son:

- **Cirugía.** Durante muchos años la cirugía fue el único tratamiento para erradicar el cáncer. Suele utilizarse cuando el cáncer se encuentra localizado en una sola parte del cuerpo y es posible extraerlo por completo. Sin embargo, muchos tumores son imposibles de extirpar o se han extendido por todo el organismo.
- **Radioterapia.** Utiliza partículas u ondas de alta energía (Rayos X, gamma o de electrones y/o protones) dirigidas a una parte o a todo el cuerpo para eliminar o dañar las células cancerosas. Es uno de los tratamientos más comunes y suele administrarse junto con medicamentos que hacen a las células más sensibles a la radiación.
- **Quimioterapia.** Mientras que la cirugía y la radioterapia suelen enfocarse en una sola parte del cuerpo, la quimioterapia actúa en todo el organismo por lo que puede destruir las células cancerosas que han invadido otras partes del cuerpo. El tratamiento consiste en la administración de distintos medicamentos con el fin de aumentar la eficiencia en la destrucción de las células cancerosas y de reducir las probabilidades de que el cáncer se vuelva resistente a un tipo de medicamento en específico (American Cancer Society, 2014).

Aunque los tratamientos convencionales han mejorado su tasa de éxito, falta mucho para encontrar una cura segura y 100% eficaz. También se sabe que estos tratamientos tienen varios efectos secundarios que reducen la calidad de vida de los pacientes debido a que afectan no solo a las células cancerosas sino también al tejido sano (Cravo, 2013). Es por esto que desde hace años la investigación contra el cáncer ha recurrido a nuevas

tecnologías y métodos para encontrar la cura a esta enfermedad que aqueja a millones de personas en todo el mundo.

### **1.3. La nanotecnología para el tratamiento contra el cáncer.**

En años recientes la nanotecnología ha cobrado importancia dentro del área de investigación y desarrollo médico debido al gran potencial que tiene para mejorar aspectos como la entrega de fármacos en el organismo, la detección de enfermedades y la obtención de imágenes de relevancia clínica (Gallego, 2006). Para lograr esto, se fabrican materiales de escala nanométrica ya que se sabe que, al alcanzar dicha escala muestran nuevas propiedades tales como las ópticas, térmicas, eléctricas o magnéticas (Grainger, 2008).

En la investigación contra el cáncer las aportaciones de la nanotecnología pueden clasificarse en dos áreas: a) el desarrollo de nanopartículas que pueden utilizarse como fármacos dirigidos al tejido canceroso y b) como sensores con la capacidad de detectar cáncer en etapas tempranas de la enfermedad. La combinación de estas propiedades puede conducir a una detección oportuna, mejor monitoreo y tratamiento. Además, de la reducción de efectos secundarios adversos en comparación con los tratamientos convencionales (Janát, 2014).

- **Detección y monitoreo de enfermedades.** La nanotecnología plantea la posibilidad de detectar una gran variedad de señales y marcadores biológicos con los cuales la detección de enfermedades podría hacerse en etapas tempranas y a bajas concentraciones de dichos marcadores. Existen varios dispositivos que pueden utilizarse para la detección y el monitoreo del cáncer, entre los cuales se incluyen nanoalambres con la capacidad de detectar genes alterados asociados al desarrollo del cáncer, cantilévers que pueden detectar cantidades muy pequeñas de moléculas en fluidos biológicos y puntos cuánticos que debido a su fluorescencia y fotoestabilidad pueden ser utilizados como agentes de contraste en la obtención de imágenes y que permiten visualizar ciertos tipos de células y moléculas en el organismo (Janát,2014).

- **Entrega de fármacos.** Hay dos tipos de aproximaciones que tiene la nanotecnología para la entrega de medicamentos. La primera utiliza nanopartículas orgánicas en cuyo interior se localiza el químico de interés mientras que la segunda utiliza nanopartículas inorgánicas que tienen el fármaco sobre la superficie junto con agentes que los dirigen a las células cancerosas (Gallego, 2006).

#### **1.4. Aspectos toxicológicos de los nanomateriales**

Se dice que la nanotecnología está generando una revolución que traerá avances a gran escala en diversas áreas de nuestras vidas tales como la ingeniería, la computación y la salud. Sin embargo, para que la nanotecnología cumpla con estas expectativas es necesario que se establezca una producción a gran escala y que se conozcan los posibles riesgos de estas tecnologías (Donaldson, 2004).

Actualmente se produce un amplio rango de nanopartículas y nanomateriales con diferentes propiedades de interés. Nanomateriales como las nanopartículas metálicas, películas delgadas, nanotubos de carbono y óxidos (óxido de titanio, óxido de silicio, etc.) se utilizan cada vez más en la producción industrial, así como en la investigación científica, biológica y médica (Donaldson, 2012). Aunque hasta ahora la exposición a los nanomateriales parece no tener riesgos sobre la salud pública y el ambiente, esto puede cambiar en el futuro debido a que se incrementará la producción y surgirán nuevos nanomateriales (Colvin, 2003).

En la industria farmacéutica ya existen algunos productos a base de nanomateriales que han sido aprobados para uso clínico. Cabe mencionar que a pesar de su aprobación todavía no existe una reglamentación clara y eficaz para determinar su biocompatibilidad y toxicidad (Dobrovolskaia, 2007). Por esta razón algunos investigadores han decidido estudiar sus efectos para determinar la repercusión que podría tener la liberación de los nanomateriales sobre el ambiente y la salud. La mayoría de las investigaciones se han enfocado en los nanomateriales a base de carbono, puntos cuánticos y partículas metálicas.

No obstante, otros nanomateriales se han dejado a un lado y no han recibido suficiente atención (Chang, 2007).

Se ha comprobado que la exposición de células animales a partículas de polvo de origen mineral como el carbón o los silicatos, fibras de asbesto y óxido de titanio producen lesiones en los pulmones, inflamación, fibrosis y citotoxicidad (Sohaebuddin, 2010). Se ha observado que las nanopartículas tienen mayor capacidad de viajar a través de un organismo que otros materiales o partículas más grandes. Otras nanopartículas tienen la capacidad de entrar al sistema sanguíneo o al sistema nervioso, donde existe el riesgo de que alteren las funciones cerebrales y cardíacas (Nel, 2006). Además de su posible acumulación en el organismo, los nanomateriales pueden activar procesos inflamatorios o respuestas inmunológicas y se ha observado que varios materiales no tóxicos en la macroescala se vuelven tóxicos cuando se reducen a la nanoescala.

Existe un aspecto que dificulta la investigación toxicológica de los nanomateriales y, es que distintos grupos de investigación han reportado que los efectos tóxicos de un nanomaterial pueden variar de acuerdo al tipo de línea celular o ambiente sobre el cual se evalúan (Sohaebuddin, 2010). Esto implica que hay muchos factores a considerar como el tamaño, forma, composición o la estructura cristalina, antes de determinar si un nanomaterial es tóxico o inocuo, razón por la cual algunos investigadores sugieren que los estudios toxicológicos deben ser específicos para cada lote de nanomaterial en lugar de generalizar los resultados (SCENIHR, 2006) así como desarrollar un método de síntesis con el cual, el tamaño, morfología, estabilidad y propiedades de los nanomateriales se puedan controlar (Wiley, 2007). Este problema debe solucionarse pronto debido a que la nanotecnología se ha desarrollado y expandido rápidamente en muy poco tiempo por lo que es necesario comprender los mecanismos de acción de los nanomateriales en las células y tejidos de los organismos ya que esta información ayudará al desarrollo de nanopartículas más seguras y eficaces, además de acelerar la implementación de la nanotecnología en las distintas áreas de la sociedad.

Por los motivos anteriores, varios investigadores han propuesto una subcategoría de la toxicología, la nanotoxicología, encargada de determinar los efectos tóxicos de la gran variedad de nanomateriales existentes, de la implementación de protocolos de seguridad y del manejo apropiado de los nanomateriales (Oberdörster, 2004). En algunos casos se planean modificar los procedimientos ya establecidos por la toxicología convencional, pero con énfasis en la comprensión de la relación entre tamaño y el área superficial de los materiales, así como su acumulación y desplazamiento (Donaldson, 2004).

### **1.5. Las nanopartículas de plata**

La plata es un metal dúctil y maleable, tiene la conductividad eléctrica y térmica más alta de todos los metales. Junto con el oro, a lo largo de la historia se ha usado principalmente en joyería, utensilios, divisas monetarias, aleaciones dentales, fotografía, explosivos y en menor medida por sus propiedades antimicrobianas (Chen, 2008). Se sabe que la liberación de iones provenientes de los diferentes compuestos de plata, puede dañar organismos como algas, hongos, bacterias y virus al limitar su capacidad de crecimiento (Wijnhoven, 2009).

Aunque por sí sola, la plata como material en bulto resulta de interés por su actividad antimicrobiana, no ha sido sino hasta la producción de compuestos de plata de tamaño nanométrico que se ha extendido su uso en una gran variedad de productos. Se ha comprobado que la plata es mucho más eficiente como agente microbiano a nanoescala que como material en bulto (Marambio-Jones, 2010). El mecanismo por el cual se presenta la actividad antimicrobiana todavía es desconocido, aunque se ha sugerido que es debido a las interacciones de los iones de plata con los grupos tiol de las proteínas necesarias para la respiración celular (Cho et al, 2005).

### 1.5.1. Síntesis de las nanopartículas de plata

Existen muchos métodos para producir nanopartículas de plata (AgNPs por sus siglas en inglés), que pueden clasificarse en tres categorías: métodos físicos, químicos y biológicos.

Los métodos físicos generalmente utilizan ciclos de evaporación y condensación para lograr la síntesis de nanopartículas. En el proceso conocido como condensación física de vapor, se coloca un material precursor en un horno tubular a presión atmosférica. El material precursor se vaporiza y se convierte en un gas portador que al condensarse forma nanopartículas de tamaño pequeño en una alta concentración (Kholoud, 2010).

La ablación láser es otro método físico que suele utilizarse para sintetizar nanopartículas. Se coloca el material en bulto y se evapora al hacer incidir un haz de láser. Se ha comprobado que las características de las nanopartículas sintetizadas por este método dependen de parámetros como la longitud de onda del láser, la duración del pulso y la presencia o ausencia de agentes tensoactivos (Mafuné, 2000).

Por otro lado, los métodos químicos hacen uso de precursores metálicos, agentes reductores y agentes estabilizadores para sintetizar AgNPs. La técnica más utilizada consiste en la reducción de una sal de plata disuelta en agua con un agente reductor como el borohidrato de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), citrato, glucosa, hidracina o el ascorbato (Marambio-Jones, 2010). Se sabe que los agentes reductores fuertes tienden a producir nanopartículas de tamaño pequeño a comparación de los reductores débiles en cuyo caso el tamaño de las nanopartículas es mayor y más variado. Para producir nanopartículas de tamaño específico generalmente se utiliza un método de dos pasos que consiste en la preparación del núcleo de la partícula mediante la acción de un agente reductor fuerte, seguido por el crecimiento controlado mediante el uso de un agente débil (Shirtcliffe, 1999).

El método Tollens es otro proceso en el cual se produce la reducción de una solución de amoníaco y plata con el uso de un aldehído para producir nanopartículas. Este método puede modificarse; al reducir cationes  $\text{Ag}^+$  mediante el uso de sacáridos y en presencia de

amonio, se obtienen películas de nanopartículas cuyo tamaño varía entre los 50 y 200 nm (Panacek et al, 2006).

Otro método químico permite sintetizar AgNPs al irradiar soluciones de sales de plata que contienen agentes reductores y estabilizadores. Las fuentes de radiación suelen ser láseres, microondas y radiación ionizante (Marambio-Jones, 2010).

Por último, los métodos biológicos para la producción de AgNPs utilizan compuestos extraídos de algunos organismos (generalmente plantas) como reductores o estabilizadores (Liuya et al, 2015). Esos extractos incluyen proteínas, aminoácidos, polisacáridos y vitaminas. Adicionalmente, algunos microorganismos como las bacterias *Pseudomonas stutzeri*, *Shewanella oneidensis* o *Bacillus licheniformis* tienen la capacidad de sintetizar AgNPs como resultado de sus actividades metabólicas (Iravani, 2014).

### **1.5.2. Aplicaciones de las nanopartículas de plata**

Actualmente existe una gran variedad de nanomateriales hechos a base plata tales como nanopartículas metálicas, partículas de cloruro de plata, zeolitas impregnadas con plata, dendrímeros, películas y recubrimientos. Estos materiales pueden insertarse fácilmente en sustratos metálicos, cerámicos, poliméricos, de vidrio y textiles (Wijnhoven, 2009), por lo que se han implementado fácilmente en productos industriales y de consumo.

Los productos que implementan nanopartículas de plata son variados e incluyen áreas de la vida cotidiana y la medicina. Existen en el mercado detergentes, pinturas, ropa, aparatos electrodomésticos, dispositivos anticonceptivos, vendajes, así como instrumentos quirúrgicos e implantes y prótesis con recubrimientos de AgNPs (Arora, 2008).

### **1.5.3. Estudios sobre la toxicidad de las nanopartículas de plata**

Se estima que la producción de nanopartículas de plata en el año 2009 fue de 320,000 kg a nivel mundial y se espera que la producción se incremente debido a la comercialización de nuevos productos que utilizan AgNPs en su fabricación, así como su creciente demanda en el mercado. Distintas organizaciones gubernamentales y de carácter

público han comenzado a preocuparse por los efectos que las AgNPs pudieran tener sobre la salud pública ya que cabe la posibilidad de que el riesgo toxicológico debido a las nanopartículas sea de 100 a 10,000 veces mayor en comparación con la plata como material en bulto debido a una mayor área superficial. (Crocetti, 2011). Como consecuencia se han publicado muchos estudios que investigan los efectos de varios tipos de nanopartículas de plata sobre diferentes sistemas y organismos (Park et al, 2011).

Existen varias investigaciones que han evaluado los efectos de diferentes AgNPs sobre distintas líneas celulares de cáncer, como la de carcinoma de pulmón A549, la de cáncer cervicouterino HeLa, la de cáncer de mama MCF-7 y la de hepatocarcinoma HepG2. También se han utilizado líneas celulares no cancerosas como células madre mesenquimales, fibroblastos y macrófagos de ratón.

La investigación hecha por Nana Asare et al (2012) mostró que las AgNPs presentan mayor toxicidad que las nanopartículas de óxido de Titanio (TiO<sub>2</sub>-NPs) sobre células testiculares de ratón (Línea celular NT2), además encontraron que los efectos que causan apoptosis, necrosis y disminuyen la proliferación celular son dependientes de la concentración y del tiempo de exposición (Asare, 2012).

Por otro lado, el grupo de Magriet Park (2011) evaluó la influencia del tamaño de las nanopartículas de plata (20, 80 y 113 nm) sobre fibroblastos de ratón (Línea celular L929) y en macrófagos (Línea celular RAW 264.7). Encontraron que todas las nanopartículas causaron efectos en la actividad metabólica de las células, así como daño en la membrana. Sin embargo, lo más relevante fue que se encontró que las nanopartículas con un tamaño de 20 nm son más tóxicas que los iones de plata para los fibroblastos L929, pero no para los macrófagos RAW 264.7 (Park, 2011).

Otro estudio hecho por Kaur et al (2013) encontró que la toxicidad de las AgNPs también depende del método de síntesis, así como del tipo de células que se utilizan para evaluar los efectos. Se observó que las AgNPs son tóxicas para la línea celular de carcinoma epitelial humano A431, la línea celular de carcinoma de pulmón A549 y para los macrófagos RAW 264.7. Además, encontraron que las AgNPs sintetizadas por el método de reducción

con ácido tánico son más tóxicas que las sintetizadas por el método de reducción del borohidruro. Por último, encontraron cambios en la expresión de la proteína P38 de las células A431, lo cual sugiere que las AgNPs tienen la capacidad de dañar al ADN (Kaur, 2013).

En otra investigación, hecha por el grupo de Mukherjee et al. se utilizaron dos líneas celulares de cáncer (HaCat y HeLa) y se planteó la posibilidad de que las AgNPs interactúan con el medio de cultivo y provocan efectos secundarios sobre las células. De manera similar a otros estudios, encontraron que los efectos de las AgNPs son dependientes de la dosis, el tiempo de exposición y de la línea celular evaluada. Entre los efectos que registraron se encuentra la inhibición de glutatión, daño a la membrana celular y estrés oxidativo (Mukherjee, 2011).

Por último, la investigación hecha por el grupo de Beer en el 2011 comparó los efectos de las AgNPs con la de iones de plata sobre células de carcinoma de pulmón A549. Encontraron que a altas concentraciones de iones ( $\geq 5.5\%$ ), las AgNPs no aumentan la toxicidad de manera significativa mientras que a concentraciones bajas ( $\leq 2.6\%$ ), las AgNPs son más tóxicas que los iones. Esto sugiere que la cantidad de iones de plata, presente en las preparaciones de AgNPs, tiene un rol importante sobre la toxicidad de las suspensiones de AgNPs.

Como se ha descrito, a pesar del gran potencial de las AgNPs para su implementación en aplicaciones médicas, es necesario que se comprenda su impacto sobre la salud humana antes de que se extienda su uso (Liuya et al, 2015).

## **1.6. Cultivos celulares**

Los cultivos celulares son una gran herramienta para la investigación en muchos campos de la ciencia. Hoy en día gracias al desarrollo de las técnicas de cultivo celular, muchos aspectos de la investigación involucran el uso de células de mamíferos como sistemas modelo *in vitro*, substratos para virus y para la producción de productos terapéuticos y de diagnóstico en la industria farmacéutica (Meleady, 2006).

Existen dos tipos de cultivo *in vitro*: en suspensión (células individuales o en pequeños cúmulos) o adherentes (monocapa adherida a la superficie de la caja de cultivo). Las líneas celulares requieren de condiciones específicas para su desarrollo por lo que el medio de cultivo a utilizar debe imitar las condiciones fisiológicas presentes en los tejidos de origen. El cultivo celular también requiere de un ambiente estéril debido a que la cantidad de nutrientes para el metabolismo celular, así como el pH y la temperatura de incubación utilizada proporcionan el medio óptimo para el desarrollo de una gran variedad de microorganismos que contaminan los cultivos celulares (Meleady, 2006).

Comercialmente, existen disponibles distintas formulaciones de medio de cultivo que varían en la complejidad de sus nutrientes y que han sido desarrollados para el mantenimiento de distintos tipos de líneas celulares. Entre los medios de cultivo más utilizados se encuentran: Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), RPMI 1640 y Ham's F12 (Meleady, 2006).

### **1.6.1. Células HeLa**

Las células HeLa son una población celular que proviene del tejido canceroso de cérvix. Se considera que esta fue la primera línea celular humana en ser cultivada con éxito en el laboratorio y se tomó el nombre de HeLa a partir de las dos primeras letras del nombre de Henrietta Lacks, la paciente a partir de la cual se extrajeron muestras del tumor cervical que la aquejaba. Estas células fueron cultivadas por el investigador George Gey en 1951. Él observó que mientras las células de tejidos normales morían en un corto plazo, las obtenidas del tejido canceroso seguían creciendo y reproduciéndose indefinidamente. Esta es una característica de las células cancerosas que se debe a modificaciones en el ADN que inhabilitan los procesos de muerte celular programada. Bajo las condiciones adecuadas se dice que las células cancerosas son inmortales (Freeman, 2014).

Actualmente, la línea celular HeLa se ha convertido en una de las más utilizadas en los laboratorios de todo el mundo y se ha convertido en un modelo para los desarrollos experimentales en la investigación contra el cáncer y en el desarrollo de vacunas. Una de

las primeras aplicaciones de las células HeLa fue en la creación de vacunas contra la poliomielitis, el estudio de la tuberculosis, el virus del papiloma humano y del VIH. También se han usado para probar medicamentos contra el cáncer y el mal de Parkinson, así como para probar productos cosméticos (Masters, 2002).

### **1.7. Justificación**

Por los motivos anteriores es que existe el interés por estudiar la toxicidad de las AgNPs ya que además de conocer los efectos que tienen sobre células humanas. Se pretende conocer los mecanismos de muerte celular que pueden provocar y los diferentes efectos al exponer células de cáncer a distintos tiempos de exposición. Con esta información es posible que en el futuro se puedan aprovechar dichos mecanismos para el desarrollo de un tratamiento que elimine células cancerosas sin que se afecte al tejido sano.

### **1.8. Hipótesis**

La citotoxicidad de las nanopartículas de plata sobre las células cancerosas HeLa es dependiente del tiempo y de la dosis.

### **1.9. Objetivo general**

Evaluar los efectos de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa mediante ensayos de citotoxicidad.

### **1.10. Objetivos específicos**

- a) Reactivar y mantener en cultivo la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa
- b) Evaluar el efecto citotóxico en células HeLa expuestas a distintas concentraciones de nanopartículas de plata, mediante ensayos colorimétricos de viabilidad celular.
- c) Observar la morfología por microscopía óptica de las células HeLa expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Mantenimiento de la línea celular**

Para el mantenimiento de la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa (ATCC CCL-2) se utilizó el medio de cultivo DMEM de Sigma-Aldrich (Cat. D777) que contiene sales inorgánicas, aminoácidos esenciales, vitaminas, glucosa y rojo fenol. El medio se preparó al disolver un sobre con 13.5 g de DMEM en polvo en 1 litro de agua desionizada y previamente esterilizada. Además, se le agregaron 10 ml de L-glutamina (Sigma-Aldrich Cat. G6392), 10 ml de solución antibiótica/antimicótica (Sigma-Aldrich Cat. A5955) y 100 ml de suero bovino fetal (Bench-Mark Gemini, Bio-Products, USA). Los componentes adicionales se agregaron para enriquecer el medio de cultivo y el antibiótico para evitar la contaminación por microorganismos.

Los cultivos se hicieron en placas de cultivo celular de 5 y 10 cm debido a que las células HeLa son del tipo adherente. Se cambiaron a una nueva placa cada tercer día, cuando las células habían cubierto entre el 70 y 90% de la superficie de la caja de cultivo. Este procedimiento que se conoce como subcultivo involucra el desprendimiento de la monocapa en la superficie de la caja, así como la ruptura de las uniones intercelulares y extracelulares. Para lograr dicho desprendimiento se utilizó tripsina/EDTA que es una enzima proteolítica que rompe los enlaces de unión de las células.

#### **2.1.1. Subcultivo de células HeLa (Tripsinización)**

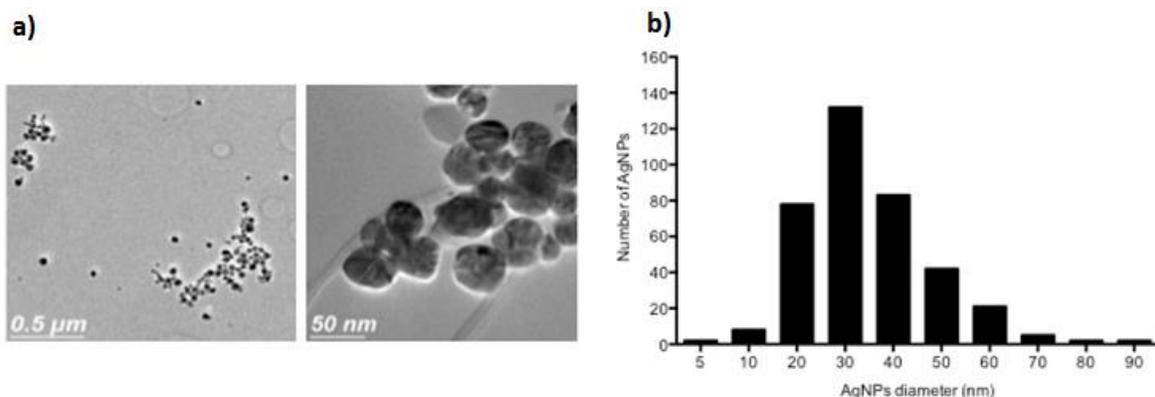
El procedimiento utilizado para los subcultivos de células HeLa es el siguiente: Se retiró el medio de cultivo de las cajas Petri, se enjuagó la caja con 1 ml de PBS y se agregaron 600 µl de tripsina/EDTA e inmediatamente se incubaron las cajas a 37° C durante 2 minutos. Se verificó que las células se despegaran por completo de la superficie de la caja al verla a contraluz y luego se agregó 1 ml de PBS. Se recuperaron las células en un tubo cónico de 15 ml y se aforó con medio de cultivo a 10 ml para interrumpir la acción de la tripsina/EDTA. Posteriormente se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se desechó

el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo. Se tomaron 300  $\mu$ l de las células resuspendidas y se colocaron en una caja de cultivo nueva con 5 ml de medio de cultivo para las cajas de 5 cm y con 10 ml de medio para las de 10 cm. Por último, se colocaron las cajas en la incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Todo el procedimiento se hizo bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel A2.

## **2.2. Preparación de las AgNPs con diferentes concentraciones de plata metálica**

Las nanopartículas de plata fueron proporcionadas por la Dra. Nina Bogdanchikova del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la UNAM. Proviene del Centro de Investigación y Desarrollo Vector-Vita, Rusia. Tienen un tamaño promedio de 30 $\pm$ 5 nm y un diámetro hidrodinámico de 70 nm. La solución de nanopartículas de plata Argovit™ es una solución al 20% (de peso) de AgNPs que consiste en 1.2% de plata metálica y que se encuentran recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) al 18.8%. La concentración de plata metálica de la preparación Argovit™ es de 12  $\mu$ g/ $\mu$ l. A partir de la solución con la concentración de plata metálica antes mencionada se hicieron todas las diluciones de trabajo, que desde ahora se considerarán como las concentraciones de AgNPs.

Hasta la fecha, las nanopartículas de plata Argovit™, son las únicas nanopartículas de plata que cuentan con certificados internacionales de instancias gubernamentales para su uso en aplicaciones médicas. Por ejemplo, cuentan con el Certificado del dispositivo médico: esponja hemostática bioabsorbible para uso interno y externo de cuerpo humano, otorgado por el Servicio Federal de Vigilancia en Salud y Desarrollo Social en Rusia, con número de registro 2011/10301 FSP, desde el 27 de enero de 2014 sin límite de caducidad durante todo el tiempo de producción del dispositivo. Y el Certificado de Conclusión Sanitario-Epidemiológico para productos cosméticos con aplicación de gel y crema con base en Argovit, con número de registro N1324458, otorgado por el Servicio Federal de Regulación Técnica y Metrología, Rusia desde el 23 de octubre de 2013 hasta el 22 de octubre de 2016.



**Figura 2. Nanopartículas de plata Argovit.** a) Observadas por microscopía electrónica de transmisión. b) Histograma de dispersión de tamaño de las nanopartículas de plata Argovit.

Las concentraciones para los tratamientos se obtuvieron al hacer diluciones 1:10 y 1:100 de AgNPs stock (AgNPs al 20%) en agua desionizada, con el fin de no tomar menos de 1  $\mu$ l de volumen al momento de agregarlas a las cajas de cultivo. Las concentraciones de plata metálica utilizadas para los distintos ensayos y métodos se muestran en las **Tablas I y II.**

*Tabla I. Concentraciones de AgNPs utilizadas para los ensayos MTT y rojo neutro.*

Concentración AgNPs ( $\mu$ g/ml)
0.625
1.25
2.5
2.6
3
3.4
3.8
4.2
4.6
5
10
20

*Tabla II. Concentraciones de AgNPs utilizadas para la tinción con azul tripano.*

Concentración AgNPs ( $\mu$ g/ml)
1.25
2.4
3.4
10

## 2.3. Ensayos de viabilidad celular.

### 2.3.1. Ensayo MTT

La reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es un proceso que realiza la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en células metabólicamente activas. La enzima transforma el MTT de un compuesto hidrofílico de color amarillo a un compuesto hidrofóbico de color azul conocido como Formazán (Frei, 2014).

El protocolo para medir viabilidad celular a través de la reducción de MTT fue desarrollado por Tim Mosmann en 1983 y posteriormente fue modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang. Actualmente el ensayo por MTT es uno de los más empleados para medir viabilidad y toxicidad celular debido a su facilidad y sensibilidad (Denizot, 1986).

Para el ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT, se colocaron 10,000 células en cada pozo de una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 horas a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente se prepararon las concentraciones de AgNPs que se muestran en la **Tabla I**. Se agregaron las dosis de AgNPs asignadas a cada pozo y se colocaron las placas en la incubadora durante un tiempo determinado de 12 ó 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se utilizó medio de cultivo sin AgNPs como blanco y dimetil sulfóxido (DMSO) sin AgNPs como control negativo.

Al término del tiempo de tratamiento se descartó el medio de cultivo y se enjuagaron las placas tres veces con solución PBS. Posteriormente se agregaron 50 µl de solución MTT (Sigma-Aldrich, Cat. M-1940), diluida al 10% en medio de cultivo. Se incubaron las placas durante dos horas, luego se agregaron 50 µl de solución de solubilización MTT (Sigma M-8910), y se incubaron nuevamente durante 30 minutos. Por último, se midió la absorbancia a 550 nm, tomándose como referencia una longitud de onda de 690 nm.

Los resultados del ensayo se graficaron tomando en cuenta el valor de la absorbancia obtenido para el control positivo (Células HeLa en medio de cultivo sin AgNPs) como el 100% de viabilidad celular, posteriormente las mediciones de absorbancia para

cada condición experimental fueron convertidas a porcentajes de sobrevivencia teniendo como referencia el valor del control positivo. Todos los experimentos se hicieron tres veces de forma independiente y con triplicados internos para su comparación. Los datos se presentan como el promedio de los experimentos con su respectiva desviación estándar.

### **2.3.2. Ensayo por exclusión de rojo neutro**

El ensayo con rojo neutro fue desarrollado en la Universidad Rockefeller por Borenfreund et al (Borenfreund, 1985), como una forma de cuantificar la citotoxicidad de compuestos químicos. Se basa en la habilidad de las células vivas de incorporar en su interior al colorante rojo neutro el cual es un compuesto catiónico débil que penetra la membrana de las células viables por difusión pasiva y se acumula en los lisosomas, donde se une a los aniones y/o grupos fosfato presentes en la matriz lisosomal (Repetto et al, 2008). El colorante se libera de las células usando una solución acidificada de etanol y la absorbancia del colorante solubilizado se cuantifica con ayuda de un espectrofotómetro. El cambio en el nivel de colorante incorporado se relaciona con un incremento o reducción del número de células viables.

Se siguió el protocolo desarrollado por Guillermo Repetto, con reactivos de Sigma-Aldrich. Se preparó una solución de medio cultivo con el colorante a 0.33% de concentración. La solución se incubó durante 24 horas con las mismas condiciones que las de las células (37°C con 5% de CO<sub>2</sub>). Al día siguiente, se centrifugó la solución para remover los restos de colorante que no se diluyeron con el fin de evitar interferencias durante las mediciones.

Los ensayos se hicieron en placas de 96 pozos, con 10,000 células HeLa por pozo y se utilizaron las concentraciones de AgNPs que se muestran en la **Tabla I**. El tiempo de tratamiento fue de 12 y 24 horas. Al término del tiempo de tratamiento se desechó el medio de cultivo de las placas, se agregaron 100 µl de medio con rojo neutro a cada pozo y se incubaron durante 3 horas. Posteriormente se removió el medio con rojo neutro de las placas y se enjuagó cada pozo con 150 µl de Buffer de fosfatos (PBS 1X) pH 7.4. Luego se

agregaron 150  $\mu$ l de solución de desteñimiento (50% etanol al 96%, 49% agua desionizada, 1% ácido acético glacial) a cada pozo, se protegieron de la luz y se colocaron en un agitador orbital durante diez minutos a velocidad baja. Por último, se midió la absorbancia a 540 nm con ayuda de un espectrofotómetro. Se tomó como referencia medio con rojo neutro sin células ni AgNPs.

Los resultados del ensayo se graficaron tomando el valor de la absorbancia obtenido para el control positivo como el 100% de viabilidad celular. Se convirtieron las mediciones de absorbancia para cada tratamiento a porcentajes de sobrevivencia con base en el valor del control positivo. Todos los experimentos se hicieron dos veces de forma independiente y con triplicados internos para su comparación. Los datos se presentan como el promedio de los experimentos con su respectiva desviación estándar.

### **2.3.3. Ensayo por exclusión del azul tripano**

El azul tripano es una molécula impermeable para la membrana celular sana por lo que solo puede entrar en células cuya membrana se encuentre dañada. Una vez dentro de las células el azul tripano se une a las proteínas intracelulares, dándole a la célula un color azul. De esta forma es muy fácil distinguir entre las células vivas (sin teñir) de las muertas (teñidas de color azul) (Strober, 1997).

Esta tinción es una forma rápida para determinar la viabilidad celular de un cultivo, pero tiene como desventaja que depende de la integridad de la membrana celular. Es posible que la viabilidad celular se vea comprometida a pesar de que la membrana celular se conserve intacta y viceversa, que la membrana celular presente daños y que aun así la célula pueda repararse para conservar la viabilidad.

Para este ensayo se utilizaron células cultivadas en cajas Petri de 5 cm con las concentraciones de AgNPs mostradas en la **Tabla II**. Después del tiempo de tratamiento se recolectaron las células, se centrifugaron para recuperarlas y se desechó el medio de cultivo. Posteriormente se resuspendieron en 250  $\mu$ l de medio de cultivo sin AgNPs y se

añadieron 250  $\mu$ l de azul tripano al 0.4% en PBS 1X. Se incubaron las muestras durante 2 minutos a temperatura ambiente, se tomaron 10  $\mu$ l de las células teñidas para colocarse en una cámara de Neubauer para conteo celular y con ayuda de un microscopio óptico se contaron las células teñidas y sin teñir. Se determinó el porcentaje de células vivas y muertas con base en el número total de células contadas.

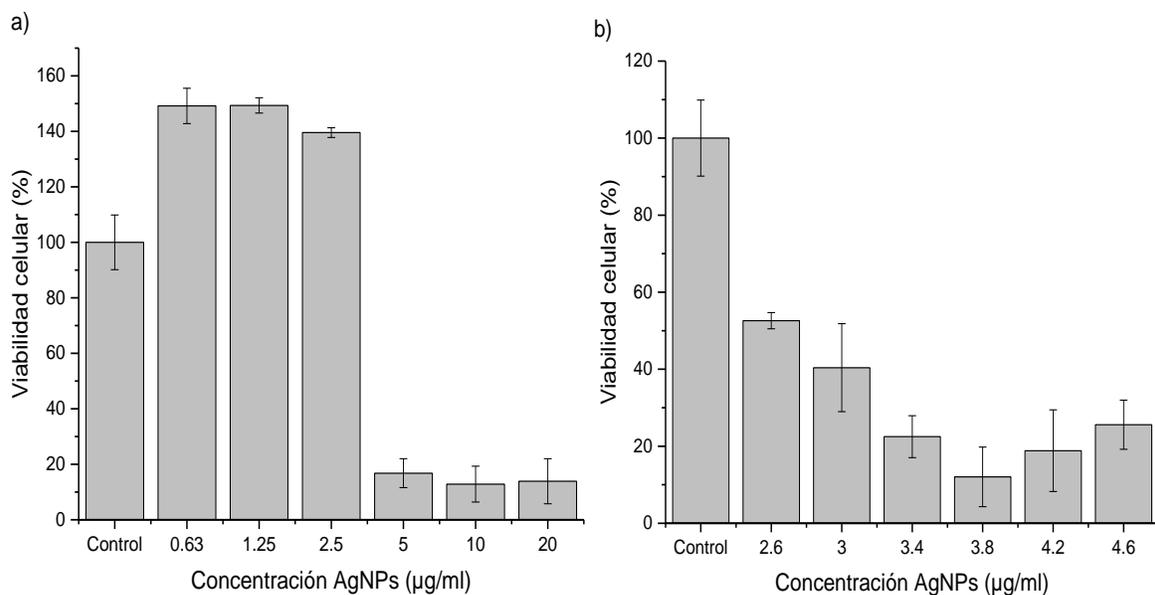
### 3. RESULTADOS

Se hicieron tres ensayos de citotoxicidad para comprobar la viabilidad de las células HeLa al ser expuestas a diferentes concentraciones de AgNPs durante 12 y 24 horas: el ensayo MTT, el ensayo por exclusión del rojo neutro y el ensayo por exclusión del azul tripano. Adicionalmente las células se observaron con ayuda de un microscopio óptico para verificar su integridad morfológica.

#### 3.1. Ensayo MTT

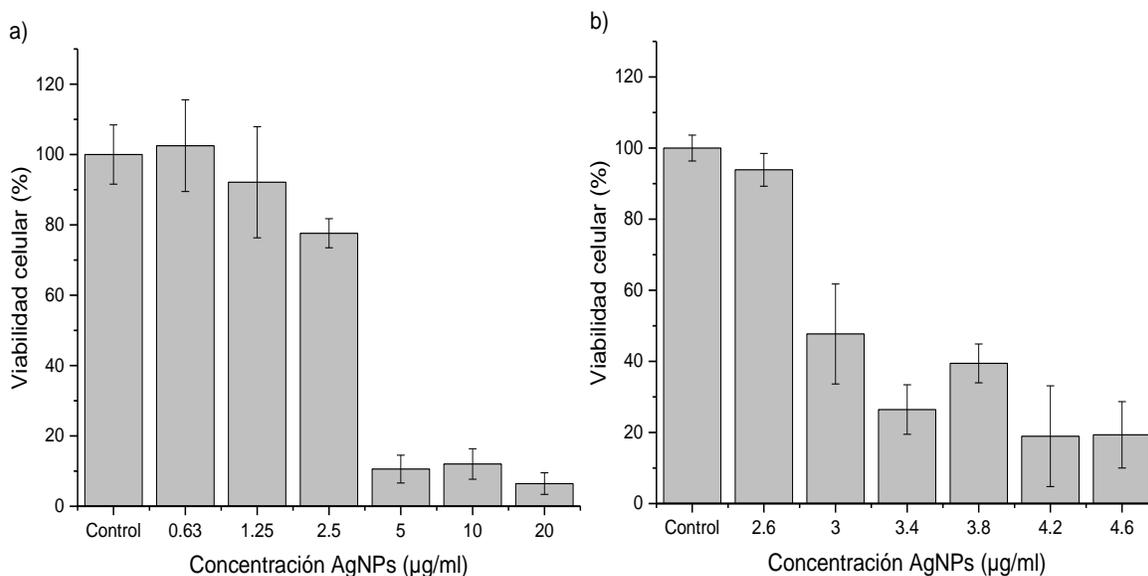
El ensayo MTT se basa en la reducción metabólica del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol hecha por la enzima succinato deshidrogenasa que lo convierte en compuesto de color azul llamado formazán. Se eligió este método debido a su facilidad y a la precisión que tiene. En la **Figura 3** se muestran los porcentajes obtenidos de la viabilidad celular a las 12 horas de tratamiento mientras que la **Figura 4** muestra los resultados de la viabilidad celular para 24 horas de exposición a las AgNPs.

En la **Figura 3a** se observa que a las 12 horas la viabilidad se mantiene por arriba del 100% hasta la concentración de 2.5 µg/ml. Debido a la diferencia en los porcentajes de viabilidad entre las concentraciones de 2.5 µg/ml y de 5 µg/ml se hicieron pruebas para un rango entre estas dos concentraciones. De esta forma en la **Figura 3b** se observa que la viabilidad decae hasta aproximadamente el 50% a una concentración de 2.6 µg/ml y continúa bajando hasta la concentración de 3.8 µg/ml.



**Figura 3. Citotoxicidad de las nanopartículas de plata en células de cáncer cervicouterino (HeLa) después de 12 horas de exposición determinada por medio del ensayo MTT. a) Concentración de Ag metálica 0-20 µg/ml y b) Diluciones de plata metálica 2.6-4.6 µg/ml. Los datos se muestran como el porcentaje respecto al grupo control  $\pm$  la desviación estándar.**

La **Figura 4** muestra los resultados de los ensayos MTT para las células tratadas con AgNPs durante 24 horas. De manera análoga a la **Figura 3**, la **Figura 4a** muestra los tratamientos de plata metálica en el rango de concentraciones de 0 a 20 µg/ml. De dicha figura se observa que la viabilidad decae desde la primera concentración en comparación con los tratamientos de 12 horas mientras que los resultados de la **Figura 4b** son muy similares a los que se muestran en la **figura 3b**, con la diferencia de que la viabilidad a las concentraciones de 2.6 y 3.8 µg/ml son mayores en los tratamientos a 24 horas.

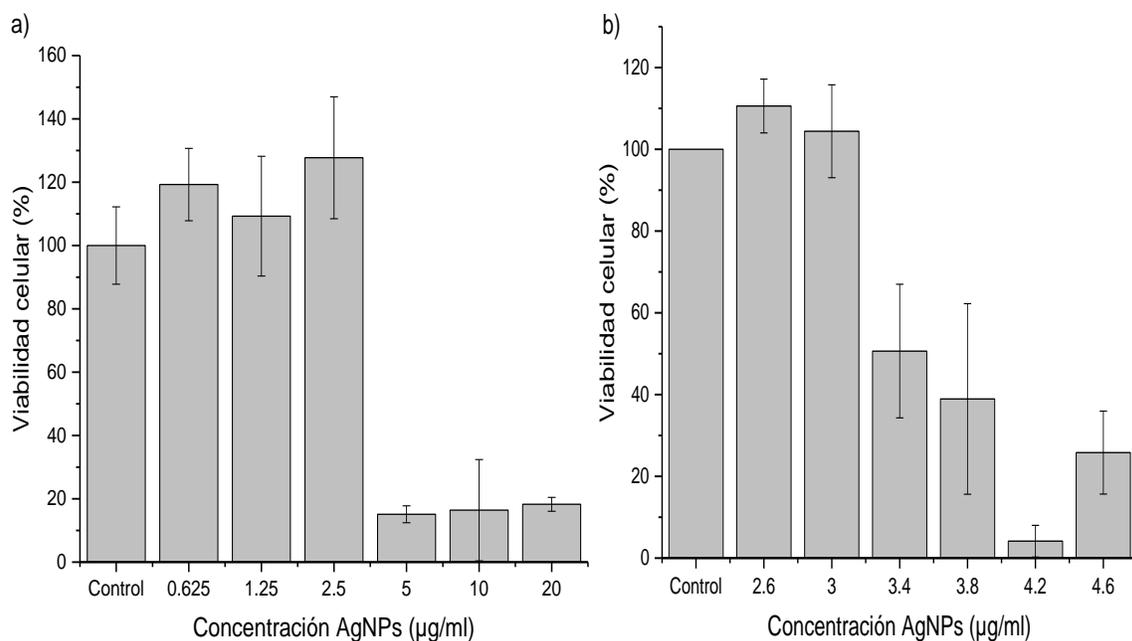


**Figura 4. Citotoxicidad de las nanopartículas de Ag en células de cáncer cervicouterino (HeLa) después de 24 horas de exposición determinada por medio del ensayo de MTT. a) Concentración de Ag metálica 0-20 µg/ml. b) Diluciones de plata metálica 2.6-4.6 µg/ml. Los datos se muestran como el porcentaje respecto al grupo control ± la desviación estándar.**

### 3.2. Ensayo por exclusión del rojo neutro

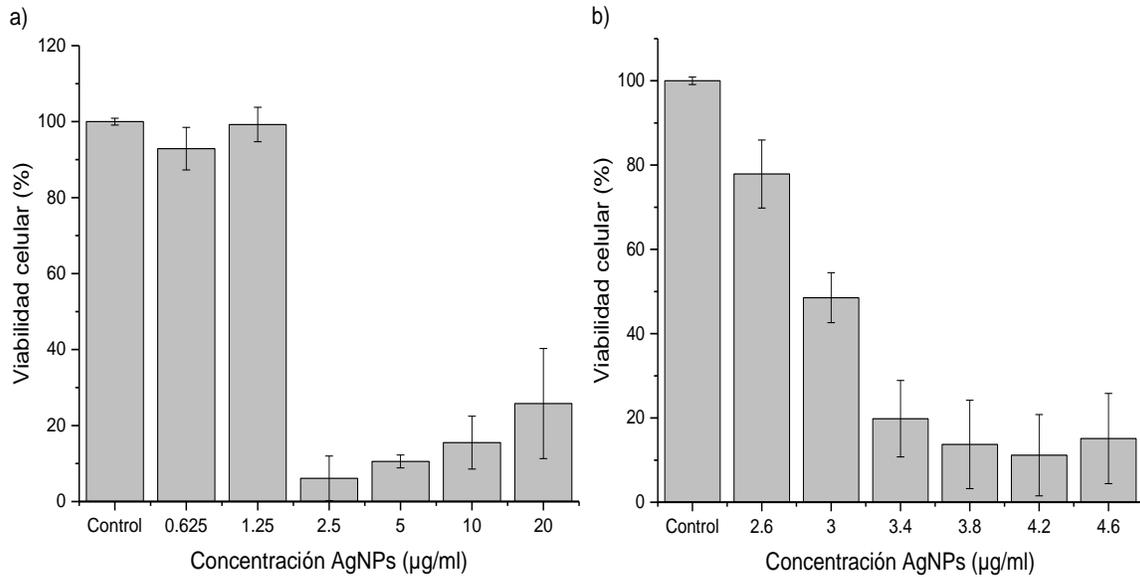
Los resultados del ensayo por exclusión del rojo neutro se muestran en la **Figura 5** y la **Figura 6** para los tratamientos de AgNPs incubadas durante 12 y 24 horas respectivamente. Al igual que en el ensayo MTT, se hicieron ensayos adicionales para las concentraciones comprendidas entre 2.5 y 5 µg/ml de AgNPs.

En la **Figura 5** se observa que la viabilidad se mantiene por encima del 100% hasta una concentración de 3 µg/ml. A partir de dicha concentración la viabilidad decae rápidamente y se mantiene en aproximadamente 20% respecto al grupo control en las concentraciones subsecuentes. Con excepción de la concentración de 4.2 µg/ml que se muestra en la **Figura 5b**, la viabilidad baja conforme aumenta la concentración de plata metálica.



**Figura 5. Determinación de la citotoxicidad de las AgNPs en células de cáncer cervicouterino (HeLa) después de 12 horas de exposición por medio del ensayo del rojo neutro.** a) Concentración de Ag metálica 0-20 µg/ml. b) Diluciones de plata metálica 2.6-4.6 µg/ml. Los datos se muestran como el porcentaje respecto al grupo control  $\pm$  la desviación estándar.

En la **Figura 6a** se observa que después de incubar las células HeLa con AgNPs durante 24 horas, la viabilidad decae por debajo del 100% desde la menor concentración de AgNPs (0.625 µg/ml). Aunque a una concentración de 2.5 µg/ml parece que hay un descenso abrupto en el porcentaje de viabilidad, en la **Figura 6b** se aprecia que la viabilidad se conserva por arriba del 50% hasta alcanzar la concentración de 3 µg/ml. Con base en lo observado en los otros ensayos se concluye que el resultado correcto de la concentración 2.5 µg/ml a 24 horas de exposición es el que se muestra en la **Figura 6b**.

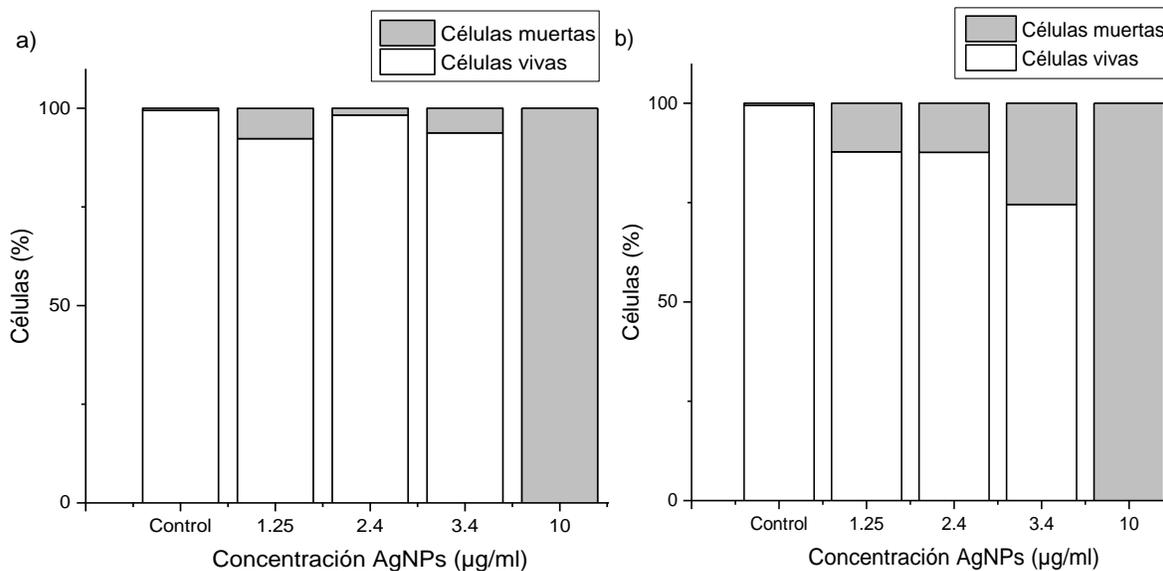


**Figura 6. Citotoxicidad de las nanopartículas de plata en células de cáncer cervicouterino (HeLa) después de 24 horas de exposición determinada por medio del ensayo del rojo neutro. a) Concentración de Ag metálica 0-20 µg/ml. b) Diluciones de plata metálica 2.6-4.6 µg/ml. Los datos se muestran como el porcentaje respecto al grupo control  $\pm$  la desviación estándar**

### 3.3. Ensayo por exclusión del azul tripano

Los resultados de la tinción con azul tripano se muestran en la Figura 6. Para cada tratamiento se contaron 100 células, por lo que se muestra el porcentaje de células vivas para cada concentración. La Figura 6a muestra los datos a las 12 horas de tratamiento, en donde se observa que el porcentaje de células muertas se mantiene por debajo del 10% en todas las concentraciones con excepción de la concentración de 10 µg/ml de plata metálica, concentración a la cual todas las células se observaron teñidas con azul tripano.

Por otro lado, en la **Figura 7b** se encuentran los resultados para las células tratadas con AgNPs durante 24 horas. De dicha imagen se aprecia que el porcentaje de células muertas es mayor en comparación con los datos de **Figura 7a** y que en la concentración de 10 µg/ml todas las células se encontraron teñidas con azul tripano, lo cual indica que todas las células estaban muertas.

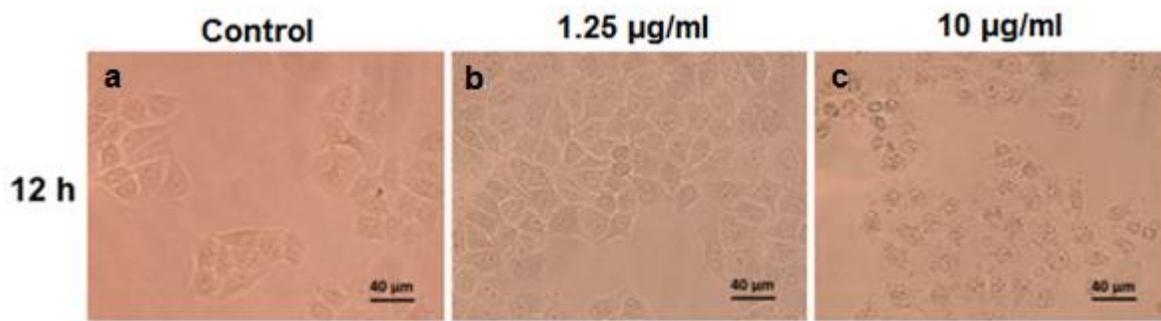


**Figura 7. Citotoxicidad de las AgNPs en células de cáncer cervicouterino (HeLa) mediante la tinción con azul tripano.** Se muestra el porcentaje de células vivas y muertas expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata durante a) 12 horas y b) 24 horas.

### 3.4. Observación de las células por microscopía óptica

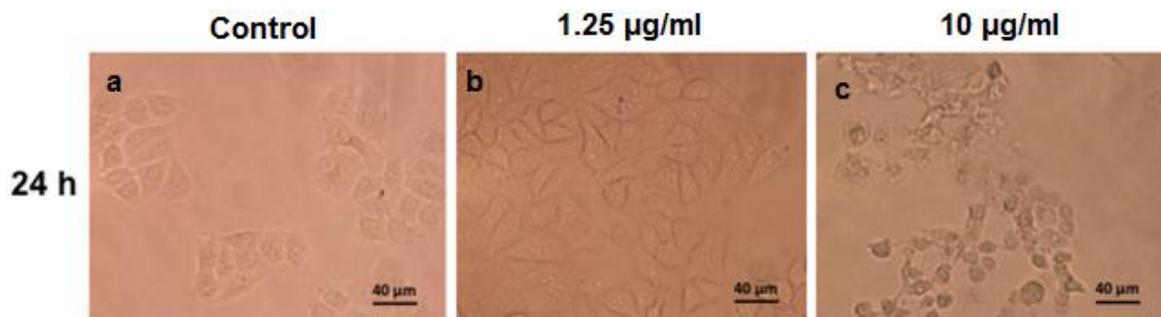
Se observaron las células con ayuda del microscopio invertido Axio Observer A1 (Zeiss, Alemania) para comprobar la integridad de la membrana. En la **Figura 8** se observan las células HeLa expuestas a AgNPs durante 12 horas mientras que la **Figura 9** muestra las células a las 24 horas de exposición.

De la **Figura 8** se observa que para ambos tratamientos no hay cambios significativos en la morfología de las células en comparación con las del grupo control.



**Figura 8.** Células de cáncer cervicouterino (HeLa) expuestas a AgNPs durante 12 horas Observadas por microscopía óptica. a) Células sin tratamiento, b) Expuestas a 1.25 µg/ml y c) 10 µg/ml de plata metálica respectivamente.

De la **Figura 9b** se observa que hay algunas células desprendidas de la monocapa que se observan en otro plano óptico. Por otro lado, en la **Figura 9c** se aprecian cambios relevantes en las células, entre los cuales se incluye el desprendimiento de algunas células de la monocapa, así como la modificación de la morfología de las células y en su tamaño.



**Figura 9.** Células de cáncer cervicouterino (HeLa) expuestas a AgNPs durante 24 horas. Observadas por microscopía óptica. a) Células sin tratamiento, b) Expuestas a 1.25 µg/ml y c) 10 µg/ml de plata metálica respectivamente.

#### 4. DISCUSIÓN

Uno de los aspectos más importantes a evaluar después de sintetizar un nanomaterial es su efecto tóxico en diferentes tipos celulares. Sin embargo, poco se sabe al respecto sobre los efectos citotóxicos y genotóxicos de los nanomateriales. Por esta razón es importante considerar el estudio de estos parámetros al momento de utilizar nanomateriales que estén en contacto con sistemas biológicos. Debido a ello, es que en este trabajo se decidió evaluar el efecto citotóxico de las nanopartículas de plata Argovit en células de cáncer cervicouterino HeLa.

Los motivos por los que se eligió la línea celular HeLa es que es la línea celular de cáncer más estudiada y es ampliamente conocida. Además de que el cáncer represente uno de los problemas más importantes de salud pública a nivel mundial.

Por otro lado, se ha visto que las nanopartículas de plata son el nanomaterial con mayor número de aplicaciones comerciales y biomédicas debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Por estas razones la exposición a este tipo de nanomaterial es elevada y justifica el estudio de su toxicidad en sistemas biológicos.

En este trabajo se utilizaron tres técnicas diferentes para la evaluación de los efectos citotóxicos de las nanopartículas de plata. Todos los ensayos se basan en métodos colorimétricos.

El primer ensayo, comúnmente llamado Ensayo del MTT, consiste en la reducción del formazán por hidrogenasas mitocondriales, esta técnica evalúa la actividad metabólica de las células. Por otro lado, el ensayo del rojo neutro y por exclusión del azul tripano evalúan la integridad de la membrana celular. De esta forma, ambas técnicas indican si existen daños en la membrana celular debido a la exposición a las nanopartículas de plata.

A partir de los datos obtenidos para los ensayos de viabilidad celular MTT y rojo neutro, se observó que a 12 horas de exposición a las AgNPs se puede concluir que en el

rango de concentraciones de 0 a 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , las AgNPs no presentan efectos citotóxicos en las células HeLa. A partir de la concentración de 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  la viabilidad decae rápidamente hasta llegar a aproximadamente 20%.

Estos resultados concuerdan con la técnica de viabilidad por exclusión del azul tripano, pues como se observa en los resultados del ensayo de azul tripano a 12 horas (**Figura 7a**), la viabilidad decae al exponer las células a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de plata metálica. En el caso del ensayo por rojo neutro, es posible que los valores de viabilidad celular observados a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  se deban a la interferencia de precipitados de cristales de rojo neutro que no se eliminaron por completo durante el desarrollo experimental.

Para el tiempo de exposición de 24 horas, en los ensayos por MTT y rojo neutro se observó que hay pérdida de viabilidad estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) a partir de la concentración de 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de plata metálica. De la misma forma, en el ensayo por exclusión del azul tripano a 24 horas (**Figura 6a**) también se observa que el porcentaje de células vivas es menor en comparación con lo observado a 12 horas de exposición. Estas diferencias en la viabilidad celular entre los tiempos de exposición sugieren que la dependencia entre el tiempo y los efectos citotóxicos es directamente proporcional porque a mayor tiempo de tratamiento hay mayor pérdida de viabilidad celular.

Debido al abrupto decaimiento de la viabilidad celular que ocurre entre las concentraciones de 2.5 y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de plata metálica a 12 y 24 horas, se decidió hacer una expansión de estas concentraciones para tener una mejor referencia de la viabilidad celular en ese intervalo. Estos datos se encuentran ilustrados en las **Figuras 3b, 4b, 5b y 6b**. Con base en estos datos se definió que la dosis letal media (LD50) de las AgNPs, esto es, el valor de concentración de plata metálica en el cual el 50% de las células se encuentran vivas y el otro 50% están muertas. A partir de estos resultados se obtuvo que la LD50 de las AgNPs es de 2.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Finalmente, al comparar las figuras de las células expuestas durante 12 (**Figura 8**) y 24 horas (**Figura 9**) a AgNPs, se observó que en ambos casos a 1.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de plata metálica no existen diferencias morfológicas en las células respecto al grupo control. Sin embargo,

se encontró que a 24 horas de exposición a 10 µg/ml de plata metálica, las células sufren cambios morfológicos considerables que indican la pérdida de la viabilidad celular. Asimismo, es posible que dichos cambios estén asociados a otros efectos citotóxicos como la producción de especies reactivas de oxígeno o la inducción de muerte celular por apoptosis. Sin embargo, es necesario hacer otro tipo de ensayos si se quiere determinar el tipo de muerte celular que promueven las AgNPs en células HeLa.

Este es uno de los primeros trabajos en donde se evalúa el efecto citotóxico de las AgNPs Argovit y donde se relaciona el efecto del tiempo de incubación con la concentración de las AgNPs. Además, se abre la oportunidad de estudiar y entender los mecanismos cito y genotóxicos que ocasionan las AgNPs en células de mamíferos, con la posibilidad de utilizar este tipo de nanopartículas en futuras aplicaciones biomédicas.

## 5. CONCLUSIONES

- Existe una dependencia directamente proporcional entre el tiempo de exposición y la aparición de efectos citotóxicos de las AgNPs en células HeLa.
- Los ensayos de viabilidad celular muestran que los efectos citotóxicos que provocan muerte celular ocurren a partir de la concentración de 2.8 µg/ml de plata metálica.
- Hasta donde se sabe, este es de los primeros trabajos en considerar el tiempo de exposición de las células a las AgNPs como un factor que influye en su toxicidad.

## 6. PERSPECTIVAS

Al tener la certeza de que el tiempo de exposición afecta la toxicidad se podrían hacer estudios que abarquen más rangos de tiempo para definir más diferencias en los efectos citotóxicos.

De los resultados obtenidos en este trabajo se ha observado que el tiempo de exposición se encuentra ligado de forma directa con la toxicidad de las AgNPs. Una ruta de trabajo a seguir es evaluar los efectos citotóxicos en modelos murinos para determinar las posibles diferencias entre ambos sistemas.

Otro aspecto importante a determinar es el tipo de muerte celular que provocan las AgNPs. Esta información es de relevancia porque en el futuro podría desarrollarse un tratamiento contra el cáncer que se dirija específicamente a las células cancerosas y que promueva apoptosis, un proceso controlado y que no se considera tóxico. De la misma manera, es de importancia conocer la posible producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que están involucradas en procesos tóxicos como el estrés oxidativo celular. Por último, también es recomendable determinar los efectos que las AgNPs tienen sobre el material genético de las células, esto es, determinar los posibles daños al ADN mediante ensayos de genotoxicidad.

## 7. REFERENCIAS

- American Cancer Society (2014). Una guía sobre el cáncer. ACS. <http://www.cancer.org>.
- Arora, S. et al, (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies. *Toxicol. Lett.* 179.
- Asare, N., Instanes, C., Sandberg, W. J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M., & Brunborg, G. (2012). Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology*, 291(1-3), 65–72. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2011.10.022>.
- Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D. S., & Autrup, H. (2012). Toxicity of silver nanoparticles-Nanoparticle or silver ion? *Toxicology Letters*, 208(3), 286–292. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.002>.
- Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods*, 9(1), 7–9. doi:10.1007/BF01666038.
- Chang, J. S., Chang, K. L. B., Hwang, D. F., & Kong, Z. L. (2007). In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line. *Environmental Science & Technology*, 41(6), 2064–2068. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es062347t>.
- Chen, X., & Schluesener, H. J. (2008). Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*, 176(1), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.004>.
- Cho, K.-H., Park, J.-E., et al. (2005). The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanoAg ingredient. *Electrochim. Acta* 51 (5), 956–960.
- Colvin, V. L. (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1166–1170.
- Cravo, Ana S. & Randall J. Mrsny. (2013). A time travel journey through cancer therapies. Springer Science+Business Media, New York, USA, 3-30.
- Crocetti, G. & G. M. (2011). *nano - silver*. (N. Lowrey, Ed.) (Second). Friends Of The Earth Australia.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271–277. doi:10.1016/0022-1759(86)90368-6.
- Dobrovolskaia, M.A. & S.E. McNeil. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, 2(8), 469-478.
- Donaldson, K & Anthony Seaton. (2012). A short history of the toxicology of inhaled particles. *Particle and fibre toxicology*.
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W., & Borm, P. J. a. (2004). Nanotoxicology. *Occupational and Environmental Medicine*, 61(9), 727–728. <http://doi.org/10.1136/oem.2004.013243>.
- Freeman, Shanna. (2012). How HeLa Cells Work. <http://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/hela-cell.htm>.
- Frei, M. (2014). Cell viability and proliferation. *Sigma-Aldrich*, 6(5), 17–21. Retrieved from <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html>.
- Gallego, Ó., & Puentes, V. (2006). What can nanotechnology do to fight cancer? *Clinical and Translational Oncology*, 8(11), 788–795. <http://doi.org/10.1007/s12094-006-0133-6>.

Grainger, D. W., & Castner, D. G. (2008). Nanobiomaterials and nanoanalysis: Opportunities for improving the science to benefit biomedical technologies. *Advanced Materials*, 20(5), 867–877. <http://doi.org/10.1002/adma.200701760>.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*.

INEGI. (2014). Estadísticas a propósito de... día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Datos Nacionales. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI).

Iravani, S. (2014). Bacteria in Nanoparticle Synthesis: Current Status. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–18. doi:10.1155/2014/359316

Janát, Margit & You Han Bae. (2014). Nanotechnology in cancer. *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Second edition. Human Press, 709-713.

Jemal, Amedin et al. (2011). Global Cancer Statistics. *Cancer Journal for Clinicians*, 2011(61), 69-90.

Kaur, J., & Tikoo, K. (2013). Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.044>.

Kholoud, M.M. et al. (2010). Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arab. J. Chem.* 3, 135–140.

Liuya Wei et al. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, Volume 20, Number 5.

Mafuné, Fumitaka et al. (2000). Structure and Stability of Silver Nanoparticles in Aqueous Solution Produced by Laser Ablation. *The Journal of Physical Chemistry B* 2000 104 (35), 8333-8337.

Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531–1551. <http://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>.

Masagué, Joan. (2008). Hacia una comprensión del cáncer. *Fronteras del conocimiento*.

Masters, John R. (2002). HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews: Cancer*. Vol 2. April 2002.

Meleady, P., & O'Connor, R. (2006). General procedures for cell culture. *Cell Biology, Four-Volume Set*, 1, 13–20. <http://doi.org/10.1016/B978-012164730-8/50003-4>.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

Mukherjee, S. G., O'Claonadh, N., Casey, A., & Chambers, G. (2012). Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26(2), 238–251. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.12.004>.

Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5761), 622–627. <http://doi.org/10.1126/science.1114397>.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823–839. <http://doi.org/10.1289/ehp.7339>.

OMS. (2014). World Cancer Report 2014. IARC.

- OPS. (2012). Perfiles de país. Enfermedades no transmisibles. [www.paho.org/ncds](http://www.paho.org/ncds).
- Panacek A, et al. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B* 110:16248–16253.
- Park, M. V. D. Z., Neigh, A. M., Vermeulen, J. P., de la Fonteyne, L. J. J., Verharen, H. W., Briedé, J. J., ... de Jong, W. H. (2011). The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32(36), 9810–9817. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.085>.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–1131. <http://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>.
- Sankaranarayanan R et al. (2010). Cancer survival in Africa, Asia, and Central America: a population based study. *Lancet Oncol*. 2010(11):165-173.
- SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) (2006). Opinion consultation on the appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General.
- Secretaría de Salud (2013). Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos. [www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html](http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html).
- Shirtcliffe N & Nickel U Schneider (1999). Reproducible preparation of silver sols with small particle size using borohydride reduction: for use as nuclei for preparation of larger particles. *J Colloid Interface Sci* 211:122–129.
- Sohaebuddin, S. K., Thevenot, P. T., Baker, D., Eaton, J. W., & Tang, L. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology*, 7, 22. <http://doi.org/10.1186/1743-8977-7-22>.
- Strebhardt K, Ullrich (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat. Rev. Cancer* 8(6):473–480.
- Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology* / Edited by John E. Coligan ... [et Al.], Appendix 3, Appendix 3B. <http://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>.
- Wijnhoven SW et al (2009). Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 3, no. 2 (2009): 109-138.
- Wiley, B., Sun, Y., Xia, Y. (2007). Synthesis of silver nanostructures with controlled shapes and properties. *Acc. Chem. Res.*, (40), 1067–1076.