



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD LEGARIA



**“Síntesis de nanotransportadores poliméricos de nanopartículas de plata:
Evaluación de su toxicidad en líneas celulares de origen neoplásico”**

Tesis que para obtener el grado de Maestría en Tecnología Avanzada presenta:

Rocio Guadalupe Casañas Pimentel

Director

Dr. Eduardo San Martín Martínez

Junio de 2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 14:00 horas del día 24 del mes de junio del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA - Legaria para examinar la tesis de titulada:

Síntesis de nanotransportadores poliméricos de nanopartículas de plata: evaluación de su toxicidad en líneas celulares de origen neoplásico

Presentada por el alumno:

| | | | | | | |
|------------------|------------------|-----------------|---|---|---|---|
| Casañas | Pimentel | Rocío Guadalupe | | | | |
| Apellido paterno | Apellido materno | Nombre(s) | | | | |
| Con registro: | | | | | | |
| B | 0 | 7 | 1 | 7 | 2 | 5 |

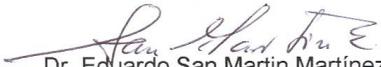
aspirante de:

Maestría en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis


Dr. Eduardo San Martín Martínez


Dr. José Guzmán Mendoza


Dra. Ruth Pedroza Islas


Dra. Ma. Consuelo Gómez García


Dr. Geonel Rodríguez Gattorno

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. José Antonio Iran Díaz Gongora
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA
DEL IPN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **México D. F.** el día 24 de Junio del año **2009** el que suscribe Rocio Guadalupe Casañas Pimentel alumno del programa de **Maestría en Tecnología Avanzada** con número de registro **B071725** adscrito a **C.I.C.A.T.A-IPN** manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del **Dr. Eduardo San Martín Martínez** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Síntesis de nanotransportadores poliméricos de nanopartículas de plata: evaluación de su toxicidad en líneas celulares de origen neoplásico”** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o direcciones del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN. Legaría 649, Col. Irrigación, 11500 D.F. México. Teléfono 015557296300 ext 67769 Fax e-mail: cgaribay@ipn.mx, esanmartin@ipn.mx.** Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Rocio Guadalupe Casañas Pimentel

Nombre y Firma

RESUMEN

Los nanomaterials han atraído la atención de múltiples disciplinas, incluyendo a la oncología; principalmente como agentes terapéuticos y de diagnóstico. Recientemente, varios grupos de investigación han reportado efectos citotóxicos de las nanopartículas de plata y, han propuesto su potencial uso en la terapia oncológica. Sin embargo, al igual que los agentes antineoplásicos actuales, el efecto citotóxico de las nanopartículas de plata no es específico para las células de cáncer y éstas podrían causar toxicidad sistémica y efectos adversos en los pacientes. La nanotecnología provee una alternativa: el uso de nanotransportadores permite el direccionamiento del efecto tóxico al sitio de acción deseado, minimizando el daño sistémico, debido a las condiciones especiales de la zona tumoral, efecto conocido como “permeabilidad y retención aumentadas” y, por la funcionalización de la superficie de los transportadores. Para lograr esto, los transportadores deben tener material biocompatible en su superficie para reducir la respuesta inmunológica y, deben tener un diámetro aproximado de 200 nm.

En el presente trabajo se reporta la síntesis de nanopartículas de plata de diámetro aproximado a 5 nm y, la encapsulación de estas mediante dos sistemas: polietilen glicol (PEG) y PEG-polietilenimina (PEI), ambos mediante una modificación del sistema “emulsión-evaporación del solvente” por interacción de cargas; la caracterización por técnicas como espectroscopia UV-Vis, EDS, SEM, TEM y espectroscopia FT-IR. Se obtuvieron nanotransportadores de nanopartículas de plata de diámetro de 100-300 nm, en los ensayos sin PEI, con PEG en la superficie, el cual es conocido como un material biocompatible. Las partículas fueron evaluadas en células Ca Ski, demostrando que las nanopartículas de plata son citotóxicas para esta línea celular y que, el sistema de encapsulación permite la toxicidad de estas en la misma línea celular. Se propone la optimización de la síntesis de los nanotransportadores y la evaluación del efecto terapéutico de las nanopartículas de plata nanoencapsuladas en estudios *in vivo* para el tratamiento de cáncer.

ABSTRACT

Nanomaterials have attracted the attention of multiple disciplines, including oncology, mainly as diagnostic and therapeutic agents. Recently, several research groups have reported cytotoxic effects of silver nanoparticles and, also they have proposed its potential use in the anticancer therapy. Although, as the current anticancer drugs, the cytotoxic effect of silver nanoparticles is not specific for cancer cells and they can cause systemic toxicity and adverse effects to the patients. Nanotechnology provide an alternative: the use of nanocarriers allows the direction of the cytotoxic effects to the desired site of action, minimizing the systemic damage, because of the special conditions of the tumor zone, known as Enhanced Permeability and Retention effect, and the functionalization of the carriers. To achieve it, the carriers must be made of biocompatible materials that reduce the immune response and, also they should have a diameter of 200 nm, approximately.

We report the synthesis of silver nanoparticles of approximately 5 nm of diameter and, the encapsulation with two systems polyethilenglycol (PEG) and PEG-polyethilenimine (PEI), both by a modification or the system "emulsion-solvent evaporation" by charge interaction and, the characterization by techniques as UV-Vis, EDS, SEM, TEM and FT-IR. We obtained nanocarriers of 100-300 nm of diameter, in the assays without PEI, with PEG in the surface, known as a biocompatible material. The particles were evaluated in Ca Ski cells, showing that the silver nanoparticles are cytotoxic for this cell line and, that the encapsulation system allows the toxicity of them in the same cell line. We propose the optimization of the nanocarrier synthesis and the evaluation of the therapeutic effect of the nano-encapsulated silver nanoparticles in *in vivo* studies to the cancer treatment.

AGRADECIMIENTOS

Dedico estas primeras líneas a al Instituto Politécnico Nacional y al personal que en él labora, ya que ha sido esta la fuente de mi formación profesional. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN y al Instituto Mexicano del Seguro Social, agradezco el apoyo económico que me fue brindado en mis estudios de maestría.

A mis amigos y compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, agradezco el apoyo y la confianza que me han brindado en estos años. Al Dr. Alberto Monroy, a Rita, Carlos, Martina, a la Dra. Rosana y al Dr. Héctor Mayani, gracias por abrirme las puertas y colaborar en el desarrollo de este proyecto.

Al personal de la Facultad de Medicina y del Instituto de Química de la UNAM y al personal del Posgrado en Biomedicina Molecular de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN, agradezco su invaluable labor al compartir sus conocimientos y enriquecer mi trabajo con su experiencia, al Dr. Guillermo Pérez y a su esposa, la Dra. Consuelo Gómez por colaborar con nosotros en el desarrollo de este proyecto.

A cada uno de los integrantes de la comunidad del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Unidad Legaria, les expreso mi más sincero agradecimiento por cada uno de los sabios consejos que he recibido por parte de ustedes, admiro y respeto ampliamente su labor, compañeros alumnos, catedráticos, personal administrativo y de apoyo, estoy orgullosa de ser parte de este centro integrado por gente de alto rendimiento y calidad intelectual y humana. A los Doctores: Eduardo San Martín, Geonel Rodríguez, José Guzmán y Ruth Pedroza, vastos y sinceros fueron siempre sus sabios consejos y críticas a mi trabajo. Me han enriquecido no sólo en el aspecto académico sino también espiritualmente.

Agradezco a la Bióloga Ma. Esther Sánchez de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y al M. en C. Miguel Ángel Aguilar por su apoyo en los estudios de microscopía electrónica, al Ing. José Refugio López y a la M. en C. Mónica Centeno por su apoyo e instrucción en el manejo de las técnicas de química analítica, a la Bióloga Isabel Contreras y al C. Miguel López por su apoyo incondicional. A mis compañeras y amigas Oriana Hidalgo y Carolina Estanislao por compartir la experiencia del posgrado conmigo. A David Flores, siempre ha sido valioso tu apoyo incondicional.

Mucha ha sido la gente implicada en mi vida profesional y personal que ha hecho posible este logro, llegan a mi mente tantos nombres de personas que han cambiado momentos clave en mi experiencia en el desarrollo de este proyecto; a todos ustedes, gracias.

Finalmente, pero sin embargo, con un profundo respeto y amor, agradezco al motor que impulsa mi vida, a la gente que me llena de dicha y de ganas de seguir adelante, la gente que me escucha, que me abraza y que día a día ha hecho de mi una persona plena, me han hecho tanta falta estos años, cada momento recuerdo sus rostros y pienso en estar a su lado, sé que he sido bendecida al permitírseme la oportunidad de convivir con ustedes cuatro, mi familia: mamita, Tony, Karlita y Pollito, los quiero con toda el alma.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES | 2 |
| La plata: el elemento y su presencia en la naturaleza | 2 |
| La plata en el organismo | 2 |
| El cáncer. Su problemática. | 3 |
| La biología del cáncer | 5 |
| El microambiente tumoral, características y su importancia en la terapia oncológica | 8 |
| Estado del arte | 9 |
| CAPÍTULO 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 18 |
| CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| CAPÍTULO 5. OBJETIVOS | 20 |
| CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| Síntesis de nanopartículas de plata | 22 |
| Materiales | 22 |
| Metodología de síntesis | 22 |
| Espectroscopia UV-Vis | 22 |
| Microscopía electrónica de transmisión | 23 |
| Síntesis de nanotransportadores de nanopartículas de plata | 23 |
| Materiales | 23 |
| Activación del PEG | 24 |
| Espectroscopia FT-IR | 25 |
| Formación de nanotransportadores | 25 |
| Microscopía electrónica de barrido | 26 |
| EDS | 27 |
| Evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas de plata libres y, cargadas en los nanotransportadores | 27 |
| Materiales | 27 |
| Cultivos celulares | 27 |
| Pruebas dosis-respuesta por citometría de flujo | 27 |
| CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 29 |

| | |
|--------------------------------------------|-----------|
| Síntesis de nanopartículas de plata | 29 |
| CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES | 53 |
| REFERENCIAS | 54 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Interacción de la plata con las proteínas. | 3 |
| Figura 2. Sitios de daño celular causado por la plata | 14 |
| Figura 3. Direccionamiento activo de transportadores farmacológicos | 17 |
| Figura 4. Diagrama de bloques del proceso experimental en la síntesis de nanopartículas de plata | 21 |
| Figura 5. Síntesis de nanopartículas de plata por la vía sol-gel. | 22 |
| Figura 6. Microscopio electrónico de transmisión | 23 |
| Figura 7. Diagrama de bloques del proceso experimental en la síntesis de nanotransportadores de nanopartículas de plata | 24 |
| Figura 8. Activación del PEG..... | 25 |
| Figura 9. Formación de nanotransportadores | 26 |
| Figura 10. Microscopio electrónico de barrido | 26 |
| Figura 11. Cámara de Neuvauer | 27 |
| Figura 12. Placa de cultivo de 24 pozos. | 28 |
| Figura 13. Citómetro de flujo BD FACSCalibur..... | 28 |
| Figura 14. Espectroscopia UV-Vis / micrografía electrónica / histograma MUESTRA A.. | 29 |
| Figura 15. Espectroscopia UV-Vis / micrografía electrónica / histograma MUESTRA B.. | 29 |
| Figura 16. Espectroscopia UV-Vis / micrografía electrónica / histograma MUESTRA C.. | 30 |
| Figura 17. Espectroscopia UV-Vis / micrografía electrónica / histograma MUESTRA D.. | 30 |
| Figura 18. Espectroscopia UV-Vis Muestra 1_probe..... | 31 |
| Figura 19. Micrografía electrónica muestra 1_probe A Figura 20. Micrografía electrónica muestra 1_probe B | 32 |
| Figura 21. Histograma de distribución de tamaños muestra 1_probe A | 32 |
| Figura 22. Histograma de distribución de tamaños muestra 1_probe B..... | 32 |
| Figura 23. Estructura del PEG..... | 33 |
| Figura 24. Vibraciones moleculares en espectroscopia IR..... | 33 |
| Figura 25. Correlación del espectro IR del PEG de 4.6 kDa con el reportado en la librería FDM | 34 |
| Figura 26. Correlación del espectro IR del PEG de 8 kDa con el reportado en la librería FDM | 34 |
| Figura 27. Substracción de la señal correspondiente a KBr | 35 |
| Figura 28. Espectro de transmisión FT-IR PEG FDM | 35 |
| Figura 29. Espectro de transmisión FT-IR PEG 4,6 kDa | 35 |
| Figura 30. Espectro de transmisión FT-IR PEG 8 kDa Tabla 3. Señales de transmisión FT-IR del PEG | 35 |
| Figura 31. Tipos de enlaces del PEG y su frecuencia en el espectro IR | 36 |
| Figura 32. Reacción del CDI con el OH del PEG. Formación del imidazolil carbamato. ... | 37 |
| Figura 33. Tipos de enlaces del CDI y su frecuencia en el espectro IR | 37 |
| Figura 34. Espectro de transmisión FT-IR CDI Tabla 4. Señales de transmisión FT-IR del CDI..... | 38 |
| Figura 35. Estructura del PEG activado | 38 |
| Figura 36. Espectro de transmisión FT-IR PEG 4.6 kDa | 38 |
| Figura 37. Espectro de transmisión FT-IR PEG 8 kDa | 38 |
| Figura 38. Micrografía electrónica por SEM del primer ensayo de la síntesis de nanotransportadores..... | 40 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 39. Micrografías electrónicas por TEM del primer ensayo de la síntesis de nanotransportadores..... | 40 |
| Figura 40. Micrografías electrónicas por TEM de los nanotransportadores de nanopartículas de plata..... | 41 |
| Figura 41. Micrografías por TEM de la muestra Ng 1_probe_1_1 | 42 |
| Figura 42. Micrografías por SEM de la muestra Ng 1_probe_1_1 | 42 |
| Figura 43. Resultados EDS para la muestra Ng 1_probe_1_1 | 43 |
| Figura 44. Tratamientos evaluados en la línea celular Ca Ski..... | 43 |
| Figura 45. Ejemplo de gráfico SSC/FSC para la línea celular Ca Ski..... | 44 |
| Figura 46. Ejemplo de histogramas de frecuencia para la línea celular Ca Ski. (gráficos del tratamiento To) | 44 |
| Figura 47. Resultados para CFSE de las muestras tratadas con nanopartículas de plata en la línea celular Ca Ski..... | 45 |
| Figura 48. Resultados para IP de las muestras tratadas con nanopartículas de plata en la línea celular Ca Ski..... | 46 |
| Figura 49. Resultados para CFSE de las muestras tratadas con el vehículo 1 en la línea celular Ca Ski | 47 |
| Figura 50. Resultados para IP de las muestras tratadas con el vehículo 1 en la línea celular Ca Ski | 48 |
| Figura 51. Resultados para CFSE de las muestras tratadas con el nanotransportador en la línea celular Ca Ski..... | 49 |
| Figura 52. Resultados para IP de las muestras tratadas con el nanotransportador en la línea celular Ca Ski | 49 |
| Figura 53. Resultados para CFSE de las muestras tratadas con el vehículo 2 en la línea celular Ca Ski | 50 |
| Figura 54. Resultados para IP de las muestras tratadas con el vehículo 2 en la línea celular Ca Ski | 50 |
| Figura 55. Resultados para CFSE de las muestras tratadas con cisplatino en la línea celular Ca Ski | 51 |
| Figura 56. Resultados para IP de las muestras tratadas con cisplatino en la línea celular Ca Ski..... | 51 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Condiciones de síntesis de nanopartículas de plata. Ensayo 1 | 29 |
| Tabla 2. Condiciones de síntesis de nanopartículas de plata. Muestra 1_probe..... | 31 |
| Tabla 3. Señales de transmisión FT-IR del PEG | 35 |
| Tabla 4. Señales de transmisión FT-IR del CDI..... | 38 |
| Tabla 5. Comparación de espectros de transmisión FT-IR del PEG, el CDI y el PEG activado..... | 39 |

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es actualmente, la tercera causa de muerte por enfermedad a nivel mundial, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes y, su terapéutica actual presenta diferentes problemáticas. Lo anterior hace que el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de esta enfermedad sea de gran importancia. Las nanopartículas de plata han sido propuestas como potenciales agentes anticancerosos, ya que su acción citotóxica es similar a las observadas en diversas estrategias terapéuticas anticáncer actuales. El desarrollo de nanopartículas de plata y su estudio como agente antineoplásico promete ser una opción terapéutica para el cáncer, sin embargo; al igual que los quimioterapéuticos disponibles, su actividad no es específica y sus efectos colaterales podrían ser importantes. La generación de nanotransportadores ofrece la posibilidad de disminuir los efectos adversos de la terapia mediante el direccionamiento del efecto. En el presente trabajo se desarrolló la síntesis, caracterización y estudios del efecto citotóxico de las nanopartículas de plata en líneas celulares neoplásicas y, el diseño y síntesis de nanotransportadores de estas con las características farmacológicas de la tendencia actual en la quimioterapia, principalmente la biocompatibilidad y el tamaño adecuado. Para introducir al lector al tema se inicia con una breve descripción de las características de la plata, su relación con el tratamiento oncológico y, una breve descripción de la problemática a la cual se enfrenta actualmente la oncología. Se exponen los estudios realizados hasta el momento en el área tanto para la toxicidad de las nanopartículas de plata como para los sistemas de nanotransporte farmacológico en la terapia oncológica que están siendo evaluados hasta el momento. El desarrollo de este trabajo permitió encontrar condiciones para obtener nanopartículas de plata de tamaño homogéneo de diámetro aproximado a 5 nm y la síntesis de estructuras poliméricas que encapsulan a la plata en su interior, de diámetro medio de 100 a 300 nm, debidamente aisladas y con una cubierta biocompatible de PEG. Se comprobó, mediante citometría de flujo, que las nanopartículas de plata son citotóxicas para la línea celular Ca Ski, y que, la estructura generada para contenerlas permite la actividad de las nanopartículas. Al realizar los estudios comparativos contra los vehículos sin nanopartículas se comprobó que el efecto citotóxico se debe a las nanopartículas de plata y no a los compuestos involucrados en su síntesis o en su encapsulamiento. Al concluir este estudio, considero que dará la pauta para futuras investigaciones que permitan evaluar su factibilidad terapéutica antineoplásica bajo las condiciones en que actualmente se están desarrollando los agentes anticancerosos, que permiten direccionar el efecto a sitios específicos de acción y así disminuir los efectos adversos.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

La plata: el elemento y su presencia en la naturaleza

La plata es un elemento químico de número atómico 47, situado en el grupo Ib de la tabla periódica. Su símbolo es Ag (procede del latín: *argentum*). Es un metal de transición blanco, brillante, blando, dúctil, maleable y es el mejor conductor metálico del calor y la electricidad. Tiene una densidad de 10490 kg/m³ y una estructura cristalina cúbica centrada en las caras. Se encuentra en la naturaleza formando parte de los distintos minerales (generalmente en forma de sulfuro) o como plata libre. Desde el punto de vista químico, es un material poco reactivo; se disuelve en ácidos oxidantes y puede presentar estados de oxidación +1, +2 y +3, siendo el más común el estado de oxidación +1. En su estructura atómica presenta 5 niveles de energía con 2, 8, 18, 18 y 1 electrones en cada uno de ellos, respectivamente. Los principales productores de plata a nivel mundial son Perú, México, China, Australia y Chile. La plata ha sido ampliamente utilizada en la historia de la humanidad. El 95% del consumo mundial anual de plata es para usos industriales, fotografía, joyería y ornamentales; aunque con el avance de la tecnología, están tomando importancia sus usos eléctricos, mecánicos, ópticos y médicos (The Silver Institute, 2009). Se encuentra a niveles menores de 0.000001 mg/m³ de aire, 0.2-2.0 ppb en aguas superficiales como lagos y ríos, así como a niveles de 0.20-0.30 ppm en suelo en los sitios de fuente natural (ATSRD, 1990).

La plata en el organismo

La plata entra en el organismo por ingestión, respiración o por contacto con la piel y sale a través de las heces, en el transcurso de una semana. Muy poca plata sale por la orina. Pero ésta puede acumularse en varias partes del cuerpo. Desde principios del siglo pasado, se sabe que los compuestos de plata pueden teñir de gris o gris azulado a los tejidos. Padecimiento denominado argiria. La argiria ocurre en personas que comen o inhalan compuestos de plata durante mucho tiempo (varios meses o años) (ATSRD, 1990). Estudios indican que la argiria se presenta después de una dosis total de 0.9 g de plata. La plata se deposita también en los pulmones y puede producir neumoconiosis, fibrosis pulmonar y evolucionar a carcinoma (Meo S, 2003). Se ha empleado en la práctica médica desde hace varios años, por ejemplo, en presentación oftálmica como nitrato de plata para tratamiento de conjuntivitis infecciosa, en comprimidos como tratamiento de la adicción al tabaco, en ungüentos para tratamiento de lesiones por quemaduras, etc. (ATSRD, 1990).

En el organismo, la plata puede interferir con funciones de catálisis, de almacenamiento y transporte, en la estructura y ciclo celulares, en la señalización inter e intracelular, en la expresión genética, etc; todo esto debido a que se une covalentemente con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, pudiendo afectar o inhibir su función y causar daño celular.

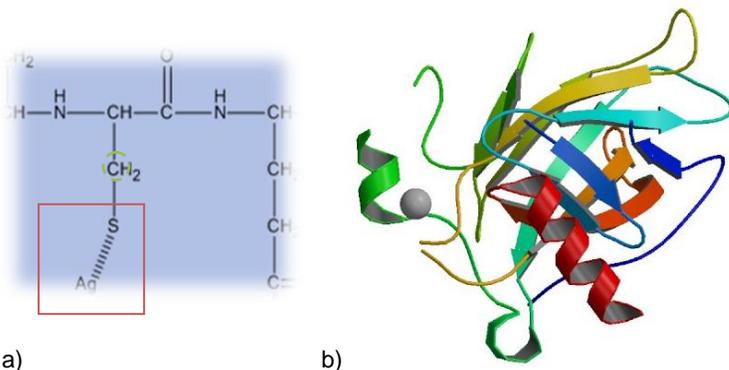


Figura 1. Interacción de la plata con las proteínas. La plata se enlaza covalentemente al los grupos sulfhidrilo de las proteínas como se observa en a), esta interacción genera modificaciones en la estructura de éstas, pudiendo afectar su conformación tridimensional, alterando su papel estructural o su actividad enzimática b) estructura terciaria de una proteína, c) modificación estructural hipotética por efecto de la interacción de la proteína con la plata.

Además de la plata, existen otras sustancias que interfieren con la función proteica que han sido estudiadas y desarrolladas por varias décadas, como algunos quimioterapéuticos que por su citotoxicidad han sido empleados en el tratamiento del cáncer, entre ellos el busulfán, la carmustina, la ciclofosfamida, el clorambucil, la lomustatina, el melfalán, el carboplatino y el cisplatino (Riesenfeld, 1942).

El cáncer. Su problemática.

Cáncer, es el término utilizado para designar a los tumores malignos. En él existen, entre otros eventos, inestabilidad genética y acumulación de múltiples alteraciones moleculares, que resultan en el crecimiento celular incontrolado (Cotran R, 2000). A pesar del conocimiento que se tiene sobre esta enfermedad, resultado del avance científico-tecnológico, la oncología se enfrenta a diversas problemáticas: a) aún no es posible ofrecer un tratamiento exitoso, debido principalmente a la gran variabilidad entre tipos y subtipos de neoplasias; b) la mayoría de los agentes quimioterapéuticos anticancerosos no discriminan las células tumorales de las células normales, causando toxicidad sistémica y efectos adversos en los pacientes; c) además, el retraso en el diagnóstico y/o tratamiento repercute ampliamente en el curso clínico y pronóstico de la enfermedad; por ejemplo, más del 60% de los pacientes con cáncer de mama, de colon, de próstata y de ovario presentan metástasis al momento del diagnóstico (Shuming N, 2007). Debido a estos y otros problemas, el cáncer es actualmente, la tercera causa de muerte por enfermedad a nivel mundial, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Ferlay J, 2004). En el 2005 se reportó al cáncer dentro de las 10 principales causas de mortalidad general mundial; registrándose 7.6 millones de muertes, de las cuales, el 13% se debió a esta enfermedad; el 70% de estas se presentó en países en vías de desarrollo. Se estima que para el año 2015 la mortalidad por esta causa ascenderá a 9 millones y, para el año 2030 será de 11,4 millones (OMS, 2005). Debido a la importancia de esta enfermedad, muchas instituciones mundiales y nacionales, suman sus esfuerzos en el desarrollo de la oncología clínica y molecular, que incluyen: a) tecnologías avanzadas de imagenología y detección oportuna del cáncer, b) mejores métodos

de diagnóstico y pronóstico, c) estrategias para minimizar o eliminar la toxicidad y los efectos adversos de los agentes quimioterapéuticos y, d) descubrimientos básicos en la biología del cáncer que ofrezcan conocimientos que contribuyan al entendimiento de las neoplasias y, así incidir en el curso clínico de las mismas. En años recientes, se ha propuesto que los avances en estas áreas permitirán una práctica oncológica personalizada en la que la detección, el diagnóstico y la terapia sean adecuadas a las condiciones moleculares específicas de las neoplasias y el desarrollo de una oncología predictiva, en la cual, mediante marcadores genéticos y moleculares se pueda predecir el curso clínico de la enfermedad (Ferrari, 2005).

La terapéutica convencional actual incluye a la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia; éstas alternativas de tratamiento se desarrollan con indicaciones precisas y bajo protocolos establecidos; sin embargo, los resultados no son del todo satisfactorios en diversas neoplasias; debido, entre otras cosas, a la variabilidad en la respuesta al tratamiento de los individuos y a características propias del cáncer, principalmente a la capacidad invasiva y metastásica y la resistencia al tratamiento. La invasión y la metástasis son las principales características distintivas de las neoplasias y lo que en la mayoría de los casos determina el pronóstico y calidad de vida de los pacientes (Steeg, 2006), además de que la biología de las neoplasias repercute en la respuesta a los diversos tratamientos (Mareel M, 2003). Existen tumores que a pesar de ser agresivos, son curados cuando se incide en etapas tempranas, tal es el caso del seminoma testicular (Nur U, 2008), el cual es radiosensible; mientras que ciertos tipos de leucemias (Laubach J, 2008) y linfomas (Johnston A, 2008), son sensibles a diferentes quimioterapéuticos. La terapéutica convencional, también trae consigo una serie de efectos adversos, causando por ejemplo, edema postquirúrgico por destrucción linfática, quemaduras por radioterapia y mielosupresión por quimioterapéuticos, entre otros; llegando a ser de tal importancia que en ocasiones, la calidad de vida se ve seriamente afectada, llevando incluso al abandono del tratamiento y, en el peor de los casos, a la muerte del paciente (Jaehde U, 2008). Por ejemplo, Al mismo tiempo que la sobrevida del cáncer de mama aumenta con el diagnóstico en etapas más tempranas de la enfermedad y la mejora de los tratamientos, los efectos adversos del tratamiento oncológico, como la cardiotoxicidad, siguen siendo clínicamente importantes. Las antraciclinas causan cardiotoxicidad crónica, así mismo lo hacen la radioterapia, la terapia hormonal (incluyendo al tamoxifen y los inhibidores de aromatasa) y la quimioterapia con taxanos y trastuzumab (Bird BR, 2008). La neurotoxicidad medicamentosa, también ha sido reconocida como un problema significativo en los pacientes con linfoma del sistema nervioso central (Correa DD, 2007). De esta manera, se reconoce actualmente que, el problema principal de los quimioterapéuticos anticancerosos es que no discriminan las células normales de las de cáncer, causando toxicidad sistémica, que en muchos de los casos no es tolerada por los pacientes, y sus efectos pueden ser deletéreos más que benéficos (Krueger A, 2001).

La quimioterapia incluye diversas estrategias de acción. Entre los fármacos antineoplásicos se encuentran los que inhiben a las enzimas de duplicación celular, los agentes que interactúan con el ADN, los ligandos a la tubulina, los antimetabolitos, los inhibidores de la ciclooxigenasa-2, los inhibidores de la lipooxigenasa-2, los que interactúan con la proteína cinasa C, los fármacos antiangiogénicos, los que modulan al factor de necrosis tumoral, a las interleucinas y al factor nuclear kappa B, a AP-1, a las fosfolipasas y a los inhibidores de desacetilasas de histonas, etc. y otros más que se encuentran actualmente en investigación; aunque investigaciones recientes sugieren que los fármacos antineoplásicos multidiana parecen tener mejor efecto anticanceroso que los que actúan sobre un solo blanco terapéutico.

La biología del cáncer

Existen diferentes teorías del desarrollo del cáncer, la más simple de ellas señala que se requiere de la participación de un carcinógeno (iniciador) y de la estimulación subsecuente con un mutágeno (promotor); sin embargo, se reconoce que la carcinogénesis es un proceso de múltiples pasos en los que, tanto el ambiente como la información genética son importantes. Aunque el cáncer se origine a partir de una clona celular, la que posteriormente, por expansión, origine células hijas similares, genotípica y fenotípicamente; es bien sabido que los tumores malignos son compuestos por diversas subclonas; resultado de la inestabilidad genética y epigenética. En general, las neoplasias malignas requieren del desarrollo de algunas o de todas estas características: a) autosuficiencia, b) pérdida de la inhibición por contacto, c) evasión de la apoptosis, d) aumento de su potencial replicativo, e) angiogénesis sostenida y, f) invasión y metástasis (Alexrod D, 2006).

Autosuficiencia

Las células de cáncer generan sus propias señales de crecimiento, que se expresan en condiciones fisiológicas como la cicatrización y reparación de las heridas. Estos moduladores estromales incluyen al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y al factor de crecimiento transformante (TGF); los cuales, también activan a las células estromales como los fibroblastos, estimulando la secreción de otros factores de crecimiento y algunas proteasas que favorecen el crecimiento tumoral, creando círculos de señalización (Alexrod D, 2006).

Pérdida de inhibición por contacto

Las células de cáncer son insensibles a las señales de inhibición. Bajo condiciones normales, las células epiteliales que han perdido contacto con su membrana basal y con las células adyacentes presentan apoptosis, condición que no se presenta en el cáncer; ya que la célula adquiere mecanismos de evasión de la apoptosis aunada a la acción de citocinas antiapoptóticas provenientes de células estromales como los fibroblastos (Alexrod D, 2006).

Evasión de la apoptosis

Las células, en general, poseen diferentes mecanismos de muerte: la apoptosis, la necrosis y la autofagia. La apoptosis es un proceso de muerte programada que se lleva a cabo por dos vías. La intrínseca, a través de miembros de la familia de proteínas BCL-2, que inducen la liberación del complejo de proteínas pertenecientes al sistema mitocondrial citocromo c, repercutiendo en la función de las caspasas, una familia de proteasas que ocasiona proteólisis y activación de nucleasas que degradan el genoma, resultando en una muerte rápida sin inflamación. La extrínseca, a través de receptores de muerte celular de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) que incluyen al TNF1, Fas (CD95), DR3/WSL y a los ligandos relacionados con el TNF, TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand)/Apo-2L (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5). Una vez que el ligando se une a su receptor se activa el dominio efector de muerte, activando a la caspasa 8, la cual escinde varias proteínas, incluyendo a la procaspasa-3, que resulta en su activación y muerte celular. Hay un solapamiento e integración de las dos vías a través de un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2 (Bid), el cual es escindido a través de caspasa 8 incrementando su actividad proapoptótica, que resulta en su translocación a la mitocondria, donde promueve la liberación del citocromo c. La translocación de estas vías es mínima, ya que la mayoría de las ocasiones cada una opera de manera independiente. (Gross A 1999, Yin XM 1999). Morfológicamente, la célula apoptótica se observa encogida, con condensación citoplasmática, con inclusiones citoplásmicas conocidas como cuerpos apoptóticos o con edema de membrana, condensación de cromatina y fragmentación del DNA y, a nivel molecular, aunque el acontecimiento central es la activación de cisteín-proteasas, aspartil-proteasas y caspasas. Sin embargo, el hecho aceptado es que, la célula de cáncer presenta dos mecanismos fundamentales de evasión de la apoptosis: a) por inhibición de los mecanismos que estimulan la señalización intracelular para la activación de caspasas y, b) la inhibición por estimulación trófica mediada por factores de crecimiento provenientes tanto de la célula tumoral como del estroma. En los tumores, contrario a lo que se piensa, se presenta una alta tasa de muerte celular, debida principalmente a la alta tasa mitótica aunada al suministro insuficiente de oxígeno y nutrientes por una vasculatura disfuncional, lo que lleva a la célula a estrés metabólico, presentándose áreas de necrosis intratumorales. La necrosis, es otro mecanismo de muerte celular por pérdida de su integridad física; este es un mecanismo de muerte con mayor repercusión que la apoptosis, ya que promueve el proceso inflamatorio. Al parecer, la necrosis en células tumorales con defectos en la apoptosis se presenta cuando el consumo de energía excede a la producción, por lo que se dice que la muerte celular está ligada al metabolismo, el cual, podría ser un blanco terapéutico atractivo. Aunque, si bien es cierto que las células con defectos apoptóticos recurren a la autofagia para generar energía; otro mecanismo de muerte celular comúnmente encontrado en tumores, en el cual se obtiene energía a partir del consumo de los desechos celulares y así evitar la muerte por necrosis y sobrevivir al estrés metabólico; la autofagia progresiva por privación de nutrientes conduce a la muerte celular. (Jin S, 2007).

Las células de cáncer desarrollan angiogénesis sostenida

La angiogénesis es el proceso por el cual se desarrollan nuevos vasos que resulta en el aumento del flujo sanguíneo al interior tumoral, el mediador primario de este fenómeno es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*), secretado por las células tumorales (Alexrod D, 2006). Este un fenómeno complejo en el que participan múltiples moléculas, como son: el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *Fibroblast Growth Factor*), el factor de crecimiento transformante (TGF, *Transforming Growth Factor*), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *Platelet Derived Growth Factor*), proteasas, etc. La transformación maligna requiere de un ambiente fértil que propicie la formación de un tejido con características invasivas y metastásicas. Se sabe que la masa tumoral no crecería más de 1 mm de diámetro si careciera de vasos sanguíneos; la vascularidad entonces, es importante para el desarrollo neoplásico. En estudios clínicos se encontró relación positiva entre densidad vascular y progresión tumoral. Por otro lado, también es sabido por algunas investigaciones que los neovasos no son del todo funcionales, por lo que es frecuente observar áreas de necrosis debidas a la alta tasa de crecimiento tumoral; aunque el tamaño del tumor, depende también de factores de crecimiento, de citocinas, de quimiocinas y de proteasas, que conllevan a la activación de señales intracelulares y activación subsecuente de genes específicos (Alexrod D, 2006).

Las células de cáncer invaden y metastatizan

Durante la carcinogénesis, las células cambian su comportamiento biológico y su fenotipo. El proceso se inicia con la transición epitelio mesénquima, en la cual, la célula presenta pérdida de características epiteliales como: polaridad, contactos intercelulares y con la membrana basal (MB); adquiere mayor plasticidad, se vuelve fusiforme, con aspecto fibroblastoide, y presenta cambios en el patrón de expresión de citoqueratinas, cadherinas, cateninas y vimentinas; se activan receptores tirosina-cinasa y TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*), que a su vez, activan proteínas intracelulares como Ras. Mediante cambios en el citoesqueleto, la célula de cáncer forma invadopodias, que junto con la acción de proteasas, le permiten atravesar la membrana basal y moverse al medio contiguo. Estas y otras rutas de señalización, tienen como resultado a la invasión y la metástasis. Cada neoplasia tiene capacidad invasiva y metastásica propias, estas son las características distintivas del cáncer y los mayores condicionantes del pronóstico de la enfermedad (Alexrod D, 2006)

El microambiente tumoral, características y su importancia en la terapia oncológica

Un tumor sólido es un ecosistema compuesto por células de cáncer, por el estroma y moléculas presentes en el medio; este complejo es denominado “microambiente tumoral” (Witz, 2008). El estroma incluye a los elementos formes, entre ellos: fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales, células cebadas, macrófagos, linfocitos y adipocitos; además de proteínas estructurales y funcionales como: colágenas, fibronectina, elastina, entactina, y moléculas como los glucosaminoglicanos que participan también en mecanismos de adhesión y señalización celular; los cuales pueden favorecer la progresión neoplásica mediante la secreción de factores de crecimiento celulares y angiogénicos, moléculas de adhesión y proteasas, entre otros; pero que pueden también tener un efecto opuesto, secretando sustancias con acción antiangiogénica, factores inhibidores del crecimiento e incrementando la respuesta inmune en contra de la célula tumoral. Las moléculas del microambiente tumoral (TGF β , NF- κ B, TNF α , TLR's, proteasas, etc.), en general, desarrollan acciones duales, desde la detención del ciclo celular, inducción de apoptosis, activación de la respuesta inmune, etc., hasta la inducción de la transición epitelio mesénquima, angiogénesis, protección contra apoptosis y promoción de la invasión y la metástasis (Witz, 2008).

El crecimiento y la sobrevivencia de la célula de cáncer requiere de la adecuada distribución de nutrientes por vasculatura sanguínea. En los tumores existen dos tipos de vasos sanguíneos, los preexistentes y los generados *de novo* por la influencia de factores proangiogénicos, desarrollados a partir de los primeros, pero que presentan una serie de modificaciones morfológicas y funcionales. Las vénulas se tornan tortuosas, alargadas y en ocasiones, dilatadas; sin embargo, el número de vasos sanguíneos preexistentes no aumenta, por el contrario, algunos de ellos se atrofian; mientras que otros permanecen funcionales y probablemente responden a estímulos fisiológicos y farmacológicos. Los vasos sanguíneos formados *de novo* en tumores con alta tasa de crecimiento, presentan anormalidades estructurales, ya que el endotelio es defectuoso, la membrana basal está ausente o interrumpida, los canales sanguíneos están delimitados por cordones de células tumorales, hay ausencia de pericitos y de componentes contráctiles de pared, así como de receptores fisiológicos/farmacológicos; la distribución de la vascularización es heterogénea, hay expansión del espacio intercapilar, etc. También se presentan alteraciones funcionales, como: desviación de la perfusión arteriovenosa, inestabilidad de la velocidad y dirección de flujo, ausencia de vasomoción, aumento de la fragilidad vascular, obstrucción capilar, agregación plaquetaria, micro y macro trombosis, aumento de la permeabilidad vascular, hemoconcentración, aumento en el volumen de flujo y presión intersticial, extravasación celular; etc.

No se tienen datos precisos de la perfusión sanguínea en tumores humanos pero algunos estudios sugieren que es menor que la del tejido normal; inclusive, los tumores primarios presentan una mejor perfusión que los metastásicos y, en la

periferia tumoral, también hay una mayor perfusión respecto al interior. Sin embargo, el flujo sanguíneo puede variar de manera importante aun en tumores de la misma estirpe histológica. Los tumores pueden tener flujo sanguíneo similar a aquellos órganos con altas tasas metabólicas (hígado, corazón y cerebro) o, menores a aquellos tejidos con bajas tasas metabólicas (epitelial, músculo-esquelético y adiposo); puede ser también mayor o menor que el del tejido de origen; por ejemplo, en el cáncer mamario, el flujo sanguíneo es substancialmente mayor que la mama postmenopáusica; el de los carcinomas es similar al de los sarcomas y, los tumores metastásicos poseen un flujo similar al tumor primario cuando presentan tamaños comparables. La mayoría de los tumores presentan áreas de alta perfusión y regiones con poca perfusión; lo cual, trae consigo alteraciones en la distribución de nutrientes, de oxígeno y de los quimioterapéuticos. La difusión limitada, al inducir hipoxia reduce los efectos de la radioterapia; mientras que la privación de nutrientes y la insuficiente remoción de los desechos celulares, trae consigo acidosis, por la acumulación de ácido láctico, desarrollándose el denominado “efecto Pasteur” (Vaupel P).

Estado del arte

La nanotecnología en la medicina, es un campo emergente de investigación interdisciplinaria, que permite modificar las propiedades de los materiales mediante el cambio en el tamaño de las partículas a escalas nanométricas, ofreciendo propiedades atractivas para la aplicación en la detección, en el diagnóstico y en el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer (Ferrari, 2005). Se ha demostrado que en los nanocristales de metales nobles, las propiedades son altamente influenciadas por su forma y tamaño; por esta razón, se han desarrollado rutas sintéticas que permiten un mejor control de estos parámetros. En el caso de la plata, como todo metal noble, es posible preparar soluciones coloidales acuosas mediante pulverización o por reducción de una sal de plata en una solución débilmente alcalina. Por adición de electrolitos o mediante ebullición, se coagula fácilmente el coloide de plata; para evitarlo, es necesario añadir a las soluciones, antes de la reducción, un coloide protector, como goma arábiga, albúminas y sustancias análogas; de esta manera se pueden obtener incluso, coloides de plata reversible; es decir, por lo que después de evaporar a sequedad se disuelven de nuevo en agua (Riesefeld, 1942).

En los últimos años, las nanopartículas de plata han sido objeto de intensa investigación para la evaluación de su actividad en sistemas biológicos. Se plantea que los iones de plata interaccionan fuertemente con los grupos tiol de enzimas vitales, inactivándolas (Feng L, 2000) y, que el DNA pierde su capacidad replicativa (Pal S, 2007). En otros estudios, se ha reportado que los iones plata provocan cambios estructurales irreversibles en la membrana celular de algunas bacterias, por efecto de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS-*Reactive Oxygen Species*-) (Sondi I, 2004). Morones y colaboradores reportaron que las nanopartículas de plata pueden actuar de manera similar a los iones de este material. Estos autores proponen tres formas principales mediante las cuales, las nanopartículas de plata, pueden actuar contra bacterias Gram negativas: 1) las

nanopartículas en el intervalo de tamaño de 1-10 nm, se adhieren a la superficie de la membrana celular y afectan drásticamente sus funciones, como la permeabilidad y la respiración; 2) éstas, son capaces de penetrar a las bacterias y causar un daño posterior, debido a las posibles interacciones con compuestos que contienen azufre y fósforo, principalmente el DNA y; 3) las nanopartículas pueden liberar iones de plata, contribuyendo adicionalmente a su efecto bactericida (Morones J, 2005). Por otro lado, se ha reportado que la plata posee actividad antiviral, ya que es capaz de inhibir o disminuir la capacidad infectiva del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1); observando que las nanopartículas de plata de 1 a 10 nm interactúan con el virus mediante la glicoproteína gp120, bloqueando su enlace y acción, de manera dosis-dependiente. Los autores también reportaron que, la acción de las nanopartículas, dependió del agente tensoactivo utilizado en su síntesis y del material de recubrimiento empleado en los diferentes ensayos (Elechiguerra J, 2005) (Forster M, 2000) (Leonard C, 1990). El amplio espectro de acción tóxica de la plata es conocido desde hace tiempo; sin embargo, hasta hace algunos años, no se habían reportado estudios de su interacción con células eucariotas, y no había sido considerada para el tratamiento de cáncer. Sin embargo, recientemente son varios los grupos de investigación que sugieren su uso. AshaRani y colaboradores, evaluaron la toxicidad de nanopartículas de plata cubiertas con almidón en la línea celular de fibroblastos de pulmón humano (IMR-90) y, en células de glioblastoma humano (U251); utilizando como criterios, cambios en la morfología celular, en la viabilidad celular, en la actividad metabólica y la activación del estrés oxidativo, observando que las nanopartículas de plata redujeron el contenido celular de ATP, causando daño mitocondrial e incrementando la producción de ROS, ambos de manera dosis-dependiente y, siendo, el daño al DNA, más prominente en las células de cáncer. El tratamiento con nanopartículas causó paro del ciclo celular en la fase G(2)/M, posiblemente debido a la reparación del DNA dañado. No se observó apoptosis o necrosis masivas. Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM), mostraron la presencia de nanopartículas de plata intramitocondriales e intranucleares, lo cual fue relacionado con su capacidad para romper la cadena respiratoria, permitiendo la producción de ROS e inhibiendo la síntesis de ATP, causando daño al DNA. Los autores propusieron que la sensibilidad superior de la línea celular U251 y la detención del ciclo celular, podrían ser analizados posteriormente para evaluar el uso potencial de las nanopartículas de plata en la terapia oncológica (AshaRani PV, 2009). Así mismo, Wu y colaboradores, reportaron que las nanopartículas de plata con diámetro promedio de 6 nm, suprimen eficazmente la proliferación de células de leucemia humana (K562) en función de la dosis y el tiempo; sugiriendo su posible uso en la terapéutica del cáncer (Wu O, 2008). Por otro lado, Carlson y colaboradores evaluaron la interacción de nanopartículas de plata de 15, 30 y 55 nm en macrófagos alveolares, encontrando acumulación intracelular significativa a las 24 h de exposición con dosis altas de nanopartículas y disminución en la viabilidad al incrementar la dosis de nanopartículas de 15 y 30 nm (10-75 µg/mL). También encontraron un incremento de 10 veces en el nivel basal de ROS en células expuestas a 50 µg de nanopartículas de 15 nm de diámetro por mililitro; sugiriendo que la toxicidad de éstas es mediada por estrés oxidativo. Así mismo, al medir los

niveles de citocinas y quimiocinas liberadas al medio de cultivo, encontraron una respuesta inflamatoria significativa por la liberación de TNF- α , MIP-2 e IL-1 β ; sin encontrar niveles detectables de IL-6; concluyendo que, las nanopartículas de plata presentan toxicidad dependiente del tamaño y, que uno de los mecanismos de toxicidad es el estrés oxidativo (Carlson C, 2008). Hussain y colaboradores probaron nanopartículas metálicas y de óxidos de metal, incluyendo en el estudio nanopartículas de plata de 15 y 100 nm, en la línea celular derivada de hígado de rata (BRL 3A), con un tiempo de exposición de 24 h, observando que las nanopartículas de plata en concentraciones de 5-50 $\mu\text{g/mL}$ disminuyeron significativamente la función mitocondrial y que la liberación de LDH aumentó significativamente en las células expuestas a dosis de 10-50 $\mu\text{g/mL}$, concluyendo que, las nanopartículas de plata son altamente tóxicas en comparación con aquellas compuestas por otros metales u óxidos metálicos. Los estudios de microscopía revelaron que las células presentaron tamaño y forma anormales, así como contracción. Los autores reportaron un decremento significativo en GSH (glutatiión reducido), el potencial de membrana reducido e incremento en los niveles de ROS, sugiriendo que la toxicidad de las nanopartículas de plata de 15 y 100 nm en células de hígado puede estar mediada por estrés oxidativo (Hussain S, 2008). Ahamed y colaboradores, estudiaron la respuesta al daño del DNA causado por nanopartículas de plata, con y sin cubierta de polisacárido, en células madre y en fibroblastos de embrión de ratón, mES y MEF, respectivamente; encontrando que para ambos tipos de nanopartículas de plata hubo un incremento significativo en la expresión de la proteína p53 (importante en el control del ciclo celular) y de las proteínas de reparación de DNA: Rad51 y H2AX fosforilada. Ambos tipos de nanopartículas indujeron muerte celular. Sus observaciones sugieren que los cambios en la superficie de las nanopartículas inducen diferente respuesta al daño al DNA, encontrando que las nanopartículas cubiertas generan un daño mayor que las desnudas (Ahamed M, 2006). Hsin y colaboradores, reportaron que, las nanopartículas de plata inducen apoptosis en fibroblastos NIH3T3 por la liberación del citocromo c en el citosol y la translocación de Bax (proteína perteneciente a la familia de Bcl-2, reguladores de la apoptosis y del ciclo celular) a la mitocondria. La inducción de apoptosis se encontró asociada a la generación de ROS y la activación de JNK (Jun N-terminal kinase, también conocida como proteína cinasa activada por estrés- SAPK-). En las células resistentes a las nanopartículas de plata HCT116, encontraron sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas, principalmente de Bcl-2; estos autores concluyeron que las nanopartículas de plata inducen apoptosis por la vía mitocondrial (Hsin Y, 2008). Arora y colaboradores, evaluaron la acción de nanopartículas de plata de 7-20 nm en las líneas celulares HT-1080 y A431; encontrando que, por debajo de 6.25 $\mu\text{g/mL}$ no se presentan alteraciones en la morfología celular, sin embargo; a concentraciones mayores (6.25-50 $\mu\text{g/mL}$) las células se observaron con morfología alterada. Los valores de IC₅₀ para HT-1080 y A431 fueron 10.6 y 11.6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. $\frac{1}{2}$ de la IC₅₀ (6.25 $\mu\text{g/mL}$) generó signos claros de estrés oxidativo (decremento de GSH –glutatiión oxidasa-, SOD –superóxido dismutasa- e incremento en la peroxidación) y fragmentación del DNA, la cual sugiere muerte por apoptosis (Arora S, 2008). Estos mismos autores evaluaron la interacción de nanopartículas de plata de 7-20 nm con cultivos primarios de fibroblastos y células

de hígado de ratones albinos. Por debajo de 24 h de exposición, la morfología celular en ambos casos permaneció sin alteraciones al emplear concentraciones de 25 y 100 µg/mL, respectivamente; determinaron una IC₅₀ de 61 y 449 µg/mL, para cada una. Con dosis de ½ de la IC₅₀ durante 24 h, encontraron signos de acumulación de nanopartículas en mitocondria y citoplasma; en fibroblastos también detectaron incremento de GSH y decremento en la peroxidación lipídica; mientras que en las células de hígado encontraron niveles aumentados de SOD y GSH. Con ensayos de actividad de caspasa-3 determinaron que la concentración de nanopartículas necesaria para disparar la apoptosis son mucho menores (3.12 µg/mL para los fibroblastos y 12.5 µg/mL en las células de hígado) que las necesarias para inducir necrosis (100 µg/mL para los fibroblastos y 500 µg/mL en las células de hígado) (Arora S, Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblast and liver cells, 2009). Por otro lado, Cha K. y colaboradores, reportaron inducción de apoptosis en la línea celular de hepatoma humano Huh-7, por nanopartículas de plata de 13 nm. En un estudio en modelo murino, determinaron mediante microarreglos de cDNA alteración en la expresión de genes relacionados con la apoptosis y la inflamación que reflejan un aumento en estos dos procesos; los resultados fueron validados mediante RT-PCR semicuantitativa (del inglés *Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction*) (Cha k, 2008).

Entre las especies reactivas de oxígeno se encuentra el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Stoys S, 1995). Los radicales de oxígeno dañan a los lípidos, a los ácidos nucleicos, a las proteínas y a los carbohidratos; resultando en la alteración de la función e integridad celular. Sin embargo, las células están cuentan con mecanismos de protección (antioxidantes, enzimas, necrofagia y procesos de reparación), que actúan contrarrestando los efectos de los radicales libres (Britton, 1996). La formación de radicales libres mediada por metales causa varias modificaciones a las bases nitrogenadas, potencia la peroxidación lipídica y altera la homeostasis de calcio y de sulfhidrilo. Los peróxidos lipídicos formados mediante el ataque de los radicales libres a los residuos de ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, pueden, así mismo, reaccionar con los metales reductores, produciendo finalmente los mutágenos: malondialdehído, 4-hidroxi-nonenal y otros aductos hexocíclicos en el DNA, del tipo eteno o propano (Valko M, 2005). Los radicales hidroxilo son unas de las especies de radicales más reactivas, atacan lípidos, proteínas y DNA. En la peroxidación lipídica, los radicales causan destrucción oxidativa de ácidos grasos poliinsaturados. La peroxidación lipídica es una reacción en cadena que daña directamente a las membranas celulares e indirectamente a otros constituyentes por la actividad de los aldehídos, productos secundarios de la reacción, fenómeno conocido como “efecto dominó”. El estrés oxidativo es la respuesta del organismo a los radicales libres e implica actividad de diversas enzimas: catalasa, SOD, glutatión reductasa, etc., así como de moléculas con acción antioxidante: vitamina E, vitamina C, glutatión, ácido úrico, etc. (Sakac V, 2000). Khaitan y Dwarakanath, mencionan que el estrés oxidativo intratumoral está determinado por el estado de los sistemas mitocondrial, metabólico, de oxigenación y enzimático; los cuales influyen el crecimiento tumoral y la respuesta a los agentes antineoplásicos. El

estrés oxidativo inducido, es uno de los determinantes importantes en el éxito del tratamiento con ciertos quimioterapéuticos y con la radiación ionizante. Los niveles bajos a moderados de ROS se han relacionado con las respuestas de sobrevida y resistencia terapéutica. Los niveles mayores de ROS estimulan múltiples vías de muerte, incrementando la eficiencia terapéutica. Sin embargo, es importante mencionar que, la actividad de las ROS es contradictoria y, depende mucho su papel benéfico o maligno de las circunstancias del tejido en el que actúen; por ejemplo, la formación de ROS es constante en el metabolismo celular aerobio y, éstas participan de manera importante en procesos celulares; cuando hay alteraciones en el equilibrio de la formación de ROS y la eficiencia de los mecanismos antioxidantes, se produce estrés oxidativo, el cual, causa daño a macromoléculas importantes como el DNA, proteínas y lípidos. Se ha señalado que hay participación de ROS en la transformación maligna celular, ya que inducen inflamación, activación de citocinas, señales oncogénicas, proliferación, mutaciones y alteraciones en la cadena respiratoria. Sin embargo, la generación de ROS es un mecanismo importante para las estrategias terapéuticas en el tratamiento anticáncer (Khaitan D, 2009). Así, la producción de ROS es uno de los mecanismos de acción de diversos agentes quimioterapéuticos, debido a su implicación en el control de la apoptosis. La respuesta celular a las ROS, depende de la duración y la intensidad en la exposición a un ambiente con altas concentraciones de ROS. Entonces, el estado de óxido-reducción es de gran importancia para la activación del proceso oncogénico y, también está implicado en la susceptibilidad tumoral a fármacos quimioterapéuticos específicos (Cejas P, 2004). Se sabe que, la potenciación de la respuesta a la quimio y radioterapia, se debe a la potenciación de las rutas de señalización de las proteínas cinasas activadas por el mitógeno p38 y de la cinasa c-Jun-N terminal (JNK), involucrando la participación de las ROS (Benhar M, 2001). Por su naturaleza altamente citotóxica, las ROS pueden ser utilizadas inducir muerte en células de cáncer, ésta estrategia es conocida como terapia de oxidación, la cual debe ser dirigida selectivamente en células de cáncer, por la liberación de ROS en los tumores sólidos, o alternativamente inhibiendo los sistemas enzimáticos anti-oxidativos en el tumor (Fang J, 2009). Varios agentes antineoplásicos fundamentan su acción vía apoptosis activada por la generación de ROS, entre ellos: la vinblastina, el cisplatino, la mitomicina C, la doxorubicina, la camptotecina, la inostamicina, la neocarzinostatina, etc. Desde 1950 se ha estudiado esta estrategia para el tratamiento del cáncer con resultados poco satisfactorios, probablemente porque no se ha logrado una actividad antitumoral selectiva de las ROS; resultando en la inducción de múltiples efectos adversos, por (ejemplo, cardiotoxicidad por doxorubicina) (Fang J N. H., 2007). Sin embargo, hay estrategias en este campo, sobre todo mediante el uso de enzimas generadoras de ROS, las cuales actualmente están siendo complementadas con ayuda de la nanotecnología, mediante la encapsulación y el direccionamiento del efecto. Se prevé que esta puede ser una modalidad terapéutica poderosa para el futuro tratamiento anticáncer (Fang J N. H., 2007).

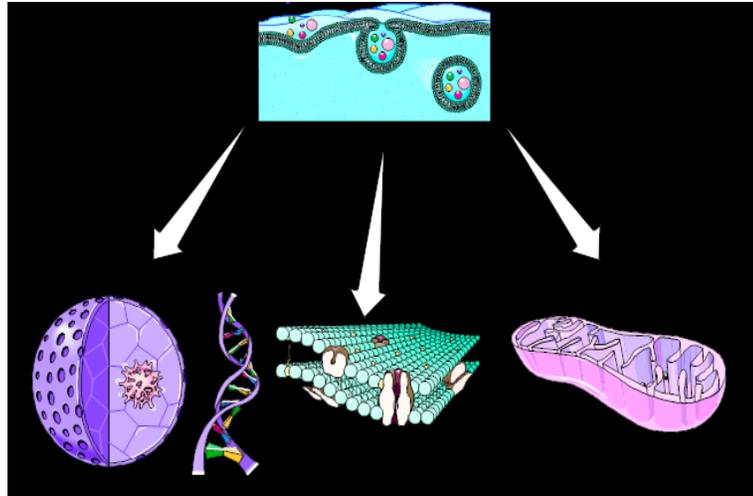


Figura 2. Sitios de daño celular causado por la plata

Se sabe que la toxicidad sistémica afecta, sobre todo, a los tejidos con alto índice mitótico, como la médula ósea, el tejido linfoide y los epitelios (Yonezawa, 2004). Con el uso de la nanotecnología, se han desarrollado diversas estrategias para el transporte y direccionamiento eficaz de los fármacos al sitio de acción, a fin de evitar o disminuir los efectos colaterales del tratamiento farmacológico antineoplásico (Nishiyama N, 2006) (Bae Y, 2005), prometiendo, además, corregir otras limitantes como la baja solubilidad acuosa, la baja biodisponibilidad oral y los bajos índices terapéuticos. Para mejorar la biodistribución de fármacos antineoplásico, se están sintetizando nanopartículas poliméricas acarreadoras, incluyendo: lipoproteínas, micelas poliméricas, dendrímeros, nanocorazas, nanotubos funcionalizados y microesferas poliméricas, entre otros; los cuales, transportan a los fármacos, evadiendo la respuesta inmunológica y liberándolos directamente en la zona tumoral (Duncan, 2003). Varias nanopartículas han sido diseñadas en su tamaño óptimo y sus características superficiales para incrementar el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. Éstas son capaces de transportar a los fármacos hacia las células de cáncer, utilizando las características del microambiente tumoral, como el efecto de permeabilidad y retención incrementadas (EPR –Enhanced Permeability and Retention-). Además del mecanismo del direccionamiento pasivo, actualmente se desarrollan estrategias de direccionamiento activo a través de ligandos o anticuerpos dirigidos a marcadores tumorales específicos, ampliando la especificidad de estas nanopartículas terapéuticas. La resistencia a fármacos, otro obstáculo tanto para el marcaje tumoral como para los agentes quimioterapéuticos convencionales, puede ser superada, o al menos reducida, usando nanopartículas. Las nanopartículas tienen la capacidad de acumularse en las células sin ser reconocidas por la glicoproteína P, uno de los principales mediadores de la resistencia a multifármacos, resultando en el incremento de la acumulación intracelular de éstos. Las nanopartículas multifuncionales/multidiana, están siendo activamente investigadas y se vislumbran como la próxima generación de nanofármacos, facilitando la terapia antineoplásica personalizada (Cho K, 2008). Los bloques copoliméricos de carácter ambifílico, con estructura de núcleo-coraza, han demostrado mayor estabilidad en el torrente sanguíneo y acumulación

efectiva en la zona tumoral, después de su administración sistémica. Se sabe que las partículas biocompatibles con tamaño menor a 200 nm, pasan desapercibidas por el sistema retículo-endotelial (RES) (Nishiyama N, 2006). Se ha demostrado que, los polímeros se acumulan preferente y efectivamente, en los tumores sólidos, debido a que existe hiperpermeabilidad microvascular a las macromoléculas, así como a un drenado linfático disminuido; este efecto es denominado “Permeabilidad y Retención Incrementadas”. Se ha sugerido que la hiperpermeabilidad vascular tumoral se debe tanto a la relación de la expresión del factor de permeabilidad vascular (VPF) sobre el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), como a la secreción de otros factores, incluyendo al factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) (Nishiyama N, 2006). Así mismo, se han reportado algunos estudios de sistemas de liberación de fármacos basados en bloques de copolímeros; por un lado, micelas formadas por copolímeros de polibencil-aspartato (PBLA) y polietilenglicol (PEG) que, actúan como acarreadores de fármacos hidrofóbicos; tal es el caso de los fármacos antineoplásicos adriamicina y doxorrubicina. Se ha demostrado que la acumulación efectiva del acarreador en la zona tumoral, depende de su tiempo en la circulación sanguínea. Otros estudios proponen sintetizar nanopartículas que funcionen puedan funcionar como cargadoras de fármacos a partir de micelas poliméricas formadas por la mezcla de la solución de 5'-trifosfato (FATP) citotóxico y 5-fluoroadenosin arabinosa (fludarabine) y polímeros de polietilenimina protonada (PEI+), que interaccionan con grupos fosfato del FATP. La estructura compacta de polímeros flexibles resulta en una cápsula compleja de FATP/PEI que actúa como núcleo, el cual; es revestido de una coraza hidrofílica de PEG. Esta coraza permite la liberación sostenida de FATP e impide su degradación enzimática. El efecto del FATP en las células tumorales ha sido evaluado a través de estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos murinos en diversas neoplasias. En este estudio se evaluó también la tasa de liberación de FATP de los polímeros transportadores mediante espectrofotometría, así como su citotoxicidad, con el ensayo estándar de azul de tiazolio- bromuro tetrazolio (MTT)(47). Estudios realizados con micelas poliméricas compuestas por PEG-poli(D,L-lactida) (PEG-b-PDLLA) marcado con ¹²⁵I mostraron que las partículas presentaron una $t_{1/2}$ ~18 h, después de la administración intravenosa; manteniéndose el 25% de la dosis a las 24 h post tratamiento. Las micelas se distribuyeron únicamente en el compartimiento sanguíneo e interactuaron fuertemente con las células sanguíneas inmediatamente después de su administración. Su relación de distribución en el tejido y la sangre fue comparable al espacio vascular en los órganos (pulmones, riñón, hígado y bazo); las micelas poliméricas evitaron el reconocimiento por el RES y eliminación por el sistema porta-hepático, el cual se caracteriza por poseer grandes uniones interendoteliales (~100 nm) y por carecer de membranas basales. Los constituyentes del bloque de copolímeros fueron excretados vía renal, debido a su tamaño molecular menor al requerido en el umbral de filtración glomerular (42-50 kDa), sugiriendo la seguridad de las micelas poliméricas, con un riesgo bajo de acumulación crónica en el cuerpo (Nishiyama N, 2006). Otros autores, han propuesto el uso de quitosan para la generación de las nanoestructuras; sin embargo, éstas se degrada en medio acuoso aun sin la presencia de lisozimas (López-León T, 2005).

También se ha propuesto el uso de nanogeles anfotéricos constituidos por ovoalbúmina y ovotransferrina, compuestos que causan reacciones alérgicas en algunas personas (Jinhua H, 2007). Recientemente, Vinogradov, Bronich y Kavanov reportaron la preparación de partículas con interacción cruzada entre PEG y PEI, una modificación del método de emulsión/evaporación del solvente, obteniendo distribuciones de tamaño de 40 a 300 nm, las partículas formaron complejos con oligonucleótidos con carga negativa y fueron propuestas para terapia génica (Vinogradov S, 2005). Como se ha mencionado, existen múltiples estrategias para el desarrollo de nanoestructuras transportadoras de fármacos, su elección debe acoplarse al sistema químico a encapsular y a las condiciones biológicas que deberá soportar para asegurar el direccionamiento y transporte efectivo del fármaco y, sobre todo, a mejorar la eficacia terapéutica de los fármacos y la calidad de vida de los pacientes. En años recientes, muchas nanoestructuras artificiales funcionales han sido sintetizadas, para ello se pueden utilizar copolímeros de diferente composición que interaccionen de manera específica con los fármacos, con componentes, biológicamente inertes y, se puede aplicar ingeniería en su estructura. Estas nanoestructuras presentan diferentes ventajas: su preparación es simple, transportan eficientemente al fármaco sin modificarlo químicamente y lo liberan de manera controlada. Además, son capaces de evitar la excreción renal cuando presentan un tamaño mayor a su valor umbral (42-50 kDa) y evitan al RES cuando los transportadores poliméricos son de tamaños menores a 200 nm, así como por su biocompatibilidad, la cual, se ve favorecida si éstas son recubiertas con polímeros hidrofílicos biocompatibles como el PEG (Nishiyama N, 2006). Debido a que el esqueleto polimérico del PEG no es de origen biológico, este no es realmente degradado por las enzimas de los mamíferos (aunque algunas enzimas bacterianas pueden romperlo). Esta propiedad resulta en una degradación lenta del polímero cuando es aplicado in vivo, prolongando la vida media de las sustancias a las que es acoplado. La modificación con PEG sirve para enmascarar a cualquier molécula a la que este sea unido de la actividad del sistema de complemento y las inmunoglobulinas en el torrente sanguíneo. Desde el primer reporte por Abuchowski et al. (1977) relacionado con la alteración de las propiedades inmunológicas de la albúmina sérica bovina (BSA, bovine serum albumin) que había sido modificada con PEG, el interés por la modificación polimérica de moléculas biológicas ha ido aumentando. El PEG unido a otras moléculas puede ser usado para alterar las características de solubilidad en solventes orgánicos o acuosos (Inada et al; 1986), para la modulación de la respuesta inmune (Delgado et al; 1992), para incrementar la estabilidad de proteínas en solución (Berger y Pizzo; 1988), (Knauf et al; 1988) para incrementar la vida media de sustancias in vivo, para ayudar en la penetración de las membranas celulares para alterar las propiedades farmacológicas (Dunn y Ottenbrite; 1991), para incrementar la biocompatibilidad, especialmente de sustancias externas y prevenir la adsorción de proteínas en la superficie. Las micelas poliméricas son caracterizadas por su concentración crítica de asociación (c.a.c. -critical association concentration-) que define el umbral de concentración de ensamble; éstas presentan una c.a.c baja (10^{-6} – 10^{-7} M), lo cual retrasa su disociación después de su aplicación sistémica (su disociación es cinéticamente lenta). Esta propiedad permite a las micelas circular en el torrente

sanguíneo hasta su acumulación en su zona de acción (Nishiyama N, 2006). Debido a que las nanopartículas presentan una amplia área superficial, es posible el uso de múltiples grupos funcionales de superficie que se pueden unir por conjugación química a múltiples agentes de diagnóstico y/o terapéuticos, por ejemplo, el abraxane, nanopartícula farmacológica formada por albúmina y paclitaxel, aprobada recientemente por la FDA para el tratamiento del carcinoma mamario metastásico.

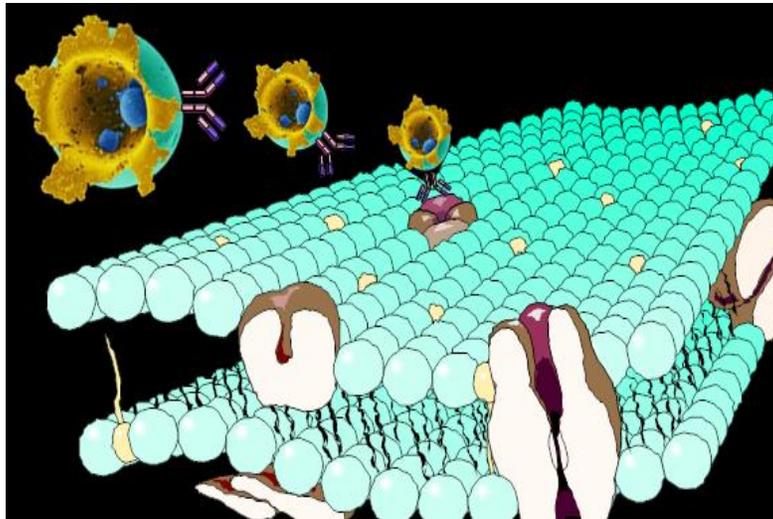


Figura 3. Direccionamiento activo de transportadores farmacológicos

CAPÍTULO 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer representa un problema de Salud Pública Mundial. A pesar de los grandes esfuerzos que se han realizado para avanzar en su lucha, la terapéutica farmacológica actual no es completamente satisfactoria. Los fármacos disponibles por lo general tienen un espectro de acción limitado a un grupo específico de neoplasias, además de que causan toxicidad sistémica de diferentes grados al no discriminar a las células del cáncer de las normales, dando como resultado efectos adversos de diferente gravedad en los pacientes. Por lo anterior, la evaluación de nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento de esta enfermedad es fundamental.

CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia del cáncer en la salud pública y a la problemática de la terapéutica oncológica, el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de esta enfermedad toma gran importancia. Las nanopartículas de plata han sido propuestas como potenciales agentes anticancerosos, ya que su acción citotóxica es similar a las observadas en diversas estrategias terapéuticas actuales. El desarrollo de nanopartículas de plata y su estudio como agente antineoplásico promete ser una opción terapéutica para el cáncer, sin embargo; al igual que los quimioterapéuticos disponibles, su actividad no es específica y sus efectos colaterales podrían ser importantes. La generación de nanotransportadores ofrece la posibilidad de disminuir los efectos adversos de la terapia mediante el direccionamiento del efecto. El estudio de la citotoxicidad de las nanopartículas de plata y el desarrollo de acarreadores farmacológicos con propiedades biocompatibles y tamaño adecuado para la acumulación efectiva en la zona tumoral dará pauta al desarrollo de futuros estudios en los que se evalúe la factibilidad terapéutica de las nanopartículas de plata en el tratamiento del cáncer.

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

Objetivo general

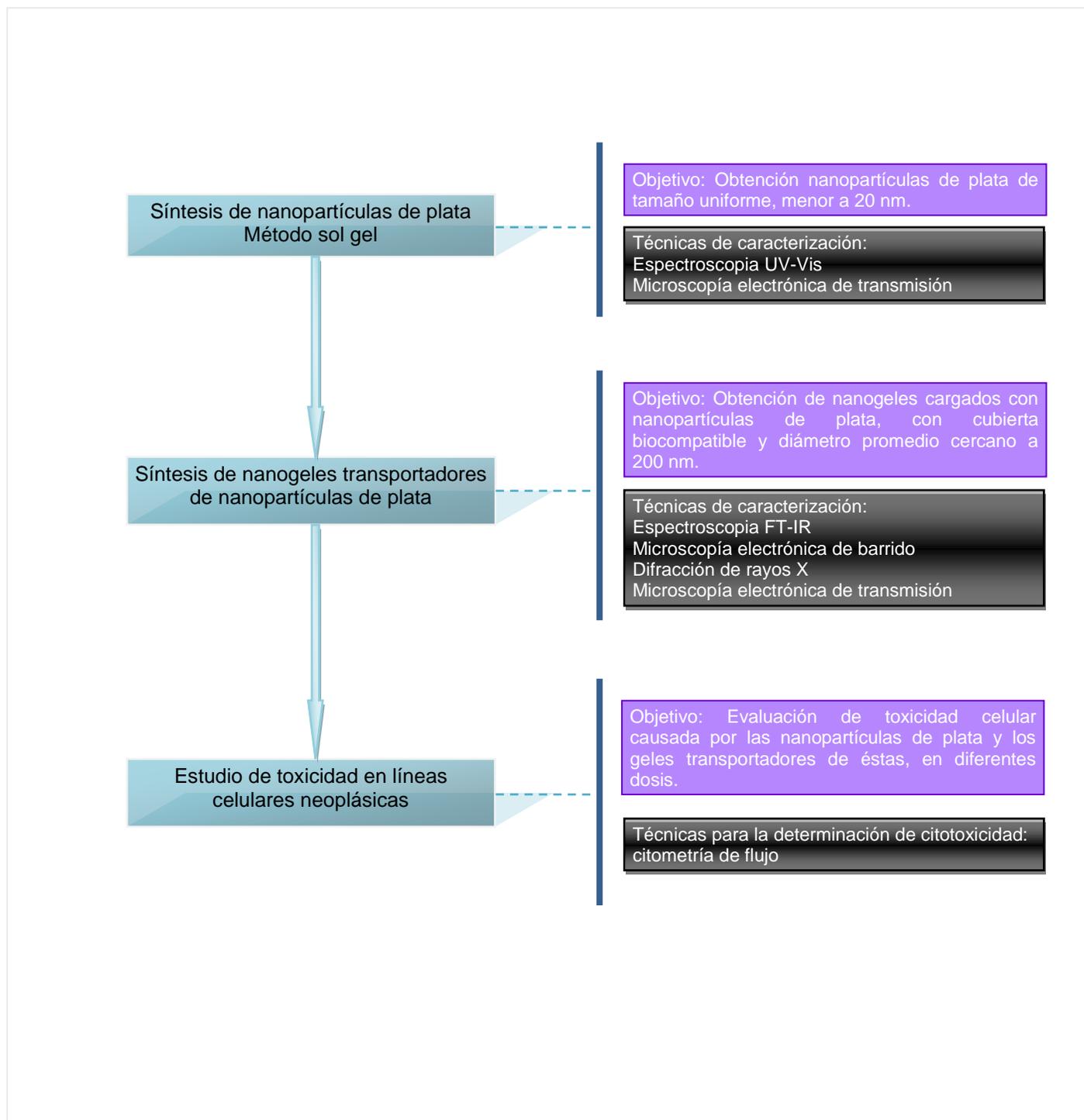
- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata y, evaluar su efecto citotóxico en líneas celulares neoplásicas.
- Sintetizar y caracterizar nanotransportadores de nanopartículas de plata, con superficie biocompatible y tamaño aproximado de 200 nm, que permitan la actividad farmacológica de la plata.

Objetivos particulares

- Sintetizar nanopartículas de plata con diámetro promedio menor a 20 nm y con baja distribución de tamaño.
- Seleccionar el sistema y establecer el método de síntesis y el proceso de encapsulamiento de las nanopartículas dentro de los nanotransportadores.
- Determinar el nivel celular y subcelular en el cual se depositan las nanopartículas de plata.
- Evaluar el efecto citotóxico de las nanopartículas de plata libres y encapsuladas sobre líneas celulares neoplásicas.

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 4. Diagrama de bloques del proceso experimental en la síntesis de nanopartículas de plata



Síntesis de nanopartículas de plata

Materiales

El nitrato de plata y la dextrosa (glucosa), fueron obtenidos de Sigma-Aldrich; la gelatina fue obtenida de Gardhal. En todos los experimentos se utilizó agua desionizada ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

Metodología de síntesis

Las nanopartículas de plata fueron sintetizadas por la vía sol-gel, mediante la reducción de nitrato de plata con dextrosa, en las condiciones de síntesis señaladas para cada experimento. Para ello, se vertieron 30 mL de agua desionizada en un matraz bola y se adicionó la gelatina y la dextrosa. Posteriormente se ajustó el pH a 10. La solución fue calentada hasta la temperatura indicada y, se adicionaron por goteo, 10 mL de AgNO_3 (0.1 M). La reacción se mantuvo en agitación magnética durante el tiempo indicado para cada experimento (ver figura 5).

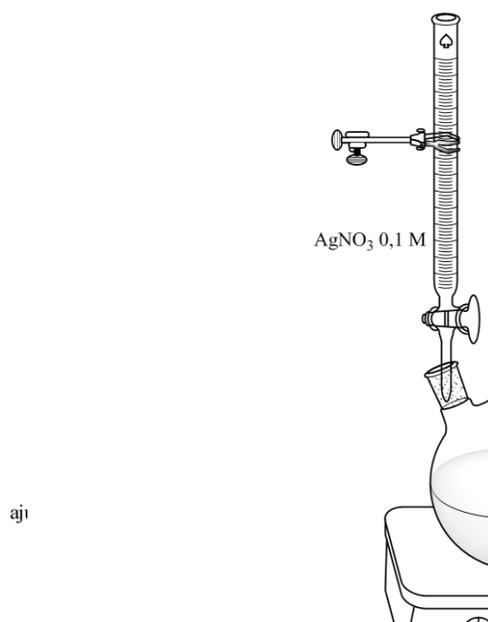


Figura 5. Síntesis de nanopartículas de plata por la vía sol-gel. Se preparó la solución de reacción con gelatina y glucosa, se ajustó el pH a 10. A la temperatura de síntesis, se adicionó gota a gota la solución de AgNO_3 y se mantuvo en agitación.

Espectroscopia UV-Vis

Los espectros de absorción óptica de las soluciones de nanopartículas de plata fueron obtenidos en un intervalo de longitud de onda de 300-800nm, empleando un espectrofotómetro Varian.

Microscopía electrónica de transmisión

El tamaño de las nanopartículas de plata fue determinado por microscopía electrónica de transmisión (SEM JEM-1010 JEOL Japan) sobre rejillas de cobre de 200 mesh con recubrimiento de carbono, en la Central de Instrumentación de Microscopía de la Sección de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.



Figura 6. Microscopio electrónico de transmisión

Síntesis de nanotransportadores de nanopartículas de plata

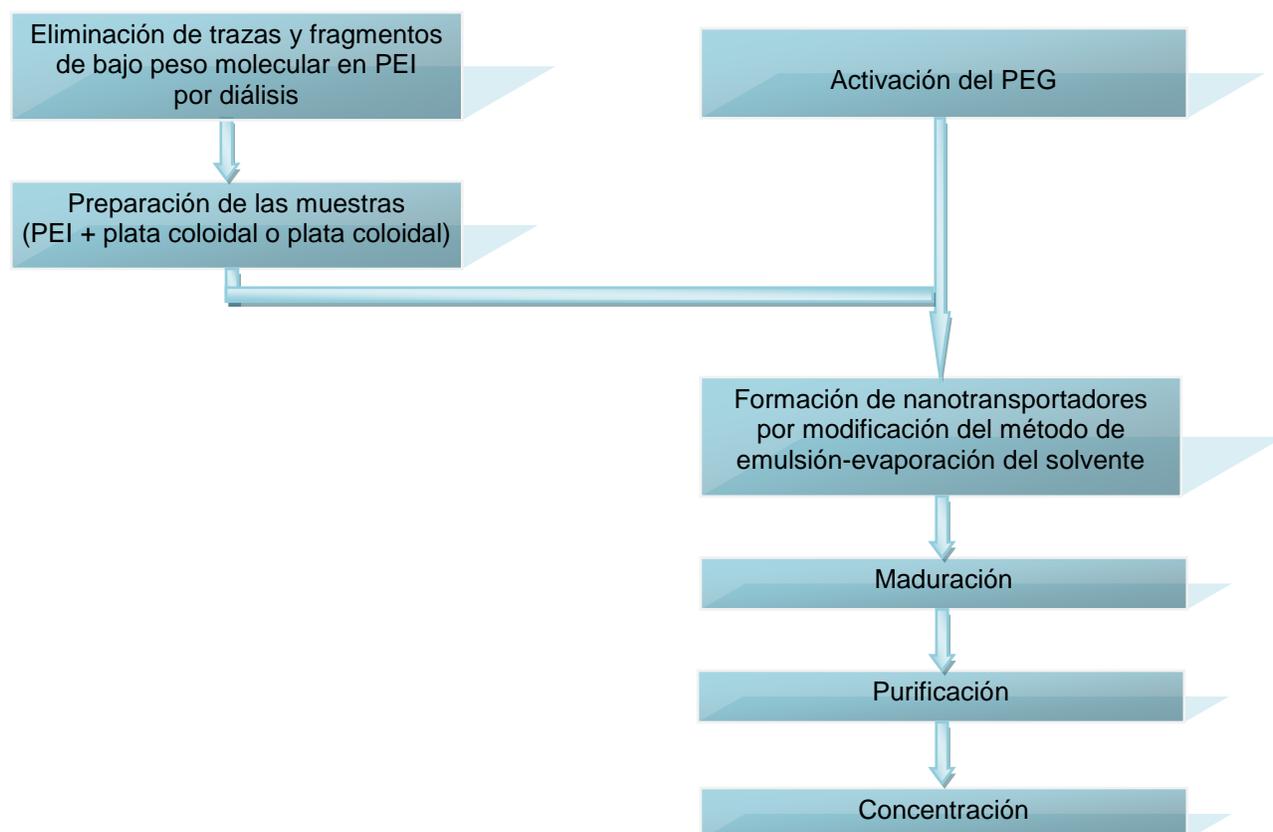
Materiales

El PEG de 8 y 4.6 kDa y el 1,1'-carbonildiimidazol, fueron adquiridos de la compañía Sigma-Aldrich.

Metodología de síntesis

Los nanotransportadores fueron sintetizados por una variación del método de emulsión-evaporación del solvente (ver figura 7), para ello, los reactivos empleados (PEG y PEI), fueron previamente tratados para su participación en la síntesis.

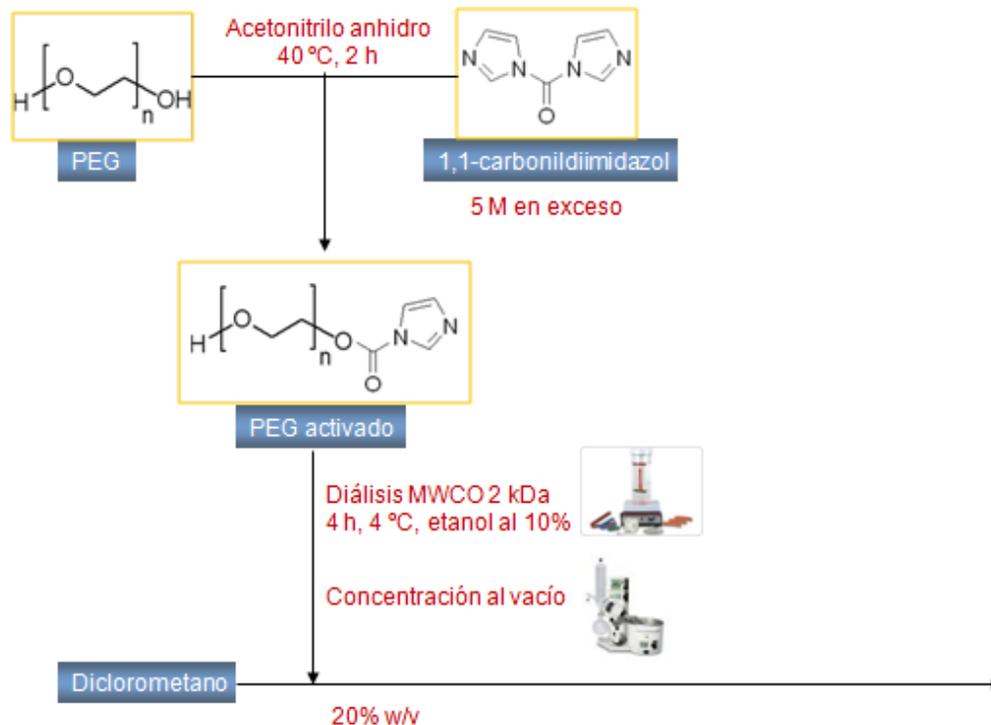
Figura 7. Diagrama de bloques del proceso experimental en la síntesis de nanotransportadores de nanopartículas de plata



Activación del PEG

El PEG de 8 y 4.6 kDa fue activado en acetonitrilo anhidro durante 2 h a 40 °C con 1,1'-carbonildiimidazol 5 M en exceso. El producto activado fue purificado por diálisis contra etanol al 10% a 4 °C durante 4 h, por duplicado, empleando un tamaño de corte molecular (MWCO) de 2 kDa; posteriormente fue concentrado al vacío en rotavapor a 42 °C y 63 rpm durante 1 h y secado en estufa al vacío a 42 °C (ver figura 8). El producto obtenido fue recuperado y caracterizado por espectroscopia FT-IR.

Figura 8. Activación del PEG



Espectroscopia FT-IR

Las muestras fueron analizadas por espectroscopía FT-IR. Se empleó el software EssentialFT-IR v1.50 y la base de datos de la librería FDM FTIR Spectra of Polymers and Polymer Additives, 1997, Fiveash Data Management, Inc.

Formación de nanotransportadores

La estructura fue obtenida por una modificación del método de “emulsión–evaporación del solvente”. Se obtuvieron dos tipos de nanotransportadores, el primero de ellos con el uso de PEI de 25 kDa. Con el objetivo de eliminar trazas y fragmentos de bajo peso molecular, la PEI se dializó contra agua desionizada a $25\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h, MWCO 2 y 12-14 kDa. La PEI fue mezclada en diferentes relaciones con las muestras de nanopartículas de plata. Se realizó baño ultrasónico, 25 kHz, durante 10 min, posteriormente se dializó contra agua desionizada a $25\text{ }^\circ\text{C}$ durante 96 h. El segundo tipo de nanotransportadores sólo incluyó las nanopartículas de plata sin la interacción con la PEI. A partir de estas soluciones, se prepararon 250 mL de estas diferentes concentraciones. El PEG activado fue disuelto en 15 mL de diclorometano en una relación 20% w/v; éste fue agregado gota a gota en agitación magnética. Se realizó baño ultrasónico durante 10 min y, posteriormente se evaporó el diclorometano en vacío a $60\text{ }^\circ\text{C}$. El nanotransportador se dejó madurar durante 24 h a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Se removieron las cadenas grandes a 971 xg durante 30 min. Los nanotransportadores fueron

dializados contra amonía acuosa al 0.025% con 10 % de etanol durante 24 h y concentrados en vacío a 57 °C. Los productos fueron evaluados por microscopía electrónica de transmisión y de barrido, por EDS y, por espectroscopia FT-IR (ver metodologías en el apartado de síntesis de nanopartículas) (ver figura 9).

Figura 9. Formación de nanotransportadores



Microscopía electrónica de barrido

Los nanogeles fueron evaluados a diferentes ampliaciones, con baño de oro, sobre cinta de carbono por microscopia electrónica de barrido (SEM JSM-6390LV JEOL Japan).



Figura 10. Microscopio electrónico de barrido

EDS

Los geles fueron evaluados en composición elemental por espectros de dispersión de energía, EDS, en el microscopio de electrónico de barrido.

Evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas de plata libres y, cargadas en los nanotransportadores

Materiales

Las líneas celulares de carcinoma epidermoide cervical, Ca Ski (ATCC No. CRL-1550) y, de adenocarcinoma cervical, HeLa (ATCC No. CCL-2) fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC). El yoduro de propidio (IP) fue obtenido de Sigma-Aldrich.

Cultivos celulares

El medio base para el cultivo de ambas líneas celulares fue el RPMI-1640, suplementado con SFB al 10%. Se cultivaron a 37 °C con atmósfera controlada 95% de aire - 5% de CO₂. Para su propagación, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 cm² hasta alcanzar el 90% de confluencia.

Pruebas dosis-respuesta por citometría de flujo

Las células fueron cosechadas con solución de tripsina al 0.25%, 0.53 mM EDTA. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 125 xg por 5 minutos. Las células fueron contadas con cámara de Neuvauer (figura 11), teñidas con CFSE 200 μM (10 μL/mL) y cultivadas en placas de 24 pozos (figura 12), según el número indicado en cada experimento.

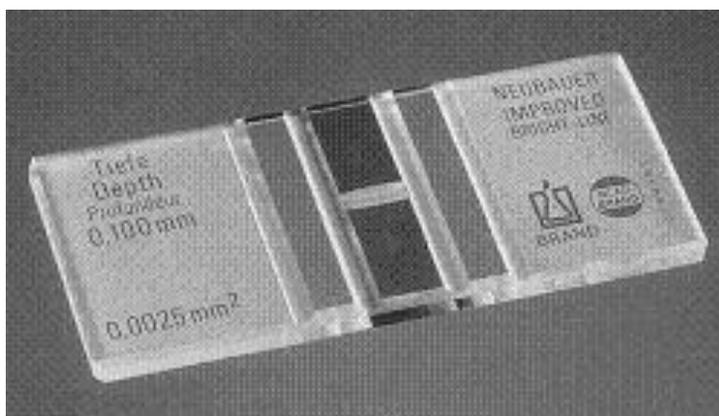


Figura 11. Cámara de Neuvauer

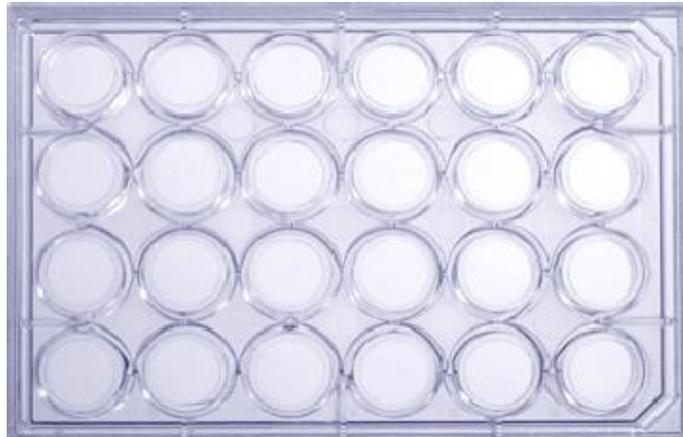


Figura 12. Placa de cultivo de 24 pozos.

Después de que las células se adhirieron a la superficie, se adicionaron diferentes dosis de nanopartículas de plata, nanotransportadores cargados y sus respectivos vehículos, empleando como control cisplatino en diferentes dosis. Al completar el tiempo de tratamiento se recuperó el sobrenadante y se tripsinizaron las células adheridas, la suspensión se centrifugó a 125 xg por 5 minutos y se lavó con buffer de fosfatos salino (PBS) por duplicado. Se adicionaron al botón celular 200 μ L de PBS con 3% de SFB y 1% de IP, posteriormente se adicionaron 100 μ L de paraformaldehído al 4%. Las muestras fueron evaluadas en el citómetro de flujo BD FACSCalibur (figura 13) en los canales 1 y 3 y los resultados fueron evaluados en el software WinMDI 2.9.



Figura 13. Citómetro de flujo BD FACSCalibur

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de nanopartículas de plata

Ensayo 1

Se sintetizaron nanopartículas de plata bajo las condiciones señaladas en la tabla 1. Estas fueron elegidas con base en resultados previos obtenidos por el grupo de investigación.

| Muestra | Gel/Ag | Glc/Ag | Temperatura [°C] |
|---------|--------|--------|------------------|
| A | 0.66 | 1.2 | 58 |
| B | 1.5 | 1.2 | 92 |
| C | 0.66 | 1.2 | 92 |
| D | 0.66 | 1.8 | 58 |

Tabla 1. Condiciones de síntesis de nanopartículas de plata. Ensayo 1

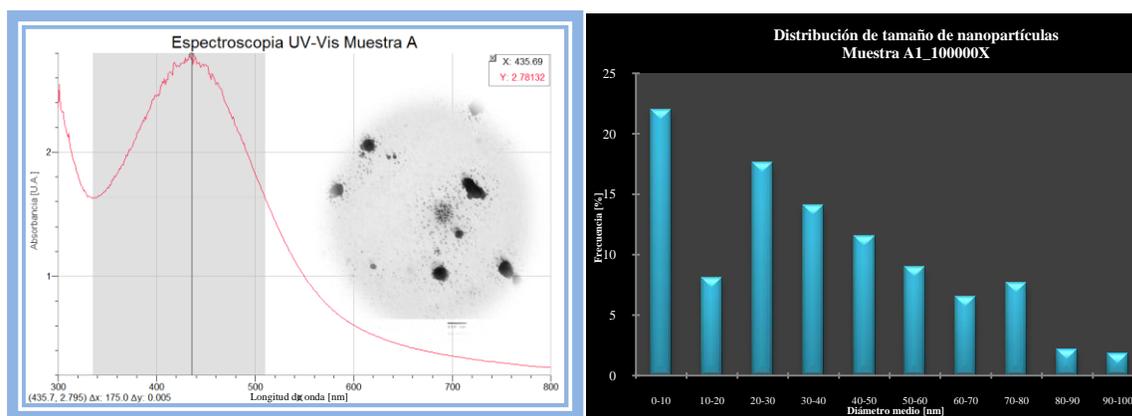


Figura 14. Espectroscopia UV-Vis / micrografía electrónica / histograma MUESTRA A

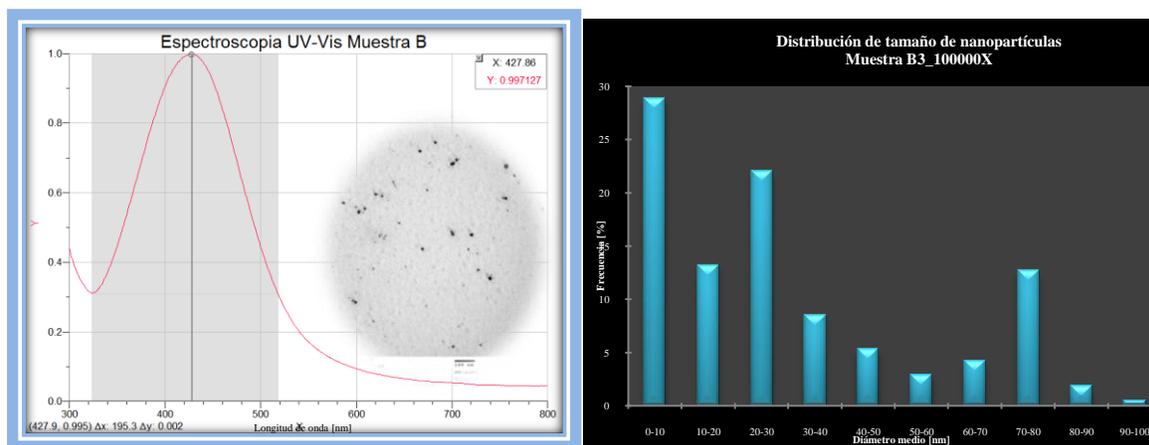


Figura 15. Espectroscopia UV-Vis / micrografía electrónica / histograma MUESTRA B

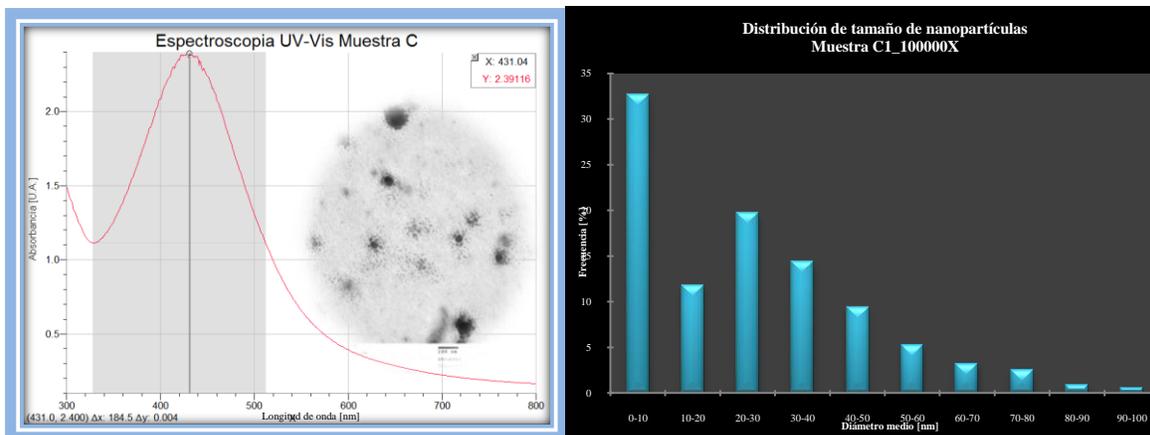


Figura 16. Espectroscopia UV-Vis / micrografía electrónica / histograma MUESTRA C

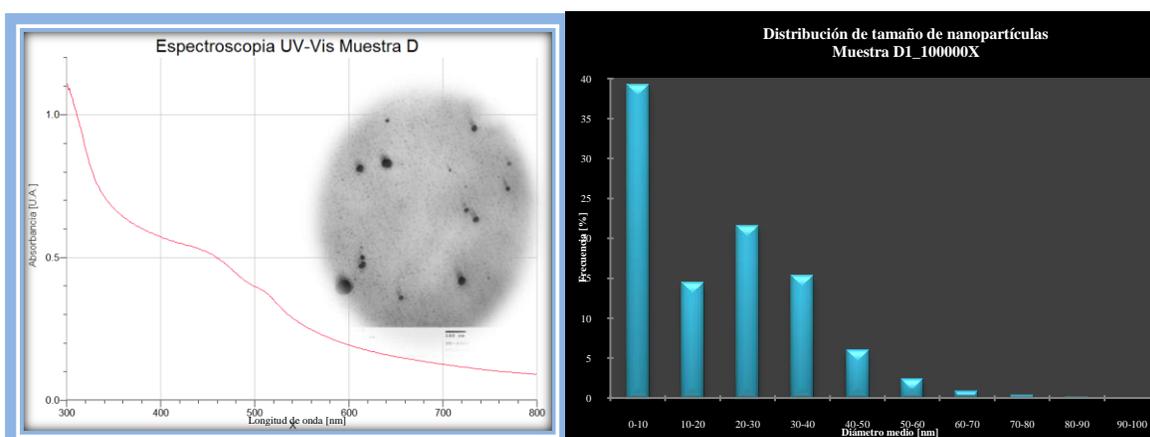


Figura 17. Espectroscopia UV-Vis / micrografía electrónica / histograma MUESTRA D

La respuesta óptica de los metales se debe al acoplamiento de las vibraciones propias de los electrones en el metal con las oscilaciones de la componente eléctrica de una onda electromagnética, fenómeno conocido como resonancia plasmónica. De acuerdo a la teoría de Mie: el ancho a la mitad de su altura y la posición de la banda de resonancia plasmónica es directamente proporcional a la distribución de tamaños de partícula en una dispersión coloidal. En general, para tamaños de partícula mayores, el ancho de la banda es mayor y mayor es el valor de la longitud de onda a la que aparece el máximo.

Las muestras A y C, con 0.66 de gel/Ag y 1.2 de glc/Ag mostraron espectros de absorción similares, con una distribución de tamaño grande, la muestra C, cuya síntesis se realizó a 92 °C mostró gelificación, ninguna de estas muestras se consideró apta para el estudio. Por otro lado, la muestra B, que tenía un poco más de gelatina (1.5 gel/Ag) mostró una respuesta óptica característica para las nanopartículas de plata, la distribución de tamaños fue menor que para los experimentos anteriores pero también se observó gelificación. Finalmente, la muestra D, en donde se aumentó la cantidad de reductor y se redujo la temperatura, presentó un tamaño medio menor a todas las anteriores y una baja distribución de tamaños, sin embargo su respuesta óptica no fue característica de nanopartículas de plata indicando que la reacción pudo ser incompleta. Estos

resultados indicaron, como ya es sabido, que las temperaturas bajas favorecen el tamaño pequeño de las partículas generadas, para la síntesis de nanopartículas con las condiciones aquí evaluadas, tanto el aumento del reductor como del pasivante favorece un tamaño pequeño y una menor distribución de tamaños. El máximo de absorbancia para la síntesis A, B y C correspondió al tamaño medio observado en las micrografías electrónicas.

A partir de estos resultados se decidió probar las siguientes condiciones de síntesis:

| Muestra | Gel/Ag | Glc/Ag | Temperatura [°C] |
|---------|--------|--------|------------------|
| 1_probe | 1.8 | 1.5 | 58 |

Tabla 2. Condiciones de síntesis de nanopartículas de plata. Muestra 1_probe

A fin de verificar si la razón de que no se observara la respuesta óptica característica de las nanopartículas de plata era una reacción incompleta, se decidió hacer una cinética tomando muestras a diferentes tiempos de la síntesis, llegando hasta 120 min. Estos resultados se muestran en la siguientes gráficas:

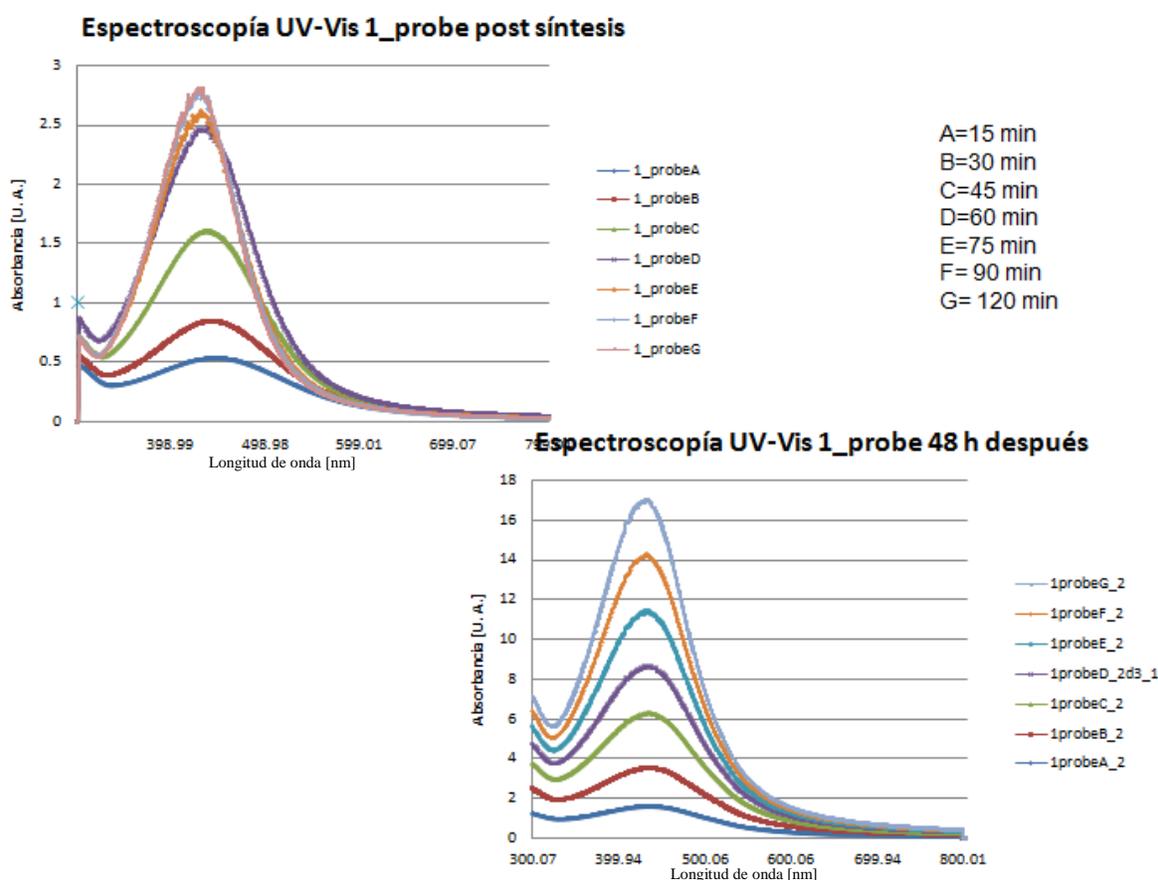


Figura 18. Espectroscopia UV-Vis Muestra 1_probe

Por lo anterior se decidió llevar el tiempo de síntesis hasta 120 min bajo las condiciones señaladas anteriormente. Esta síntesis se realizó por duplicado, las partículas obtenidas fueron evaluadas por TEM.

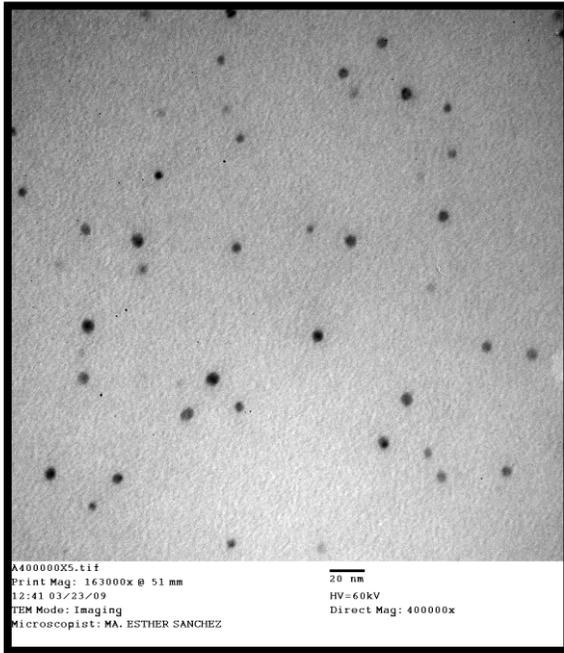


Figura 19. Micrografía electrónica muestra 1_probe A

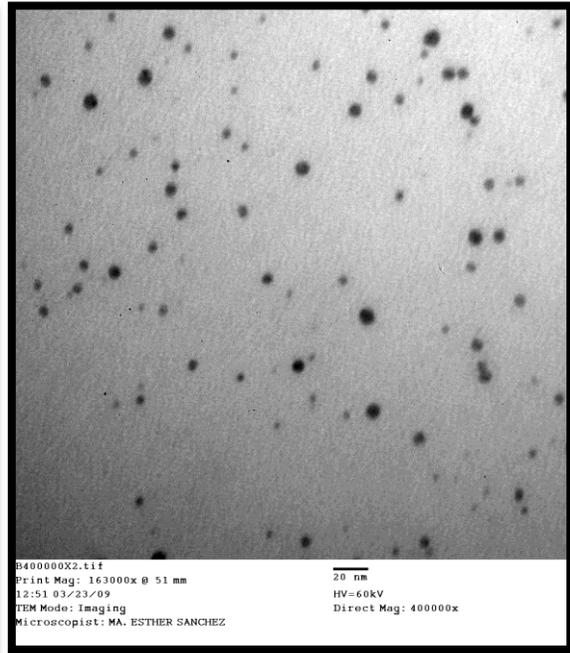


Figura 20. Micrografía electrónica muestra 1_probe B

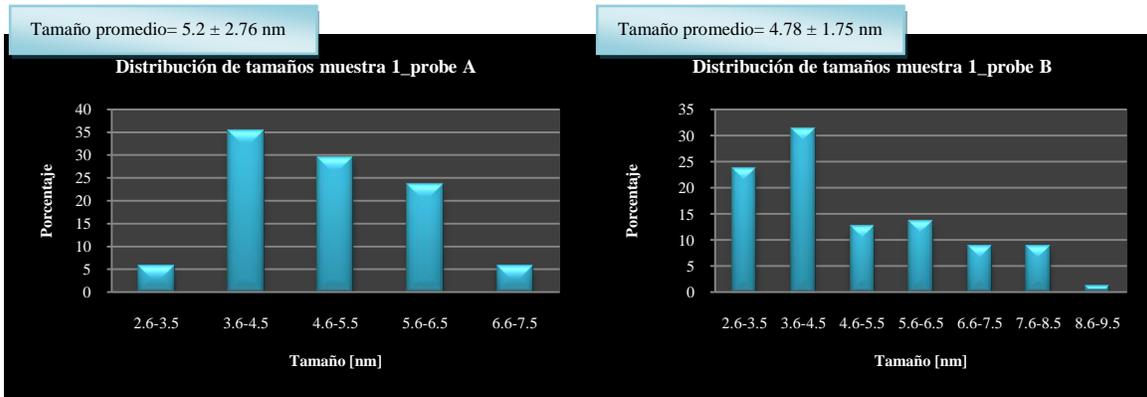


Figura 21. Histograma de distribución de tamaños muestra 1_probe A

Figura 22. Histograma de distribución de tamaños muestra 1_probe B

De acuerdo con estos resultados, al obtener partículas homogéneas con resultados reproducibles, éstas fueron las condiciones de síntesis seleccionadas para la síntesis de nanotransportadores y los estudios *in vitro*.

Evaluación de los espectros de transmisión FT-IR del PEG activado.

Espectroscopia FT-IR del PEG

El PEG es un compuesto químico formado por unidades repetidas de etilenglicol que termina en grupos hidroxilo en cualquiera de los dos extremos de una cadena lineal.

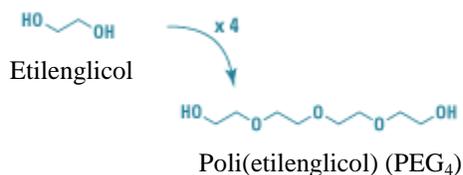


Figura 23. Estructura del PEG

Algunas construcciones tienen ramificaciones con múltiples cadenas lineales que se unen en algún punto. El PEG se forma de la polimerización aniónica del óxido de etileno, resultando en la formación de cadenas poliméricas de varios pesos moleculares potenciales, dependiendo de las condiciones de polimerización. Por lo tanto, todos los PEGs poliméricos son polidispersos y existen como una distribución de múltiples longitudes y pesos moleculares. La mayoría de las formas de PEG utilizadas en aplicaciones de bioconjugación tienen pesos moleculares menores a 20,000 Da y son solubles tanto en soluciones acuosas como en varios solventes orgánicos.

En el desarrollo de esta investigación se empleó PEG de 4,6 y 8,0 kDa, ambos fueron evaluados por espectroscopía FT-IR, la cual, es una herramienta multifacética que se aplica en la determinación de especies moleculares, se fundamenta en la absorción de la radiación en la región infrarroja del espectro electromagnético por las moléculas en vibración, absorbiendo energía cuando ésta es igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional molecular, distinguiéndose dos categorías básicas de vibración: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión se originan por cambios en el ángulo que forman dos enlaces (ver figura 24).



Figura 24. Vibraciones moleculares en espectroscopia IR

Como primer paso del análisis espectrofotométrico del PEG, ambos espectros (PEG 4,6 y 8 kDa) fueron evaluados empleando el software EssentialFT-IR v1.50 y, la base de datos de la librería FDM FTIR Spectra of Polymers and Polymer Additives, 1997, Fiveash Data Management, Inc.

El espectro de transmisión FT-IR del PEG de 4.6 kDa presentó un coeficiente de correlación de 0.9582, respecto al espectro del PEG reportado en la librería.

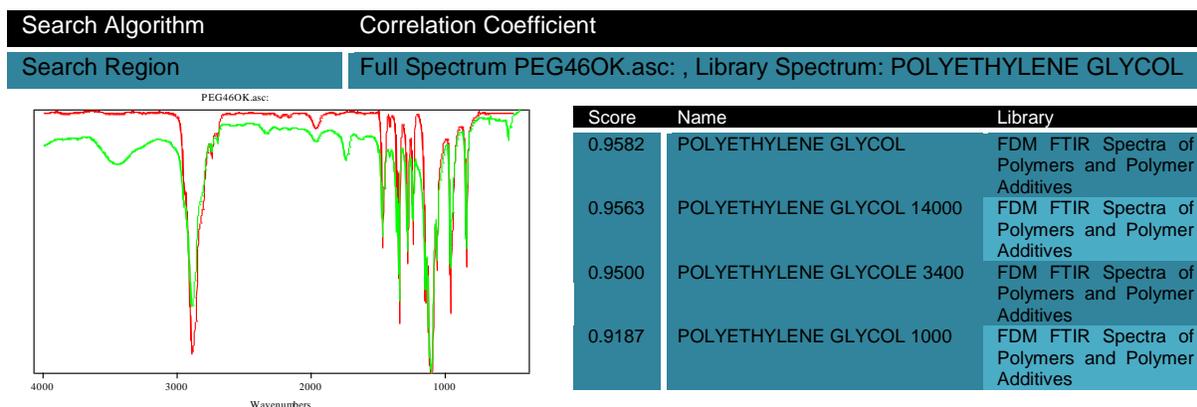


Figura 25. Correlación del espectro IR del PEG de 4.6 kDa con el reportado en la librería FDM

Mientras que el espectro de transmisión FT-IR del PEG de 8 kDa presentó un coeficiente de correlación de 0.9539 frente al PEG reportado en la librería.

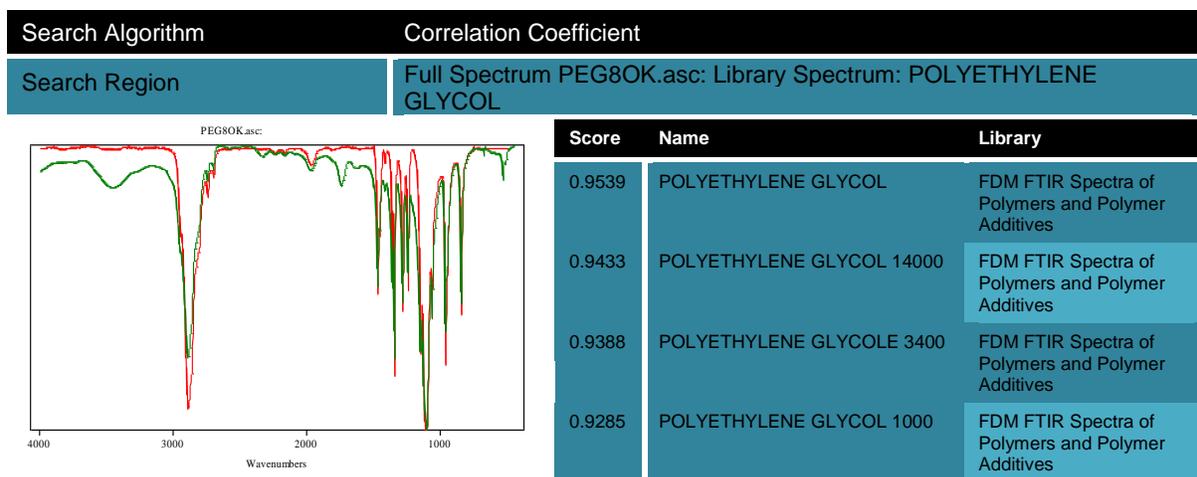


Figura 26. Correlación del espectro IR del PEG de 8 kDa con el reportado en la librería FDM

A continuación, se realizó en ambos espectros la substracción de la señal correspondientes al KBr, obtenidos experimentalmente, empleando un factor de substracción de 1,0 y una sensibilidad de 0,1.

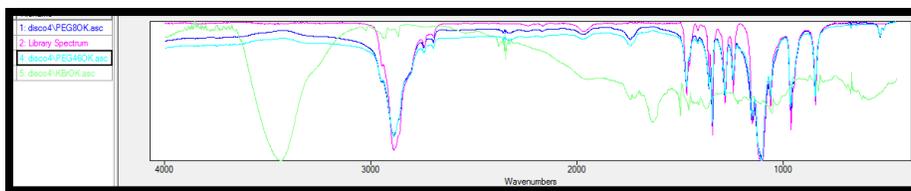


Figura 27. Substracción de la señal correspondiente a KBr

Los espectros obtenidos fueron evaluados con la herramienta “peak picking” utilizando una sensibilidad de 1, para cada uno de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

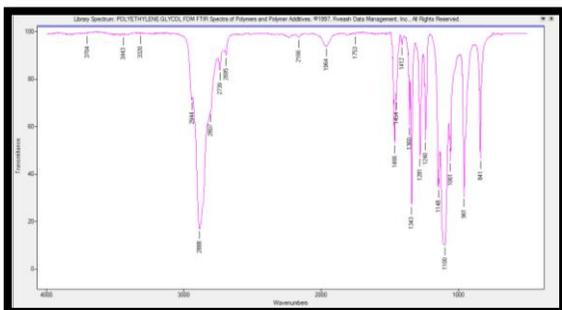


Figura 28. Espectro de transmisión FT-IR PEG FDM

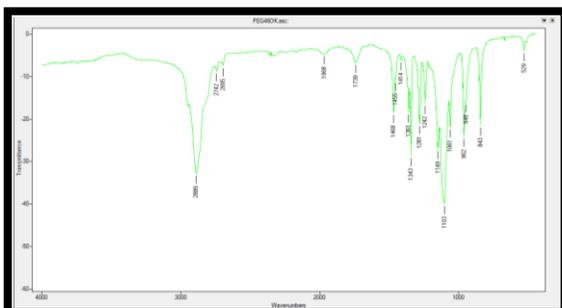


Figura 29. Espectro de transmisión FT-IR PEG 4,6 kDa

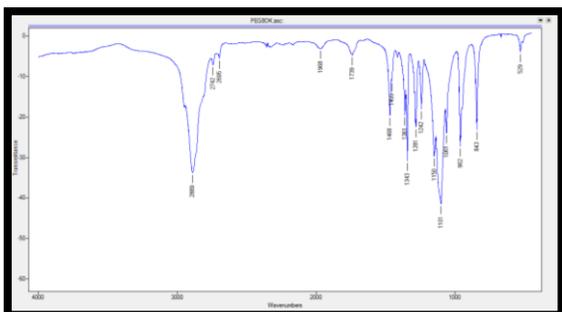
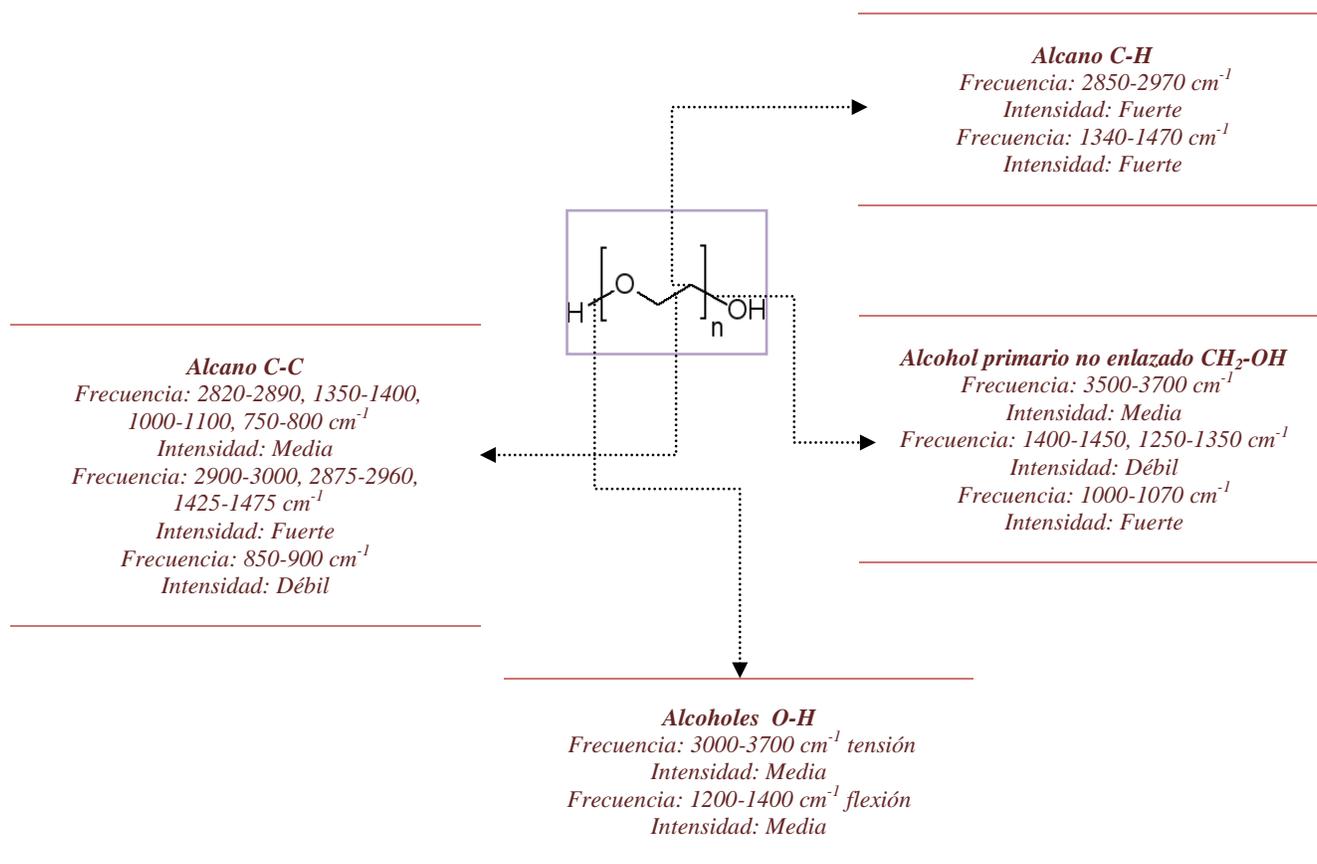


Figura 30. Espectro de transmisión FT-IR PEG 8 kDa

| PEG 4,6 kDa | PEG 8,0 kDa | PEG FDM |
|----------------|----------------|----------------|
| Número de onda | Número de onda | Número de onda |
| 529 | 529 | - |
| 843 | 843 | 841 |
| 948 | - | - |
| 962 | 962 | 961 |
| 1061 | 1061 | 1061 |
| 1103 | 1101 | 1100 |
| 1149 | 1150 | 1148 |
| 1242 | 1242 | 1240 |
| 1281 | 1281 | 1281 |
| 1343 | 1343 | 1343 |
| 1361 | 1361 | 1360 |
| 1414 | - | 1412 |
| 1455 | 1455 | 1454 |
| 1468 | 1468 | 1466 |
| 1739 | 1739 | 1753 |
| 1968 | 1968 | 1964 |
| - | - | 2166 |
| 2695 | 2695 | 2695 |
| 2742 | 2742 | 2739 |
| - | - | 2807 |
| 2889 | 2889 | 2888 |
| - | - | 2944 |
| - | - | 3320 |
| - | - | 3443 |

Tabla 3. Señales de transmisión FT-IR del PEG

Figura 31. Tipos de enlaces del PEG y su frecuencia en el espectro IR



Activación del PEG

El 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) es un compuesto carbonilado altamente reactivo que fue primeramente reconocido como un excelente formador de enlaces amida en la síntesis peptídica (Paul y Anderson, 1962). Después fue empleado para activar grupos carboxilo e hidroxilo empleados como ligando de moléculas con grupos amino (Battling et al., 1973; Hearn, 1987).

Para la activación de compuestos con grupos hidroxilo, el CDI reacciona para formar un intermediario imidazolil carbamato, el cual, puede reaccionar con un nucleófilo para formar una unión N-alkil carbamato. Las proteínas normalmente se unen a través de sus grupos amino terminal (α -amino) y los de la cadena lateral de la lisina (ϵ -amino). El enlace final es un derivado de uretano, sin carga, que posee una excelente estabilidad química.

El PEG activado con CDI es estable por años, seco o disuelto en solventes orgánicos anhidros y, posee una vida media excelente a la hidrólisis medida en horas. El enlace óptimo del PEG-CDI se lleva a cabo en un pH alcalino, típicamente por encima de 8,5.

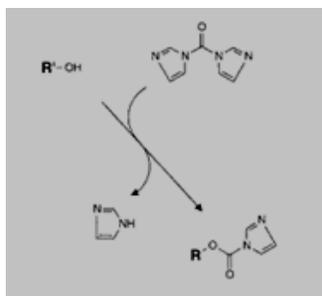


Figura 32. Reacción del CDI con el OH del PEG. Formación del imidazolil carbamato.

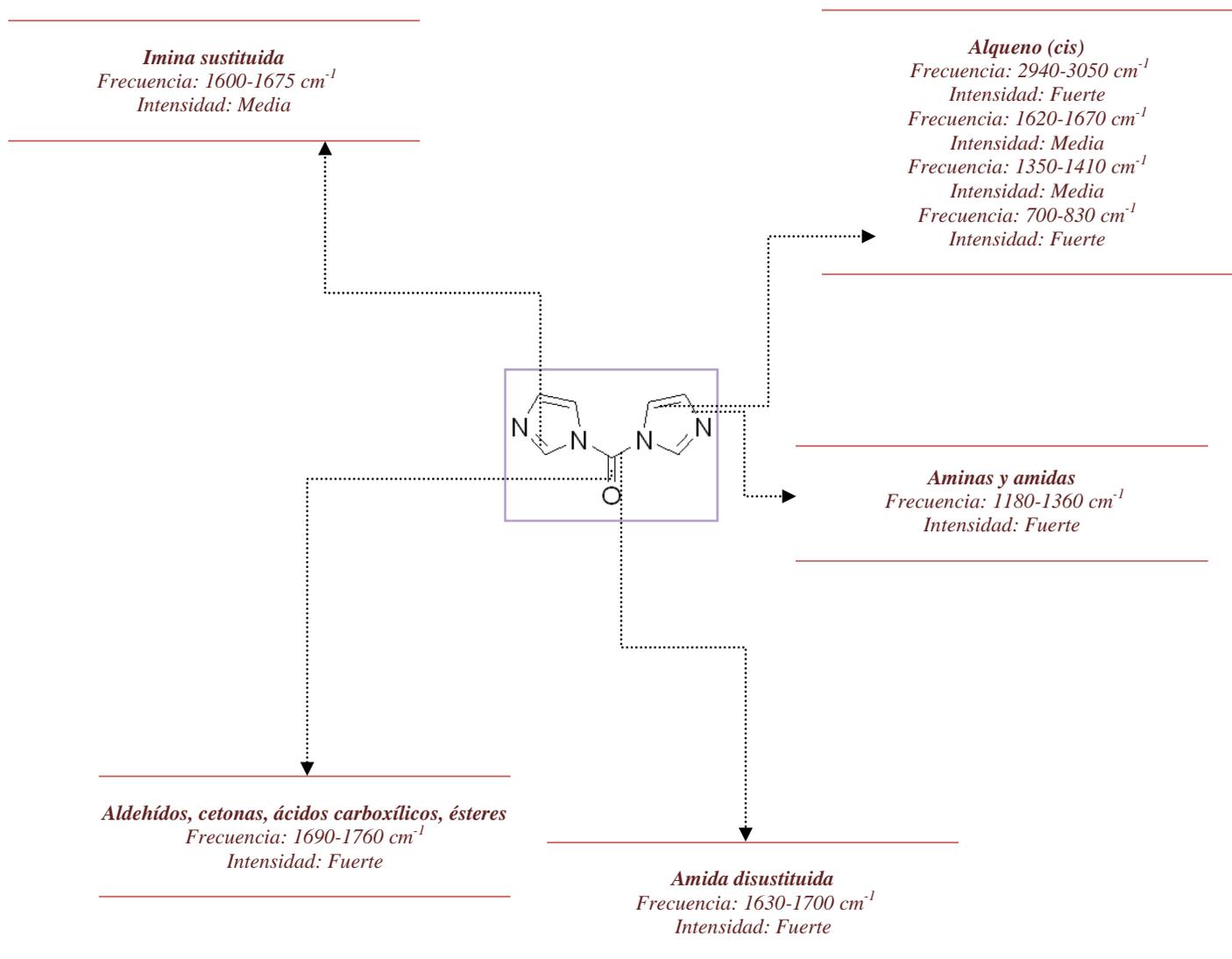


Figura 33. Tipos de enlaces del CDI y su frecuencia en el espectro IR

Se obtuvo el espectro de transmisión IR del CDI, posteriormente se hizo substracción del espectro del KBr, se evaluó la señal con la herramienta “peak picking” con una sensibilidad de 20.

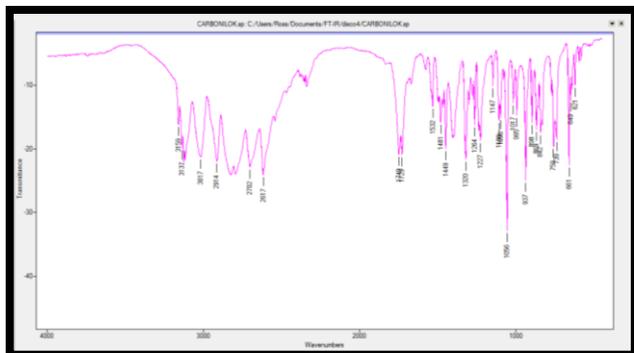


Figura 34. Espectro de transmisión FT-IR CDI

| Número de onda | | |
|----------------|------|------|
| 621 | 1017 | 1532 |
| 649 | 1056 | 1729 |
| 661 | 1098 | 1749 |
| 739 | 1109 | 2617 |
| 759 | 1147 | 2702 |
| 842 | 1227 | 2914 |
| 869 | 1264 | 3017 |
| 898 | 1320 | 3137 |
| 937 | 1449 | 3159 |
| 995 | 1481 | |

Tabla 4. Señales de transmisión FT-IR del CDI

De la misma manera se obtuvieron los espectros de transmisión para las muestras de PEG activado de ambos pesos moleculares y sus respectivos valores de la señal.

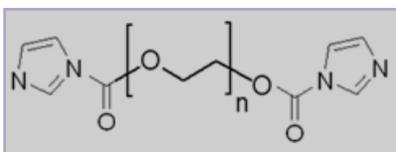


Figura 35. Estructura del PEG activado Poli(etilen)glicol activado

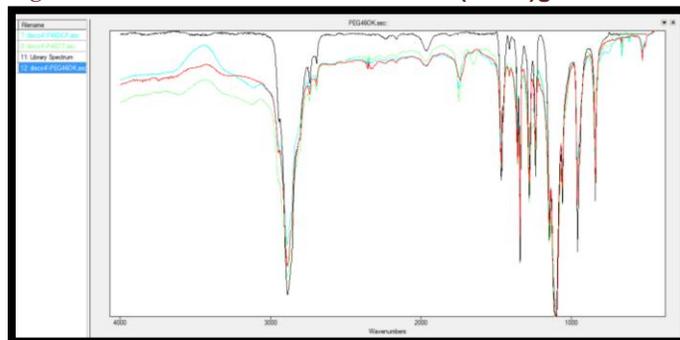


Figura 36. Espectro de transmisión FT-IR PEG 4.6 kDa

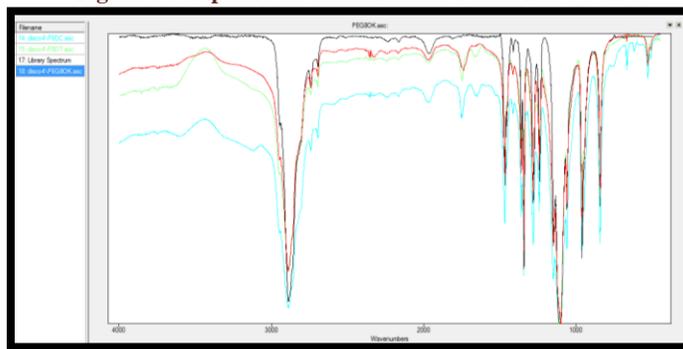


Figura 37. Espectro de transmisión FT-IR PEG 8 kDa

| PEG 4,6 kDa | PEG 8,0 kDa | PEG FDM | CDI | P46DCP | P46DT | P8DC | P8DT | Enlace presuntivo |
|-------------|-------------|---------|------|--------|-------|------|------|---------------------------------------|
| 529 | 529 | - | | 529 | 529 | 529 | 530 | |
| - | - | - | 621 | 618 | - | - | - | |
| - | - | - | 661 | 667 | 667 | 667 | 668 | Alqueno (cis) |
| 843 | 843 | 841 | 842 | 843 | 843 | 843 | 843 | |
| 948 | - | - | - | - | - | - | 947 | |
| 962 | 962 | 961 | - | 962 | 963 | 962 | 963 | |
| 1061 | 1061 | 1061 | - | 1061 | 1061 | 1061 | 1061 | |
| 1103 | 1101 | 1100 | - | 1101 | 1103 | 1100 | 1112 | |
| 1149 | 1150 | 1148 | 1147 | 1149 | 1149 | 1150 | 1150 | |
| 1242 | 1242 | 1240 | - | 1242 | 1242 | 1242 | 1243 | |
| 1281 | 1281 | 1281 | - | 1281 | 1281 | 1281 | 1281 | |
| 1343 | 1343 | 1343 | - | 1343 | 1343 | 1343 | 1343 | |
| 1361 | 1361 | 1360 | - | 1360 | 1360 | 1360 | 1361 | |
| 1414 | - | 1412 | - | - | - | - | 1413 | Alcohol primario no enlazado o alcano |
| 1455 | 1455 | 1454 | - | - | - | - | 1456 | |
| 1468 | 1468 | 1466 | - | 1468 | 1468 | 1468 | 1468 | |
| 1739 | 1739 | - | - | - | - | - | - | |
| - | - | - | 1749 | 1750 | 1748 | 1751 | 1748 | Carbonilo |
| 1968 | 1968 | 1964 | - | 1969 | 1968 | 1969 | - | |
| 2695 | 2695 | 2695 | - | 2696 | 2695 | - | 2695 | |
| 2742 | 2742 | 2739 | - | 2742 | - | 2742 | 2742 | |
| 2889 | 2889 | 2888 | - | 2889 | 2889 | 2890 | 2890 | |

Tabla 5. Comparación de espectros de transmisión FT-IR del PEG, el CDI y el PEG activado

Los resultados mostraron que la activación del PEG se realizó satisfactoriamente ya que sus espectros presentan las señales correspondientes a la estructura del imidazol y, de mayor importancia, la correspondiente el grupo carbonilo formado en la reacción (Tabla 5).

Formación de nanotransportadores de nanopartículas de plata

El primer ensayo para la formación de nanotransportadores se realizó adicionando gota a gota y en agitación magnética 1.5 mL de la solución de nanopartículas de plata a 5 mL de PEI; de esta solución se preparó una dilución de 250 mL al 4% y se adicionaron 15 mL de PEG de 8 kDa activado al 20% w/v. Lo anterior dio como resultado la estructura polimérica evaluada por SEM que se muestra en la figura 38.

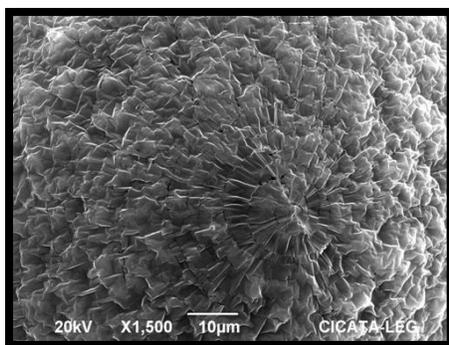


Figura 38. Micrografía electrónica por SEM del primer ensayo de la síntesis de nanotransportadores

Las micrografías electrónicas por TEM mostraron la formación de estructuras de aproximadamente 500 nm de diámetro con zonas de diferentes densidades electrónicas, siendo las más fuertes al centro y en la zona señalada en las imágenes, que sugieren el sitio de acumulación de la plata.

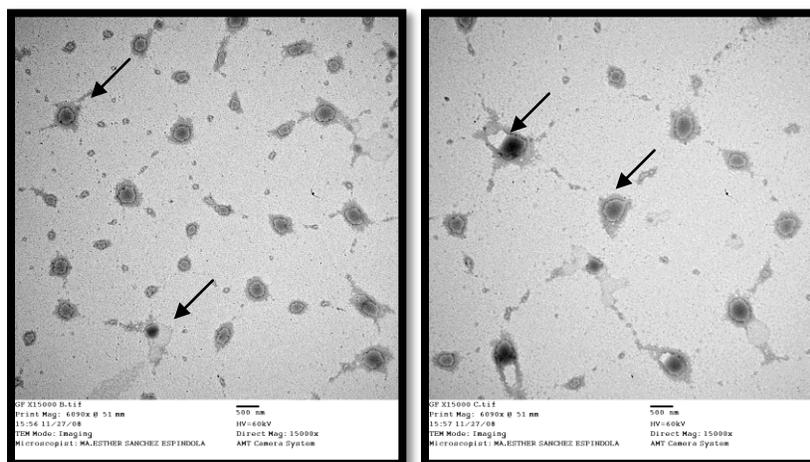


Figura 39. Micrografías electrónicas por TEM del primer ensayo de la síntesis de nanotransportadores

Sin embargo, las características deseadas para los transportadores incluyen un tamaño aproximado de 200 nm, por lo que posteriormente se realizaron los siguientes ensayos a fin de reducir el tamaño de las estructuras transportadoras, todos ellos incluyeron 3.78 mL de la solución de nanopartículas de plata.

| Cantidad de PEI | PEG 4.6 kDa | PEG 8 kDa |
|-----------------|----------------|----------------|
| 0.00 mL | Ng 1_probe_1_1 | Ng 1_probe_1_2 |
| 3.78 mL | Ng 1_probe_2_1 | |
| 5.00 mL | Ng 1_probe_3_1 | Ng 1_probe_3_2 |

Durante la síntesis se observó que el PEG de 4.6 kDa se disuelve completamente en diclorometano, con facilidad; mientras que el PEG de 8 kDa forma burbujas y gránulos y, se disuelve con mayor dificultad. Por otro lado, Las muestras pierden un poco su coloración al agregar el PEG, siendo la muestra 1, en ambos casos, la que menos sufre estos cambios. Cuando se usa PEG 2 es más fácil eliminar el diclorometano y queda un mayor volumen final.

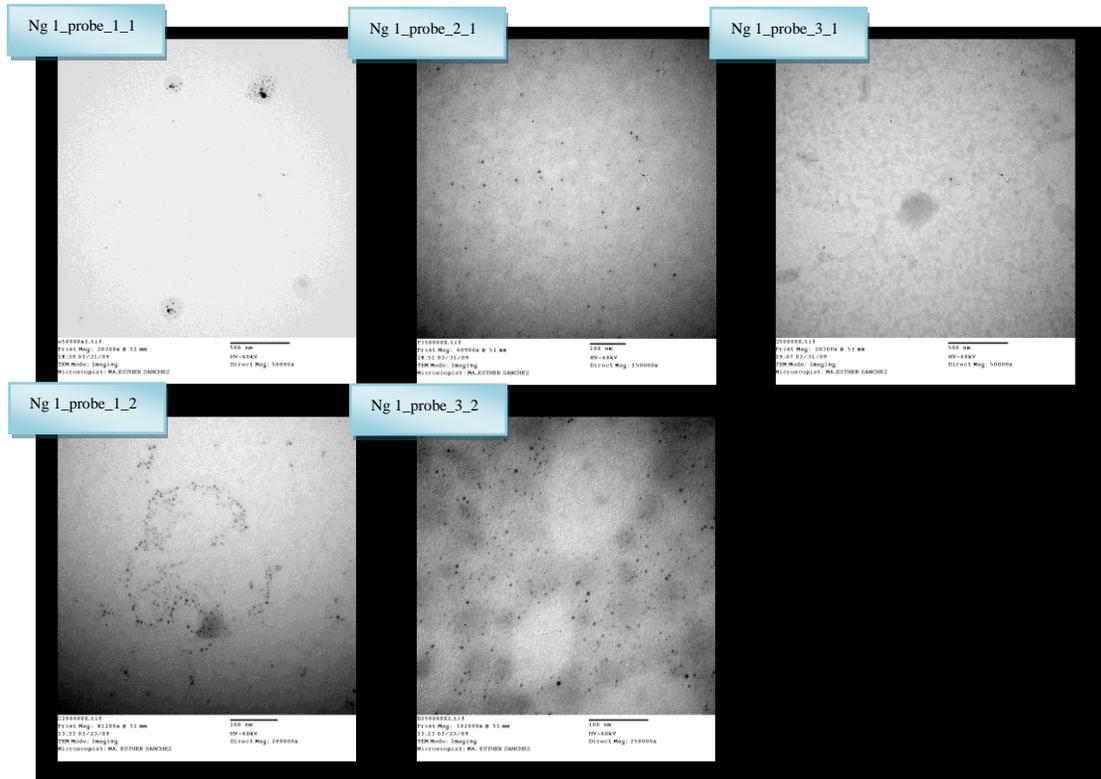


Figura 40. Micrografías electrónicas por TEM de los nanotransportadores de nanopartículas de plata

Los resultados obtenidos para las muestras con PEI mostraron zonas de densas pero no la formación delimitada de los transportadores, probablemente por la disminución de la relación PEI/nanopartículas de plata, en los resultados se observa que es posible formar las estructuras sin necesidad de utilizar PEI; esto se debe a que los carbonatos formados en la reacción de activación del PEG pueden reaccionar rápidamente con nucleófilos para formar enlaces carbamato, que son extremadamente estables. Los nucleófilos, como los grupos amino primarios de las proteínas reaccionan para dar enlaces carbamato con el CDI. La gelatina (colágeno de la familia adiponectina de *Sus scrofa domestica* -GenBank: AAQ24844.1-) empleada en el proceso experimental, forma parte de la familia de colágenos de triple hélice. Contiene 20 copias G-X-Y repetidas que forman una triple hélice. La primera posición de repetidos en glicina, la segunda y tercera posición pueden ser ocupadas por cualquier otro residuo, generalmente son prolina e hidróxiprolina (Marchler-Bauer A, 2007). Esta proteína presenta grupos amino que son capaces de interactuar con el PEG activado y formar estructuras que, sin la interacción de la PEI tienen diámetros menores y, al emplear PEG de menor peso molecular se favorece igualmente un menor tamaño, lo anterior se puede observar en las siguientes imágenes.

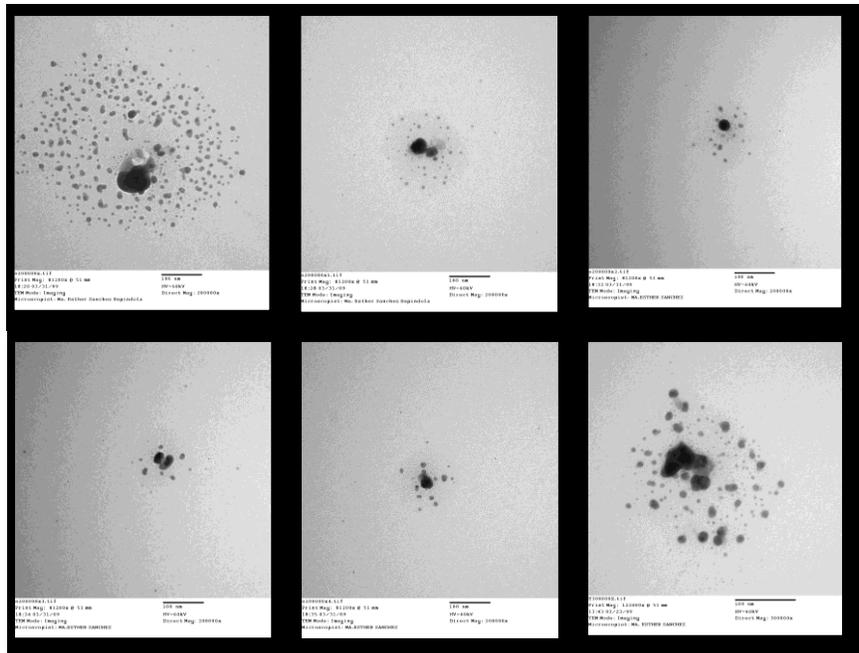


Figura 41. Micrografías por TEM de la muestra Ng 1_probe_1_1

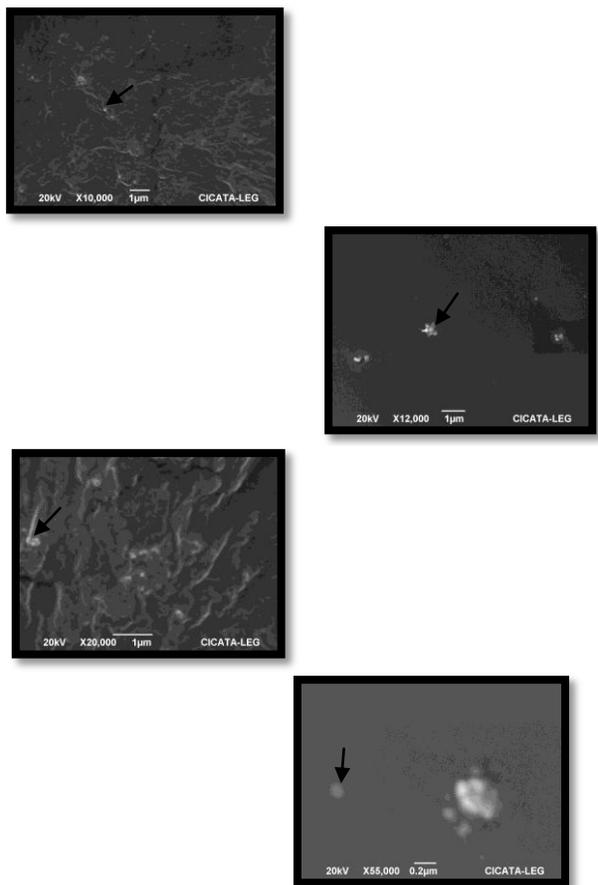


Figura 42. Micrografías por SEM de la muestra Ng 1_probe_1

Como se puede observar, los transportadores obtenidos presentaron tamaños promedio de 100 a 300 nm (Figura 41), la localización de las nanopartículas de plata fue más evidente, aunque al parecer, se formaron microgotas embebidas en el PEG pero las estructuras se observan delimitadas y de tamaño adecuado. Las micrografías electrónicas por SEM también evidenciaron la presencia de estructuras de aproximadamente 100 nm embebidas en el polímero al secarse sobre cinta de carbono (figura 42). Al realizar estudios de espectroscopia de dispersión de energías (EDS) se identificó la presencia de plata, carbono, oxígeno, nitrógeno y azufre, todos ellos, elementos que conforman a la estructura de los componentes del nanotransportador (ver figura 43).

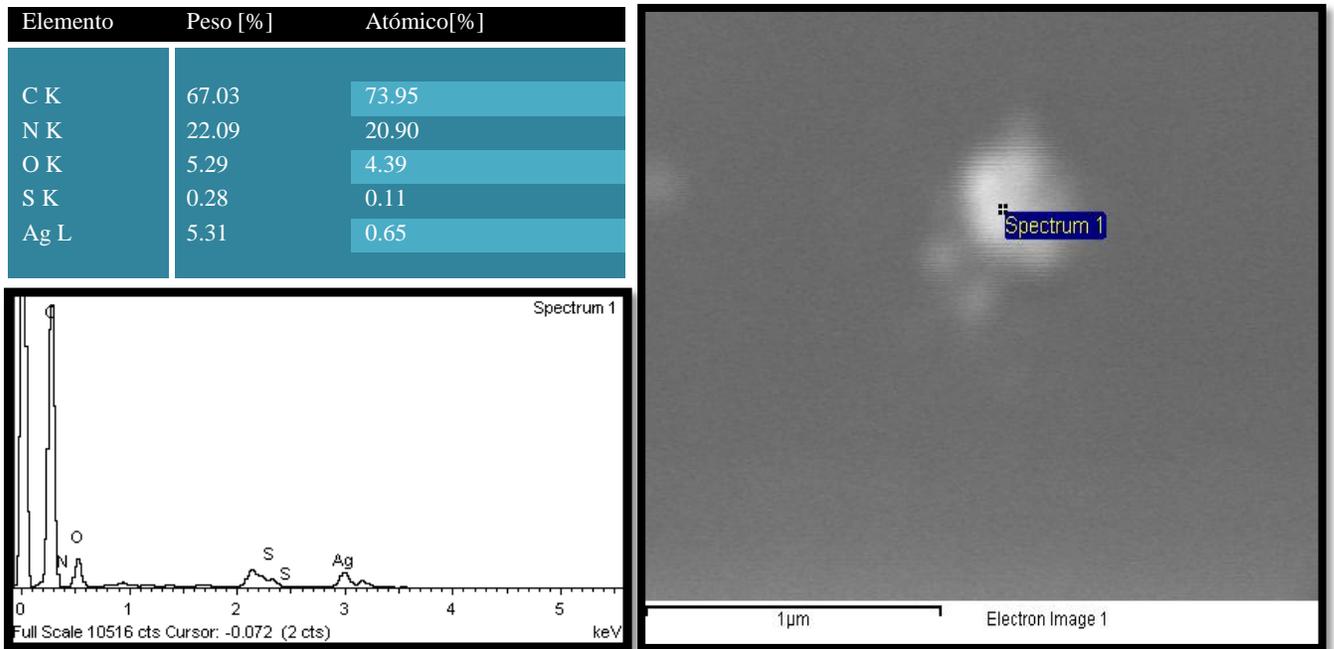


Figura 43. Resultados EDS para la muestra Ng 1_probe_1_1

Evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas de plata libres y encapsuladas, por citometría de flujo

Se sembraron 70 000 células de la línea celular Ca Ski en placas de cultivo de 24 pozos, se dejaron en incubación durante 24 h con el fin de que se adhirieran a las superficie. Posteriormente, se adicionaron diferentes dosis de nanopartículas de plata, de su vehículo -1- (gelatina y dextrosa tratadas bajo las mismas condiciones, sin adicionar AgNO_3), de nanotransportadores cargados, de su vehículo -2-, tratado bajo las mismas condiciones a partir del vehículo 1 y, de cisplatino, agente antineoplásico utilizado como control. Lo anterior bajo el siguiente esquema:

Figura 44. Tratamientos evaluados en la línea celular Ca Ski

El tratamiento se mantuvo en incubación a 37 °C durante 24 h, posteriormente, las células fueron cosechadas, teñidas y evaluadas por citometría de flujo obteniéndose los siguientes resultados:

La población celular fue localizada por tamaño y granularidad en gráficos SSC/FSC

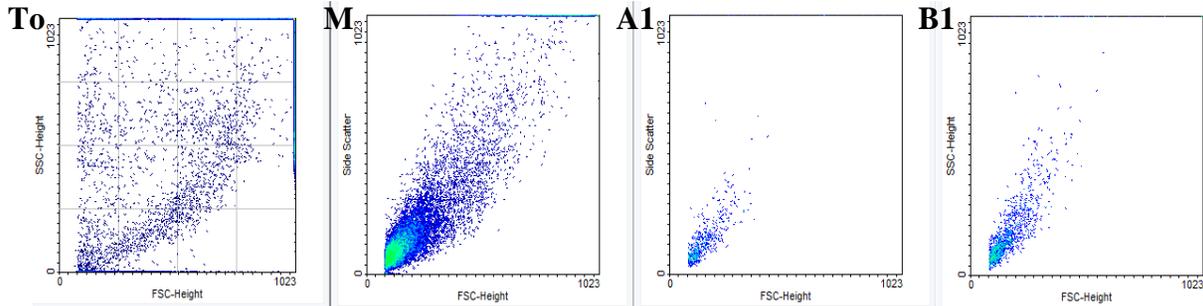


Figura 45. Ejemplo de gráfico SSC/FSC para la línea celular Ca Ski.

De la misma manera se obtuvieron los histogramas correspondientes a cada tratamiento evaluado

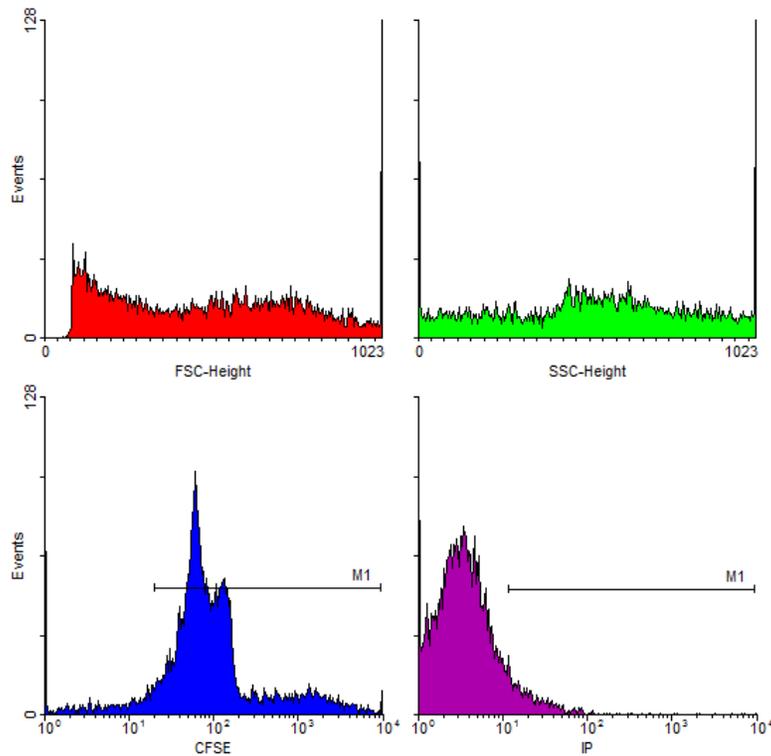


Figura 46. Ejemplo de histogramas de frecuencia para la línea celular Ca Ski. (gráficos del tratamiento To)

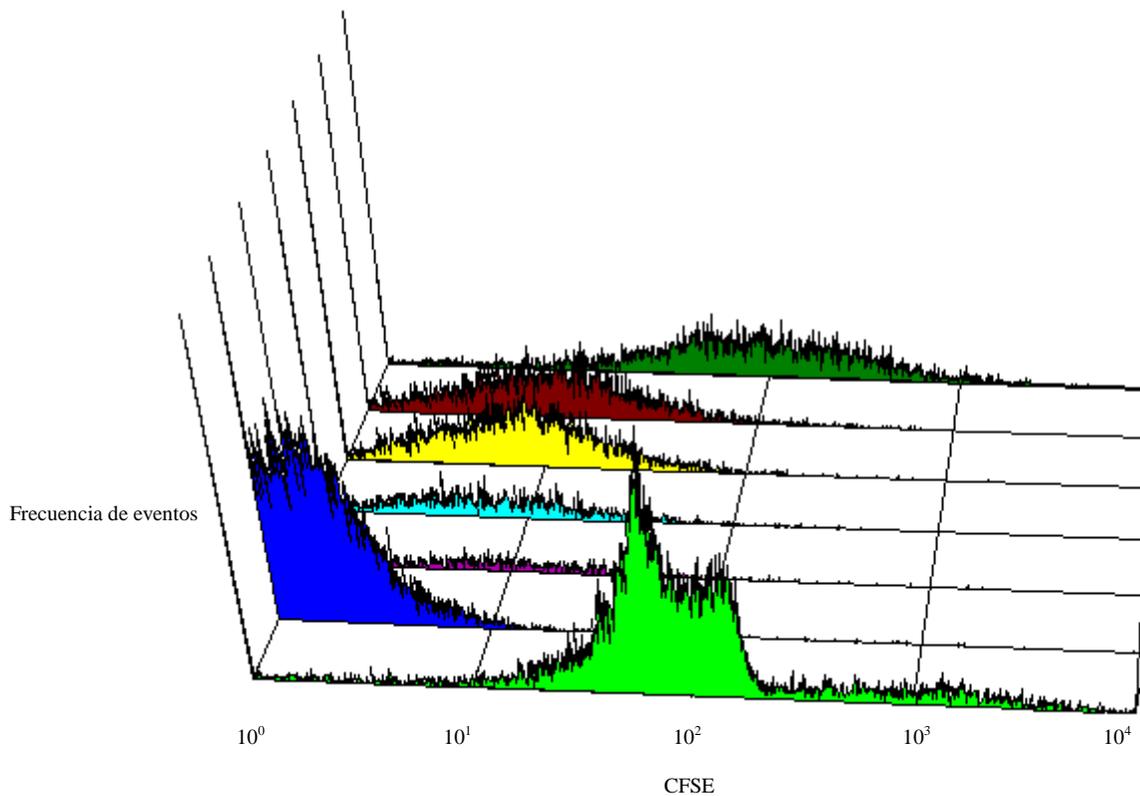


Figura 47. Resultados para CFSE de las muestras tratadas con nanopartículas de plata en la línea celular Ca Ski

La CFSE (del inglés *-carboxyfluorescein succinimidyl ester-*) es una molécula fluorescente permeable a la célula que se utiliza para el estudio de proliferación celular. Los resultados que se muestran en la gráfica, en primer lugar (verde claro) son para aquellas células teñidas en tiempo T_0 , es decir, al mismo tiempo que las células tratadas pero que no tuvieron tratamiento alguno, se puede observar que el valor de la señal para CFSE encuentra su valor máximo alrededor de 10^2 y que todos ellos fueron positivos a la tinción. A continuación, el gráfico en color azul, es el correspondiente a células muertas que no fueron teñidas con CFSE, por lo que no muestran señal (se consideró positivo a partir de 10^1), las siguientes cuatro gráficas corresponden a los tratamientos con nanopartículas de plata en orden ascendente, es decir, de 5-100 μg , como se puede observar, el número de casos negativos aumentó conforme aumentó la dosis de nanopartículas, finalmente, como control, se muestra la gráfica de células teñidas al tiempo T_1 (verde oscuro), es decir, justo antes de la citometría de flujo, en donde todos los casos fueron positivos a la tinción.

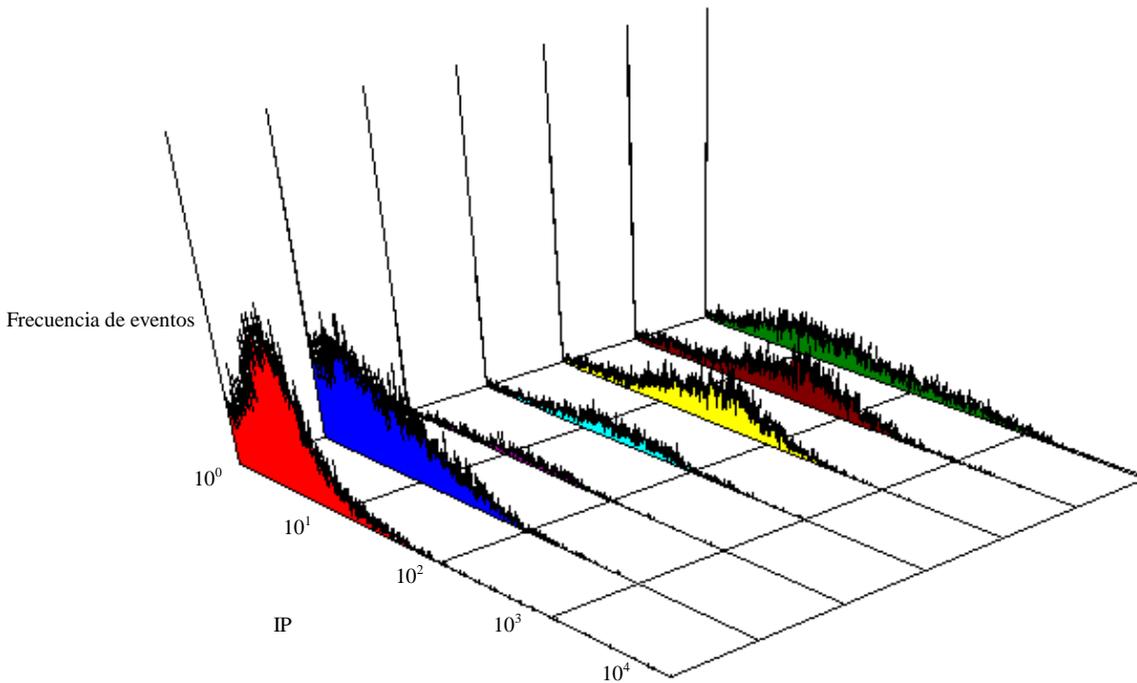


Figura 48. Resultados para IP de las muestras tratadas con nanopartículas de plata en la línea celular Ca Ski

Por otro lado, las células también fueron teñidas con Ioduro de Propidio, una agente fluorescente que se intercala en la doble hélice del DNA, no permeable a las células, en citometría de flujo se utiliza para identificar células muertas, el valor positivo para este marcador fue considerado a partir de 10^1 , el primer gráfico mostrado (rojo) corresponde a las células que se mantuvieron en crecimiento continuo sin recibir tratamiento alguno, como se puede observar no son positivas para IP. El gráfico en color azul, es el correspondiente a células muertas teñidas con IP, en éste gráfico se observa positividad para la tinción con IP, aunque no todas ellas, esto debido a que el criterio de selección fue tomar las células suspendidas en el medio asumiendo que dentro de ellas la mayoría estarían muertas pero esto no siempre es así. Las siguientes cuatro gráficas corresponden a los tratamientos con nanopartículas de plata en orden ascendente, es decir, de 5-100 μg , como se puede observar, contrario a los resultados con CFSE, el número de casos positivos aumentó conforme aumentó la dosis de nanopartículas, lo cual, junto con los resultados anteriores, confirma el efecto tóxico de las nanopartículas de plata sobre esta línea celular. Finalmente, como control, se muestra la gráfica de células teñidas al tiempo T_1 (verde oscuro), es decir, justo antes de la citometría de flujo, en donde se observan tanto valores positivos como negativos debido a que las células fueron cosechadas y tratadas para su estudio y sin discriminar vivas de muertas.

A fin de determinar si la citotoxicidad fue causada por las nanopartículas de plata y no por los otros componentes empleados, se evaluó el efecto sobre el vehículo, es

decir, se realizó el mismo tratamiento experimental para la síntesis, sin adicionar AgNO_3 . Este tratamiento arrojó los siguientes resultados:

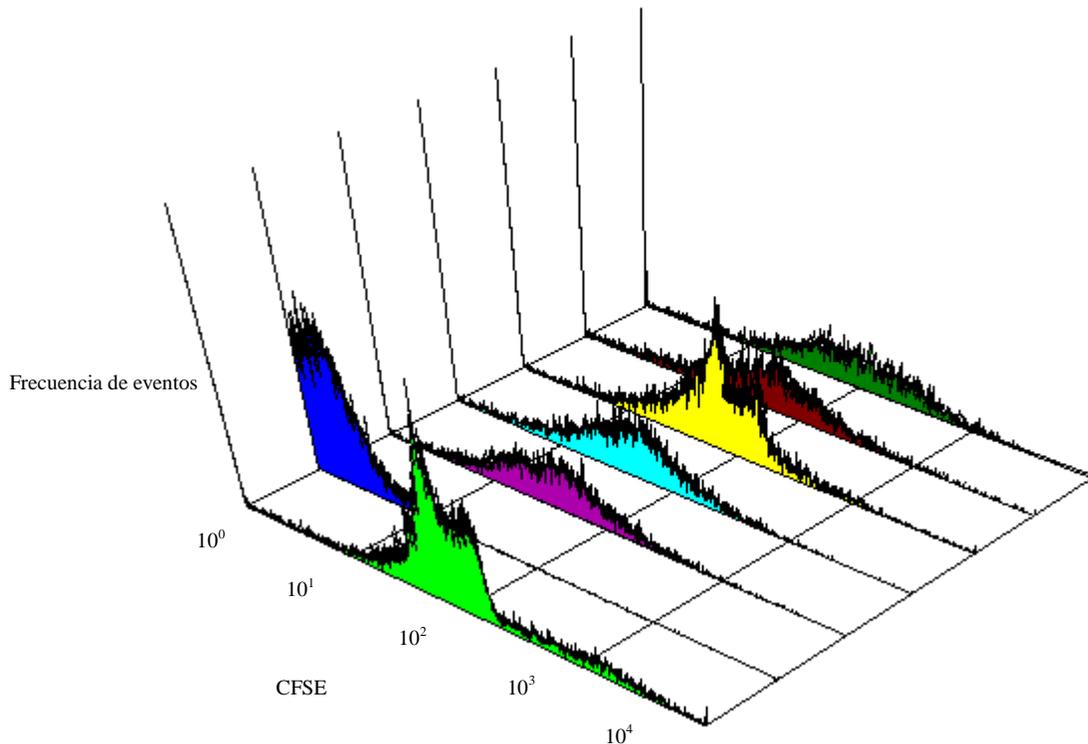


Figura 49. Resultados para CFSE de las muestras tratadas con el vehículo 1 en la línea celular Ca Ski

Los resultados que se muestran en la gráfica, en primer lugar (verde claro) son para aquellas células teñidas en tiempo T_0 , es decir, al mismo tiempo que las células tratadas pero que no tuvieron tratamiento alguno, se puede observar que el valor de la señal para CFSE encuentra su valor máximo alrededor de 10^2 y que todos ellos fueron positivos a la tinción. A continuación, el gráfico en color azul, es el correspondiente a células muertas que no fueron teñidas con CFSE, por lo que no muestran señal (se consideró positivo a partir de 10^1), las siguientes cuatro gráficas corresponden a los tratamientos con el vehículo 1 en orden ascendente, es decir, el correspondiente a las dosis de 5-100 μg para nanopartículas de plata, como se puede observar, no se observó toxicidad celular por el vehículo, ya que el número de los casos negativos no aumentó con el tratamiento, por el contrario, el comportamiento fue similar al de las células control (gráficas verde claro y verde fuerte –células teñidas al tiempo T_1 -). Para corroborar lo anterior, se realizó el mismo estudio para la señal de IP, encontrándose los siguientes resultados:

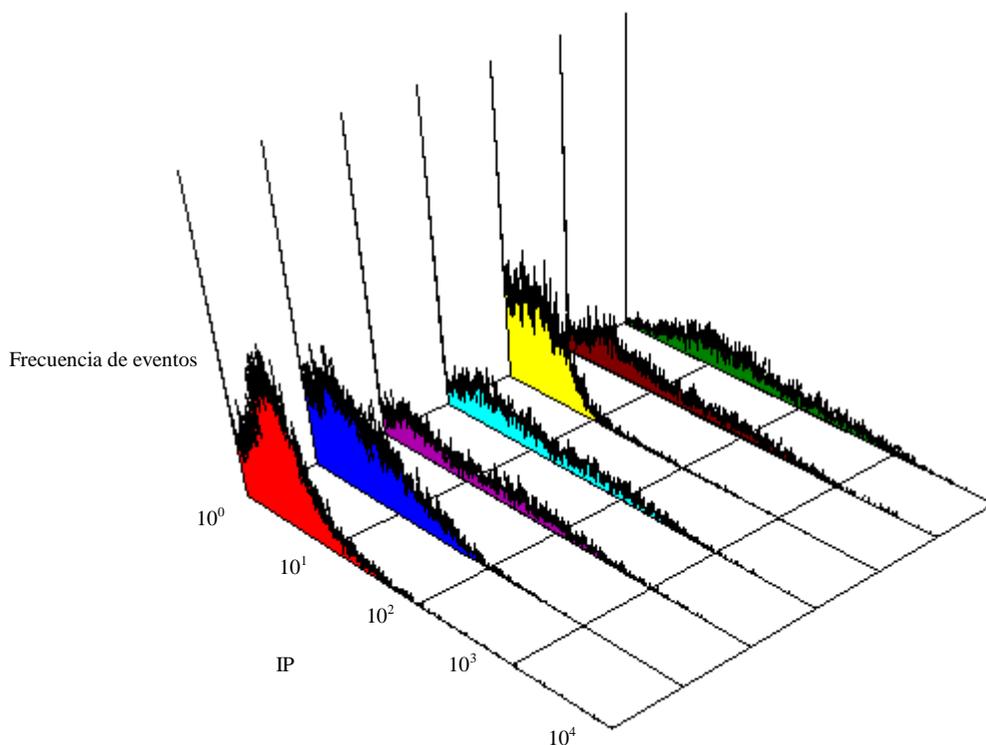


Figura 50. Resultados para IP de las muestras tratadas con el vehículo 1 en la línea celular Ca Ski

Al evaluar la respuesta al con IP (gráficas morada, verde agua, amarilla y café) se observó un comportamiento similar a los controles (rojo y verde), lo cual confirma que las nanopartículas son citotóxicas para esta línea celular, mientras que su vehículo no genera los mismo efectos.

El siguiente paso fue evaluar el efecto citotóxico de las nanopartículas de plata cargadas en los nanotransportadores. Las lecturas para CFSE (figura 51) mostraron un aumento en la toxicidad celular conforme aumentó la dosis 5-100 μL (gráficos morado, verde agua, amarillo y café), lo que se evidencia si sus gráficos son comparados con los de los controles sin tratamiento (T_0 verde claro y T_1 verde fuerte). Estos resultados fueron contrastados con los obtenidos para IP (figura 52) que, como se puede observar, tuvo positividad importante para todos los casos. Estos resultados, igual que los obtenidos para las nanopartículas de plata fueron comparados con los obtenidos para el vehículo sin nanopartículas de plata a fin de confirmar que la acción citotóxica se debiera a las nanopartículas y no a otros componentes del transportador farmacológico. Los resultados para este experimento con CFSE se muestran en la figura 53, en la cual se puede observar que las muestras, para todos los casos, fueron positivas y presentaron un comportamiento parecido al de las muestras control (verde claro y verde oscuro), mientras que para el IP (figura 54) los resultados fueron similares a los controles sin tratamiento (verde claro y verde oscuro) mostrando que la toxicidad causada por los transportadores se debe a las nanopartículas de plata, principalmente.

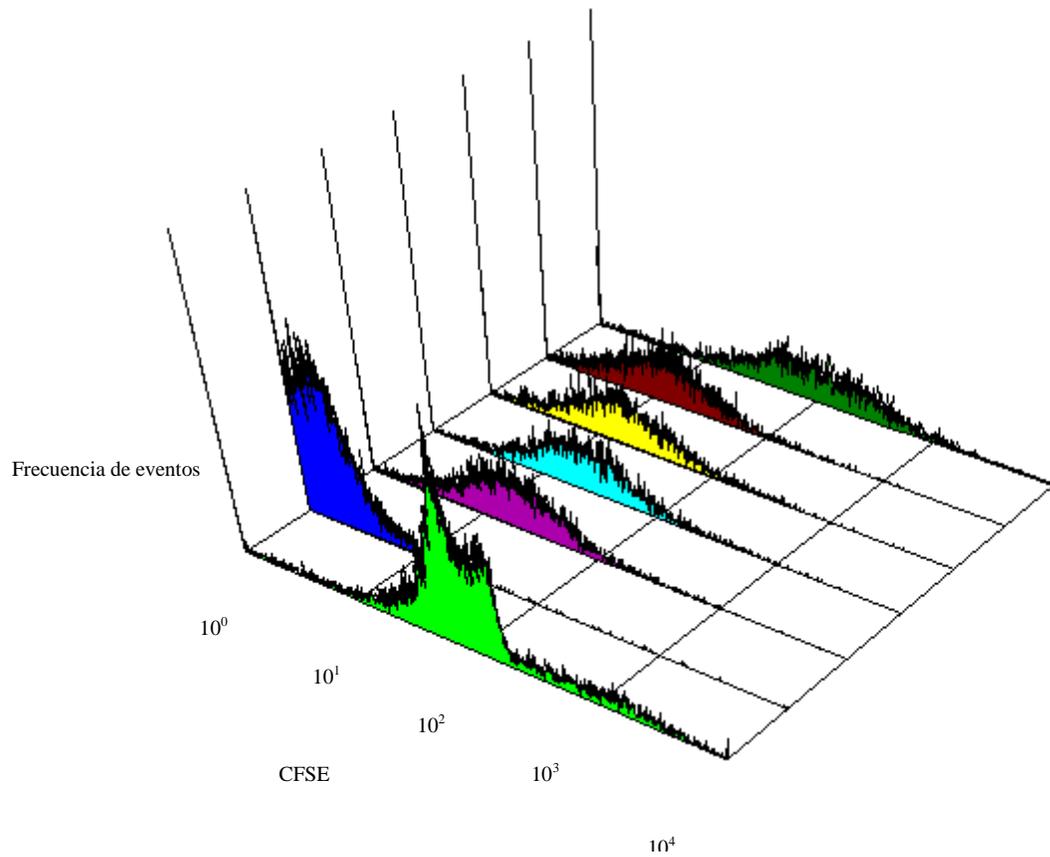


Figura 51. Resultados para CFSE de las muestras tratadas con el nanotransportador en la línea celular Ca Ski

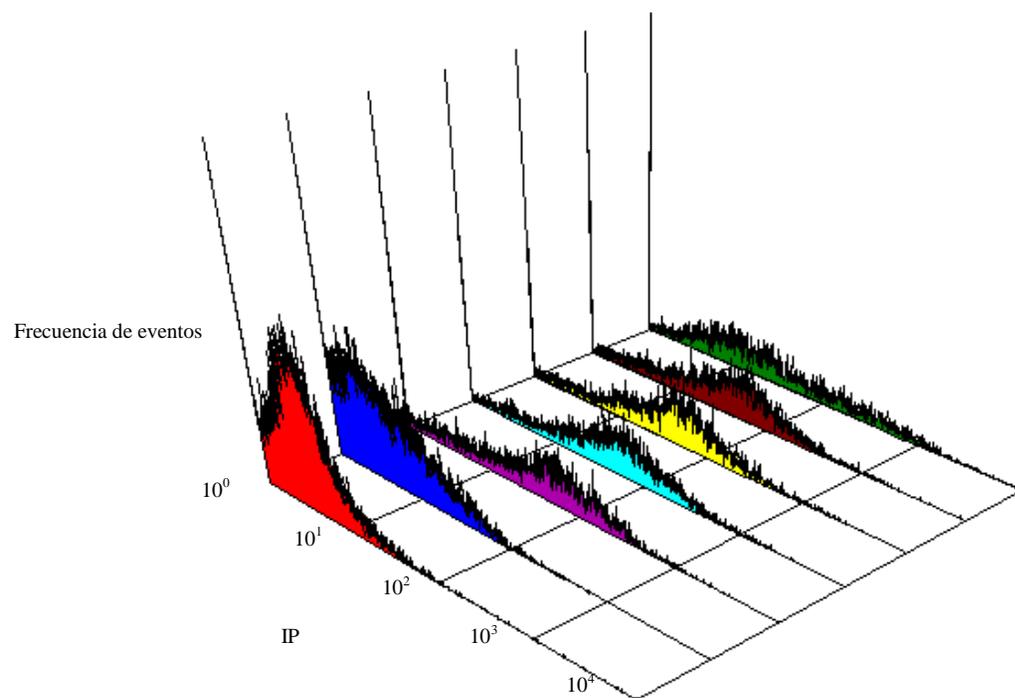


Figura 52. Resultados para IP de las muestras tratadas con el nanotransportador en la línea celular Ca Ski

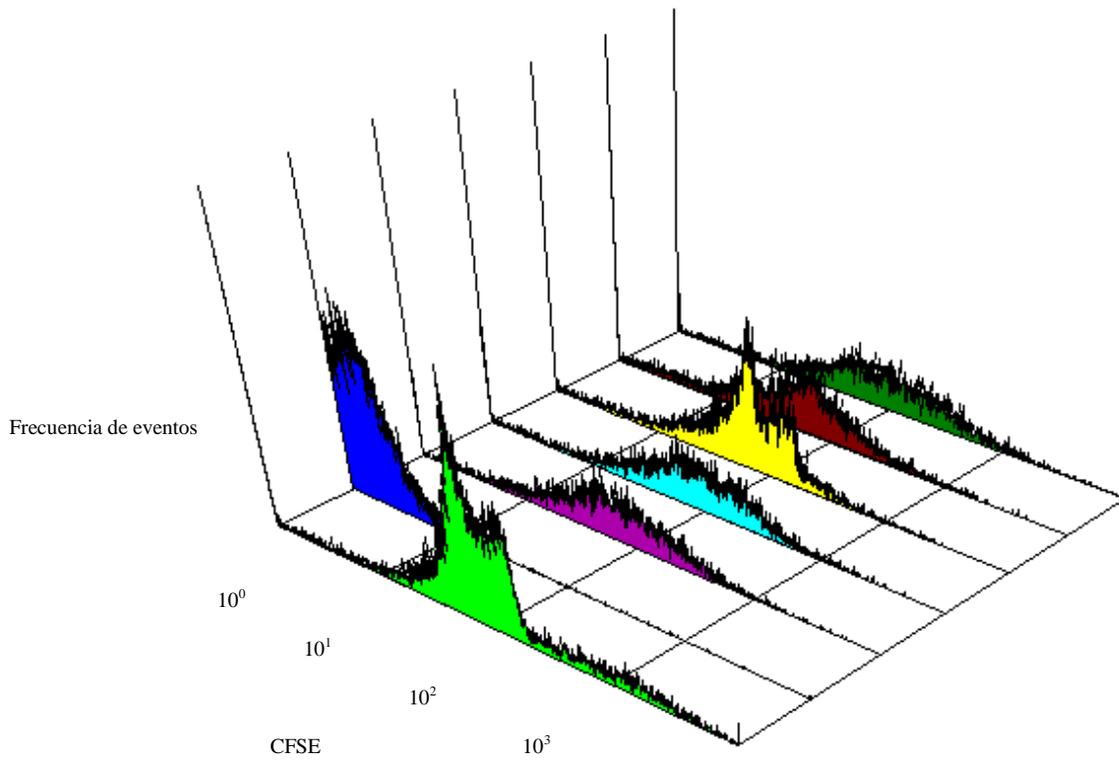


Figura 53. Resultados para CFSE de las muestras tratadas con el vehículo 2 en la línea celular Ca Ski

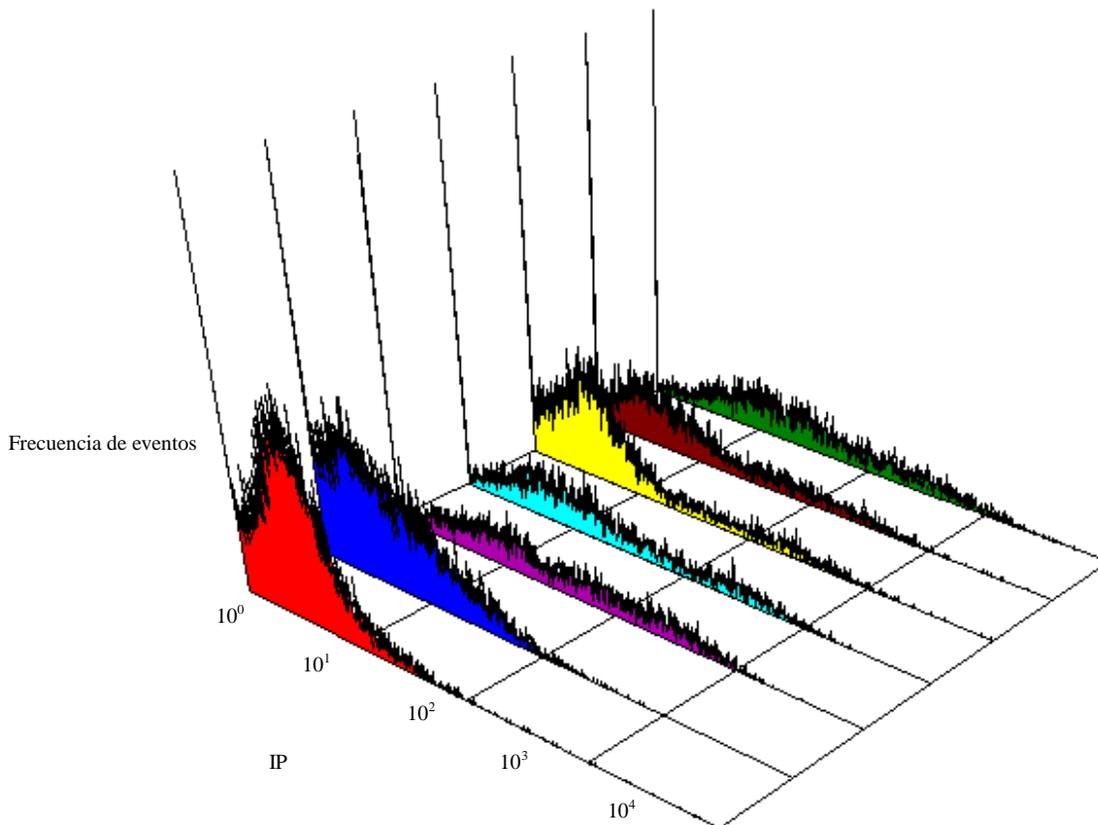


Figura 54. Resultados para IP de las muestras tratadas con el vehículo 2 en la línea celular Ca Ski

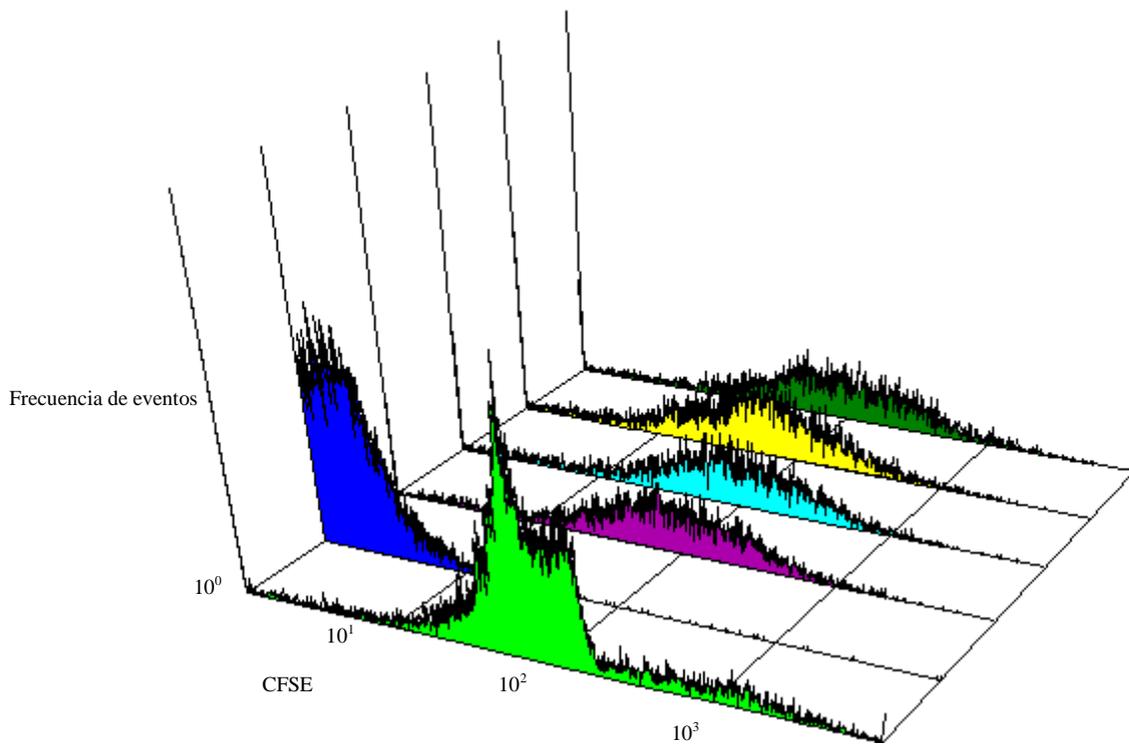


Figura 55. Resultados para CFSE de las muestras tratadas con cisplatino en la línea celular Ca Ski

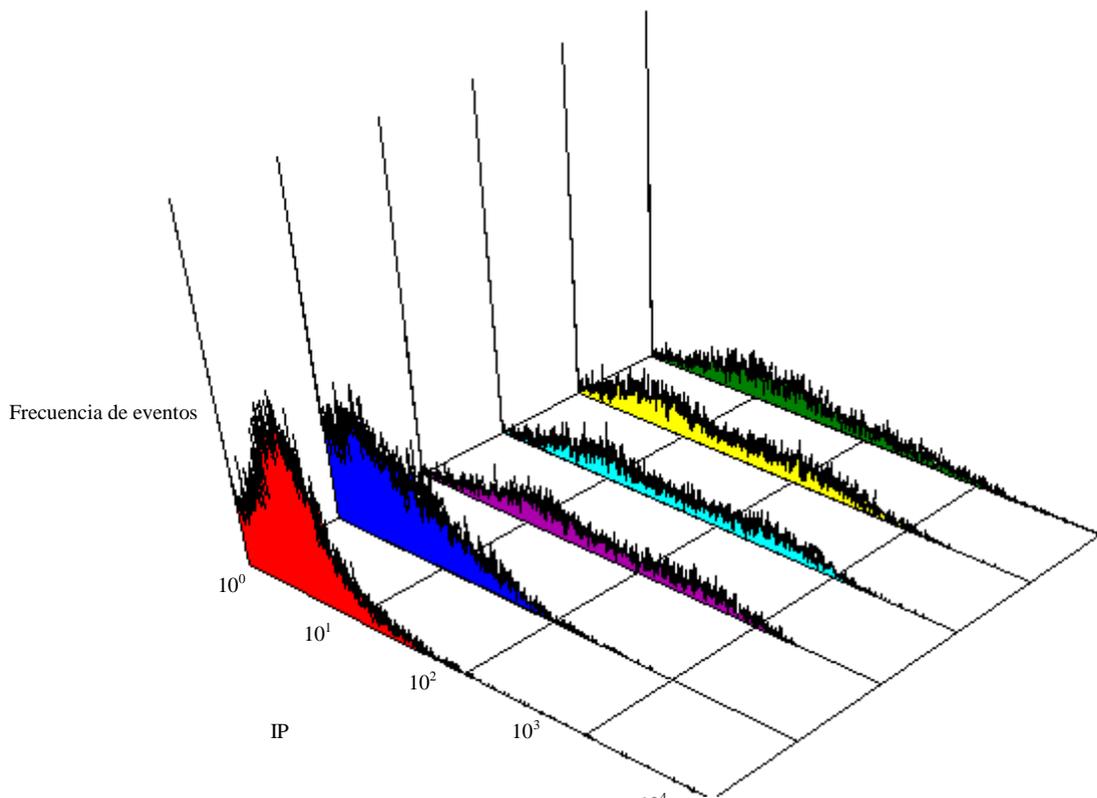


Figura 56. Resultados para IP de las muestras tratadas con cisplatino en la línea celular Ca Ski

Por otro lado, los tratamientos con cisplatino (figuras 53 y 54) no mostraron diferencia en el comportamiento respecto al control sin tratamiento (verde claro y verde fuerte), sin embargo, las observaciones al microscopio evidenciaron daño celular ya que las células no estaban adheridas a la superficie de las placas de cultivo, la razón de estos resultados puede ser que el cisplatino no haya generado daño a la membrana o que el tiempo de tratamiento no haya sido suficiente para hacerlo, aunque, como se mencionó en los antecedentes de este trabajo, el cisplatino, entre sus mecanismos de acción incluye la inducción de muerte por apoptosis mediada por la formación de radicales libres, lo cual, genera daño a la membrana celular, pero éste daño depende de la concentración de ROS generadas y del tiempo que se mantenga el estímulo.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

El desarrollo de este trabajo permitió encontrar condiciones de síntesis que, bajo el protocolo estudiado, permiten obtener nanopartículas de plata de tamaño homogéneo menor a 20 nm, estas son: 1.8 gel/Ag, 1.5 glc/Ag, temperatura de síntesis de 58 °C, tiempo de síntesis de 2 h, obteniendo partículas de ~5 nm de diámetro con baja distribución de tamaño. Se observó que es posible obtener nanotransportadores de nanopartículas de plata utilizando PEI y PEG, lo que generó estructuras de diámetro medio aproximadamente igual a 500 nm, pero que, el uso de PEI no es necesario ya que es posible la interacción de la gelatina con el PEG activado, lo que genera estructuras de diámetro medio de 100 a 300 nm, debidamente aisladas y con una cubierta biocompatible de PEG. Se comprobó, mediante citometría de flujo, que las nanopartículas de plata son citotóxicas para la línea celular Ca Ski, y que, la estructura generada para contenerlas permite la actividad de las nanopartículas. Al realizar los estudios comparativos contra los vehículos sin nanopartículas se comprobó que el efecto citotóxico se debe a las nanopartículas de plata y no a los compuestos involucrados en su síntesis o en su encapsulación. Estos resultados permiten proponer el estudio de las nanopartículas de plata, principalmente de las cargadas en el nanotransportador, para la evaluación de su factibilidad terapéutica en el tratamiento de cáncer; para ello será necesario optimizar la síntesis de los transportadores y adecuar las dosis y tiempo de respuesta, evaluar *in vitro* su actividad y, posteriormente, hacer estudios *in vivo* empleando las condiciones propias del microambiente tumoral, o bien, mediante el direccionamiento activo de los transportadores empleando sistemas ligando-receptor o antígeno-anticuerpo para tipos específicos de neoplasias.

Referencias

- Ahamed M, K. M. (2006). DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* , 41, 2699-2711.
- Alexrod D, P. K. (2006). Evolution of cooperation among tumor cells. *PNAS* , 103, 13474–13479.
- Arora S, J. J. (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett* , 179, 93-100.
- Arora S, J. J. (2009). Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblast and liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* , 236, 310-318.
- AshaRani PV, L. K. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* , 3, 270-290.
- ATSRD, A. p. (1990). *Reseña Toxicológica de la Plata*. Servicio de Salud Pública, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Atlanta, GA.
- Bae Y, e. a. (2005). Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Mol Biosyst* , 1, 242-250.
- Benhar M, D. I. (2001). Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* , 21, 6913-26.
- Bird BR, S. S. (2008). Cardiac toxicity in breast cancer survivors: review of potential cardiac problems. *Clin Cancer Res* , 14, 14-24.
- Britton, R. (1996). Metal-induced hepatotoxicity. *Semin Liver Dis* , 16, 3-12.
- Carlson C, H. S.-S. (2008). Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *J Phys Chem* , 112, 13608-13619.
- Cejas P, C. E.-I. (2004). Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer. *Cancer Causes Control* , 15, 707-19.
- Cha k, H. H. (2008). Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. *Biotechnol Lett* , 30, 1893-1899.
- Cho H, C. J. (2005). Surface-enhanced Raman Scattering and Density Functional Theory Calculation of Uracil on Gold and Silver Nanoparticle Surfaces. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* , 61, 1141-1145.
- Cho K, W. X. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* , 14, 1310-1316.
- Correa DD, M. L. (2007). Cognitive functions in primary central nervous system lymphoma: literature review and assessment guidelines. *Ann Oncol* , 18, 1145-1151.
- Cotran R, K. V. (2000). *Robbins. Patología Estructural y Funcional*. (6ª Ed ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Duncan, R. (2003). The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* , 347-360.
- Elechiguerra J, e. a. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-I. *Journal of nanobiotechnology* , 3, 1-10.
- Fang J, N. H. (2007). Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target* , 15, 475-86.

- Fang J, S. T. (2009). The therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev* , 290-302.
- Feng L, W. J. (2000). A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *J Biomed Mater Res* , 52, 662-668.
- Ferlay J, et al. (2004). *GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide* . IARC Press, Lyon.
- Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* , 5, 161-171.
- Forster M, M. B. (2000). Molecular modelling study of HIV p17gag (MA) protein shell utilising data from electron microscopy and X-ray crystallography. *J Mol Biol* , 298, 841-857.
- Hsin Y, C. C. (2008). The apoptotic effect of nanosilver is mediated by ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett* , 179, 130-139.
- Hussain S, H. K. (2008). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Applied Biotechnology* .
- Jaehde U, L. A. (2008). Minimising treatment-associated risks in systemic cancer therapy. *Pharm World Sci* , 30, 161-168.
- Jin S, D. R. (2007). Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *Journal of Cell Science* , 120, 379-383.
- Jinhua H, S. Y. (2007). Stable Amphoteric Nanogels Made of Ovalbumin and Ovotransferrin via Self-Assembly. *Langmuir* , 23, 6358-6364.
- Johnston A, S. G. (2008). Prognostic systems for lymphomas. *Hematol Oncol Clin North Am* , 5, 839-861.
- Khaitan D, D. B. (2009). Endogenous and induced oxidative stress in multi-cellular tumour spheroids: implications for improving tumour therapy. *Indian J Biochem Biophys* , 46, 16-24.
- Krueger A, W. G. (2001). Complications and patient satisfaction following expander/implant breast reconstruction with and without radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* , 3, 713-21.
- Laubach J, R. A. (2008). Current and emerging strategies for the management of acute myeloid leukemia in the elderly. *Oncologist* , 10, 1097-1108.
- Leonard C, et al. (1990). Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* , 265, 10373-10382.
- López-León T, C. E.-V.-G. (2005). Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *Journal of Colloid and Interface Science* , 283, 344-351.
- Lu H, O. W. (2006). Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Mol Cancer Res* , 4.
- Marchler-Bauer A, A. J.-S. (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* , 35, D237-40.
- Mareel M, L. A. (2003). Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* , 83, 337-76.
- Meo S, A.-K. T. (2003). Health hazards of welding fumes. *Saudi Med J* , 24, 1176-82.
- Montgomery R, D. R. (1980). *Bioquímica Médica*. Barcelona, España: Salvat Editores.

- Morones J, E. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles :. *Nanotechnology* , 16, 2346-2353.
- Nishiyama N, e. a. (2006). Current State, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacology and Therapeutics* , 112, 630-648.
- Nur U, R. B. (2008). Survival from testicular cancer in England and Wales up to 2001. *Br J Cancer* , 99, S80-S82.
- OMS, O. M. (2005). *Cancer topics*.
- Pal S, T. K. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-negative Bacterium Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* , 73, 1712-1720.
- Reardon D, W. P. (2008). Glioblastoma multiforme: an emerging paradigm of anti-VEGF therapy. *Expert Opin Biol Ther* , 8, 541-553.
- Riesefeld, E. H. (1942). *Tratado de Química Inorgánica*. Barcelona: Librería Hachette S. A.
- Sakac V, S. M. (2000). Free oxygen radicals and kidney diseases--part I. *Med Pregl* , 53, 463-474.
- Shuming N, e. a. (2007). Nanotechnology applications in cancer. *Annu Rev Biomed Eng* , 9, 12.1-12.32.
- Sittig, M. (1981). *Handbook of toxic and hazardous chemicals*. New Jersey: Noyes publications.
- Sondi I, S. B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on Escherichia coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* , 275, 177-182.
- Stegg, P. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* , 12, 895-904.
- Stohs S, B. D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* , 18, 321-336.
- The Silver Institute*. (2009). Obtenido de <http://www.silverinstitute.org>
- Valko M, M. H. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* , 12, 1161-1208.
- Vaupel P, R. F. (s.f.). Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review.
- Vinogradov S, e. a. (2005). Polyplex Nanogel formulations for drug delivery of cytotoxic nucleoside analogs. *J Control Release* , 103, 143-157.
- Weigelt B, P. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* , 5, 591-602.
- Witz, I. (2008). Yin-Yang Activities and Vicious Cycles in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* , 68.
- Wu O, C. H. (2008). Biomolecule-assisted synthesis of water-soluble silver nanoparticles and their biomedical applications. *Inorg Chem* , 47, 5882-5888.
- Xie, J. (2008). Molecular biology of basal and squamous cell carcinomas. *Adv Exp Med Biol* , 624, 241-251.
- Yang L, W. H. (2008). Shape-controlled synthesis of protein-conjugated silver sulfide nanocrystals and study on the inhibition of tumor cell viability. *Chem Commun (Camb)* , 26, 2995-2997.

Yonezawa, M. T. (2004). Photoinduced formation and aggregation of silver nanoparticles at the surface of carboxymethylcellulose films. *Journal of Nanoparticle Research* , 6, 457-465.