

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Modulación de genes antiproliferativos y apoptóticos en
células de cáncer de mama mediada por AgNPs como agente
único y en combinación con tamoxifeno**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

María Dolores Rivera Guzmán

Ensenada, Baja California, México
2019

Tesis defendida por
María Dolores Rivera Guzmán

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Codirectora de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Codirector de tesis

Miembros del comité

Dra. Ernestina Castro Longoria

Dra. Elizabeth Ponce Rivas

Dr. Israel Rocha Mendoza

Dr. David Cervantes Vásquez



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **María Dolores Rivera Guzmán** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología

Modulación de genes antiproliferativos y apoptóticos en células de cáncer de mama mediada por AgNPs como agente único y en combinación con tamoxifeno

Resumen aprobado por:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Codirectora de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Codirector de tesis

En México, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres. En el año 2013, se registraron 16 muertes por cada 100,000 mujeres mayores a 20 años de edad. Algunas innovaciones en el tratamiento de esta enfermedad han contribuido a obtener una mejor eficacia en las terapias, sin embargo, esta problemática persiste de manera significativa debido a que las concentraciones de los tratamientos empleados resultan ser sumamente tóxicas, y desarrollo de resistencia a la quimioterapia. Uno de los mayores inconvenientes de la quimioterapia, son sus efectos secundarios tóxicos (cito- y genotóxicos) y la adquisición de resistencia múltiple a fármacos por parte de las células cancerígenas. Esto hace que la quimioterapia sea inefectiva. Por ello, es necesario generar nuevas herramientas para el tratamiento del cáncer con menores efectos secundarios. En este sentido, la actividad citotóxica de nanopartículas de plata (AgNPs) ha sido ampliamente reportada. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó, *in vitro*, el efecto citotóxico, genotóxico y molecular de la respuesta celular ocasionada por diferentes concentraciones de AgNPs en combinación con diversas concentraciones del fármaco antineoplásico tamoxifeno en dos líneas celulares de cáncer de mama que representan los tipos de cáncer más frecuentes como el hormono-dependiente (MCF-7) y uno de los más agresivos e invasivos como el cáncer de mama triple-negativo (MDA-MB-231). Los resultados obtenidos revelaron que las combinaciones de AgNPs y fármaco tamoxifeno seleccionadas, tienen un efecto citotóxico aditivo, en tanto que algunas combinaciones mostraron un claro efecto citotóxico antiproliferativo sinérgico. Este efecto está correlacionado con los cambios morfológicos observados en las células, la inducción de la muerte celular por apoptosis, el incremento en la cantidad del transcrito de la proteína P53 y con el incremento en la generación de las especies reactivas de oxígeno. Además de ello, se estableció que estas concentraciones no tienen un efecto genotóxico significativo en relación a las células control. Se concluye que la combinación de AgNPs y fármaco tamoxifeno tiene un claro efecto citotóxico antiproliferativo en las células de cáncer MDA-MB-231 y MCF-7, las cuales no muestran daños genotóxicos asociados a los tratamientos.

Palabras clave: cáncer de mama, nanopartículas de plata, tamoxifeno, sinergia, anticancerígeno.

Abstract of the thesis presented by **María Dolores Rivera Guzmán** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology

Modulation of antiproliferative and apoptotic genes in breast cancer cells mediated by AgNPs as a single agent and in combination with tamoxifen

Abstract approved by:

Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno
Codirectora de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Codirector de tesis

In Mexico, breast cancer is the leading cause of death among malignant neoplasms in women. In 2013, there were 16 deaths per 100,000 women over 20 years of age. Some innovations in the treatment of this disease have contributed to obtain a better efficacy in the therapies. However, this problem persists significantly because the concentrations of their treatments are extremely toxic and resistance to chemotherapy development. The biggest drawbacks of chemotherapy are its toxic side effects (cyto- and genotóxico) and the acquisition of multiple drug resistance by cancer cells. This makes chemotherapy ineffective. Thus, it is necessary to generate new tools for the treatment of cancer with lower side effects. In this sense, the cytotoxic activity of silver nanoparticles (AgNPs) has been widely reported. Therefore, in the present work the cytotoxic, genotoxic and molecular effect caused by different concentrations of AgNPs was evaluated in vitro in combination with various concentrations of tamoxifen drug in two breast cancer cell lines representing the most frequent types of cancer such as hormone-dependent (MCF-7) and one of the most aggressive and invasive as triple-negative breast cancer (MDA-MB-231). The results obtained revealed that the combinations of AgNPs and tamoxifen drug selected have an additive cytotoxic effect, while some combinations showed a clear synergistic antiproliferative cytotoxic effect. This effect is correlated with the morphological changes observed in the cells, the induction of cell death by apoptosis, the increase in the amount of the transcript of the P53 protein and with the increase in the generation of reactive oxygen species. In addition, it was established that these concentrations do not have a significant genotoxic effect in relation to control cells. We conclude that the combination of AgNPs and tamoxifen drug has a clear cytotoxic antiproliferative effect in the MDA-MB-231 and MCF-7 cancer cells, which do not show genotoxic damage associated with the treatments.

Keywords: breast cancer, silver nanoparticles, tamoxifen, synergy, anticancerigen.

Dedicatoria

Para los amigos que están y ya no están.

Para todo aquel que sienta curiosidad por conocer los misterios de la biología del
cáncer y nanociencias.

Agradecimientos

Mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno, codirectora de mi tesis de maestría. Gracias por elegirme nuevamente para desarrollar este tipo de proyecto, gracias por permitirme recibir todo el conocimiento necesario y motivación a lo largo de mi estancia. Valoro la confianza que ha puesto en mí y su dedicación.

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt, codirector de mi tesis de maestría y jefe del departamento de Bionanotecnología del CNYN-UNAM. Gracias por el interés que ha mostrado en mi trabajo y por las aportaciones que ha realizado en mi proyecto. Aprecio todas las facilidades que me ha brindado para poder realizar los experimentos de mi tesis de maestría. Su trayectoria me inspira a plantearme la meta de ser una investigadora exitosa.

Agradezco el interés mostrado por mi trabajo, las correcciones y sugerencias recibidas por la Dra. Ernestina Castro Longoria, Dra. Elizabeth Ponce Rivas, el Dr. Israel Rocha Mendoza y Dr. David Cervantes Vásquez, miembros del comité tutorial.

Agradezco al CICESE, gracias a la Dra. Rufina Hernández, directora de estudios de posgrado y a la Dra. Patricia Juárez Camacho, coordinadora del posgrado en Ciencias de la Vida. Gracias a la atención recibida por parte del Departamento de Estudios Escolares, Dolores Sarracino, Norma Fuentes y Citlali Romero. Un especial agradecimiento a la Lic. Ruth Eaton por la atención recibida en relación a la solicitud de mi beca de maestría.

Agradezco al Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, a los Doctores Katrin Quester, Rubén Cadena, Alejandro Huerta Saquero, Andrés Zárate y Ana Rodríguez y a la Maestra Itandehui Betanzo, por brindarme todas las facilidades y poder realizar mi trabajo de tesis. Un agradecimiento a todos mis amigos y compañeros de laboratorio, por todas las experiencias y buenos momentos.

Agradezco sinceramente a los proyectos CONACYT NO. 269071, (por parte de la Dra. Karla Juárez) y Cátedras No. 53 (por parte del Dr. Rafael Vázquez).

Agradezco a mis amigos del posgrado en Ciencias de la Vida.

Edith, Chantal, Jessica, Vareska, agradezco todas nuestras conversaciones entre amigas y experiencias.

A mi amigo Rafael al cual considero como un hermano, gracias por escucharme en momentos complicados de mi vida y sobre todo por tu amistad.

Agradezco a mi amigo Juan Cañez, durante la etapa de clases y parte de mi año de tesis te ganaste mi confianza y amistad, nunca olvidaré que los tiempos de silencio realizando cultivo celular se convirtieron en momentos de risas y conversaciones amenas.

A mí querido amigo Edgardo, por transmitir tu alegría en todos los momentos en que convivimos. Tu amistad es invaluable.

A mis cuatachos Mario, Erick, Iván y Eduardo, agradezco los momentos en los que nos divertíamos jugando videojuegos. También agradezco su apoyo durante la realización de nuestras tesis.

A mi amigo Kee, por su sincera amistad y positivismo, además de ser nuestro representante de estudiantes. También por invitarme a unirme al equipo “Pelicanos del CICESE” durante dos años.

A mi amigo Kevin Hernández, “we’re partners in crime”.

Agradezco a una de mis amistades más preciadas, a mi amiga Alison Ortega, agradezco nuestras conversaciones, estar al pendiente una de la otra. Tu manera de ser me inspira siempre a ser una mejor persona. Me llena de felicidad verte estudiando un posgrado en el CICESE.

Un agradecimiento muy especial merece el apoyo y paciencia recibido de mis padres y hermanos.

Le agradezco a Dios por haber estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, por brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiii
Lista de ecuaciones.....	xiv
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 El cáncer de mama como problema mundial de salud.....	2
1.1.2 Estadísticas sobre el cáncer de mama a nivel mundial.....	2
1.1.3 La situación del cáncer de mama en México.....	4
1.1.4 Marcadores moleculares en el cáncer de mama.....	5
1.1.5 Tratamientos convencionales contra el cáncer y efectos secundarios.....	7
1.1.6 Combinación de fármacos antineoplásicos para el tratamiento del cáncer de mama.....	10
1.1.7 Efecto sinérgico.....	11
1.1.8 Modelos de interacción de fármacos.....	11
1.1.9 Nanopartículas de plata como el nanomaterial más utilizado en aplicaciones biomédicas.....	15
1.1.10 Efecto de las nanopartículas de plata en combinación con fármacos antineoplásicos.....	18
1.2 Justificación.....	19
1.3 Hipótesis.....	19
1.4 Objetivos.....	19
1.4.1 Objetivo general	19
1.4.2 Objetivos específicos.....	20
Capítulo 2. Metodología	
2.1 Nanopartículas de plata.....	21
2.2 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de plata.....	21
2.2.1 Análisis mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM).....	21

2.2.2	Dispersión dinámica de luz.....	22
2.2.3	Análisis del plasmón de resonancia superficial mediante espectrometría de UV-Vis..	22
2.2.4.	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	22
2.3	Cultivo de células.....	23
2.4	Subcultivo de las células de cáncer de mama y tripsinización.....	23
2.5	Criopreservación de las células.....	24
2.6	Preparación de las AgNPs con diferentes concentraciones de plata metálica.....	24
2.7	Ensayos de viabilidad celular por colorimetría (reducción del MTT).....	24
2.8	Ensayos de sensibilidad celular a fármacos antineoplásicos.....	25
2.9	Ensayos de interacción de nanopartículas de plata y fármacos antineoplásicos en células de cáncer.....	26
2.10	Aislamiento de ARN de la línea celular MDA-MB-231.....	27
2.11	Cuantificación de ARN total de la línea celular MDA-MB-231.....	28
2.12	Síntesis de ADNc de la línea celular MDA-MB-231.....	28
2.13	Cuantificación de ADNc de la línea celular MDA-MB-231.....	29
2.14	Reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR)	30
2.15	Retrotranscripción – PCR.....	31
2.16	Evaluación del efecto genotóxico de la combinación de AgNPs y tamoxifeno.....	32
2.17	Análisis estadístico.....	33
Capítulo 3. Resultados		
3.1	Caracterización fisicoquímica de las AgNPs.....	34
3.2	Determinación in vitro de la concentración media inhibitoria (IC50) de las AgNPs y del tamoxifeno en células de cáncer de mama.....	36
3.3	Determinación in vitro del tipo de interacción de la combinación de las AgNPs y del tamoxifeno en células de cáncer de mama	41
3.4	Expresión de los genes GAPDH, TP53 Y SOD1 en células de cáncer de mama.....	48
3.5	Evaluación del efecto genotóxico de la combinación de AgNPs y tamoxifeno en la línea celular MDA-MB-231	50
Capítulo 4. Discusión		
4.1	Efecto del tamoxifeno y de las AgNPs, y de sus combinaciones en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.....	54
4.2	Efecto sinérgico en las células MCF-7 y MDA-MB-231, su significancia biológica y limitaciones del modelo de interacción de Chou-Talalay	59

4.3 Ensayos preliminares de la expresión de los genes TP53 Y SOD1 en las células en las células MDA-MB-231.....	63
4.4 Daño genotóxico generado en las células MDA-MB-231 por la exposición a los tratamientos de las combinaciones de AgNPs y tamoxifeno con efecto sinérgico.....	65
Capítulo 5. Conclusiones.....	67
Literatura citada.....	68
Anexos.....	73

Lista de figuras

Figura		Página
1	Número de casos registrados por cáncer a nivel mundial. Ambos sexos, todas las edades.....	3
2	Número de muertes registradas por cáncer a nivel mundial. Ambos sexos, todas las edades.....	4
3	Características generales del cáncer	6
4	Estructura química del fármaco tamoxifeno	8
5	Descripción esquemática del mecanismo de acción del tamoxifeno	9
6	Gráfico fracción contra índice de combinación (Fa-CI).....	14
7	Representación isoblográfica de la interacción de fármacos en combinación.....	14
8	Mecanismo de la toxicidad de las nanopartículas de plata propuesto por P. AshaRani.....	17
9	Caracterización fisicoquímica de la muestra "A" de AgNPs mediante, a) y b): microscopía electrónica de transmisión. c): espectrofotometría UV-Vis.....	34
10	Caracterización fisicoquímica de la muestra "B" de AgNPs mediante, a) y b): microscopía electrónica de transmisión. c): espectrofotometría UV-Vis.....	35
11	Caracterización fisicoquímica de la muestra "C" de AgNPs mediante, a) y b): microscopía electrónica de transmisión. c): Dispersión de luz dinámica. d): Espectrofotometría UV-Vis.....	36
12	Evaluación de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de la muestra "A" de AgNPs en la línea de cáncer de mama a) MDA-MB-231 y b) MCF-7.....	37
13	Evaluación de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de la muestra "B" de AgNPs en la línea de cáncer de mama a) MDA-MB-231 y b) MCF-7.....	37
14	Evaluación de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de la muestra "C" de AgNPs en la línea de cáncer de mama a) MDA-MB-231 y b) MCF-7.....	38
15	Evaluación de la citotoxicidad del nitrato de plata a diferentes concentraciones en la línea de cáncer de mama a) MDA-MB-231 y b) MCF-7.....	39

16	Evaluación de la citotoxicidad del tamoxifeno a diferentes concentraciones en la línea de cáncer de mama a) MDA-MB-231 y b) MCF-7.....	40
17	Efecto antiproliferativo de la combinación de las AgNPs en presencia de diferentes concentraciones de fármaco tamoxifeno en células de cáncer de mama MDA-MB-231.....	42
18	Representación gráfica obtenida con el software CompuSyn para las combinaciones de AgNPs de 68 nm y el fármaco tamoxifeno en la línea celular MDA-MB-231.....	45
19	Efecto antiproliferativo de la combinación de las AgNPs en presencia de diferentes concentraciones de fármaco tamoxifeno en células de cáncer de mama MCF-7.....	46
20	Representación gráfica obtenida con el software CompuSyn para las combinaciones de AgNPs de 68 nm y el fármaco tamoxifeno en la línea celular MCF-7. a) Modelo isobolográfico y b) Gráfico fracción contra índice de combinación (Fa-CI)	48
21	Gel de agarosa al 1.5% con los productos de PCR correspondiente a los genes TP53, Sod1 y GAPDH de la línea celular MDA-MB-231.....	49
22	Detección de daño al ADN en células MDA-MB-231 vía γ H2AX antibody/Alexa fluor 555 secondary en células MDA-MB-231.....	52
23	Actividad genotóxica los controles individuales y de las combinaciones de AgNPs y tamoxifeno con efecto sinérgico antiproliferativo en la línea celular MDA-MB-231.	53
24	Número de cánceres invasivos por cada 10 000 mujeres. Los controles corresponden a mujeres tratadas con placebo.....	63
25	Evaluación morfológica de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de AgNPs en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con respecto al control negativo (células sin tratamiento). Observado mediante microscopía óptica a un aumento de 10x.....	73
26	Evaluación morfológica de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de AgNPs en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con respecto al control negativo (células sin tratamiento). Observado mediante microscopía óptica a un aumento de 10x.....	74
27	Evaluación morfológica de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de fármaco antineoplásico tamoxifeno en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con respecto al control negativo (células sin tratamiento). Observado mediante microscopía óptica a un aumento de 10x.....	75

28	Evaluación morfológica de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de fármaco antineoplásico tamoxifeno en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con respecto al control negativo (células sin tratamiento). Observado mediante microscopía óptica a un aumento de 10x.....	76
29	Evaluación morfológica de la citotoxicidad de las concentraciones de AgNPs en combinación con concentraciones del fármaco antineoplásico tamoxifeno que demostraron un efecto sinérgico de acuerdo con el modelo de interacción de Chou-Talalay en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, con respecto al control negativo (células sin tratamiento). Observado mediante microscopía óptica a un aumento de 100x.....	77
30	Evaluación morfológica de la citotoxicidad de las concentraciones de AgNPs en combinación con la concentración del fármaco antineoplásico tamoxifeno que demostró un efecto sinérgico de acuerdo con el modelo de interacción de Chou-Talalay en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, con respecto al control negativo (células sin tratamiento). Observado mediante microscopía óptica a un aumento de 100x.....	77
31	Ensayo de formación de colonias en la línea celular MDA-MB-231 expuestas a las combinaciones con efecto sinérgico de acuerdo con el modelo de interacción de Chou-Talalay. Observado mediante microscopía de fluorescencia a 10x.....	78
32	Ensayo de formación de colonias en la línea celular MCF-7 expuesto a la combinación con efecto sinérgico de acuerdo con el modelo de interacción de Chou-Talalay. Observado mediante microscopía de fluorescencia a 10x.....	78
33	Especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular MCF-7. Detectado mediante citometría de flujo.....	79

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer de mama.....	8
2	Componentes requeridos para la una reacción síntesis de de ADNc.....	28
3	Master Mix requerido para la una reacción síntesis de ADNc.....	29
4	Componentes para la reacción de PCR de cada muestra de templado de ADNc.....	30
5	Secuencias de los oligonucleótidos para la amplificación de los genes de interés y su temperatura de fusión (Tm).....	30
6	Condiciones de PCR.....	31
7	Componentes para la reacción de RT-qPCR de cada muestra de templado.....	32
8	Determinación de IC ₅₀ de las muestras "A", " B" y "C" de AgNPs y del tamoxifeno en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.....	40
9	Cuantificación del índice de interacción (CI) entre las AgNPs de 68 nm y el fármaco tamoxifeno en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.....	44
10	Cuantificación del índice de interacción (CI) entre las AgNPs de 68 nm y el fármaco tamoxifeno en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.....	47
11	Concentración y pureza del ARN aislado de la línea celular MDA-MB-231.....	49
12	Índice de genotoxicidad los controles individuales y de las combinaciones de AgNPs y tamoxifeno con efecto sinérgico antiproliferativo en la línea celular MDA-MB-231.	53
13	Comparativa de los valores de IC50 calculados para diferentes AgNPs reportado por otros autores.....	57
14	Comparación de los modelos de cultivos celulares bidimensionales y tridimensionales.	61

Lista de ecuaciones

	Página
1 Ecuación de efecto medio.....	12
2 Ecuación general del índice de combinación.....	12
3 Ecuación extendida del índice de combinación.....	13

Capítulo 1. Introducción

El cáncer de mama es una enfermedad extremadamente compleja y diversa, y es una de las principales causas de muerte en mujeres. Esta enfermedad se caracteriza por el crecimiento no controlado de células malignas en el tejido epitelial mamario, puede originarse en el revestimiento interior de los ductos de leche o en los lóbulos que le suministran leche a la glándula mamaria. Un cáncer de mama que empieza desde los ductos es llamado carcinoma ductal, y es el tipo de cáncer de mama más común, mientras que el que se desarrolla en los lóbulos es conocido como carcinoma lobular, que es menos común.

Los primeros síntomas del cáncer de mama usualmente son un área de tejido grueso o un bulto en el pecho de la mujer, dolor, picaduras y/o enrojecimiento de la piel del pecho, bultos en las zonas axilares, tejido endurecido en los senos, supuración y descamación de la piel de los senos, cambio de apariencia, forma y tamaño de los senos (Department of Health, 2015).

Se han aislado tejidos tumorales de pacientes para llevar a cabo estudios de ciencia básica, con los que se ha determinado que el cáncer de mama es biológicamente heterogéneo, además, se han identificado distintas líneas celulares tumorales con características moleculares particulares (Turashvili y Brogi, 2017).

Cabe destacar que de todas estas líneas, el modelo hormono-dependiente de línea celular más utilizada es la MCF-7, las cuales son células poco agresivas y no invasivas, que se caracterizan por la de expresión de los receptores de estrógeno, progesterona, y HER2- (Comşa et al., 2015).

Por otro lado, uno de los prototipos más utilizados para el estudio de células de cáncer de mama hormono independientes ha sido la línea celular MDA-MB-231, que se caracteriza por corresponder a células agresivas e invasivas y resistentes a varios agentes anticancerígenos. Esta línea celular no expresa los receptores de estrógeno, progesterona y HER2 (J.Magee et al., 2004), y por lo tanto es conocida como una línea celular de cáncer de mama triple negativo y se presenta en aproximadamente 20% de los tumores mamarios. Debido a la heterogeneidad en los tumores cancerosos de mama, éstos representan un problema de salud pública a nivel mundial.

1.1 Antecedentes

1.1.1 El cáncer de mama como problema mundial de salud

A nivel mundial, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres, con una incidencia que aumenta dramáticamente con la edad (Siegel, Miller, y Jemal, 2019), por lo que representa un desafío de salud pública a escala global. El cáncer de mama se caracteriza por el crecimiento no controlado de células malignas en el tejido epitelial mamario y la propagación de éstas hacia otros órganos o tejidos del cuerpo. Si la propagación de las células malignas no es controlada, puede resultar en la muerte.

Aunque el cáncer es una enfermedad compleja y multisistémica, se ha reportado que puede surgir debido a mutaciones en los genes de las células del tejido mamario. En la última década, se han descubierto muchos genes importantes que codifican para proteínas responsables de la génesis del cáncer de mama y la evasión de la muerte celular (Chikarmane et al., 2015).

Actualmente, se sabe que existen muchos factores que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama, algunos de los cuales son modificables, como el consumo de tabaco y el exceso de peso corporal, mientras que otros son generalmente no modificables, como mutaciones genéticas heredadas, disfunciones hormonales y afecciones inmunitarias. Estos factores de riesgo pueden actuar simultáneamente o en secuencia para iniciar y / o promover el crecimiento del cáncer (World Health Organization, 2018).

Los factores que contribuyen a las diferencias en la incidencia de cáncer y la mortalidad por esta enfermedad, incluyen variaciones en las cohortes de edad; prevalencia de factores de riesgo; y disponibilidad y uso de servicios preventivos, pruebas de detección temprana como la mamografía y tratamientos de alta calidad. Muchos de estos factores están fuertemente influenciados por el nivel de desarrollo de cada país.

1.1.2 Estadísticas sobre el cáncer de mama a nivel mundial

Para el año 2018, se estima que existieron aproximadamente 2 millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial, de los cuales el de mama representa un 11.6%. La incidencia varía a nivel mundial de manera

importante, con rangos de 48.9 casos por cada 100,000 mujeres en África y el este de Asia, hasta 84.8 casos por cada 100,000 mujeres en América del norte (figura 1).

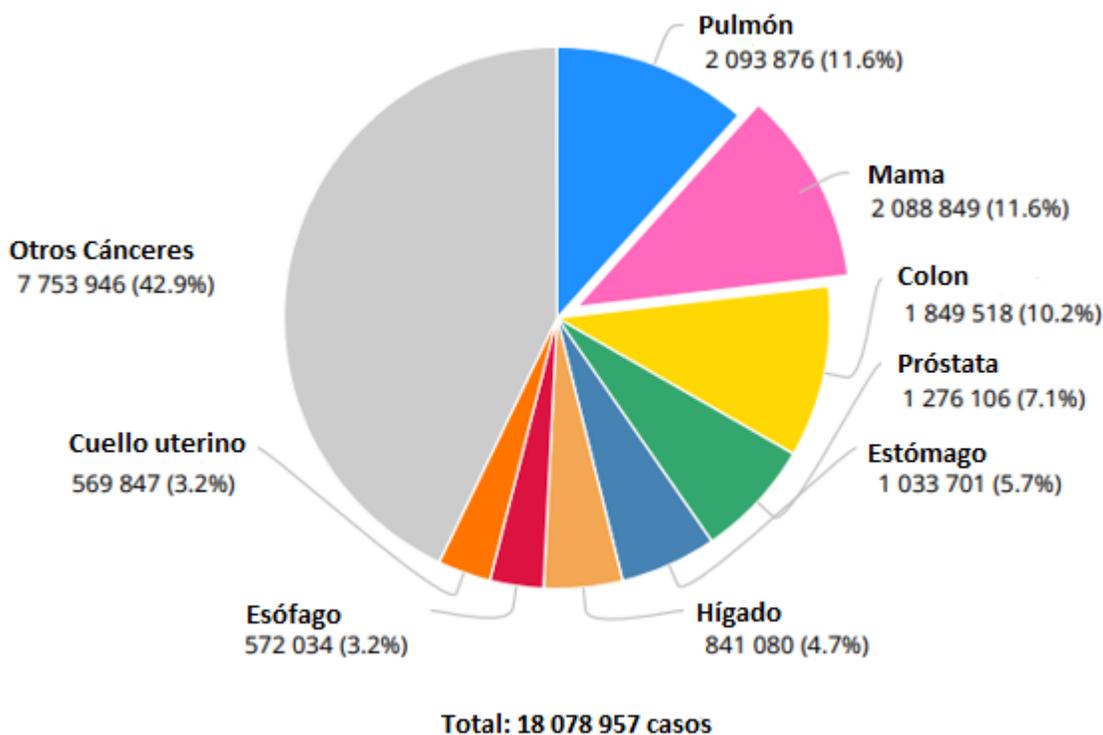


Figura 1. Número de casos registrados por cáncer a nivel mundial. Ambos sexos, todas las edades. Modificado de American Cancer Society, 2018.

A nivel mundial, el cáncer de mama se clasifica como la quinta causa de muerte por cáncer (626, 679 muertes registradas en 2018) tal como se muestra en la figura 2, representando la causa más frecuente de muerte por neoplasias malignas en mujeres provenientes de regiones menos desarrolladas (31.31 muertes registradas por cada 100, 000 mujeres del total en el año 2018), y después del cáncer de pulmón, el cáncer de mama representa la segunda causa de muerte en regiones más desarrolladas (23.4 muertes registradas por cada 100, 000 mujeres para el año 2018). (American Cancer Society, 2018).

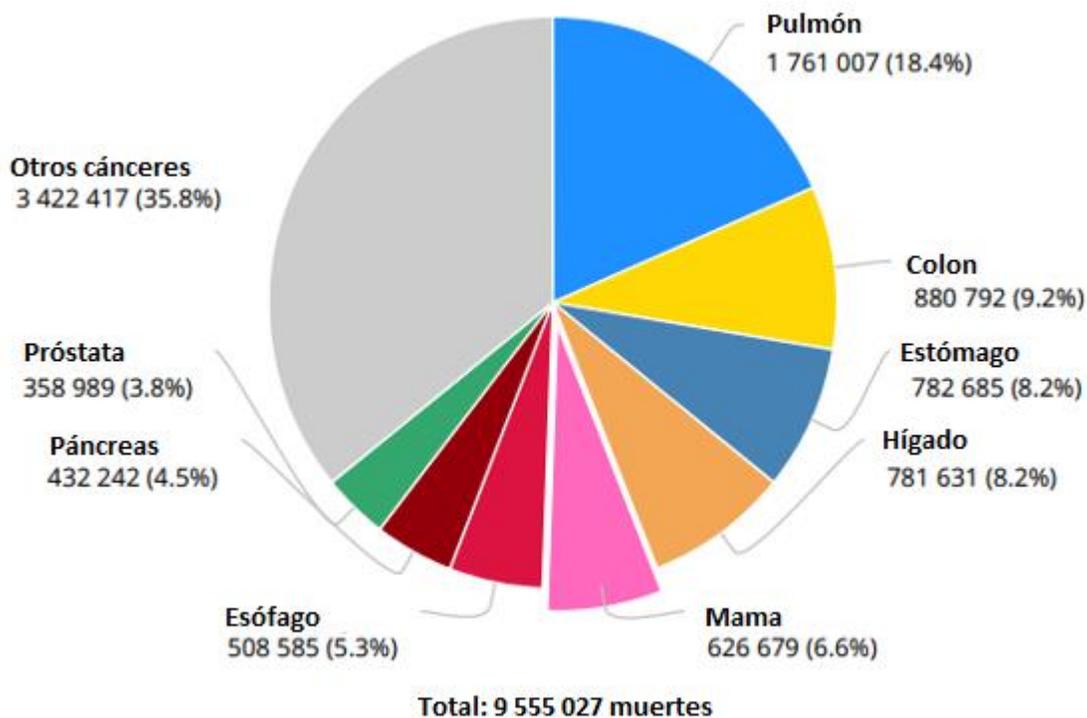


Figura 2. Número de muertes registradas por cáncer a nivel mundial. Ambos sexos, todas las edades. Modificado de American Cancer Society, 2018.

El cáncer de mama es una grave amenaza para la salud de las personas a nivel mundial y constituye una prioridad no reconocida en países de ingresos medios, como México.

1.1.3 La situación del cáncer de mama en México

El comportamiento del cáncer de mama en un periodo tan corto lo ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública, ya que puede afectar a un importante rango de la población femenina en edad productiva (20 a 59 años), que representa el 27% de la población total del país, de acuerdo con los datos del Censo General de Población y Vivienda del año 2010. El Sistema Nacional de Información de Salud (SINAIS) reportó 5010 casos nuevos en 2010, de acuerdo con el registro de egresos hospitalarios aportados por las diferentes instituciones de salud pública del país: Instituto Mexicano del Seguro Social

(IMSS), Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado (ISSSTE) y Secretaría de Salud (INEGI, 2018).

En México, el cáncer de mama también es el más frecuente en mujeres (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2018). De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), para el año 2012, se reportó una incidencia de 26.64 casos por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años.

De acuerdo con Castrezana Campos (2017), en el año 2015, la incidencia de los tumores malignos de mama entre la población de 20 años y más, fue de 14.80 casos nuevos por cada 100,000 personas. En las mujeres, alcanza su punto máximo en las del grupo de los 60 a 64 años (68.05 por cada 100,000 mujeres de ese grupo de edad).

Por entidad federativa, en el 2015, el cáncer de mama tuvo una mayor incidencia en los estados de Colima, Campeche y Aguascalientes (101.08, 97.60 y 96.85 casos nuevos por cada 100 000 mujeres de 20 y más años, respectivamente). Por ello, es que el cáncer de mama en México es un desafío clave para la salud de la mujer y también para el sistema de salud (Langer, y Frenk, 2008).

1.1.4 Marcadores moleculares en el cáncer de mama

Existen diversos genes que codifican para distintas proteínas que realizan funciones específicas en las células de cáncer y que en conjunto contribuyen al incremento de la tasa de proliferación celular y por consecuencia, a la formación de tumores y la evasión de la muerte celular, ambas, características del cáncer, como se muestra en la figura 3 (Hanahan y Weinberg, 2011).

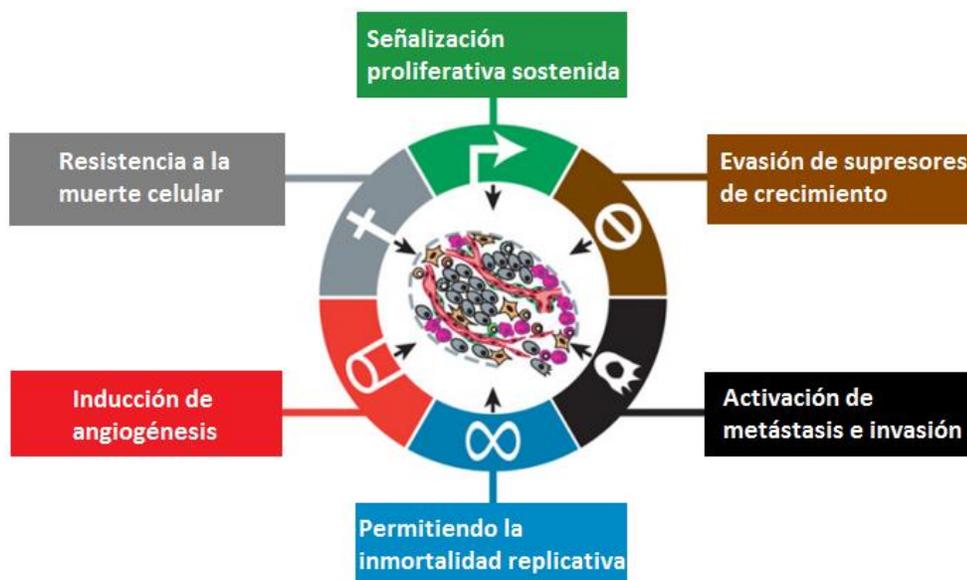


Figura 3. Características generales del cáncer. Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011.

El primero de estos genes, *TP53* codifica para la proteína p53, que actúa como factor de transcripción, controlando la expresión de genes involucrados en procesos celulares importantes como la detección de daño y reparación del ADN, arresto del ciclo celular, apoptosis y senescencia. Las mutaciones en el gen que codifica para la proteína p53, son consideradas como los cambios genéticos más comunes en el cáncer. Las proteínas p53 mutantes pueden perder su actividad supresora tumoral nativa permitiendo el desarrollo del tumor (Yue et al., 2017).

El gen *p21*, codifica para la proteína inhibidora de la cinasa dependiente de ciclina 1A (CDKN1A), la cual tiene como función regular el ciclo celular, inhibiendo la actividad de los complejos de ciclinas CDK2 y CDK4 (estas ciclinas contribuyen en la progresión de las fases del ciclo celular). En las células de cáncer la actividad de CDKN1A se ve suprimida principalmente porque no existe co-regulación por la proteína p53 (Alexandros et al., 2017).

Bcl-2 es un oncogen que codifica para una familia de proteínas conocidas como Bcl-2, que se encargan de controlar los eventos durante el proceso de apoptosis. Por ejemplo, las proteínas Bax, Bak, Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, y Blk, tienen funciones pro-apoptóticas mientras que las proteínas Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-X y BAG

están implicadas en los procesos anti-apoptóticos. Otras de las funciones de la familia de proteínas Bcl-2 es determinar la integridad de la mitocondria y el proceso de la liberación del citocromo c (Edlich, 2018).

El gen *SOD1* codifica para la enzima superóxido dismutasa 1, que se encuentra involucrada en los procesos apoptóticos que ocurren en el citoplasma, *SOD1* contribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) las cuales provocan disfunción de la mitocondria y liberación de citocromo c para activar la muerte celular por apoptosis (Zundert et al., 2017).

El gen *BIRC5*, codifica para la proteína survivina ó *BIRC5*, esta proteína pertenece a la familia de inhibidores de la apoptosis, además su función es regular negativamente la apoptosis inhibiendo la activación de caspasas. En las células cancerosas, la survivina se encuentra en altos niveles de expresión (Yağmur et al., 2016).

Se ha reportado que los cambios de expresión de los genes que codifican para las proteínas anteriormente mencionadas, contribuyen a la rápida progresión del cáncer y a su difícil tratamiento, esto se ve reflejado en la incidencia y mortalidad registrada para esta enfermedad (Lin-Tao et al., 2012).

1.1.5 Tratamientos convencionales contra el cáncer y sus efectos secundarios

En la actualidad, el tratamiento primario del cáncer es la cirugía por mastectomía (Sierra, 2006) o por lumpectomía con el objetivo de extraer el tumor por completo (Kirby, 2007). Sin embargo, existen ocasiones en las que el tumor es imposible de extirpar, en ese caso, la quimioterapia es un tratamiento auxiliar comúnmente utilizado en mujeres con cáncer de alto riesgo. Esto implica utilizar uno o más tipos de fármacos antineoplásicos o quimioterapéuticos que interfieren con el ADN de las células de rápido crecimiento, debido a que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos e interfieren en el proceso de replicación y/o transcripción.

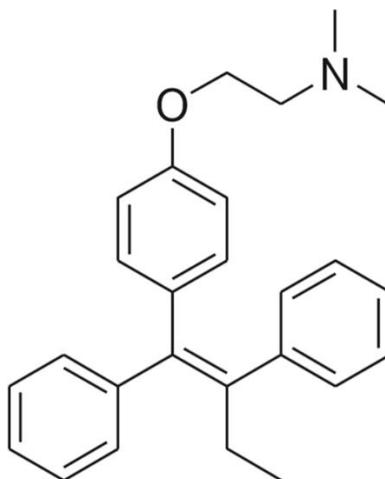
El propósito de utilizar agentes quimioterapéuticos es para prevenir que las células cancerosas se multipliquen, se propaguen mediante metástasis y ocasionen la muerte del paciente (Peto, 2012). Algunos de estos fármacos se administran oralmente, y se pueden tomar en casa, mientras que otros requieren de una pequeña hospitalización o tratamiento ambulatorio al ser administrados por vía intravenosa. Los fármacos más utilizados para el tratamiento de esta enfermedad se describen en la Tabla 1 (Roland, 2011).

Tabla 1. Fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer de mama.

Mecanismo de acción	Nombre en español
Agentes alquilantes	Ciclofosfamida, cisplatino, oxaliplatino
Antimetabolitos	5-fluoroacilo (5-FU), citarabina, 6-mercaptopurina, fosfato de fludarabina
Antibióticos citotásticos	Dactinomicina, bleomicina, daunomicina, doxorubicina
Agentes Antimitóticos	Vinblastina, vincristina, paclitaxel
Inibidores de Topoisomerasa I	Irinotecán (CPT-11)
Agentes hormonales	Antiestrógenos (tamoxifeno)

La mayoría de estos quimioterapéuticos ejercen su efecto sobre la proliferación celular lo que conlleva a la destrucción de las células cancerosas, por lo que la exposición crónica a estos fármacos, puede ocasionar el desarrollo de resistencia a un tipo de medicamento en específico (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005).

El tamoxifeno (figura 4) es el fármaco antineoplásico más utilizado para el tratamiento del cáncer de mama positivo a receptores de estrógeno o también conocido como hormono-dependiente. De acuerdo con Ahmad (Ahmad, 2018), el tamoxifeno se ha implementado en la oncología desde hace cuatro décadas hasta ahora y se ha prescrito a millones de pacientes.

**Figura 4.** Estructura química del fármaco tamoxifeno (Ahmad, 2018).

El tamoxifeno es procesado por las células mediante las enzimas citocromo P450: CYP2D6 y CYP3A4/3A5, posteriormente se producen los metabolitos 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno (Ahmad, 2018), ambos presentan actividad anticancerígena, bloqueando la unión del estradiol o estrógeno a los receptores nucleares de estrógeno (ER). De modo que, se evita que este complejo se una a una secuencia específica de ADN y actué como factor de transcripción, se inhibe la expresión de factores de crecimiento (factor de crecimiento epidermal, por ejemplo) y se produce una inhibición de la proliferación celular (figura 5). Al mismo tiempo, se ha demostrado que el tamoxifeno incrementa el estrés oxidativo e induce apoptosis mediante la regulación de la concentración de iones de calcio y especies reactivas de nitrógeno mitocondriales (mtNOS, por sus siglas en inglés). La especie reactiva superóxido reacciona y pasa de una forma óxido nítrico (NO) a un potente agente peroxinitrito (ONOO⁻), y en consecuencia, se produce una alta oxidación del ADN y proteínas, finalmente se produce daño al ADN y se activa el proceso de apoptosis celular (Yang et al., 2013).

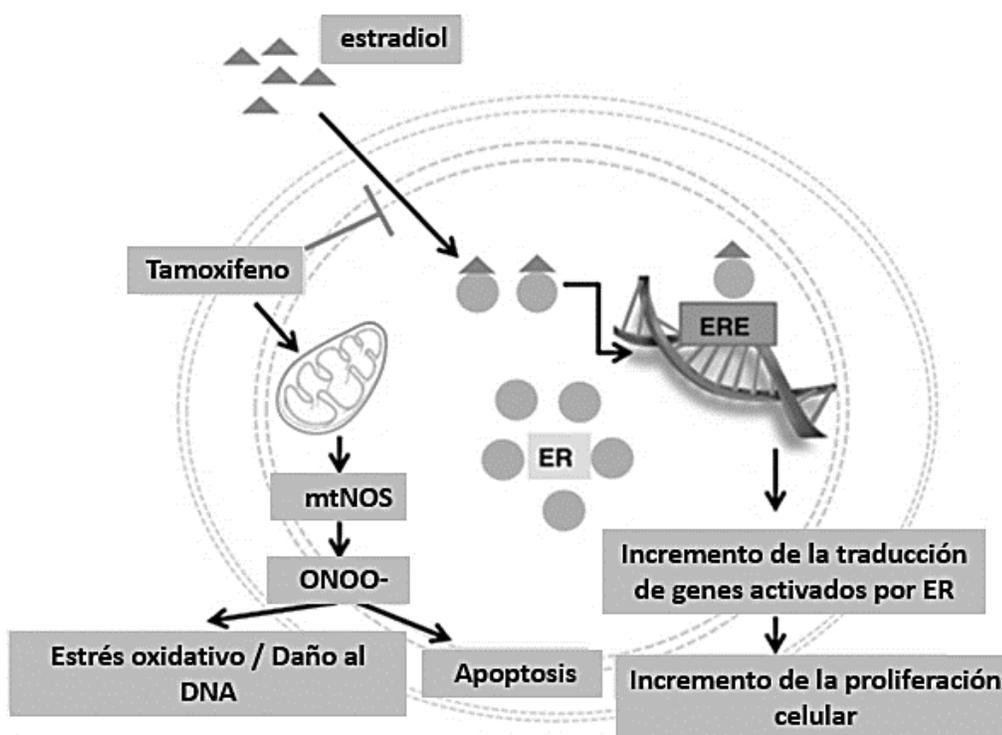


Figura 5. Descripción esquemática del mecanismo de acción del tamoxifeno. Modificado de Ahmad, 2018.

Aunque el fármaco tamoxifeno ha permitido incrementar la tasa de supervivencia en pacientes con cancer de mama (Overgaard y Jensen, 1999), se administra en dosis muy elevadas provocando una alta toxicidad y genotoxicidad (daño al ADN), esto último se ve reflejado en los efectos tóxicos secundarios, los cuales son sofocos, nausea y/o vómito, descarga de sangrado vaginal e interrupción menstrual (Buckley y Goa, 1989). Uno de los efectos adversos más importantes y alarmantes, es que aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de endometrio (Hu et al., 2015).

Para tratar de reducir la toxicidad del fármaco, se ha estudiado el efecto de su combinación con otros fármacos de primera línea (Wang et al., 2004; Ferlini et al., 1997). Por lo que en oncología, algunos pacientes reciben tratamientos combinados con tamoxifeno.

1.1.6 Combinación de fármacos antineoplásicos para el tratamiento del cáncer de mama

El uso de múltiples fármacos puede dirigirse al mismo tiempo a diferentes sitios de interés, subpoblaciones a nivel celular y enfermedades. El uso de varios fármacos con diferentes mecanismos de acción, también pueden provocar un efecto directo para tratar de manera más efectiva un solo sitio de interés o enfermedad (T. Chou, 2006).

La idea de combinar fármacos para tratar el cáncer de mama surgió debido al problema de que el uso de un solo fármaco en dosis tolerables no es suficiente para tratar y curar el cáncer de mama en los pacientes, por lo que la quimioterapia combinada con agentes citotóxicos convencionales incrementa la probabilidad de eliminar a las células de cáncer atacando varios objetivos que no son posibles con una terapia con un solo fármaco. Las ventajas del uso combinado de fármacos son varias, la primera es que ayuda a disminuir las dosis de cada fármaco reduciendo así la toxicidad del tratamiento y provocando menores efectos adversos. La segunda ventaja, es que provee un rango más amplio de interacción entre los fármacos y las células tumorales de una población tumoral heterogénea. Finalmente, existe una elevada probabilidad de prevenir y/o disminuir el desarrollo de la resistencia a fármacos por parte de las células de cáncer. Existen tratamientos con quimioterapia donde se utilizan múltiples fármacos antineoplásicos administrados simultáneamente (Foran, 2011).

Se han presentado casos con datos obtenidos de experimentos *in vitro* o *in vivo*, que han sido validados mediante modelos matemáticos en los que las combinaciones de dos o más fármacos pueden producir una interacción sinérgica para reducir la proliferación de células cancerosas.

1.1.7 Efecto sinérgico

Se le conoce como potenciación a una situación en la que la combinación de un fármaco A con actividad con un fármaco B que no tiene actividad, da como resultado que el fármaco B tiene un mayor efecto que el A. Sin embargo, si el fármaco A y B independientemente presentan un efecto, entonces su combinación puede producir un efecto sinérgico, aditivo o antagonista (Chou, 2006).

En medicina, el sinergismo o superaditividad, describe la interacción de dos o más fármacos cuando su efecto combinado es mayor que la suma de los efectos observados de cada fármaco administrado de manera independiente (R. Verpoorte et al., 2018). En relación con el tratamiento del cáncer de mama, se busca utilizar combinaciones de fármacos que produzcan efectos similares (inhibición de la proliferación celular).

En contraste al sinergismo, algunas combinaciones de fármacos pueden mostrar aditividad. Cuando el efecto de la combinación es consistente con la suma de los efectos individuales, se puede decir que la interacción es aditiva. Por otro lado el antagonismo corresponde a una interacción entre dos o más fármacos que tienen efectos opuestos en un sistema biológico. El antagonismo de los fármacos puede bloquear o reducir la efectividad de uno o más de los fármacos.

1.1.8 Modelos de interacción de fármacos

Se han desarrollado varios modelos para evaluar los efectos anteriormente mencionados de los que cabe mencionar el modelo de aditividad de Loewe (Loewe, 1926), modelo de independencia de Bliss (Bliss, 1939) y el método Isoblográfico (Fraser, 1872). Sin embargo, estos modelos presentan algunos inconvenientes: son poco precisos, se encuentran diseñados para utilizar concentraciones equimolares de fármacos, y el inconveniente principal, no son métodos cuantitativos.

Actualmente, el modelo propuesto por Chou-Talalay es uno de los más utilizados para la determinación de la interacción de compuestos, además de ser el único modelo que cuantifica la interacción entre dos o más fármacos. Este método ha sido citado más de 7,000 veces durante las últimas décadas. De acuerdo con Chou, la ecuación base de este modelo se deriva como una teoría unificada de las ecuaciones de Michaelis-Menten, Hill, Henderson Hasselbach y Scatchard. Primero se definió la ecuación de efecto medio:

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{Dm}\right)^m \quad (\text{Ecuación de efecto medio}) \quad (1)$$

donde f_a es la fracción de células afectada (p. ej., porcentaje de células muertas), f_u es la fracción de células sin afectar (p. ej., porcentaje de células vivas), D es la dosis utilizada del fármaco, Dm es la dosis de efecto medio (la dosis determinada para obtener el 50% de las células vivas y m es la sigmoidicidad de la curva dosis-respuesta (Chou, 2019).

Una regresión lineal puede ser aplicada para varias dosis y respuestas. A partir de ello, los valores para Dm pueden ser estimados y pueden ser utilizados para estimar variables en la siguiente ecuación generalizada del índice de combinación (CI):

$$CI = \frac{D_1}{E_1} + \frac{D_2}{E_2} \quad (\text{ecuación general del índice de combinación}) \quad (2)$$

Donde D_1 y D_2 son las dosis de fármacos utilizadas en combinación durante los experimentos, E_1 y E_2 son las concentraciones teóricas e individuales que deberían ser esperadas para obtener experimentalmente la respuesta medida.

Un valor de CI menor a 1 indica sinergismo, mayor a 1 indica antagonismo e igual a 1 indica aditividad. Esta ecuación puede ser más complicada dependiendo de los factores como exclusividad/independencia de los compuestos y puede ser expandida a más de dos compuestos o fármacos (Chou, 2006).

Actualmente se han desarrollado algoritmos modelos computacionales basados en el modelo de Chou-Talalay (T. C. Chou, 2014) que permiten determinar con mayor certeza el efecto de la interacción entre 2 o más fármacos donde se toma en cuenta la siguiente fórmula (Chou, 2014, 2018):

$$CI = \frac{D_1}{Dx_1} + \frac{D_2}{Dx_2} + \alpha \frac{(D_1)(D_2)}{(Dx_1)(Dx_2)} \quad (\text{Ecuación extendida del índice de combinación}) \quad (3)$$

donde Dx_1 = concentración del fármaco 1 para producir 50% de muerte celular por sí solo; D_1 = concentración del fármaco 1 para producir 50% de muerte celular en combinación con D_2 ; Dx_2 = concentración del fármaco 2 para producir 50% de muerte celular por sí solo; D_2 = concentración del fármaco 2 para producir 50% de muerte celular en combinación con D_1 . Y $\alpha = 0$ para para modos mutuamente excluyentes o 1 para modos mutuamente no exclusivos de acción de fármacos. $CI > 1.3$ indica antagonismo, $CI = 1.1$ a 1.3 indica antagonismo moderado, $CI = 0.9$ a 1.1 indica efecto aditivo, $CI = 0.8$ a 0.9 indica sinergia ligera, $CI = 0.6$ a 0.8 sinergia moderada, $CI = 0.4$ a 0.6 indica sinergia y $CI = 0.2$ a 0.4 indica sinergia fuerte.

Chou T. C. y Martin N., desarrollaron un software para calcular de manera computacional la dosis de efecto medio y el coeficiente de interacción (CI) de la combinación de dos o más fármacos. En este programa, se requiere ingresar el valor de las concentraciones (en términos de molaridad) y el efecto (citotoxicidad) de los fármacos individuales que se han obtenido experimentalmente, estos efectos se ingresan como fracción (Fa) en intervalo de 0 a 1.0. $Fa=0$ corresponde a 0% de efecto y $Fa=1$ corresponde a 100% de efecto. Posteriormente, se ingresa el valor de las concentraciones de las combinaciones utilizadas en términos de molaridad y los efectos obtenidos en términos de Fa (Chou, 2010).

A partir de los resultados determinantes para escribir el tipo de interacción de dos fármacos, Chou T. C. y Martin N. desarrollaron dos gráficos esquemáticos como valores de salida. El primero de ellos, corresponde al gráfico Fa-CI (figura 6). El eje 'x' corresponde a los valores de Fa obtenidos experimentalmente de las combinaciones, se encuentran en un intervalo de 0 a 1.0. El eje 'y' corresponde a los valores de índice de CI obtenidos mediante la ecuación de interacción de fármacos desarrollada por Chou y Talalay (descrita anteriormente en la ecuación 3); estos valores pueden observarse en un intervalo de 0 a infinito. Se despliega una línea en $CI=0$, la cual representa la línea de aditividad (los puntos que caen en la línea corresponden a un efecto aditivo). Los valores que se encuentran debajo de la línea de aditividad ($CI < 1$) son los datos que se interpretan como valores con efecto de sinergismo, los datos que se encuentran arriba de la línea de aditividad ($CI > 1$) representan valores donde se obtiene un efecto antagonista (Chou, 2006).

El segundo gráfico (figura 7), corresponde a la representación isoblográfica o normalización de los efectos de los fármacos individuales y la interacción de fármacos en combinación. El eje 'x' corresponde a la normalización de la relación D_1/Dx_1 (descritos anteriormente en la ecuación 3). Estos valores se

encuentran en un intervalo de 0 a 1.0. el eje 'y' D_2/Dx_2 , de misma manera, estos datos se encuentran graficados en un intervalo de 0 a 1.0. Se traza una línea que desde el punto $y=1.0$ hasta $x=1.0$, la cual representa el efecto de aditividad del fármaco A y B. Los datos que se encuentran arriba de la línea de aditividad son los datos o combinaciones con efecto antagonista. Los datos que se encuentran debajo de la línea de aditividad corresponden a las combinaciones de fármacos que proporcionan como resultado un efecto de sinergismo. Dependiendo de la proximidad de los datos resultantes al punto $y=0, x=0$, pueden asociarse a sinergismo ligero, sinergismo moderado o sinergismo fuerte (Chou, 2006).

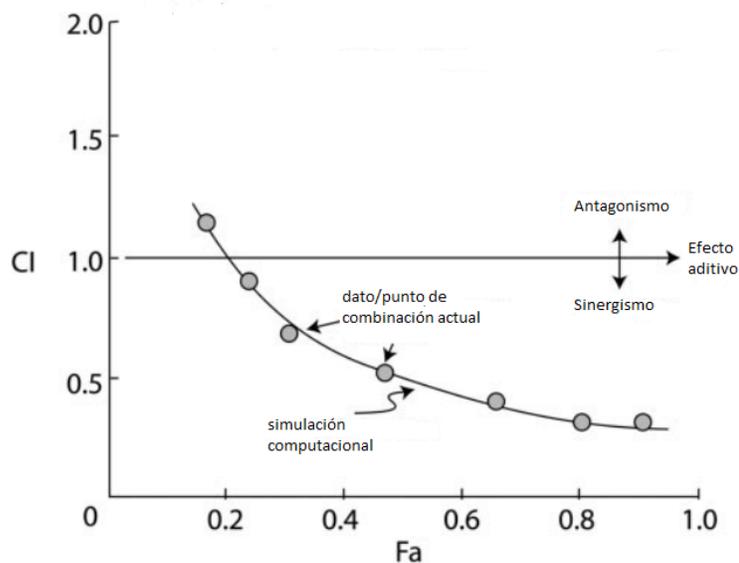


Figura 6. Gráfico fracción contra índice de combinación (Fa-CI). Modificado de T. Chou, 2006.

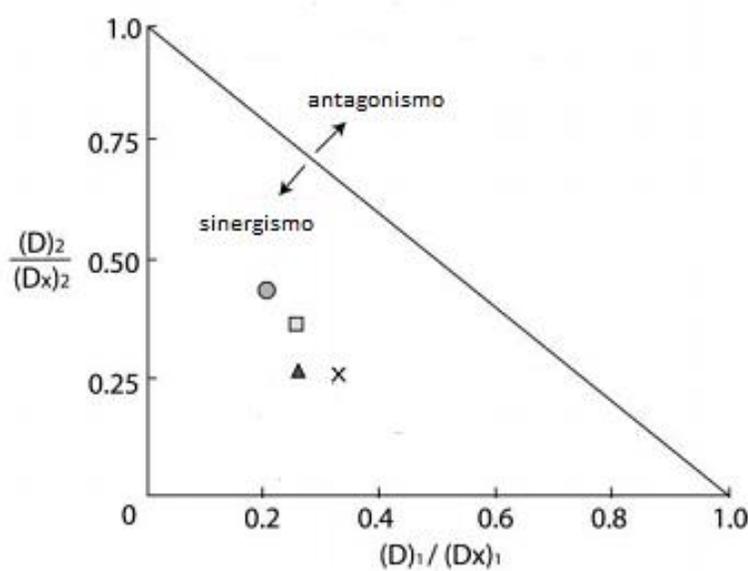


Figura 7. Representación isoblográfica de la interacción de fármacos en combinación. Modificado de T. Chou, 2006.

El modelo de sinergismo de Chou y Talalay es el método más utilizado para investigar la interacción fármaco-fármaco en cáncer a nivel *in vitro* e *in vivo*. Dada la versatilidad del modelo computacional, se ha estudiado la interacción entre fármacos y otros compuestos, incluidos nanomateriales.

1.1.9 Nanopartículas de plata como el nanomaterial más utilizado en aplicaciones biomédicas

De acuerdo con diversas investigaciones, la nanotecnología ofrece una serie de estrategias para contrarrestar el crecimiento incontrolado de las células de cáncer. Las nanopartículas son herramientas excelentes para mejorar la eficacia terapéutica de los agentes anticancerígenos debido a sus únicas propiedades fisicoquímicas con las que se puede reducir la toxicidad y potencialmente, evitar el problema de la resistencia a fármacos (Ge, 2014).

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son uno de los nanomateriales con mayores aplicaciones biomédicas (Lara, 2011). Las AgNPs, son conjuntos de átomos de plata con un intervalo de tamaño de 1 a 100 nm. Es bien sabido que la plata tiene potentes efectos antimicrobianos, además, ya se han reportado las propiedades antibacterianas, antivirales, antimicóticas y antiinflamatorias (Foldbjerg, 2009).

Jamroz y colaboradores reportaron actividad antiproliferativa y antibacteriana de AgNPs comerciales en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* multiresistente (Jamróz et al., 2018).

Existe una amplia cantidad de investigaciones donde se ha evaluado el efecto de diferentes AgNPs en distintas líneas celulares de cáncer, como las líneas de cáncer de mama MCF-7, la de cáncer cervicouterino HeLa, la de cáncer de pulmón A549, entre otras. También se ha evaluado en líneas celulares no cancerosas como fibroblastos y macrófagos de ratón.

Magriet Park y colaboradores (2011), evaluaron el efecto de nanopartículas de plata de 20, 80 y 113 nanómetros en líneas celulares de fibroblastos de ratón (L929) y macrófagos (RAW 264.7). Se determinó que las tres muestras de AgNPs ocasionaban daño en la membrana citoplasmática. Cabe mencionar, que las AgNPs de 20 nm demostraron ser más tóxicas en los fibroblastos, sin embargo, este efecto no se observó en los macrófagos RAW 264.7 (Park et al., 2011).

Mukherjee et al., utilizaron dos líneas celulares de cáncer de piel (HaCat) y cáncer cervicouterino (Hela), para realizar ensayos de citotoxicidad con diferentes concentraciones de AgNPs. Ellos encontraron que los efectos provocados por las AgNPs en estas líneas celulares como el daño a la membrana celular y el estrés oxidativo, son dependientes de la concentración y el tiempo de exposición (Mukherjee et al., 2012). En otra investigación, se trabajó con una formulación comercial de AgNPs con un tamaño promedio de 38 nm, y se estudió su efecto citotóxico y genotóxico en líneas celulares de cáncer de mama, cervix y otros. Se reportó que algunas concentraciones de estas AgNPs demostraron tener una baja genotoxicidad en células humanas (Juárez-Moreno et al., 2016).

Es importante mencionar que diversas formulaciones de AgNPs que se encuentran disponibles en el mercado, difieren en la forma de la nanopartícula, distribución de su tamaño, estabilidad de la nanopartícula, proceso de síntesis, contenido de plata metálica y funcionalización de la superficie. Todos estos factores afectan la citotoxicidad, así como las propiedades químicas superficiales de las AgNPs, que juegan un mayor papel en la interacción de las nanopartículas con los sistemas biológicos (AshaRani et al., 2009, Juárez-Moreno et al., 2017, Vázquez-Muñoz et al., 2017).

En la figura 8, se ilustra el mecanismo de acción propuesto por AshaRani y colaboradores en el 2009, mediante el que las AgNPs ocasionan toxicidad en las células animales. Se detalla que la superficie de las AgNPs puede ser fácilmente oxidada mediante O_2 y otras moléculas de los sistemas biológicos, lo que produce la liberación de iones plata $Ag (+)$, un ión que es tóxico. Por lo tanto, la citotoxicidad de las AgNPs se encuentra estrechamente relacionada con la liberación de iones $Ag (+)$. La cantidad de oxidación superficial se encuentra relacionada con el recubrimiento de la nanopartícula, moléculas coexistentes, y la interacción de las AgNPs con ácidos nucleicos, moléculas lipídicas y proteínas en un sistema biológico (AshaRani et al., 2009).

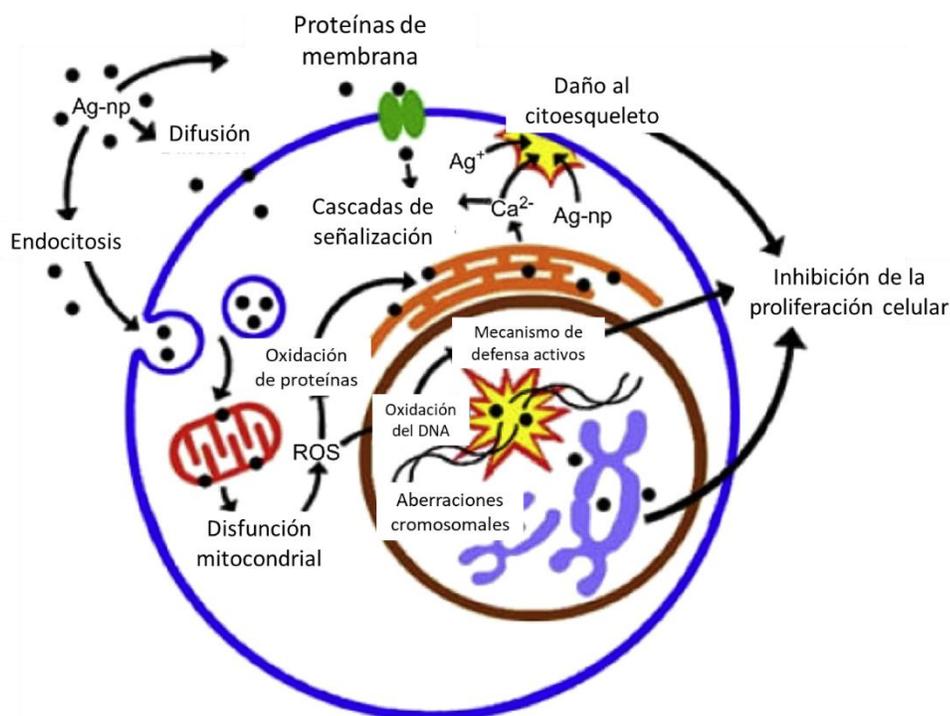


Figura 8. Mecanismo de la toxicidad de las nanopartículas de plata propuesto por P. AshaRani, 2009.

Se sabe que las AgNPs de tamaños menores a 35 nm pueden ser internalizadas por la célula mediante endocitosis, difusión o proteínas de membrana (Zhang et al., 2009). Uno de los mecanismos por el cual ocasionan citotoxicidad, es mediante la inducción de estrés oxidativo a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que causa daño a algunos componentes celulares como el ADN, activación de enzimas antioxidantes, depleción de enzimas antioxidantes como el glutatión, desensamblado de proteínas y daño a la membrana celular (McShan et al., 2014).

A pesar de las características particulares de las AgNPs y sus potenciales aplicaciones en medicina como un tratamiento del cáncer, aún es necesario que persista la investigación sobre el impacto que tienen en los diferentes genes y las proteínas de las células normales y cancerosas, así como su potencial aplicación en combinación con fármacos antineoplásicos de primera línea.

1.1.10 Efecto de las nanopartículas de plata en combinación con fármacos antineoplásicos

Actualmente sólo existen tres trabajos publicados donde se ha estudiado el efecto de la combinación de AgNPs con fármacos antineoplásicos.

El primero de estos trabajos corresponde a un estudio publicado por Kóvacs et al. (2015), en el cual, se reportó que en las células de cáncer de colon resistentes a fármacos antineoplásicos, las AgNPs de 28 nm sintetizadas mediante el método hidrotermal, pueden reducir significativamente la transcripción de la proteína de transporte P-gp, disminuyendo también el nivel de expresión de esta proteína e inhibiendo significativamente su actividad como transportador de fármacos. Por lo tanto, se demostró que las AgNPs son capaces de inhibir la actividad del eflujo de ciertos quimioterapéuticos en células cancerígenas con resistencia a fármacos mediante la inhibición de la proteína P-gp. De esta forma, se determinó que la combinación de las AgNPs con diferentes antineoplásicos, restauraba la susceptibilidad a dichos fármacos por parte de células de cáncer de colon quimiorresistentes. Además, éste fue el primer trabajo donde se calculó el coeficiente de interacción (CI) de las AgNPs en combinación con cisplatino, metotrexato, verapamilo, bleomicina, carmustina y vinblastina, los autores determinaron que existe un efecto sinérgico en todos los casos y se encontró que las AgNPs, de manera independiente, son capaces de inducir la sobreexpresión de genes relacionados con la activación de la cascada de señalización de la ruta apoptótica (Kóvacs et al., 2015).

El segundo trabajo publicado en el 2017, corresponde a un estudio realizado por Fahrenholtz y colaboradores, en el que se demostró por primera vez, que existía un efecto de antiproliferación celular potenciado, al combinar AgNPs y cisplatino en líneas celulares de cáncer de ovario. Además, fue el primer trabajo donde se evaluó la interacción de ambos reactivos utilizando un modelo de combinación de fármacos descrito por Chou-Talalay (2010). Mediante este modelo, fue posible evaluar el efecto antiproliferativo de la combinación de AgNPs y cisplatino. Se encontró que las combinaciones utilizadas en las líneas celulares de cáncer de ovario A2780 y OVCAR3 producían un efecto sinérgico y que la combinación de AgNPs y cisplatino mostró una reducción favorable de concentración en ambas líneas celulares. Estos resultados proveen un alto potencial para AgNPs en las aplicaciones para el tratamiento de cáncer de ovario (Fahrenholtz et al., 2017).

El trabajo más reciente fue publicado por Gopisetty y colaboradores en el 2019. En éste, se evaluó la actividad antiproliferativa de AgNPs de 75 nm, se realizaron ensayos de combinación con el fármaco doxorubicina en células resistentes de cáncer de mama (MCF-7/KCR). Se demostró un potente efecto de

disminución de la viabilidad celular en las concentraciones más altas, sin embargo, no se llevó a cabo la implementación de modelos para determinar el tipo de interacción que produjo la combinación.

Tomando en consideración estos antecedentes, en este trabajo se utilizarán AgNPs en combinación con un fármaco antineoplásico de primera línea como el tamoxifeno, para evaluar la respuesta celular antiproliferativa que produce esta combinación en células de cáncer de mama y se elegirá aquella combinación que produzca una mayor muerte celular con un menor daño genotóxico.

1.2 Justificación

Aunque el efecto antiproliferativo de las AgNPs se ha descrito ampliamente, existen escasos reportes en donde se estudie su papel como agente potenciador de fármacos antineoplásicos. De la misma forma, poco se conoce sobre el papel de las AgNPs en la modulación de genes relacionados con la proliferación celular. Por lo tanto, es importante realizar este proyecto de tesis, con la finalidad de encontrar mediante estudios *in vitro* aquellas concentraciones óptimas de AgNPs que permitan potenciar el efecto antiproliferativo de un fármaco antineoplásico usado de forma convencional en la quimioterapia en concentraciones que tengan un efecto genotóxico limitado.

1.3 Hipótesis

Existe una proporción óptima de concentraciones de AgNPs y fármaco antineoplásico tamoxifeno que, en combinación, tienen un efecto antiproliferativo sinérgico en células de cáncer de mama, lo que induce una modulación positiva en genes relacionados con la apoptosis.

1.4 Objetivo general

Establecer las concentraciones óptimas de AgNPs y fármaco antineoplásico tamoxifeno que generen un efecto antiproliferativo sinérgico *in vitro* en células de cáncer de mama.

1.5 Objetivos específicos

1. Determinar la concentración media inhibitoria (IC_{50}) de las AgNPs, tamoxifeno y sus combinaciones en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.
2. Evaluar el coeficiente de interacción (adición, sinergia o antagonismo) de la combinación de AgNPs y tamoxifeno *in vitro* en células de cáncer de mama.
3. Determinar los niveles de transcritos de genes relacionados con la actividad antiproliferativa (*p53*, *p21*, *survivina*, *sod1*, etc) de la combinación de AgNPs y tamoxifeno en células de cáncer de mama.
4. Determinar el efecto genotóxico de las concentraciones óptimas de AgNPs y tamoxifeno, que presenten un efecto antiproliferativo sinérgico en células de cáncer de mama.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Nanopartículas de plata

Se utilizaron nanopartículas de plata producidas comercialmente por la empresa Nanostructured & Amorphous Materials Inc. (Nanoamor Inc., Texas, USA). Se utilizaron tres tipos de AgNPs que varían en su tamaño y porcentaje de polímero que las recubre, los datos proporcionados por la empresa son los siguientes:

Muestra "A": AgNPs de 20 nm; 99% pureza con 0.3% (w/w) de polivinilpirrolidina (PVP)

Muestra "B": AgNPs de 30-50 nm, 99.9% pureza con 0.2% (w/w) de PVP.

Muestra "C": AgNPs de 80 nm, 99.9% pureza con 0.3% (w/w) de PVP.

2.2 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de plata

Se realizó la caracterización fisicoquímica mediante los métodos siguientes:

2.2.1 Análisis mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM)

Con el objetivo de obtener la distribución del tamaño de las AgNPs, se prepararon diluciones con los stocks de AgNPs de 20, 30-50 y 80 nm. Para la preparación de las muestras, se sonicaron las diluciones durante 30 minutos. Posteriormente, se colocaron 50 μ L de AgNPs de 20 nm sobre una rejilla de carbono cubierta con cobre y se dejó secar en oscuridad durante 12 hrs a 25 °C. Se repitió el mismo procedimiento con las AgNPs de 30-50 y 80 nm. Posteriormente se tomaron micrografías electrónicas con el microscopio electrónico de transmisión (Hitachi modelo H-7500) operando a 200kV. Para obtener la distribución del tamaño de las AgNPs, se analizaron las micrografías de TEM con más de 200 nanopartículas empleando el software libre ImageJ.

2.2.2 Dispersión dinámica de luz

El tamaño de partícula, distribución de tamaños y potencial Zeta, fueron determinados mediante dispersión dinámica de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) llevado a cabo en un Zetasizer (Nano-ZS DTS 1060, Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom) operando a $\lambda=532$ nm. Primero, se realizaron diluciones (1:100) de las AgNPs de 20 nm. Posteriormente, se utilizó una celda capilar y se colocó 1 ml de la dilución. Se llevó a cabo la lectura. Se repitió el mismo procedimiento con las AgNPs de 30-50 y 80 nm.

2.2.3 Análisis del plasmón de resonancia superficial mediante espectrometría de UV-Vis

Se analizó el plasmón de resonancia superficial de las AgNPs de 20, 30-50 y 80 nm mediante un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Multiskan GO). Primero, se realizaron diluciones (1:100) de las AgNPs, posteriormente en una celda de cuarzo de 1 cm se colocó 1 ml de agua desionizada y se utilizó como blanco de lectura. Después, se tomó 1 ml de la dilución AgNPs de 20 nm, se colocó en la celda. Se realizó la lectura en el espectrofotómetro en un rango de longitud de onda de 300-800 nm. Se repitió el mismo procedimiento para analizar el plasmón de resonancia superficial de las AgNPs de 30-50 y 80 nm.

2.2.4. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Se analizó el espectro de absorción de las AgNPs de 20, 30-50 y 80 nm mediante un espectrofotómetro de Infrarrojo (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Para corroborar que las AgNPs estuvieran recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP), éstas fueron analizadas mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés). Se colocaron 50 μ L de agua desionizada y se utilizó como blanco de lectura. Después se colocaron 50 μ L de una dilución (1:100) de AgNPs de 20 nm y se llevó a cabo la lectura en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} . Se repitió el mismo procedimiento con las AgNPs de 30-50 y 80 nm. Los espectros de absorción fueron comparados con el espectro de absorción de PVP sólido estándar.

2.3 Cultivo de células

Para el cultivo y mantenimiento de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) y MCF-7 (ATCC HTB-22), se utilizó el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) de Sigma-Aldrich (Cat. D777) que contiene sales inorgánicas, aminoácidos esenciales, vitaminas, glucosa y rojo fenol. El medio de cultivo se preparó al disolviendo 13.5 g de DMEM en polvo en 1 litro de agua desionizada estéril. Además, se le agregaron 5 ml de L-glutamina (Sigma-Aldrich Cat. G6392), 5 ml de solución antibióticos/antimitóticos (penicilina/estreptomina) (Sigma Aldrich Cat. A5955) y 100 ml de suero fetal bovino inactivado (Bench-Mark Gemini, Bio Products, USA), los componentes adicionales se agregaron para enriquecer el medio de cultivo y el antibiótico para evitar la contaminación por microorganismos.

Los cultivos de células se realizaron en cajas Petri de cultivo celular de 6 cm sensibilizadas, debido a que las células MDA-MB-231 y MCF-7 son de tipo adherente. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Los cultivos celulares fueron revisados y cambiados cuando se observó una confluencia celular del 70-80%, con la finalidad de obtener un subcultivo y favorecer la fase *lag* de las células de cáncer. Para despegar las células de cáncer adheridas a la caja de cultivo, se utilizó tripsina/EDTA que es una enzima proteolítica que hidroliza los enlaces de unión entre las células (Uysal, 2018).

2.4 Subcultivo de las células de cáncer de mama y tripsinización

Para realizar el subcultivo de células primero se retiró el medio de cultivo de las cajas Petri, se realizó un lavado adicionando 3 ml de PBS 1X y se agregó 1 ml de tripsina/ EDTA (Sigma- Aldrich Cat. 59429C) , las cajas se incubaron a 37° C durante 3 minutos (Clémence et al., 2017) . Después se agregó 1 ml de PBS 1X. Las células se recuperaron en un tubo cónico de 15 ml y se aforó con medio de cultivo a 10 ml para inactivar la acción de la tripsina. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a 21°C. Se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron con 2 ml de medio de cultivo y se colocaron equitativamente en dos cajas nuevas de 6 cm con 5 ml de medio de cultivo cada una. Por último, las cajas con el cultivo celular se incubaron por 24 horas a 37° C y 5% de CO₂. Todo el procedimiento se realizó bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel A2.

2.5 Criopreservación de las células

La criopreservación de las células es una técnica comúnmente utilizada para almacenar grandes cantidades de células congelándolas, evitando la cristalización y la lisis celular. Para ello se utiliza medio especial de criopreservación, compuesto por 50% de medio celular (v/v), 40% de suero fetal bovino (v/v) y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) (v/v). Para llevar a cabo la criopreservación de las células cultivadas en cajas de Petri, primero se realizó una tripsinización del cultivo para separar las células individuales. Después, se colocaron en un tubo cónico estéril de 15 ml y se aforó con 10 ml de medio de criopreservación por cada millón de células. Las células se colocaron en criotubos (1 ml por cada millón de células) y se congelaron a -70 °C hasta el momento de realizar los ensayos correspondientes (ATCC, 2012).

2.6 Preparación de las AgNPs con diferentes concentraciones de plata metálica

Las disoluciones de AgNPs, fueron realizadas a partir del contenido de plata metálica en cada una de las muestras de las AgNPs (Nanoamor Inc., Texas, USA). Se realizaron diluciones de 1:10 y 1:100 de AgNPs al 20% en medio DMEM con el objetivo de no tomar menos de 1 µl de volumen al momento de añadirlas a las cajas de cultivo.

2.7 Ensayos de viabilidad celular por colorimetría (reducción del MTT)

La reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) se ha considerado como uno de los ensayos más aceptados en la evaluación de la citotoxicidad, ya que se ha catalogado como un ensayo de detección de alto rendimiento y sensibilidad. Se realizaron diferentes experimentos por triplicado para evaluar el efecto citotóxico y el efecto sinérgico de las AgNPs y del fármaco antineoplásico tamoxifeno mediante el ensayo en placa por reducción del reactivo MTT para medir la viabilidad celular.

Para realizar el ensayo, se colocaron 10,000 células de cáncer de mama en cada pozo de una placa de 96 pozos y se incubó durante 24 horas a 37°C con 5 % de CO₂. Después del tiempo de incubación se preparó un rango de concentraciones de AgNPs en un volumen final de 100 µl de medio de cultivo. Una vez que las

concentraciones de AgNPs asignadas a cada pozo fueron añadidas, las placas con las células se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5 % de CO₂. Adicionalmente, se utilizó medio de cultivo sin AgNPs como control positivo y DMSO sin AgNPs como control negativo. Al término del tiempo de tratamiento, se descartó el medio de cultivo y las placas de cultivo se lavaron tres veces con solución PBS 1X. Posteriormente, se añadió 10 µl del reactivo MTT (Sigma-Aldrich M-8910) y 90 µl de medio DMEM sin suplementar, la placa se incubó en oscuridad durante 4 horas a 37°C con 5 % de CO₂. Posteriormente se añadió 100 µl de isopropanol para disolver los cristales de formazán y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se midió la absorbancia de la placa de 96 pozos con un espectrofotómetro a 570 nm, tomándose como referencia (blanco) una longitud de onda de 690 nm. El valor registrado a longitud de onda de 690 nm fue restado de los valores de la absorbancia a 570 nm de cada medición.

Los resultados obtenidos se graficaron tomando en cuenta el valor de la absorbancia obtenido para el control positivo (células MCF-7 y MDA-MB-231 en medio de cultivo sin AgNPs) como el 100% de viabilidad celular. Posteriormente las mediciones de absorbancia para cada condición experimental se convirtieron a porcentajes de sobrevivencia teniendo como referencia el valor del control positivo (Ahmadian et al., 2018) . Todos los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente y con triplicados internos para su comparación. Los datos se presentaron como el promedio de los experimentos con desviación estándar.

2.8 Ensayos de sensibilidad celular a fármacos antineoplásicos

Se determinó la viabilidad de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 a diferentes concentraciones de tamoxifeno. Los ensayos de viabilidad se realizaron de la misma forma descrita para los de viabilidad celular por reducción del reactivo MTT. La concentración media inhibitoria (IC₅₀) tanto de las AgNPs como del tamoxifeno, se determinaron mediante el modelo Probit (Patnaik y Padhy, 2015).

2.9 Ensayos de interacción de nanopartículas de plata y fármacos antineoplásicos en células de cáncer

Después de analizar la viabilidad celular producida a partir de los tratamientos con AgNPs, se seleccionaron los cuatro mejores tratamientos donde se registren viabilidades celulares entre 90, 80, 70 y 60% (IC_{90} , IC_8 , IC_{70} e IC_{60}), para combinarlos con el fármaco antineoplásico tamoxifeno (Sigma-Aldrich Cat. T5648), con el objetivo de analizar el efecto que produce en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 mediante el ensayo en placa por reducción del reactivo MTT (Kovács et al., 2016).

Para llevar a cabo el ensayo de viabilidad celular por reducción MTT, se colocaron 10,000 células en cada pozo de una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5 % de CO_2 . Después se prepararon las concentraciones de AgNPs y se agregaron al mismo tiempo las concentraciones indicadas de tamoxifeno. Después de haber añadido los tratamientos asignados a cada pozo, las células se incubaron durante 24 horas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO_2 . Adicionalmente, se utilizó medio de cultivo sin AgNPs y sin tamoxifeno como control positivo y DMSO, sin AgNPs y sin tamoxifeno como control negativo. El mismo procedimiento se repitió para la línea celular MDA-MB-231. Al término del tiempo de tratamiento el medio de cultivo se descartó y las placas se enjuagaron tres veces con solución PBS 1X. Posteriormente, se añadió 10 μ l del reactivo MTT y 90 μ l de medio DMEM sin suplementar, y se incubó durante 4 horas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO_2 . Por último, se añadió 100 μ l de isopropanol para solubilizar los cristales de formazán, después se incubó la placa de 96 pozos durante 30 minutos a temperatura ambiente y en obscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm, tomándose como referencia (blanco) una longitud de onda de 690 nm. Los resultados obtenidos se graficaron tomando en cuenta el valor de la absorbancia obtenido para el control positivo (células MCF-7 y MDA-MB-231 en medio de cultivo sin AgNPs) como el 100% de viabilidad celular. Posteriormente las mediciones de absorbancia para cada condición experimental se convirtieron a porcentajes de sobrevivencia teniendo como referencia el valor del control positivo. Todos los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente y con triplicados internos para su comparación. Los datos se presentaron como el promedio de los experimentos con desviación estándar.

Las interacciones reactivas entre el tamoxifeno y las AgNPs se evaluaron mediante el teorema de índice de combinación (CI) utilizando el software CompuSyn (Chou, 2018). Para el 50% de toxicidad, los valores del índice de combinación se calcularon tomando en cuenta la siguiente fórmula:

$$CI = \frac{D_1}{Dx_1} + \frac{D_2}{Dx_2} + \alpha \frac{(D_1)(D_2)}{(Dx_1)(Dx_2)} \quad (\text{Ecuación extendida del índice de combinación}) \quad (3)$$

donde $(Dx)_1$ = concentración del fármaco 1 para producir 50% de muerte celular por sí solo; $(D)_1$ = concentración del fármaco 1 para producir 50% de muerte celular en combinación con $(D)_2$; $(Dx)_2$ = concentración del fármaco 2 para producir 50% de muerte celular por sí solo; $(D)_2$ = concentración del fármaco 2 para producir 50% de muerte celular en combinación con $(D)_1$. Y $\alpha= 0$ para modos mutuamente excluyentes o 1 para modos mutuamente no exclusivos de acción de fármacos. $CI > 1.3$ indica antagonismo, $CI = 1.1$ a 1.3 indica antagonismo moderado, $CI = 0.9$ a 1.1 indica efecto aditivo, $CI = 0.8$ a 0.9 indica sinergia ligera, $CI = 0.6$ a 0.8 sinergia moderada, $CI = 0.4$ a 0.6 indica sinergia y $CI = 0.2$ a 0.4 indica sinergia fuerte (T. C. Chou, 2014).

2.10 Aislamiento de ARN de la línea celular MDA-MB-231

Se sembraron 450, 000 células MDA-MB-231 en placas de 6 cm y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5 % de CO₂. Posteriormente se colocaron los tratamientos de combinación de AgNPs con tamoxifeno en las células (y controles) en un volumen total de 5 ml, y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5 % de CO₂. El ARN total se aisló mediante el método TRIzol Reagent (Invitrogen). Se añadió 1 ml de TRIzol a cada placa de cultivo celular, el contenido se transfirió a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Las muestras se agitaron vigorosamente con vórtex y se incubaron durante 5 min. Posteriormente, se añadió 0.2 ml de cloroformo, se agitó la muestra y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Los tubos con las muestras se centrifugaron a 12 000 g y 4°C. Después de la centrifugación, se separaron las fases orgánica, intermedia y acuosa, y se tomó con cuidado la fase acuosa de cada muestra para colocarla en un tubo estéril de microcentrífuga. Los tubos se colocaron en hielo y se precipitó el ARN mediante la adición de 0.5 ml de isopropanol a cada tubo y se mezcló por inmersión. Los tubos se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación, los tubos fueron centrifugados durante 15 min, a 12 000 g, 4°C. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol al 75% y los tubos fueron centrifugados durante 10 min, a 12 000 g, 4°C. Después, del tiempo de centrifugación, se descartó el sobrenadante y se rehidrató el ARN con la adición de 100 µl de agua libre de ARNasas (Rio et

al., 2010). Las muestras se colocaron inmediatamente en hielo para llevar a cabo la cuantificación del ARN. Por último, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

2.11 Cuantificación de ARN total de la línea celular MDA-MB-231

Para llevar a cabo la cuantificación de ARN, se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop (2000c, Thermo Fisher Scientific). Se ingresó al software Nanodrop 2000, se seleccionó la opción de ácidos nucleicos y se indicó el tipo de muestra como ARN para un factor de 40. Se adicionó $1\ \mu\text{l}$ de agua libre de ARNasas al Nanodrop como blanco. Se midió $1\ \mu\text{l}$ de la muestra control de ARN de las células MDA-MB-231 sin tratamiento y se registraron los datos obtenidos correspondientes a la cantidad de ARN en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y la relación de absorbancia a $260\ \text{nm}/280\ \text{nm}$. Se repitió el mismo procedimiento para las muestras de ARN de células con tratamientos.

2.12 Síntesis de ADNc de la línea celular MDA-MB-231

Se realizó la síntesis de ADNc se siguió la metodología descrita en el protocolo kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Cat. 18080051, Invitrogen). Para la síntesis de ADNc del control de células sin tratamiento, y las células con tratamiento, se adicionó lo descrito en la tabla 2 a cada tubo de $250\ \mu\text{l}$.

Tabla 2. Componentes requeridos para la una reacción síntesis de de ADNc.

Componente	Stock	Concentración final	Volumen final
ARN		200 ng	X μl
Hexámeros	50 ng/ μl	2.5 ng/ μl	0.5 μl (dil 1:10)
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.4 μl (dil 1:10)
Agua libre de ARNasas			Hasta completar 13 μl

Posteriormente, se mezcló el contenido con vortex y un pulso en la centrífuga, las muestras se incubaron a 65°C durante 5 min. Posteriormente se incubaron las muestras en hielo durante 1 min. El siguiente paso consistió en preparar y adicionar un Master Mix requerido para la síntesis de ADNc. Lo siguiente (Tabla 3):

Tabla 3. Master Mix requerido para la una reacción síntesis de ADNc.

Componente	Stock	Concentración final	Volumen final
10 X RT buffer	5 X	1 X	5 µl
DTT	0.1 M	0.005 M	1 µl
RNAse out	40 u/µl	2 u/µl	5 µl (dil 1:100)
Super Script III RT	200 u/µl	10 u/µl	5 µl (dil 1:100)

Posteriormente, se mezcló mediante un pulso en el vórtex y un pulso en la centrífuga. En un termociclador (MyCycler™, BIO-RAD) se incubaron las muestras a 25°C durante 10 min, 50°C durante 50 min y 85°C durante 5 min. Después de los procesos de incubación, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo para llevar a cabo la cuantificación de ADNc. Por último, las muestras se almacenaron a -80°C.

2.13 Cuantificación de ADNc de la línea celular MDA-MB-231

Para llevar a cabo la cuantificación de ADNc, se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop (2000c, Thermo Fisher Scientific) y el software Nanodrop 2000, como se describió anteriormente. Los datos obtenidos correspondieron a la cantidad de ADN en µg/µl y la relación de absorbancia a 260 nm/280 nm. Se repitió el mismo procedimiento para las muestras de ADNc de células con tratamientos.

2.14 Reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR)

Se llevó a cabo reacciones de PCR de punto final para determinar las condiciones óptimas de amplificación para los oligonucleótidos de interés (descritos en la tabla 3). Se siguió el protocolo descrito en el kit Fast Start High Fidelity PCR System (Cat. 03553426001, Roche). Para cada reacción se añadió los reactivos de la siguiente manera (Tabla 4):

Tabla 4. Componentes para la reacción de PCR de cada muestra de templado de ADNc.

Componente	Stock	Concentración final	Volumen final
10 X buffer con MgCl ₂	10 X	1 X	5 µl
dNTP Mix	10 mM	1.8 mM	1 µl
Oligonucleótido sentido	10 µM	0.2 µM	0.5 µl
Oligonucleótido antisentido	10 µM	0.2 µM	0.5 µl
Templado ADNc		200 ng	
Enzyme Blend	5 u/µl	2.5 u/µl	0.5 µl
Agua libre de ARNasas			Hasta completar 50 µl

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos para la amplificación de los genes de interés y su temperatura de fusión (T_m).

Nombre de la secuencia	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	T _m (°C)
GAPDH	5'-AACGGATTTGGTCGTATTGGG-3'	5'-TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3'	56
TP53	5'-AGGAAATTTGCGTGTGGAGTAT-3'	5'-TCCGTCCCAGTAGATTACCACT-3'	60
SOD1	5'-GTGCAGGTCCTCACTTTAAT-3'	5'-CTTTGTCAGCAGTCACATTG-3'	54

En un termociclador (MyCycler™, BIO-RAD) se incubaron las muestras como se indica en la tabla 6. Después de los procesos de incubación, las muestras se almacenaron a -20°C. Posteriormente, todas las muestras se descongelaron y se colocaron en hielo para proceder a realizar un gel de agarosa al 1.5% preparado con 0.9 g de agarosa y 60 ml de TAE 1X. Una vez que el gel se solidificó, se cargaron las muestras con 5 µl de muestra y 1 µl de red gel 5X. Se cargó un marcador de peso molecular correspondiente a 1000 pares de bases (pb) y 500 pb. Las condiciones de migración de las pares de bases en el gel fueron a 74 volts, durante 60 min aproximadamente.

Tabla 6. Condiciones de PCR.

Etapa	Ciclos	Tiempo	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial	1	2 min	95
Desnaturalización	35	30 sec	95
Polimerización		30 sec	GAPDH = 56 TP53 = 60 SOD1= 54
Elongación		45 sec	72
Elongación final	1	5 min	72
Enfriamiento	infinito	infinito	4

2.15 Retrotranscripción - PCR

Después de la síntesis de ADNc por retrotranscripción (RT), se evaluon los niveles de expresión relativa de los genes de TP53 y Sod-1 mediante la técnica de PCR tiempo real (qPCR) y se normalizaron con el gen de referencia GAPDH. Se siguió el protocolo descrito del kit SYBR® Green quantitative RT-qPCR (Cat.RR0100-1KT, Sigma Aldrich) como marcador intercalante para llevar a cabo la cuantificación del amplicón por triplicado. Se añadió lo descrito en la (Tabla 5). Las muestras fueron colocadas por triplicado en placas para qPCR de 96 pozos, se realizó la corrida de PCR bajo las condiciones de reacción establecidas para cada par de oligonucleótidos a evaluar.

Tabla 7. Componentes para la reacción de RT-qPCR de cada muestra de templado.

Componente	Stock	Concentración final	Volumen final
SYBR green	10 X	1 X	12.5 μ l
Oligonucleótido sentido	10 μ M	0.2 μ M	0.5 μ l
Oligonucleótido antisentido	10 μ M	0.2 μ M	0.5 μ l
ADNc		200 ng	X μ l
Agua libre de ARNasas			Hasta completar 25 μ l

2.16 Evaluación del efecto genotóxico de la combinación de AgNPs y tamoxifeno

Las células de mamífero presentan la variante de histona H2A, que es fosforilada en el residuo de serina 139 (Ser139) en respuesta a la ruptura de la doble cadena de ADN. Esta fosforilación es un reconocido parámetro de genotoxicidad (Nakamura et al., 2006). Las evaluaciones del daño genotóxico producido por las diferentes combinaciones de las AgNPs con el tamoxifeno, se observaron por microscopia confocal usando el kit HCS DNA Damage (Invitrogen Cat. H10292), como se describe a continuación.

Se colocaron 10,000 células MDA-MB-231 en cada pozo de una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5 % de CO₂. Después, se prepararon las concentraciones de AgNPs y tamoxifeno que presentaron un efecto sinérgico mediante el modelo de interacción de fármacos de Chou-Talalay. Estas concentraciones fueron añadidas en volumen final de 100 μ l en cada pozo. Después de haber agregado los tratamientos asignados a cada pozo, las células se incubaron durante 24 hrs a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Se añadió a cada pozo 50 μ l de la solución de tinción de viabilidad celular Image-iT® Dead Green™, para un total de 150 μ l y se incubó a durante 24 hrs a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, se removió el medio y se agregaron 100 μ l de solución de fijación (1.5 ml de formaldehído acuoso al 16% en 4.5 ml PBS 1X) en cada pozo y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Después se retiró la solución de fijación y se realizó un lavado con PBS 1X. Se añadió 100 μ l de solución de permeabilización (15 μ L de Triton® X-100 en 6 ml PBS 1X) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Se removió la solución de permeabilización y se realizó un lavado con PBS 1X. Posteriormente, se añadió 100 μ l de solución de bloqueo (0.25 g de BSA en 25 ml de PBS 1X) a cada pozo y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. Después se removió la solución de bloqueo y se agregaron 50 μ l

de la solución primaria de anticuerpo (6 μ l de anticuerpo pH2AX con 6 ml de solución de bloqueo). Y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. Después se retiró la solución primaria de anticuerpo y se realizó 1 lavado con PBS 1X. Posteriormente se añadieron 50 μ l de solución secundaria de anticuerpo/contratinción (mezcla de 3 μ l de Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG (H+L) y 1 μ l de Hoechst 33342 en 6 ml de solución de bloqueo) y se incubó durante 60 min bajo oscuridad a temperatura ambiente. Después se removió la solución secundaria de anticuerpo/contratinción y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Se añadió 100 μ l de PBS 1X a cada pozo con tratamiento.

Por último, la visualización de las muestras se realizó mediante microscopía confocal. Las longitudes de excitación utilizadas fueron 350, 488, y a 555 nm.

2.17 Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como el valor medio \pm la desviación estándar. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Capítulo 3. Resultados

Se llevó a cabo la caracterización de las tres muestras de AgNPs mediante técnicas espectrofotométricas y por microscopía electrónica de transmisión. Para establecer las concentraciones adecuadas de AgNPs y de tamoxifeno para generar un efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama, fue necesario determinar *in vitro* la concentración media inhibitoria (IC_{50}) de las AgNPs y tamoxifeno en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

3.1 Caracterización fisicoquímica de las AgNPs

Se determinó el plasmón de resonancia superficial de las tres muestras de AgNPs mediante espectrofotometría de UV-Vis. Para la muestra "A" se obtuvo un pico máximo de absorción en 220 nm; (Figura 9 c)). Para la muestra de AgNPs "B" mostró un pico máximo de absorción en 420 nm (Figura 10 c)). En la muestra "C" de AgNPs se registró el plasmón superficial con un pico máximo en 420 nm (Figura 11d)).

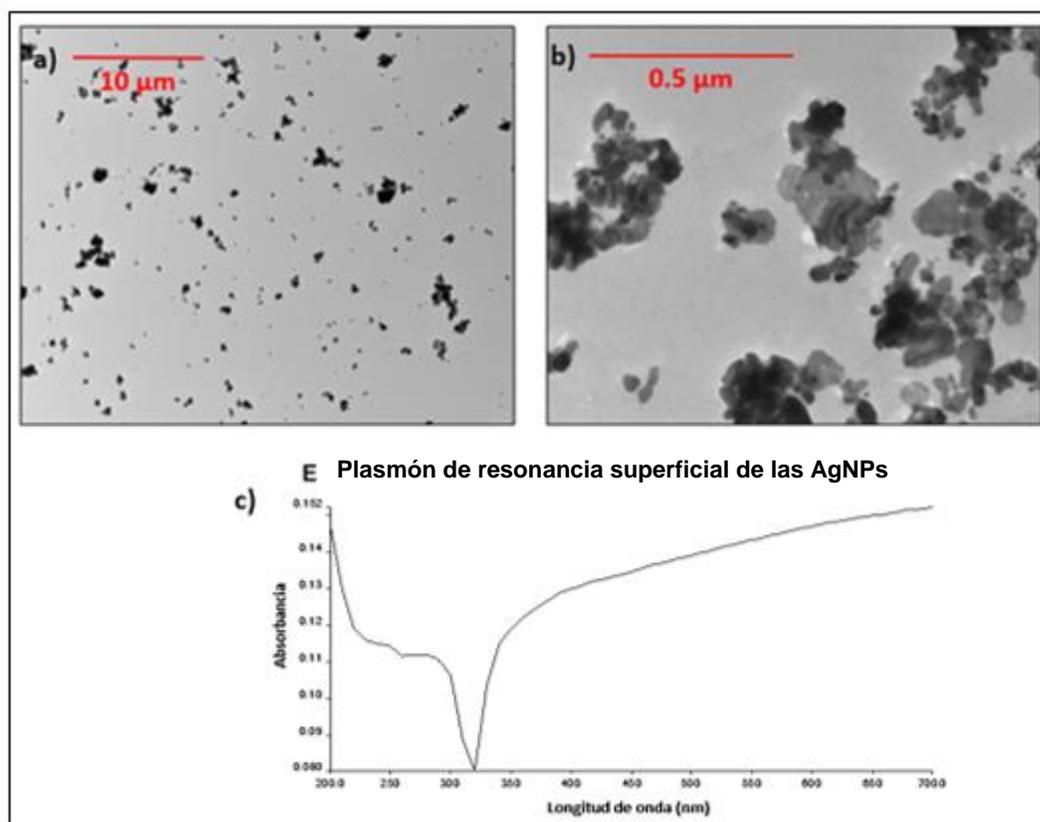


Figura 9. Caracterización fisicoquímica de la muestra "A" de AgNPs mediante, a) y b): microscopía electrónica de transmisión. c): espectrofotometría UV-Vis.

Se tomaron micrografías de las tres muestras de AgNPs mediante microscopía electrónica de transmisión. En la Figura 9 se observan las imágenes registradas con respecto a la morfología y tamaño de la muestra "A" de AgNPs. En la figura 9 a) y b) se observan que las AgNPs tienden a agregarse y que los tamaños van desde los 100 nm hasta los 1.6 μm .

En la Figura 10 se observan las imágenes registradas de la muestra "B" de AgNPs. Las cuales mostraron agregaciones (Figura 10 a) y b)). Se encontraron que las AgNPs tienden a agregarse ya que los tamaños registrados fueron de los 100 a los 900 nm.

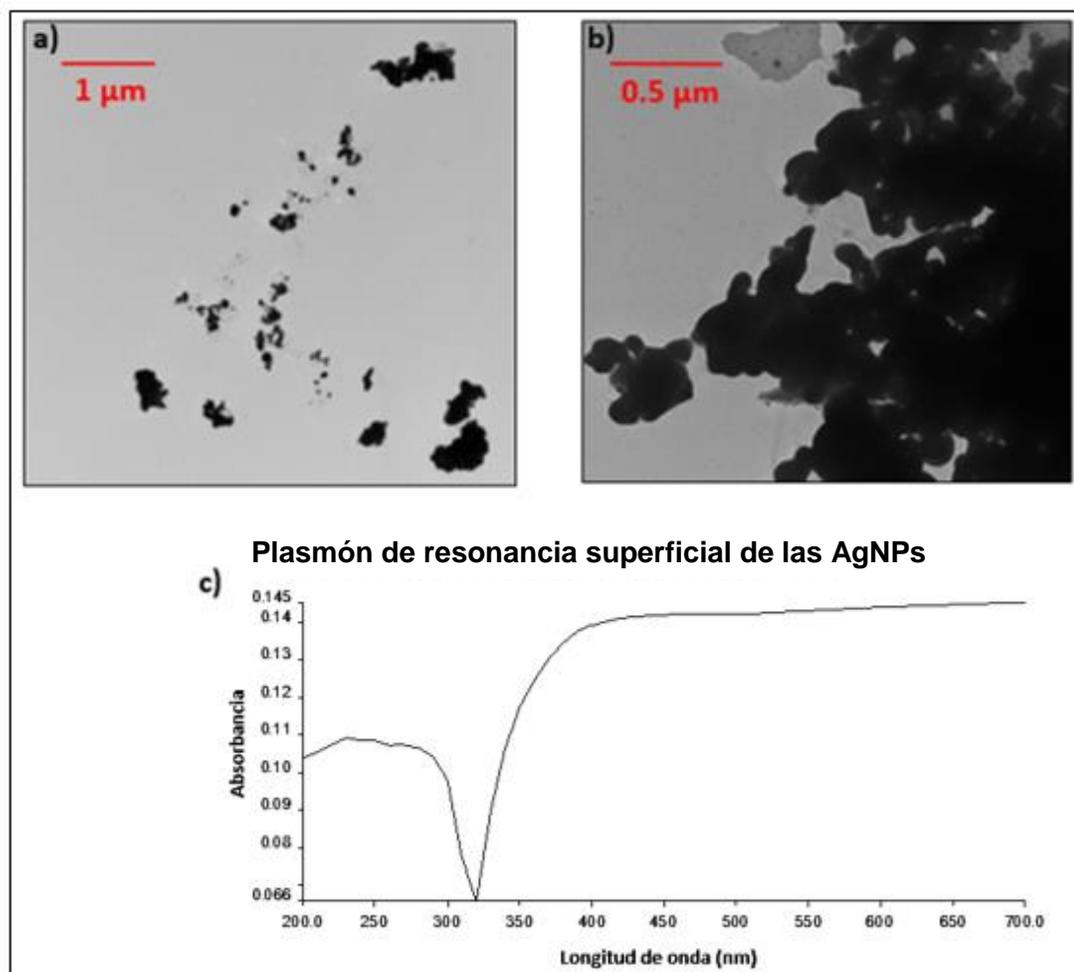


Figura 10. Caracterización fisicoquímica de la muestra "B" de AgNPs mediante (a,b) microscopía electrónica de transmisión y c) espectrofotometría UV-Vis.

En la figura 11 es posible observar que la morfología de las AgNPs de la muestra "C" es esferoidal en su mayoría (Figura 11 a)), mientras que con el análisis por microscopía se obtuvo un histograma de distribución de tamaño de las AgNPs (Figura 12 b)), las cuales mostraron un diámetro promedio de 60 nm.

Se realizaron análisis mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) para corroborar los resultados obtenidos por el TEM, donde sólo fue posible medir la muestra “C” de AgNPs, se determinó que estas AgNPs tienen un diámetro promedio de 68.82 nm mientras que el potencial Zeta tiene un valor promedio de -25.8 mV (Figura 11 c).

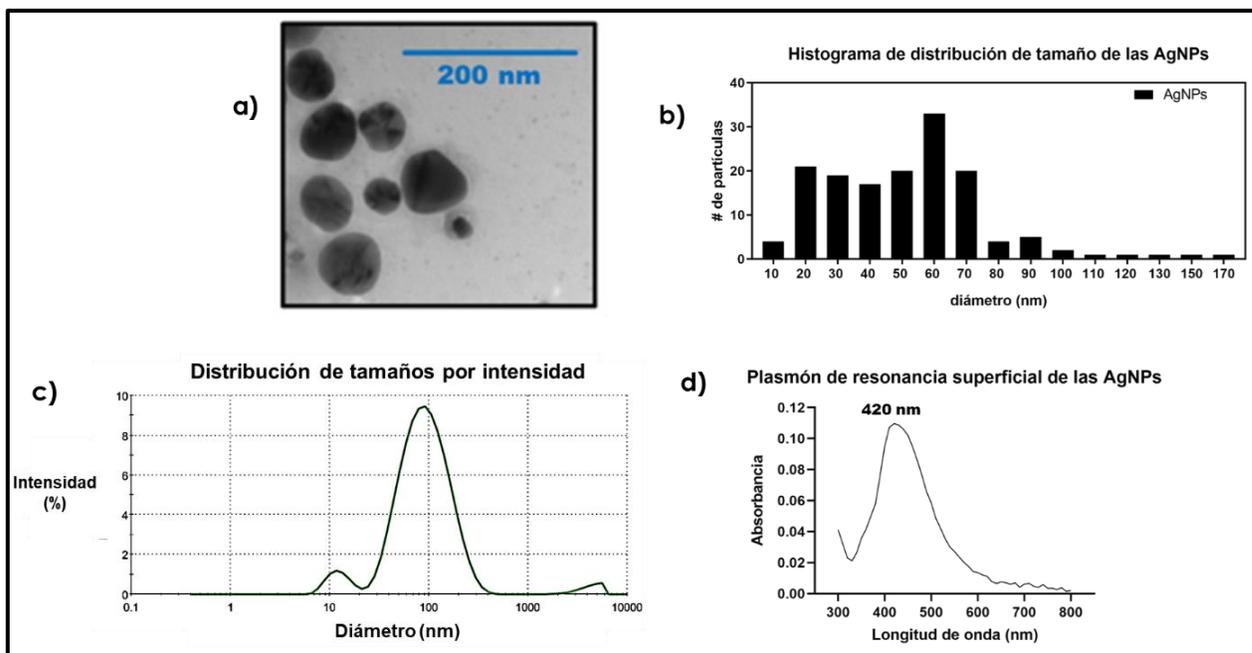


Figura 11. Caracterización fisicoquímica de la muestra “C” de AgNPs mediante microscopía electrónica de transmisión (a,b), dispersión de luz dinámica (c) y Espectrofotometría UV-Vis (d).

3.2 Determinación *in vitro* de la concentración media inhibitoria (IC₅₀) de las AgNPs y del tamoxifeno en células de cáncer de mama

Para determinar la concentración media inhibitoria (IC₅₀) de las AgNPs en células de cáncer de mama, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Como se muestra en la Figura 12, estos resultados fueron graficados como el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la concentración de AgNPs añadidas al cultivo.

En la Figura 12 a), se observó un bajo decremento en la viabilidad de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 con las AgNPs de la muestra “A” en un rango de concentraciones de 100 a 1000 μ M. Para el caso de la viabilidad de las células MCF-7, (Figura 12 b)), se observó que conforme se aumenta la concentración de AgNPs se reduce la viabilidad celular, sin embargo, nunca es menor al 50%.

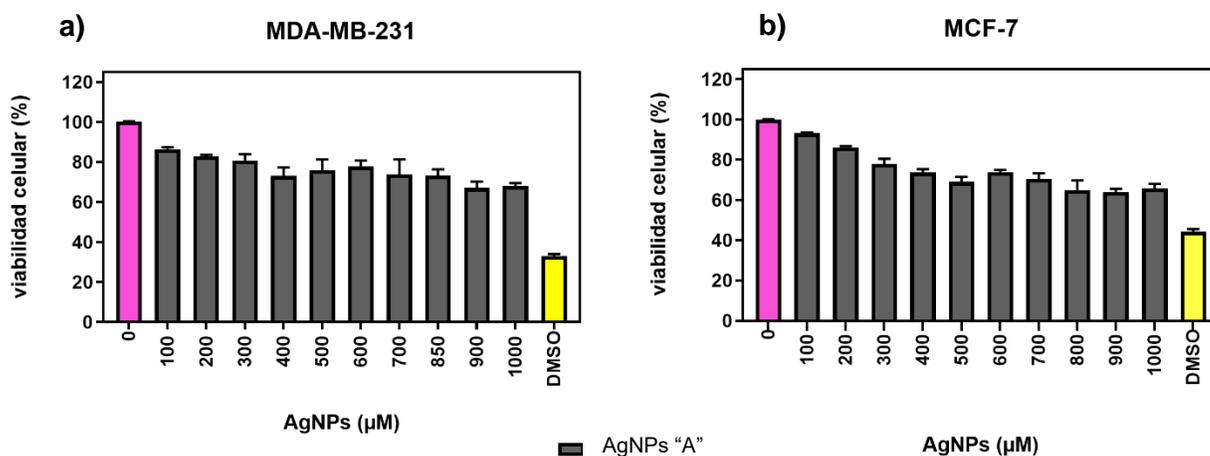


Figura 12. Evaluación de la citotoxicidad de la muestra "A" de AgNPs a diferentes concentraciones en células de cáncer de mama a) MDA-MB-231 y b) MCF-7.

Los resultados de la viabilidad celular graficados en la Figura 13 a), permiten observar que existe un bajo decremento en la viabilidad de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 que fueron expuestas a un rango de 100 – 1000 µM de la muestra "B" de AgNPs. Para el caso de la viabilidad de las células MCF-7, Figura 13 b), se observó que conforme aumenta la concentración de AgNPs, se produce un bajo decremento de la viabilidad celular.

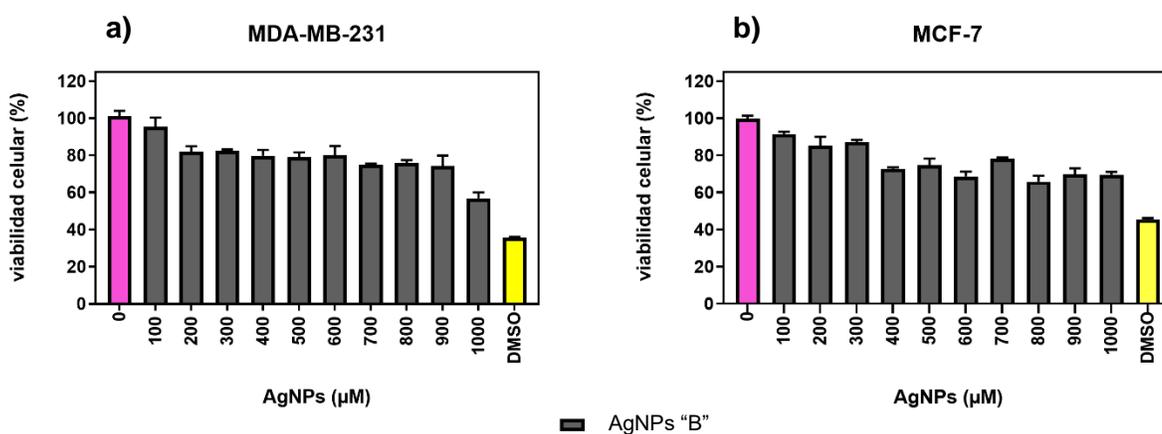


Figura 13. Evaluación de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de la muestra "B" de AgNPs en la línea de cáncer de mama a) MDA-MB-231 y b) MCF-7.

Como se observa en la Figura 14 a), existe un decremento en la viabilidad de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, con respecto a la concentración de AgNPs de 68 nm (muestra "C") adicionadas, lo cual es un claro efecto de respuesta concentración-dependiente. Para el caso de la viabilidad de las células MCF-7, como se muestra en la figura 14 b), se observó que conforme aumenta la concentración de AgNPs se reduce la viabilidad celular, lo cual también se le atribuyó a un efecto concentración-dependiente. En la línea celular MDA-MB-231 se obtuvo un porcentaje mínimo de citotoxicidad en 30 μM de AgNPs (viabilidad celular = 95.98 %) y se determinó un valor máximo de citotoxicidad con 100 μM de AgNPs (viabilidad celular = 31.84%) de acuerdo con el rango de concentraciones utilizado. Para la línea celular MCF-7 se determinó un valor mínimo de citotoxicidad en 15 μM (viabilidad celular = 97.20%) y un valor máximo de citotoxicidad en un tratamiento con 100 μM (viabilidad celular = 23.11%).

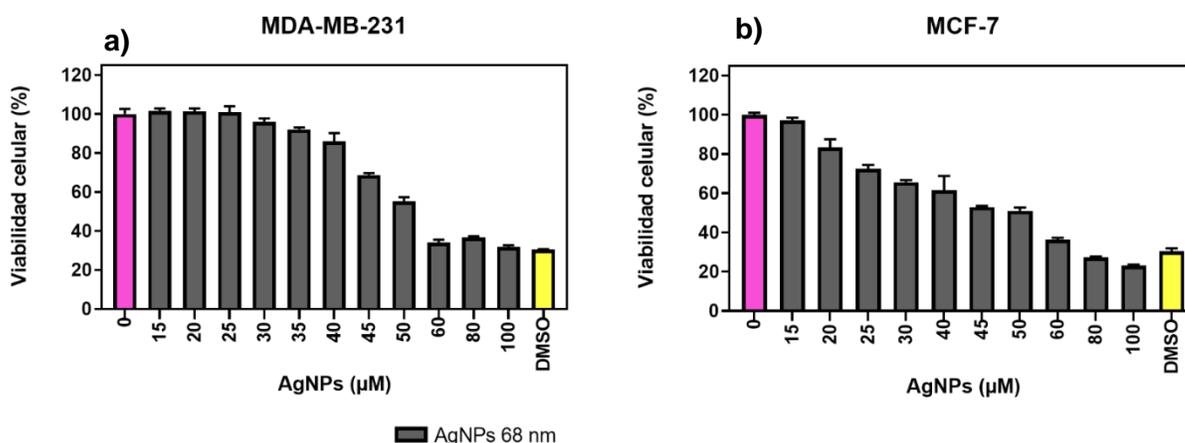


Figura 14. Evaluación de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de la muestra "C" de AgNPs en la línea de cáncer de mama a) MDA-MB-231 y b) MCF-7.

Por otro lado, se realizaron ensayos de viabilidad celular con diferentes concentraciones de nitrato de plata, como un control de inducción de muerte celular por medio de liberación de iones plata. Se utilizaron las mismas concentraciones anteriormente adicionadas en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En general, se observó una mayor muerte celular. Como se observa en la Figura 15 a), se reporta una viabilidad celular del 50% con un tratamiento de 35 μM de AgNO_3 en la línea celular MDA-MB-231, una citotoxicidad mayor que la obtenida con AgNPs. Se determinó una citotoxicidad máxima (viabilidad celular = 24.05%) con un tratamiento de 80 μM . En la Figura 15 b), se obtuvo una viabilidad celular de 50% aproximadamente con un tratamiento de 25 μM de en la línea celular MCF-7. Se determinó un determinó una citotoxicidad máxima (viabilidad celular = 21.99 %) con un tratamiento de 80 μM .

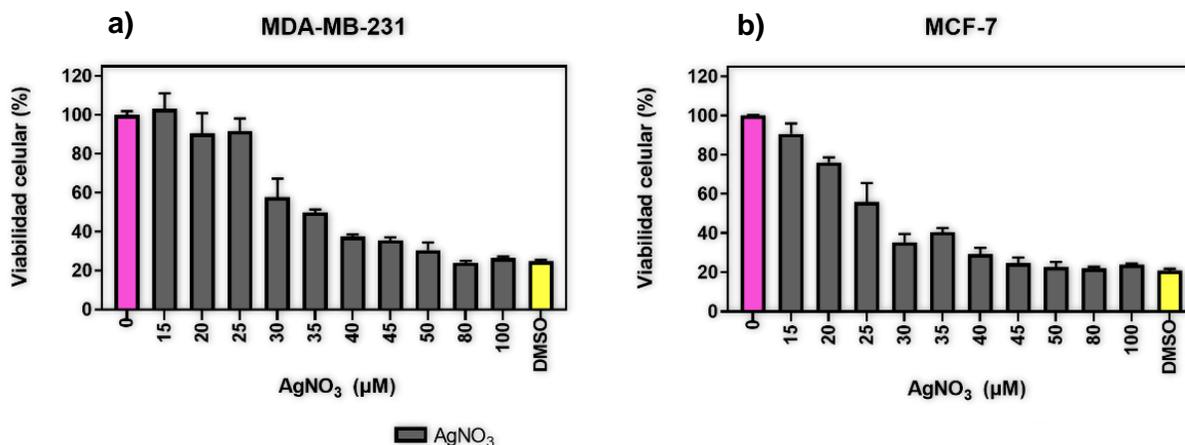


Figura 15. Evaluación de la citotoxicidad del nitrato de plata a diferentes concentraciones en la línea de cáncer de mama a) MDA-MB-231 y b) MCF-7.

Para determinar la concentración media inhibitoria (IC₅₀) del tamoxifeno en las células de cáncer de mama, se realizaron ensayos de viabilidad celular, como se muestra en la Figura 16. Estos resultados, se graficaron como el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la concentración de tamoxifeno añadido al cultivo.

En la Figura 16 a), se muestran los resultados de la evaluación citotóxica del tamoxifeno en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, en donde se observó un decremento de la viabilidad celular conforme aumentó la concentración de fármaco añadido, lo cual demostró un efecto concentración-dependiente. Se puede observar que la viabilidad celular cae abruptamente a un valor de 34.15% en la concentración de 50 µM de tamoxifeno, a partir de esa concentración y hasta 100 µM de tamoxifeno, los valores del porcentaje de la viabilidad celular se mantienen igual o ligeramente menor al 20%, lo que es considerado como una citotoxicidad franca.

De la misma manera, para las células de cáncer de mama MCF-7, se muestran los resultados en la Figura 16 b), en donde se observa un decremento de la viabilidad celular siendo esta de 66.65% a partir de los 20 µM de tamoxifeno, se puede destacar que la viabilidad cae abruptamente hasta un 39% a partir de la concentración de 30 µM de fármaco, lo que es considerado como una citotoxicidad franca y que conforme aumenta la concentración de fármaco, por ejemplo en 50 µM de tamoxifeno, la viabilidad disminuye hasta un 21.20%. Por lo tanto, es posible afirmar que el efecto citotóxico del tamoxifeno en las células MCF-7 es claramente dependiente de la concentración del fármaco.

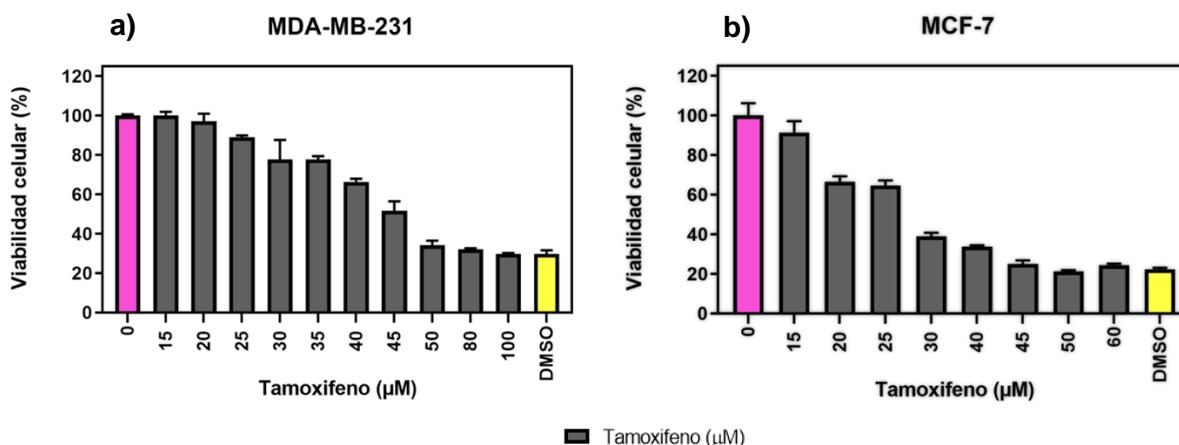


Figura 16. Evaluación de la citotoxicidad del tamoxifeno a diferentes concentraciones en la línea de cáncer de mama a) MDA-MB-231 y b) MCF-7.

De esta forma, los resultados mostrados en las Figuras 12 a 16, permitieron determinar con un índice de confianza del 95%, que la IC_{50} de cada una de las muestras de AgNPs y del fármaco tamoxifeno para cada una de las líneas celulares de cáncer de mama, como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8. Determinación de IC_{50} de las muestras "A", "B" y "C" de AgNPs y del tamoxifeno en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7.

	MDA-MB-231		MCF-7	
	IC_{50} (µM)	R^2	IC_{50} (µM)	R^2
AgNPs "A"	1179.15 ± 323.64	0.9049	1627 ± 445.47	0.9228
AgNPs "B"	1443 ± 412.95	0.9174	1754 ± 667.50	0.9077
AgNPs "C" - 68 nm	52.635 ± 1.11	0.9860	48.66 ± 3.21	0.9675
Tamoxifeno	44.76 ± 2.33	0.9503	29.18 ± 2.67	0.9290

Si bien es posible observar que las IC_{50} de las muestras "A" y "B" de las AgNPs tanto para las células MDA-MB-231 como para las MCF-7, tienen valores en el rango de 1.1 a 1.4 mM, el valor de la IC_{50} para las AgNPs de la muestra "C" para la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 fue de 52.635 ± 1.11 µM y de 48.66 ± 3.21 µM para la línea celular MCF-7. Por lo que, aparentemente, la línea celular más susceptible al

tratamiento con las AgNPs de 68 nm es la MCF-7, debido a que se requiere de una menor concentración de nanopartículas para ocasionar una muerte celular del 50%.

Se utilizaron resultados graficados en la Figura 17 para determinar la IC_{50} del tamoxifeno en las dos líneas celulares de cáncer de mama. Se obtuvo que la IC_{50} del tamoxifeno fue de $44.76 \pm 2.33 \mu\text{M}$ para las células MDA-MB-231, mientras que para las células MCF-7 se determinó una IC_{50} de $29.18 \pm 2.67 \mu\text{M}$. Por lo que, la línea celular más susceptible al tratamiento con tamoxifeno es la MCF-7, debido a que se requiere de una menor concentración de este fármaco antineoplásico para ocasionar una muerte celular del 50%.

Tanto la muestra "A" como la muestra "B" de AgNPs reportaron valores del IC_{50} muy elevados, así como una baja citotoxicidad en las células MDA-MB-231 y MCF-7, y como se observó en las figuras 10 y 11, estos efectos fueron debidos a que estas muestras se encontraron aglomeraciones por arriba de los 100 nm. A partir de este momento, las únicas AgNPs con las que se trabajaron para realizar los ensayos de combinación fueron las de 68 nm de diámetro (muestra "C").

3.3 Determinación *in vitro* del tipo de interacción de la combinación de las AgNPs y del tamoxifeno en células de cáncer de mama

Para evaluar el tipo de interacción que tienen las AgNPs de la muestra "C" en combinación con el fármaco antineoplásico tamoxifeno y su efecto citotóxico en células de cáncer de mama MDA-MB-231, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Estos resultados se graficaron como el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la concentración de AgNPs añadidas al cultivo y la concentración de tamoxifeno utilizado, como se muestra en la Figura 17.

La barra color negro de la Figura 17 corresponde al porcentaje de viabilidad de las células del control positivo (sin tratamiento) el cual corresponde a un 100% de células vivas. Las barras grises corresponden al porcentaje de viabilidad celular generado por las diferentes concentraciones de AgNPs añadidas al cultivo, mientras que las barras de color rojo representan el porcentaje de la viabilidad celular provocado por las combinaciones de las diferentes concentraciones de AgNPs y $15 \mu\text{M}$ de tamoxifeno. Para los tratamientos con AgNPs y $20 \mu\text{M}$ de fármaco, se graficaron los resultados del porcentaje de viabilidad celular con las barras de color verde. Para la concentración de $25 \mu\text{M}$ de tamoxifeno las barras son de color

amarillo, mientras que las barras de color azul representan los tratamientos con las diferentes concentraciones de AgNPs y 27 μM de tamoxifeno.

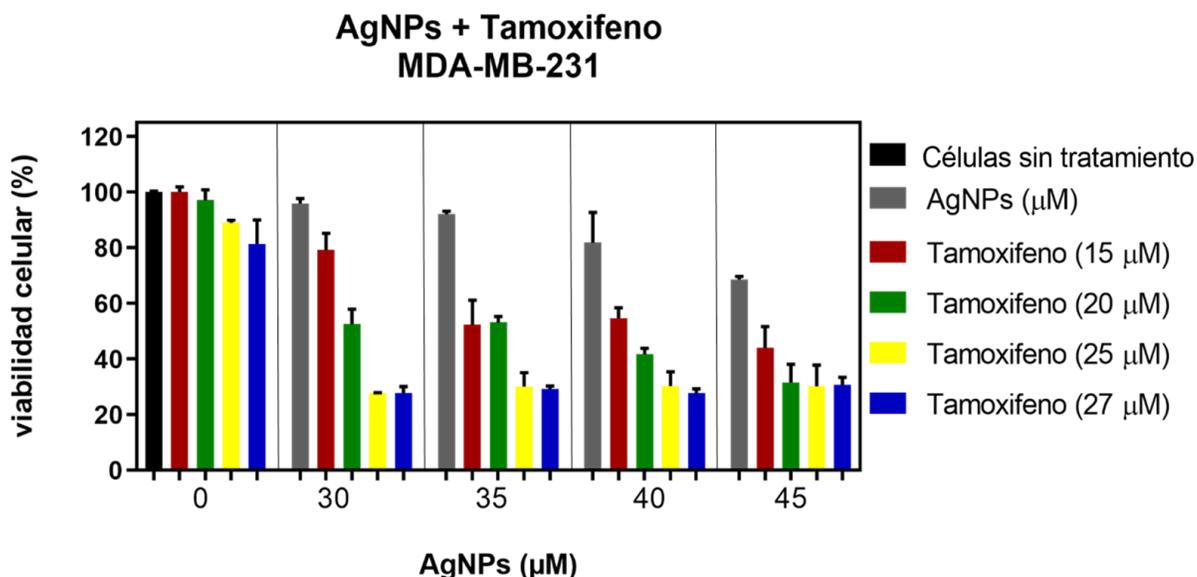


Figura 17. Efecto antiproliferativo de la combinación de las AgNPs en presencia de diferentes concentraciones de fármaco tamoxifeno en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

En la figura 17, es posible observar que la viabilidad celular al utilizar 15, 20, 25 y 27 μM de tamoxifeno fue de del 99, 97.14, 88.89 y 77.77%, respectivamente. Además, se registró una disminución de la viabilidad celular al añadir diferentes concentraciones de las AgNPs, siendo estas 95.28% para 30 μM , 86.01% para 35 μM , 77.71% para 40 μM y 65.24% para 45 μM , por lo que este comportamiento fue dependiente de la concentración de nanopartículas añadidas al cultivo. Sin embargo, cuando se agregaron las combinaciones de AgNPs (de 30, 35, 40 y 45 μM) y del fármaco (15, 20, 25 y 27 μM), se observó una potenciación en la disminución de la viabilidad la cual es mayor que la muerte celular inducida por sus individuales.

Por lo tanto, para cuantificar la interacción entre las AgNPs y el tamoxifeno, se utilizó el software CompuSyn desarrollado por Chou-Talalay, el cual se basa en el modelo de índice de combinación (CI). Después de introducir los valores de las IC_{50} de las AgNPs, las del tamoxifeno, así como los valores de la muerte de la línea celular MDA-MB-231 obtenidos de las combinaciones mostradas en la Figura 17, los resultados de los diferentes valores de índice de combinación (CI) están resumidos en la Tabla 9, en la que los valores de CI que son mayores a 1 representan las combinaciones donde no se obtuvo un efecto

sinérgico entre las AgNPs y el tamoxifeno, si los valores de CI son iguales a 1, se dice que tienen un efecto aditivo y si son menores a 1, entonces el efecto es sinérgico. De esta forma, se obtuvo una combinación con efecto aditivo ($CI = 1$) al utilizar 30 μM de AgNPs con 27 μM de tamoxifeno, además de ello, se determinó que existe un efecto sinérgico al utilizar las combinaciones de 30 μM de AgNPs con 15 μM de tamoxifeno y 30 μM de AgNPs con 25 μM de tamoxifeno debido a que los valores de CI son de 0.97 y 0.95, respectivamente.

Los siguientes resultados que se generaron con el software CompuSyn, corresponden a los valores de índice de interacción graficados mediante el modelo isobolográfico (Figura 19 a)), donde el eje 'y' representa la normalización de concentraciones del fármaco "A" (AgNPs) utilizadas individualmente. El eje 'x' representa la normalización de las concentraciones del fármaco "B" (tamoxifeno) utilizadas individualmente. La línea diagonal que comprende desde el límite de los ejes 'x' y 'y', representa la aditividad del fármaco "A" y "B". Los puntos graficados corresponden a las concentraciones de cada una de las combinaciones utilizadas. Los dos puntos que están por debajo de la línea diagonal de aditividad fueron las combinaciones de 30 μM de AgNPs con 25 μM de tamoxifeno y la combinación de 35 μM de AgNPs con 15 μM de tamoxifeno.

Los siguientes resultados que se generaron con el software CompuSyn, corresponden a los valores de índice de interacción graficados de mediante el modelo isobolográfico (Figura 18 a)), donde el eje 'y' representa la normalización de concentraciones del fármaco "A" (AgNPs) utilizadas individualmente. El eje 'x' representa la normalización de las concentraciones del fármaco "B" (tamoxifeno) utilizadas individualmente. La línea diagonal que comprende desde el límite de los ejes 'x' y 'y', representa la aditividad del fármaco "A" y "B". Los puntos graficados corresponden a las concentraciones de cada una de las combinaciones utilizadas. Los dos puntos que están por debajo de la línea diagonal de aditividad fueron las combinaciones de 30 μM de AgNPs con 25 μM de tamoxifeno y la combinación de 35 μM de AgNPs con 15 μM de tamoxifeno.

Tabla. 9 Cuantificación del índice de interacción (CI) entre las AgNPs de 68 nm y el fármaco tamoxifeno en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (Datos obtenidos con el software CompuSyn).

AgNPs (μM)	Tamoxifeno (μM)	Coefficiente de interacción (CI)
30	15	1.23
35	15	0.97
40	15	1.07
45	15	1.18
30	20	1.26
35	20	1.17
40	20	1.14
45	20	1.09
30	25	0.95
35	25	1.04
40	25	1.1
45	25	1.15
30	27	1
35	27	1.09
40	27	1.16
45	27	1.3

La Figura 18 b)), representa el gráfico del índice de combinación logarítmico. Donde el eje 'x' corresponde a la fracción de inhibición de la proliferación celular obtenido para cada una de las combinaciones empleadas con respecto al el eje 'y', que representa un valor logarítmico de cada índice de combinación obtenido. Como se observa, todas las combinaciones utilizadas y que están graficadas como puntos azules se encontraron muy próximas a un valor de $\text{Log}(\text{CI})=0$.

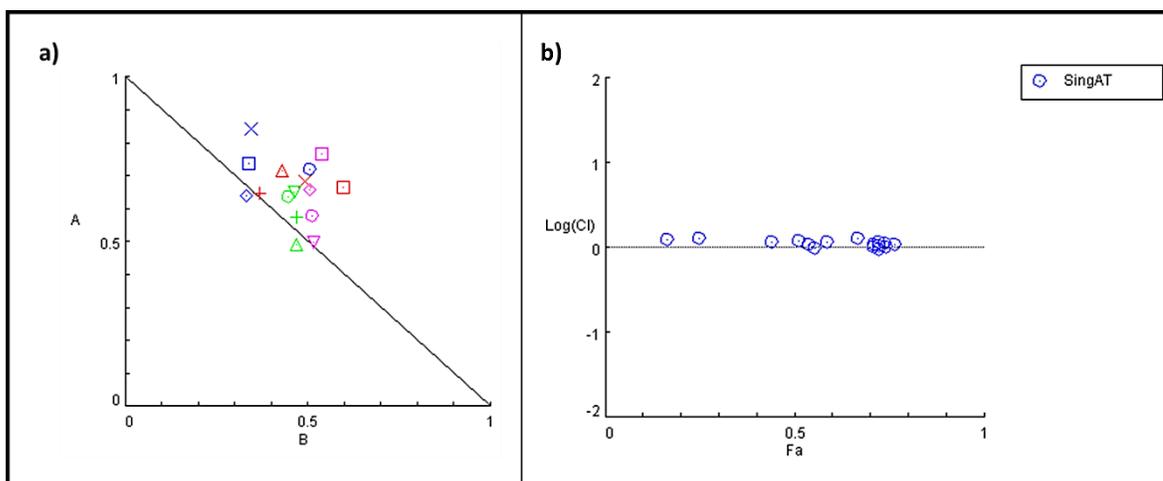


Figura 18. Representación gráfica obtenida con el software CompuSyn para las combinaciones de AgNPs de 68 nm y el fármaco tamoxifeno en la línea celular MDA-MB-231. a) Modelo isoblográfico y b) gráfico fracción contra índice de combinación (Fa-CI).

Para evaluar el tipo de interacción que tienen las AgNPs en combinación con el fármaco antineoplásico tamoxifeno en células de cáncer de mama MCF-7, se realizaron ensayos de viabilidad celular, como se muestra en la Figura 19. Estos resultados, se graficaron como el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la concentración de AgNPs añadidas al cultivo y la concentración de tamoxifeno utilizado.

La barra color negro de la Figura 19 corresponde al porcentaje de la viabilidad de las células sin ningún tratamiento, el cual es del 100%. Las barras grises corresponden a los porcentajes de viabilidad celular obtenidos con las diferentes concentraciones de AgNPs añadidas al cultivo (15, 20, 25 y 30 μM independientemente), mientras que las barras de color naranja representan los valores de los porcentajes de viabilidad celular de los tratamientos con las diferentes concentraciones de AgNPs (15, 20, 25 y 30 μM) y 10 μM de tamoxifeno. Para los tratamientos con las diferentes concentraciones de AgNPs y 15 μM de fármaco, se graficaron los resultados de la viabilidad celular con barras de color violeta. Para representar los porcentajes de viabilidad celular generadas por los tratamientos con las diferentes concentraciones de AgNPs y la concentración de 20 μM de tamoxifeno, las barras son de color azul, tal como se muestra en la Figura 19.

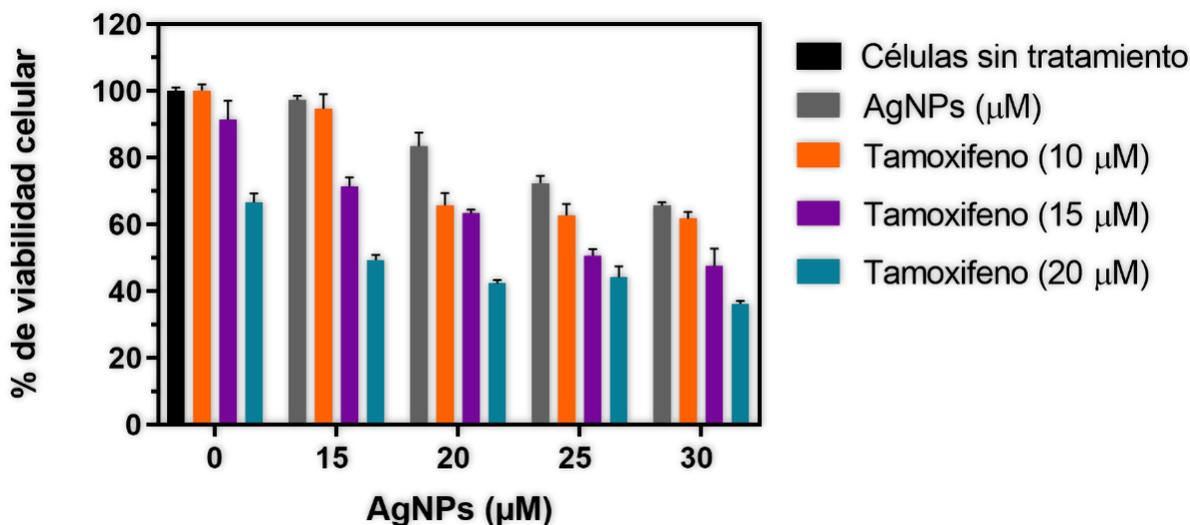


Figura 19. Efecto antiproliferativo de la combinación de las AgNPs en presencia de diferentes concentraciones de fármaco tamoxifeno en células de cáncer de mama MCF-7. Los resultados representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Como se observa en la Figura 19, se obtuvo poca disminución de la viabilidad celular al utilizar 10 y 15 μM de tamoxifeno (99% y 92% respectivamente), sin embargo, la viabilidad celular al utilizar 20 μM fue del 66.7%. Además de ello, la adición de las diferentes concentraciones de AgNPs generan una viabilidad celular de 97.2% para la concentración de 15 μM , 83.45% para 20 μM , 72.39% para 25 μM y 65.69% para 30 μM de nanopartículas, por lo tanto, el efecto citotóxico de las AgNPs depende de la concentración.

Por otro lado, se observó una potenciación en el efecto citotóxico de las combinaciones de AgNPs y fármaco tamoxifeno, por ejemplo, en las concentraciones de 15, 20, 25 y 30 μM de AgNPs combinadas con 10, 15 y 20, 25 μM de tamoxifeno, tal cual se muestra en la figura 20, por lo que es posible decir que para esas concentraciones de tamoxifeno la combinación con las AgNPs, induce una mayor muerte celular que sus individuales.

Para cuantificar esta interacción entre las AgNPs y el tamoxifeno, se utilizó el software CompuSyn que se basa en el modelo de índice de combinación descrito por Chou-Talalay, la tabla 10, resume los valores del índice de combinación obtenidos. Es importante resaltar que los valores de CI mayores a 1 representan las combinaciones donde no se obtuvo un efecto entre las AgNPs y el tamoxifeno, mientras que aquellos valores de CI menores a 1, representan un claro efecto sinérgico y los CI=1 son considerados como un efecto aditivo. Así, se obtuvo una combinación con efecto aditivo (CI = 1) en la combinación entre 15 μM

de AgNPs con 20 μM de tamoxifeno. Por otro lado, se determinó un efecto sinérgico $\text{CI}=0.97$, en la combinación de 20 μM de AgNPs con 10 μM de tamoxifeno.

Tabla 10. Cuantificación del índice de interacción (CI) entre las AgNPs de 68 nm y el fármaco tamoxifeno en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Datos obtenidos con el software CompuSyn).

AgNPs (μM)	Tamoxifeno (μM)	Coefficiente de interacción (CI)
15	10	1.73
15	15	1.12
15	20	1
20	10	0.97
20	15	1.14
20	20	1.02
25	10	1.08
25	15	1.08
25	20	1.15
30	10	1.2
30	15	1.15
30	20	1.13

En la figura 20, se presentan resultados generados con el software CompuSyn y que corresponden a los valores del índice de interacción, en el inciso (a) se presenta el modelo isoblográfico, donde el eje 'y' indica la normalización de las concentraciones del fármaco "A" (AgNPs) utilizadas individualmente. El eje 'x' representa la normalización de las concentraciones del fármaco "B" (tamoxifeno) utilizadas individualmente. La línea diagonal que comprende desde el límite de los ejes 'x' y 'y' representa la aditividad del fármaco "A" y "B". Los puntos graficados corresponden todas las concentraciones de las combinaciones de AgNPs y tamoxifeno utilizadas en la figura 19. El punto que se encuentra dentro del isoblograma, es decir por debajo de la línea diagonal de aditividad fue la combinación de 15 μM de AgNPs con 20 μM de tamoxifeno.

El índice de combinación logarítmico, se grafica en la Figura 20 b), en donde el eje 'x' corresponde a la fracción de inhibición de la proliferación celular obtenido de cada una de las combinaciones de AgNPs y tamoxifeno empleadas para la línea celular MCF-7, con respecto al el eje 'y' que representa un valor logarítmico de cada índice de combinación obtenido. Donde, todas las combinaciones utilizadas se

encontraron muy próximas a un valor de $\text{Log}(CI)=1$. Se puede identificar un dato debajo de la línea de aditividad, que corresponde a la combinación de 15 μM de AgNPs con 20 μM de tamoxifeno.

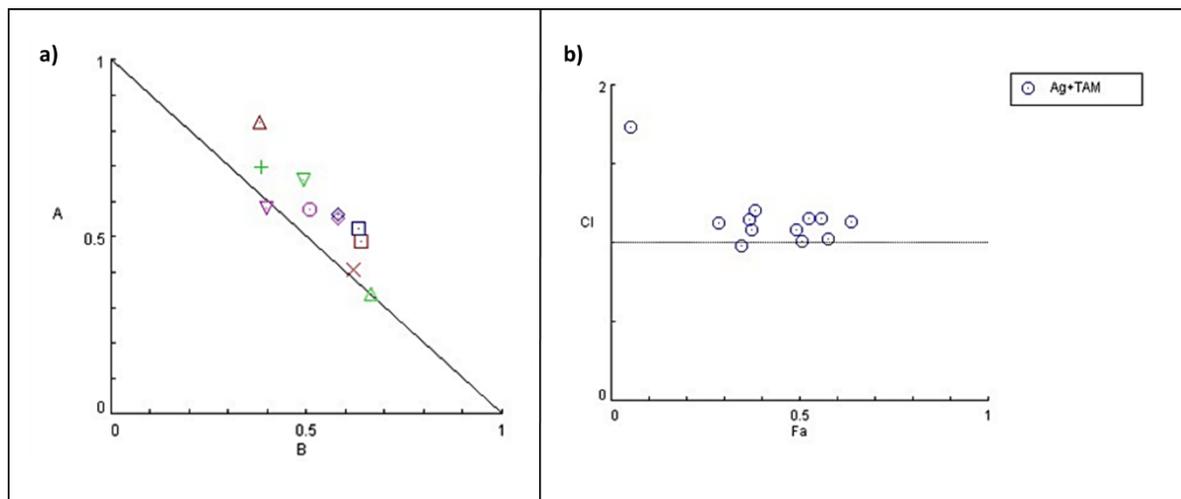


Figura 20. Representación gráfica obtenida con el software CompuSyn para las combinaciones de AgNPs de 68 nm y el fármaco tamoxifeno en la línea celular MCF-7. a) Modelo isobolográfico y b) Gráfico fracción contra índice de combinación (Fa-CI).

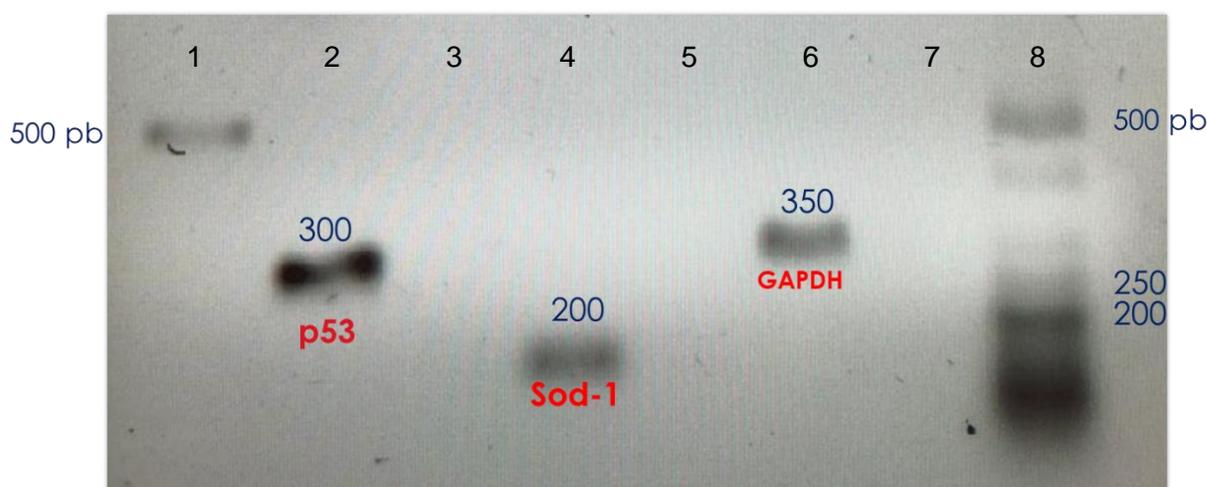
3.4 Expresión de los genes GAPDH, TP53 Y SOD1 en células de cáncer de mama

Para el análisis preliminar de la expresión de los diferentes genes (TP53, SOD1 y GAPDH) en las células MDA-MB-231 expuestas a los diferentes tratamientos con fármaco, AgNPs o sus combinaciones, se obtuvieron diferentes concentraciones y nivel de pureza del ARN, los cuales se resumen en la tabla 11. Para las células MDA-MB-231 sin tratamiento, se obtuvo una concentración de 2.365 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ARN, y una relación de absorbancia 260/280 de 1.97. Para las células MDA-MB-231 tratadas con 35 μM de AgNPs en combinación con 15 μM de tamoxifeno, se obtuvo una concentración de 1.75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ARN, y una relación de absorbancia 260/280 de 1.88. Las células MDA-MB-231 con un tratamiento de 30 μM de AgNPs en combinación con 25 μM de tamoxifeno, se obtuvo una concentración de 0.201 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ARN, y una relación de absorbancia 260/280 de 1.75. Se observó que conforme aumentó la concentración del tratamiento disminuyó la concentración de ARN aislado y su nivel de pureza.

Tabla 11. Concentración y pureza del ARN aislado de la línea celular MDA-MB-231.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Abs 260/280
MDA-MB-231 (sin tratamiento)	2.365	1.97
Combinación 1 (MDA-MB-231)	1.759	2.07
Combinación 2 (MDA-MB-231)	0.201	1.75

Después de sintetizar el ADNc de las células MDA-MB-231 (controles y tratamientos), se realizó la reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR) para determinar la expresión de los genes de interés GAPDH, TP53 Y Sod-1 y corroborar la factibilidad de las condiciones de PCR y especificidad de los oligonucleótidos a la secuencia blanco. En la figura 21 se presenta el resultado de la amplificación de las secuencias de estos genes a partir de ADNc. Los carriles 1 y 7 corresponden a los marcadores de peso molecular de 1000 pares de bases (pb) y 500 pb, respectivamente. En el carril 2 se observa la banda del producto de PCR para la secuencia TP53, se determinó un tamaño de 300 pb aproximadamente. En el carril 4 se observa la banda del producto de PCR para la secuencia Sod-1, que tiene un tamaño de 200 pb aproximadamente. En el carril 6 se observa la banda del producto de PCR para la secuencia GAPDH, con un tamaño de 350 pb aproximadamente. Los carriles 3, 5 y 7 son los productos de PCR de los controles de oligonucleótidos específicos para TP53, Sod-1 y GAPDH, respectivamente.

**Figura 21.** Gel de agarosa al 1.5% con los productos de PCR correspondiente a los genes TP53, Sod-1 y GAPDH de la línea celular MDA-MB-231.

Para determinar el nivel de expresión de genes relacionados con la apoptosis en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 expuestas a concentraciones de AgNPs y tamoxifeno donde se encontró un efecto sinérgico, se realizaron reacciones de qPCR de los genes TP53 y Sod-1. En este punto es importante resaltar que durante la metodología se omitió el tratamiento del ARN con DNAsas, lo que podría tener una influencia negativa en la amplificación del ADNc y las posteriores reacciones de qPCR. Es por esta razón, que los resultados obtenidos a partir de esta metodología, deben ser tomados considerados como preliminares y es necesario repetirlos con los tratamientos adecuados.

Sin embargo, en el caso de que se analizaran los resultados obtenidos de la cuantificación de los transcritos, es posible sugerir que en comparación a los niveles de GAPDH (gen de referencia), la expresión del gen TP53, las células expuestas a una concentración de 35 μM de AgNPs en combinación con 15 μM de tamoxifeno, el nivel de expresión de las células expuestas a una concentración de 30 μM de AgNPs en combinación con 25 μM de tamoxifeno es de 13.14.

En el caso del análisis del nivel de expresión del gen SOD1 en relación a GAPDH mediante reacciones de qPCR, se comparó el nivel de expresión de SOD1 de las células MDA-MB-231 sin tratamiento (1.88), con el de las células expuestas a una concentración de 35 μM de AgNPs en combinación con 15 μM de tamoxifeno, el cual fue de 1.10. Mientras que el nivel de expresión de SOD1 en las células expuestas a una concentración de 30 μM de AgNPs en combinación con 25 μM de tamoxifeno fue de 1307. Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, es importante repetir estos experimentos bajo las condiciones óptimas de los protocolos. Estos resultados sirven para tener una aproximación sobre el posible efecto de los tratamientos en la expresión de los genes de interés, aunque se conoce que se debe validar de una forma más adecuada.

3.5 Evaluación del efecto genotóxico de la combinación de AgNPs y tamoxifeno en la línea celular MDA-MB-231

Se evaluó el efecto genotóxico de las combinaciones de AgNPs que demostraron tener un efecto sinérgico en las células MDA-MB-231. Estos tratamientos fueron comparados con el daño genotóxico inducido por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La viabilidad celular fue detectada con el reactivo Image-iT[®] DEAD Green[™] viability stain, como se observa en la figura 22, el citoplasma de las células vivas se tiñó de verde, mientras que la morfología nuclear se

observó mediante el fluorocromo Hoechst 33342 que emite en color azul y la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX) se observó como focos de color rojo formados en el sitio del núcleo de las células, lo cual se utilizó como biomarcador de ruptura de la doble cadena de DNA.

La genotoxicidad basal se midió en el control negativo, que fueron las células sin tratamiento (C-), mientras que el control positivo (C+) de genotoxicidad, correspondió a las células con un tratamiento de 100 μ M H_2O_2 . Se observaron cambios en la morfología de las células y un incremento de la fluorescencia emitida por los anticuerpos marcados γ H2AX antibody/Alexa fluor 555 secondary, la cual se tomó como referencia de la acumulación del daño al DNA.

Como se puede observar en la Figura 23, las células con tratamiento de 30 y 35 μ M de AgNPs generaron una menor fluorescencia de los marcadores de la histona γ H2AX, el cual es muy similar al control negativo de genotoxicidad. Las células tratadas con 15, 25 y 50 μ M de tamoxifeno, mostraron una intensidad de fluorescencia menor que el control positivo de genotoxicidad. Al observar las células que fueron incubadas con un tratamiento de 35 μ M de AgNPs en combinación con 15 μ M de tamoxifeno, se determinó que la fluorescencia de la histona γ H2AX incrementó en comparación con el control negativo, pero fue menor al del control positivo de daño al DNA. El tratamiento de 30 μ M de AgNPs en combinación con 25 μ M de tamoxifeno ocasionó un menor daño que el control positivo de genotoxicidad.

Se cuantificó la fluorescencia de las micrografías registradas de los tratamientos donde se determinó un efecto sinérgico en las células MDA-MB-231, así como los controles individuales, el control positivo de genotoxicidad (células con un tratamiento de 100 μ M H_2O_2) y el control negativo de genotoxicidad basal (células sin tratamiento o DMEM). Los resultados fueron graficados como el índice de genotoxicidad relativo con respecto al control negativo.

Como se indica en la Figura 23, los índices de genotoxicidad de las células tratadas con 30 y 35 μ M de AgNPs fueron de 1.0 y 1.082, respectivamente, mientras que los valores de los índices de genotoxicidad de las células incubadas con 15 y 25 μ M de tamoxifeno fueron de 1.005 y 1.088, respectivamente, los cuales son muy similares al control de células sin tratamiento (DMEM). El índice de genotoxicidad de las células incubadas con 50 μ M de tamoxifeno fue de 1.51. En cuanto al índice de genotoxicidad de las células incubadas con las combinaciones de AgNPs y fármaco, se obtuvieron los siguientes valores: 1.11 para el tratamiento donde se combinaron 35 μ M de AgNPs con 15 μ M de tamoxifeno y por último, en el tratamiento de 30 μ M de AgNPs en combinación con 25 μ M de tamoxifeno se obtuvo un índice de genotoxicidad de 1.31.

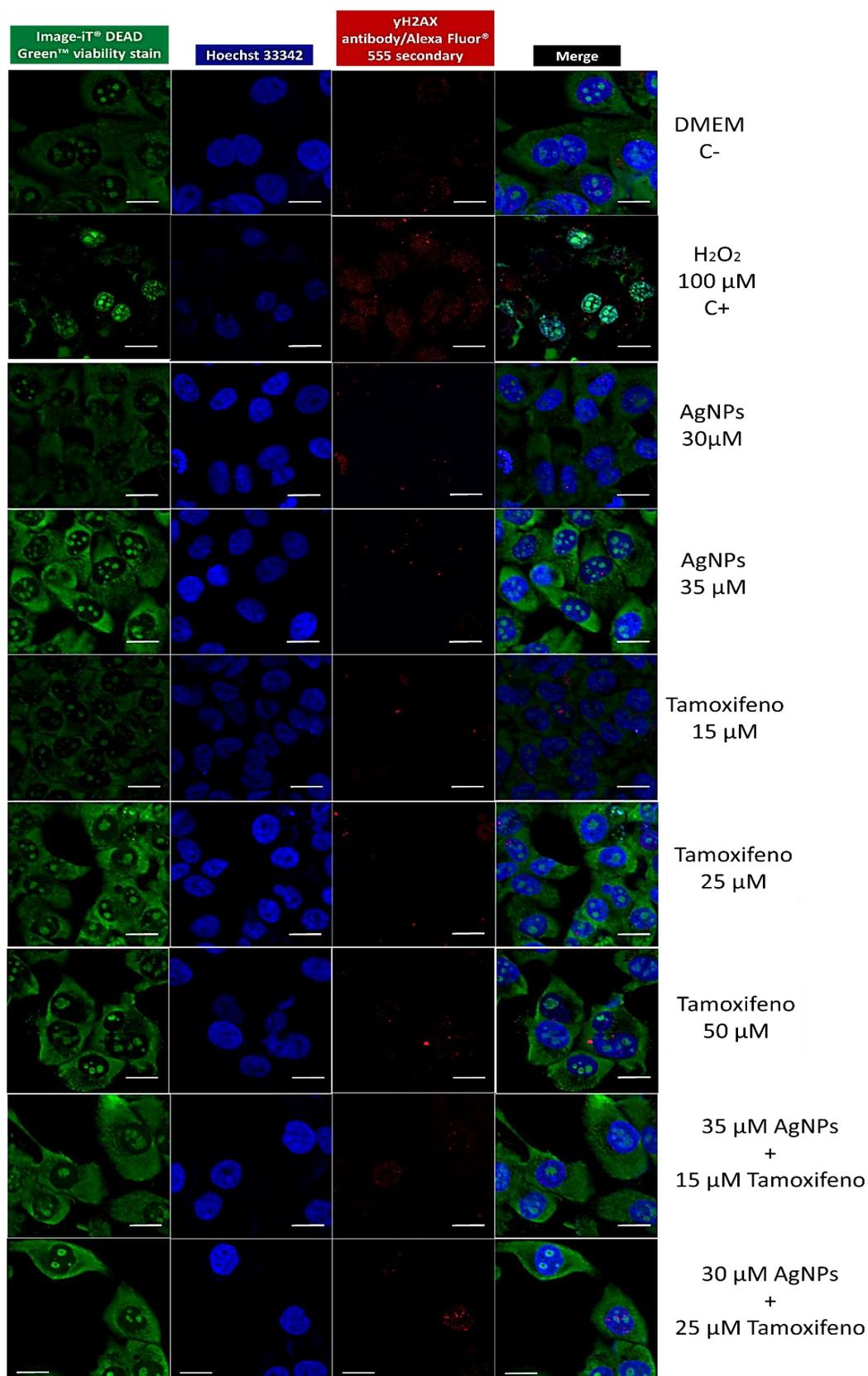


Figura 22. Detección de daño al ADN en células MDA-MB-231 vía γ H2AX antibody/Alexa fluor 555 secondary en células MDA-MB-231. En color verde se observa la morfología de la célula viva, en color azul se observa la tinción nuclear y en color rojo se detecta el daño al ADN.

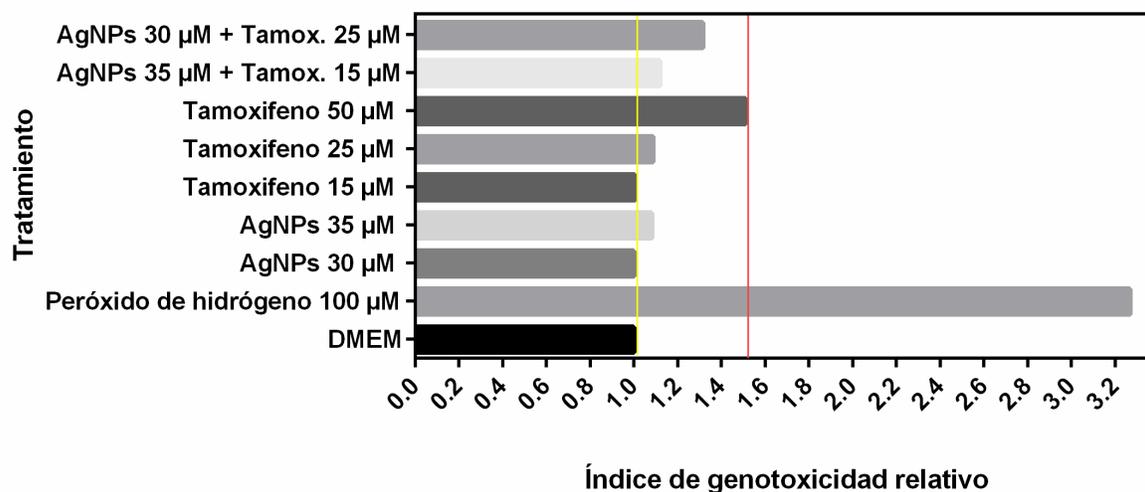


Figura 23. Actividad genotóxica los controles individuales y de las combinaciones de AgNPs y tamoxifeno con efecto sinérgico antiproliferativo en la línea celular MDA-MB-231.

Tabla 12. Índice de genotoxicidad los controles individuales y de las combinaciones de AgNPs y tamoxifeno con efecto sinérgico antiproliferativo en la línea celular MDA-MB-231.

Tratamiento	Índice de genotoxicidad
DMEM (C-)	1.0
AgNPs 30 μM	1.0
AgNPs 35 μM	1.082
Tamoxifeno 15 μM	1.005
Tamoxifeno 25 μM	1.088
Tamoxifeno 50 μM	1.51
AgNPs 35 μM + Tamoxifeno 15 μM	1.119
AgNPs 35 μM + Tamoxifeno 25 μM	1.316
H ₂ O ₂ 100 μM (C+)	3.269

Capítulo 4. Discusiones

4.1 Efecto del tamoxifeno y de las AgNPs, y de sus combinaciones en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231

En este trabajo se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de mama: MCF-7 y MDA-MB-231, la razón de estudiarlas, es que las células MCF-7 son el modelo más utilizado en el mundo para investigación, ya que presentan un inmunoperfil ER+, PR+, HER2⁻. Es importante considerar que aproximadamente el 75% de los tumores son ER+ y por lo tanto, las células MCF-7, al ser positivas a receptores de estrógeno, presentan sensibilidad al fármaco tamoxifeno (Ahmad, 2018). El tamoxifeno es un fármaco que induce muerte celular por apoptosis y su mecanismo de acción se basa en su transformación a 4-hidroxi-tamoxifeno y endoxifeno, ambos compuestos contribuyen al bloqueo de los receptores de estrógeno, con lo que se impide que se formen los complejos estrógeno-receptor de estrógeno y reclutamiento de coactivadores transcripcionales para estimular la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular. Además de ello, el tamoxifeno también es capaz de inducir estrés oxidativo (Yang et al., 2013).

Para evidenciar estos efectos y con el objetivo de evaluar la citotoxicidad del fármaco tamoxifeno en un rango de concentración de 15 a 100 μM en las células MCF-7, se realizaron ensayos de citotoxicidad *in vitro*. El análisis de los resultados obtenidos, reveló que existe una reducción de la viabilidad celular dependiente de la concentración del tamoxifeno añadido al cultivo. Este resultado es congruente pues la línea celular MCF-7, expresa receptores de estrógeno y es susceptible al tamoxifeno. Por lo que, en un tiempo de incubación de 24 hrs, fue posible observar una reducción de la viabilidad celular desde la menor concentración de tamoxifeno empleada en los ensayos (15 μM). A partir de la adición de 30 μM de fármaco a los cultivos, fue posible determinar una reducción de la viabilidad de más del 50%; y desde los 45 μM de tamoxifeno se reportaron viabilidades de aproximadamente 20%, indicativos de una citotoxicidad franca. Para confirmar los resultados de los ensayos MTT se tomaron micrografías a los cultivos con y sin los tratamientos empleados (anexo 1).

Con estos resultados, se determinó una IC_{50} de $29.18 \pm 2.67 \mu\text{M}$, este valor es comparable con el publicado por el grupo de Abu en el 2014 (Abu, et al., 2014) donde se reportó una IC_{50} de $24.76 \pm 0.80 \mu\text{M}$.

La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, tiene una expresión muy baja de receptores de estrógeno y se ha reportado que presenta un inmunoperfil ER-, PR-, HER2-. En este trabajo, se evaluó la citotoxicidad del fármaco tamoxifeno en estas células en un rango de 15 a 100 μM ; después de analizar los resultados de los ensayos de citotoxicidad, se observó que existe una reducción de la viabilidad celular que fue dependiente de la concentración de tamoxifeno añadido al cultivo. Debido a que la línea celular MDA-MB-231, exhibe una muy baja expresión de receptores de estrógeno (ER-), su susceptibilidad al fármaco tamoxifeno es en concentraciones altas, por lo que exhiben una baja citotoxicidad en un tiempo de incubación de 24 hrs a concentraciones entre 15 y 20 μM del fármaco. En consecuencia, se reportaron viabilidades similares a las del control negativo (células vivas, sin tratamiento). A partir de 25 μM de tamoxifeno, el efecto antiproliferativo comenzó a ser evidente. Se reportó una reducción de la viabilidad celular de hasta 70% (100 μM de tamoxifeno) concentración con indicio de letalidad. Para confirmar los resultados de los ensayos MTT se tomaron micrografías a los cultivos con los tratamientos de tamoxifeno empleados, se utilizó las micrografías del control negativo (100% de células vivas, sin tratamiento) y del control positivo (células con tratamiento de DMSO absoluto) como referencias comparativas de cada imagen registrada de los tratamientos y se determinó una IC_{50} de $44.76 \pm 2.33 \mu\text{M}$. Estos resultados son comparables con un trabajo publicado por el grupo de (Samadi, et al., 2014), donde se reportó una IC_{50} de 50 μM , que es un resultado por arriba del obtenido en este trabajo.

Después de comparar los resultados registrados en ambas líneas celulares, la MCF-7 fue la que presentó mayor susceptibilidad al tamoxifeno, esto se debe a que responde de manera más efectiva al fármaco mediante el bloqueo de los receptores de estrógeno. La línea celular MDA-MB-231 tiene una menor susceptibilidad debido a que presenta una expresión muy baja de estos receptores. El grupo de Zheng evaluó la respuesta de las células MDA-MB-231 y MCF-7 en concentraciones de 7 μM de tamoxifeno y determinaron que existe muerte en las células MCF-7, pero no en las MDA-MB-231 (Zheng, 2007). De acuerdo con Ferlini y colaboradores, la razón por la que se observó muerte en las células MDA-MB-231 fue mayoritariamente por la inducción de estrés oxidativo (Ferlini et al., 1999).

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son el nanomaterial con mayor número de aplicaciones comerciales y biomédicas debido a sus amplias propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Lara et al., 2011; Ge et al., 2014), por esta razón, la exposición a este tipo de nanomaterial es elevada y justifica el estudio de su citotoxicidad en sistemas biológicos. Además, las AgNPs, también han sido estudiadas como agentes antiproliferativos en distintas líneas celulares de mamíferos que incluyen, entre otros, glioblastoma humano (U251), células pluripotentes de carcinoma testicular humano (NT2), células de hepatocarcinoma humano (HepG2), células normales de fibroblastos de pulmón humano (IMR-90) y células mononucleares

de sangre periférica humana normal (PBMC) (Davis et al., 2008; AshaRani et al., 2009; Jing et al., 2011; Asare et al., 2012; Wang et al., 2013; Martinez-Paino et al., 2015), encontrándose que las AgNPs inducen citotoxicidad concentración-dependiente en esas líneas celulares evaluadas.

Después de realizar la caracterización del tamaño de las tres muestras de AgNPs comerciales (Nanostructured & Amorphous Materials Inc), se observó que las muestras "A" y "B" presentaron agregaciones superiores a los 100 nm y hasta el orden de los micrómetros. Así que, como primer resultado se demostró que las muestras "A" y "B" de AgNPs son material particulado que no tiene las características propias de un nanomaterial. Esto se verificó a su vez, debido a que los resultados de la medición del plasmón de resonancia superficial de estas muestras, no correspondía al patrón típico de la plata el cual tiene una absorbancia entre los 405 y los 430 nm. La agregación de las muestras A y B, puede explicar su nulo efecto citotóxico en las líneas de cáncer de mama evaluadas en este trabajo.

Para el caso de la muestra "C" de AgNPs, se corroboró mediante TEM que su morfología era esférica y su tamaño tenía un diámetro promedio de 60 nm, el cual coincidió con el radio hidrodinámico de 68.82 nm obtenido mediante la técnica de DLS, por lo que es posible confirmar que la muestra tiene un tamaño nanométrico por ser menor de los 100 nm. Así mismo, se corroboró el plasmón de resonancia superficial de estas AgNPs el cual presentó un pico máximo de absorbancia máximo a los 420 nm, el cual es típico de las nanopartículas. Este último resultado es comparable con un trabajo publicado por el grupo de Ostad en el 2010, donde se sintetizaron AgNPs mediante la técnica de reducción química y se caracterizaron mediante espectrofotometría de UV-Vis donde se registró un máximo pico de absorbancia a los 420 nm (Ostad et al., 2010). De acuerdo con los datos obtenidos por Salari en el 2019 y Sastry en el 1997, este pico de absorbancia es atribuido al fenómeno de plasmón de resonancia superficial que está muy bien identificado en varias nanopartículas esféricas de plata con tamaños desde 2 nm hasta 100 nm de diámetro (Salari et al., 2019; Sastry et al., 1997).

La citotoxicidad de las tres diferentes muestras de AgNPs se evaluó en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos por el cual son capaces de ocasionar citotoxicidad en las células de cáncer es mediante la internalización de las AgNPs o de los iones plata que se liberan de las mismas. En cualquier caso, esta interacción genera estrés oxidativo a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales lo que provoca la activación de la muerte celular por apoptosis (AshaRani et al., 2009; Juarez-Moreno et al., 2017).

Para evidenciar estos efectos en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, se evaluó la citotoxicidad de las tres muestras de AgNPs en un rango 15 a 100 μM . Para ambas líneas celulares que fueron tratadas con las muestras "A" y "B", se reportó disminución de la viabilidad celular a partir de los 100 μM y hasta los 1000 μM (esta última concentración como la máxima empleada), en las que se observó un ligero decremento conforme aumentó la concentración de las muestras, sin embargo, no fue posible reportar concentraciones letales en ninguno de los casos. Sin embargo, la IC_{50} de las muestras "A" y "B" en las células MDA-MB-231 y MCF-7 estaba en el rango de los 1100 a los 1750 μM , que son concentraciones muy elevadas de material, por lo que ambas muestras fueron descartadas para continuar los experimentos de este trabajo.

Por otro lado, fue evidente el efecto antiproliferativo de la muestra "C", correspondiente a las AgNPs de 68 nm, por lo que fue posible calcular los valores de IC_{50} , para las células MDA-MB-231 ($52.635 \pm 1.11 \mu\text{M}$) y para las MCF-7 ($48.66 \pm 3.21 \mu\text{M}$). Al comparar estos valores, se determinó que la línea celular MCF-7 es más susceptible a las AgNPs, debido a que se necesitó una menor concentración de éstas para reducir la viabilidad celular y obtener un 50% de muerte celular. Además, se realizó una comparativa de las IC_{50} obtenidas en este proyecto con respecto a la información disponible en la literatura donde se utilizaron AgNPs en combinación con otros fármacos (tabla 13). Los grupos de Kovács, Fahrenholtz y Gopisetty, utilizaron diferentes diámetros de nanopartícula y líneas celulares, para evaluar la IC_{50} (exceptuando a Gopisetty, quien trabajó con células MCF-7), en los tres casos, se reportaron unas IC_{50} , mayores a las obtenidas en este proyecto, por lo que los resultados anteriores permitieron decidir que en este caso, la muestra "C" de AgNPs de 68 nm de diámetro, es la mejor para realizar los ensayos de combinación.

Tabla 13. Comparativa de los valores de IC_{50} calculados para diferentes AgNPs reportado por otros autores.

Autores, año	Diámetro de partícula	IC_{50}	Línea celular
Kovács, et al. (2016).	28 nm	60 μM 60 μM	Colo 205 Colo 320 (cáncer de colon)
Fahrenholtz, et al. (2017).	24.1 nm	67 μM 88 μM 2966 μM	A2780 SKOV3 OVCAR3 (cáncer de ovario)
Gopisetty et al. (2019)	75 nm	260 μM 414 μM	MCF-7 MCF-7/KCR (cáncer de mama)

Al considerar los trabajos reportados por Fahrenholtz y Kovács (Fahrenholtz et al., 2017; Kovács et al., 2016), en donde encontraron que las AgNPs pueden tener un efecto sinérgico antiproliferativo en combinación con fármacos anticancerígenos en células de cáncer de ovario y colon, es que surgió la idea de combinar las AgNPs con fármacos antineoplásicos en células de cáncer de mama que tengan una sensibilidad intrínseca disminuida hacia la terapia con el tamoxifeno.

Esta fue una de las razones por la que en este trabajo se seleccionaron concentraciones menores a la IC_{50} del fármaco tamoxifeno y de las AgNPs para los ensayos de combinación. Otro punto muy importante que se tomó en cuenta, fue utilizar concentraciones de tamoxifeno que de acuerdo con la literatura tuvieran una genotoxicidad baja (Liapis et al., 2008).

En relación al efecto citotóxico de la combinación de las AgNPs y el tamoxifeno, en la línea celular MDA-MB-231 se utilizaron concentraciones de 30 a 45 μ M de AgNPs junto con 15 a 27 μ M de fármaco, en todas las combinaciones, se observó una mayor proporción de muerte celular en comparación con la suma de los controles individuales de AgNPs o de fármaco, por lo que es claramente un efecto de potenciación de la muerte celular. Además, se observó una disminución de la viabilidad celular similar en las combinaciones de 25 y 27 μ M de tamoxifeno con 30, 35, 40 y 45 μ M de AgNPs. Entonces, fue posible determinar que 25 μ M de tamoxifeno resultó ser un mejor tratamiento de combinación en comparación con 27 μ M ya que se requirió de menor cantidad de materia para obtener el mismo efecto. Sin embargo, un resultado de gran interés fue el registrado de la combinación de 15 μ M de tamoxifeno en combinación con 35, 40 y 45 μ M de AgNPs ya que se obtuvieron valores de viabilidad celular por debajo del 50% (en la combinación más alta). Entonces, en la línea celular MDA-MB-231 fue posible optimizar el efecto del tamoxifeno utilizando concentraciones donde éste presenta un efecto limitado y baja genotoxicidad de acuerdo con la literatura.

Para el caso de la línea celular responsiva al tamoxifeno, se seleccionaron los rangos de concentraciones de 15 a 30 μ M de AgNPs en combinación con el rango de concentraciones de 10 a 20 μ M de tamoxifeno. En todas las combinaciones, se observó una mayor proporción de muerte celular en comparación con la suma de los controles individuales de AgNPs y tamoxifeno. Cabe destacar que las concentraciones donde se determinó una viabilidad celular próxima al 50% fueron las de 15 μ M de tamoxifeno en combinación con 25 y 30 μ M de AgNPs. Así mismo, las combinaciones de 20 μ M de tamoxifeno con 25 y 30 μ M de AgNPs provocaron una viabilidad celular menor a la IC_{50} . Por lo tanto, esto permitió optimizar el efecto citotóxico del tamoxifeno utilizando concentraciones donde, de acuerdo a los reportes publicados, exhibe un bajo efecto genotóxico. Dado que el efecto de las combinaciones era claramente citotóxico, se decidió evaluar

de forma adicional a este trabajo de tesis, si estos tratamientos tienen un potencial efecto antiproliferativo, para lo cual se llevaron a cabo ensayos de formación de colonias, como se observa en el Anexo 2, fue posible comprobar que los tratamientos de la combinación de las AgNPs con el tamoxifeno no sólo tienen un efecto citotóxico, sino que también son antiproliferativos. Sin embargo, es necesario realizar un mayor número de experimentos para corroborar estos hallazgos.

4.2 Efecto sinérgico en las células MCF-7 y MDA-MB-231, su significancia biológica y limitaciones del modelo de interacción de Chou-Talalay

En la farmacología médica, el sinergismo se define como un incremento en la actividad de dos o más agentes anti-efectivos al ser administrados de manera conjunta, el cual es mayor que la suma de la actividad de los agentes administrados de forma separada. Aún cuando las atribuciones de los resultados mostrados en este trabajo son interpretados como sinergismo clásico (Manjunath et al., 2015), es necesario cuantificar este efecto tal como lo propone Chou en un amplio número de trabajos (Chou, 1984, 2006, 2010, 2014, 2019). Por esta razón, fue necesario utilizar los modelos matemáticos presentes en el software COMPUSYN desarrollado por el mismo autor para determinar mediante los resultados de los estudios de citotoxicidad *in vitro*, aquellas concentraciones de AgNPs y tamoxifeno que en conjunto, permitieron optimizar y potenciar su efecto antiproliferativo; y a su vez, obtener el coeficiente de interacción (adición, sinergia o antagonismo) para dicha combinación.

Los resultados generados mediante el software COMPUSYN, evidenciaron las concentraciones con un efecto sinérgico entre las AgNPs y el tamoxifeno en las células MDA-MB-231, que fueron las de 30 μM de AgNPs en combinación con 25 μM de tamoxifeno y 35 μM de AgNPs con 15 μM de tamoxifeno. Para la línea celular MCF-7 se determinó un efecto sinérgico en la combinación de 20 μM de AgNPs con 10 μM de tamoxifeno. Estos resultados fueron de gran interés, debido a que fue posible encontrar y cuantificar sinergismo mediante el modelo más citado de interacción de fármacos.

Hasta la fecha el modelo de interacción de fármacos de Chou-Talalay, es el mejor para identificar los efectos aditivo, antagónico o sinérgico de las combinaciones entre dos compuestos. A pesar de ello, presenta algunas limitantes, principalmente porque está basado en un modelo lineal, sin embargo, los mecanismos moleculares de la dinámica de fármacos dentro de la célula, no ocurren de manera lineal. Por lo que para determinar de forma más acertada este tipo de interacciones, es necesario utilizar otros

modelos computacionales como *Machine learning*. Otra limitante adicional es que este modelo de interacción de fármacos, no explica la razón por la que tales efectos suceden.

Para tratar de explicar los mecanismos moleculares por los que las AgNPs son citotóxicas, Zielinska y colaboradores reportaron en el 2016 que estas nanopartículas tienen la habilidad de generar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, incrementando así el estrés oxidativo y daño celular provocado por oxidantes como peroxinitrito (ONOO-) y dióxido de nitrógeno (Zielinska et al., 2016). El tamoxifeno, también converge utilizando este mecanismo molecular, pues es capaz de activar el proceso de apoptosis celular mediante la generación de peroxinitrito (Yang et al., 2013). Por lo tanto, es posible proponer que la combinación entre las AgNPs y el tamoxifeno en las células de cáncer de mama MDA-MB-231, indujo un efecto sinérgico de muerte celular debido al incremento potenciado en la generación de las especies reactivas de oxígeno y en consecuencia un incremento de la señal de activación de la ruta apoptótica.

En relación al efecto sinérgico encontrado para la combinación de AgNPs y tamoxifeno en la línea celular MCF-7, existe la posibilidad de que este efecto se deba a una contribución dual por parte de las AgNPs y el fármaco, para incrementar la producción de ROS. Aunado a ello, el bloqueo de la unión del estradiol o estrógeno a los receptores nucleares de estrógeno (ER) por parte del tamoxifeno, también podría contribuir a la inhibición de la proliferación celular (Ahmad, 2018; Yang et al., 2013), es por ello que las concentraciones tanto de AgNPs como de fármaco que se requieren para obtener un efecto citotóxico considerable, son mucho menores (20 μ M AgNPs + 10 μ M tamoxifeno) que las que se requieren para la línea celular MDA-MB-231 (30 μ M de AgNPs + 15 y 25 μ M de tamoxifeno).

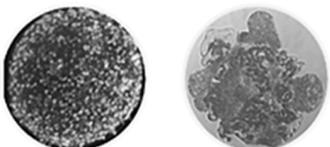
Como perspectiva en este punto y de forma adicional a los objetivos de este trabajo, se realizaron de forma preliminar algunos experimentos mediante citometría de flujo para medir la generación de especies reactivas de oxígeno y reforzar el mecanismo de acción propuesto del efecto sinérgico entre las AgNPs y el tamoxifeno (Ver anexo 3). Se espera que en ambas líneas celulares expuestas a las combinaciones donde se determinó un efecto sinérgico, se obtenga una mayor inducción de especies reactivas de oxígeno en comparación con los controles individuales. Hasta ahora, se ha logrado obtener, que para la línea celular MCF-7, existe una mayor inducción de especies reactivas de oxígeno (20 μ M AgNPs + 10 μ M tamoxifeno) en comparación con los controles de AgNPs y fármaco independiente.

Algunos de los resultados obtenidos con el modelo de Chou-Talalay para determinar el tipo de interacción entre las distintas combinaciones de AgNPs y fármaco tamoxifeno, en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7, fueron menores a 1 ($CI < 1$). De acuerdo con el modelo de Chou-Talalay, estos

valores fueron interacciones de antagonismo. Sin embargo, de acuerdo con la ecuación de Gaddum, el antagonismo se da por la competencia entre el fármaco "A" y el fármaco "B" hacia el mismo receptor celular, provocando así, que uno desplace la afinidad del otro, y por lo tanto se obtenga una inhibición del efecto cuantitativo (P.Kenakin, 2019). En este caso, las AgNPs no presentan una afinidad específica hacia el receptor de estrógeno, por lo que los valores por arriba de la línea de aditividad (CI=1) se consideraron como valores no sinérgicos, en vez de antagonistas.

Otro punto importante es que estos efectos fueron observados y cuantificados en modelos bidimensionales (2D) de cultivo celular, sin embargo, cada día se reportan mayores evidencias que apuntan a que los cultivos tridimensionales (3D) como los esferoides y los organoides son más precisos para evaluar el efecto citotóxico de los fármacos y nanomateriales, ya que debido al arreglo de su arquitectura, las respuestas celulares derivadas de ésta, son más similares a aquellas que se encuentran *in vivo*. Es por ello que se plantea que estas mismas combinaciones de AgNPs y fármaco tamoxifeno, se pueda evaluar en modelos tridimensionales como los esferoides. En la Tabla 14, se comparan las características de los modelos de cultivos celulares bidimensionales y tridimensionales de acuerdo con una revisión realizada por Edmondson y colaboradores en el 2014 (Edmondson et al., 2014).

Tabla 14. Comparación de los modelos de cultivos celulares bidimensionales y tridimensionales. Modificado de Edmondson, 2014.

		
	Modelos celulares en 2D	Modelos celulares en 3D
Consideraciones de cultivo		
Morfología celular	Anormal: se encuentran en forma plana y extendida; forman una monocapa	Natural: juntas forman una forma esferoidal/estructuras agregadas
Genoma	Discordancia con las firmas de expresión génica <i>in vivo</i>	Patrones de expresión <i>in vivo</i> más representativos
Condiciones de cultivo	Exposición uniforme al medio de cultivo (y fármacos)	Las restricciones de difusión provocan una exposición diferente en todo el sistema 3D
Sensibilidad a fármacos	Hipersensible al tratamiento farmacológico y escasa correlación de respuestas fisiológicas	Presentan mayor resistencia a los fármacos por lo que presentan una predicción mejorada de respuesta <i>in vivo</i> a fármacos
Complejidad	Baja; fácil de utilizar	Mediana; nivel de dificultad alto

Hoy en día en el área clínica se sabe que el tamoxifeno ayuda a disminuir la ocurrencia de pacientes con cáncer de mama positivo a receptores de estrógeno (ER+). En una revisión realizada por Brown en el 2009, se destacó que en una prueba clínica realizada por la institución The Royal Marsden (Reino Unido), se comparó la incidencia de mujeres con cáncer de mama ER+ al ser tratadas con tamoxifeno en comparación con pacientes con cáncer de mama ER-. Como se muestra en la figura 24, al utilizar como control pacientes tratadas con placebo, se determinó que el tratamiento con el tamoxifeno contribuye a reducir la incidencia del cáncer de mama en pacientes ER+, sin embargo no produce un cambio en pacientes ER- (Brown, 2009).

Entonces, al comparar los resultados obtenidos por Brown en el 2009, es importante hacer mención de que, en este trabajo, se logró que la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con perfil ER-, se sensibilizara al fármaco tamoxifeno, que normalmente es inefectivo o bajamente efectivo para este tipo de células. Es importante mencionar, además, que el cáncer de mama triple negativo representado por las células MDA-MB-231 es uno de los más agresivos, pues ocasiona un alto índice de metástasis y resistencia a fármacos. Esto constituye otra justificación por la cual es necesario combinar fármacos antineoplásicos con AgNPs, y para el caso del cáncer de mama ER-, este tipo de formulaciones podría ayudar para el estudio *in vitro* e *in vivo* de esta enfermedad, por lo que se sugiere que se elijan fármacos que presenten una mayor actividad o que sean de primera línea, para que se requiera de una menor concentración y por consiguiente, se logre minimizar la toxicidad sistémica (Palmer, 2017).

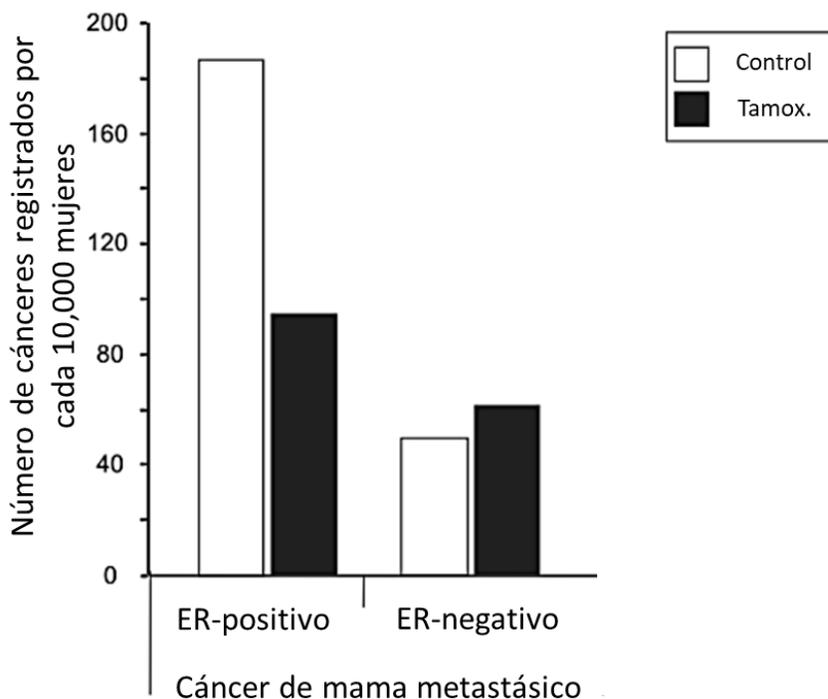


Figura 24. Número de cánceres invasivos por cada 10 000 mujeres. Los controles corresponden a mujeres tratadas con placebo. Modificado de Brown, 2009.

4.3 Ensayos preliminares de la expresión de los genes TP53 Y SOD1 en las células en las células MDA-MB-231

Como un análisis preliminar se utilizó la técnica de qPCR, para tratar de identificar si los niveles de transcripción de los genes TP53 y SOD1 eran diferentes en las células MDA-MB-231 expuestas a las combinaciones donde se encontró un efecto sinérgico mediante el modelo de interacción de Chou – Talalay, en comparación con las mismas células sin tratamiento. Con el propósito de determinar los niveles de transcritos de genes relacionados con la actividad antiproliferativa de la combinación de AgNPs y tamoxifeno en células de cáncer de mama. Los niveles de expresión fueron evaluados con relación al gen constitutivo, GAPDH, esto se basó en los trabajos previamente reportados (Gopisetty et al., 2019; Kóvacs et al., 2015).

En este caso se evaluó el nivel de transcritos del gen TP53, el cual codifica para la proteína P53, que actúa como factor de transcripción, controlando la expresión de genes involucrados en procesos celulares importantes como la detección de daño y reparación del ADN, arresto del ciclo celular, es por lo tanto, uno

de los principales mediadores de la activación de la cascada de señalización de la apoptosis celular (Yue et al., 2017). Al analizar los resultados preliminares, es posible sugerir que la cantidad del transcrito de TP53 era 10 veces mayor en las células incubadas con el tratamiento de 30 μM de AgNPs en combinación con 25 μM de tamoxifeno, en comparación al control de células sin tratamiento (transcripción basal). Sin embargo, debido a los errores de la técnica, es necesario repetir estos experimentos, para poder obtener resultados confiables de los análisis por qPCR. A pesar de ello, es posible sugerir que al estar incrementando el nivel de expresión de la proteína P53, producto del gen TP53, la cual está relacionada con la activación y modulación de la muerte celular mediada por apoptosis, el incremento en su expresión, en las combinaciones de las AgNPs y el tamoxifeno, sugiere que estos tratamientos podrían estar involucrados en la inducción de la muerte celular por apoptosis. Estos resultados se pueden relacionar con los cambios morfológicos que son evidentes en las células MDA-MB-231, que han sido expuestas a dichos tratamientos (anexo 1); en los que se observó que las células eran mucho más pequeñas y redondeadas, además de que había un gran número de células desprendidas de la caja de cultivo, todos estos cambios son signos francos de muerte celular.

Por otra parte, se evaluó el nivel de transcritos del gen SOD1, que codifica para la enzima superóxido dismutasa 1, la cual está involucrada en los procesos apoptóticos que ocurren en el citoplasma. SOD1 contribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) las cuales provocan disfunción de la mitocondria y liberación de citocromo c para activar la muerte celular por apoptosis (Zundert, et al., 2017). Los resultados preliminares obtenidos, no fueron concluyentes, debido a distintos errores en la técnica posterior a la purificación del ARN y el qPCR. Sin embargo, los resultados muy preliminares pueden sugerir que la expresión de SOD1 es mayor en las células MDA-MB-231 expuestas al tratamiento de 30 μM de AgNPs en combinación con 25 μM de tamoxifeno. No se siguió el protocolo correcto para el procedimiento de qPCR, es posible que no se hayan obtenido las mismas eficiencias entre los genes de interés y el gen de referencia al momento de cuantificar el nivel de transcritos. Una limitante al llevar a cabo estas mediciones, es que las muestras de ARN de células de cáncer de mama expuestas a las concentraciones de efecto sinérgico tienen una mala calidad, debido a que la muerte celular inducida en estos tratamientos es muy grande, limitando así la cantidad de células vivas de las cuales se pueda aislar ARN en una cantidad adecuada y de buena calidad. Por lo tanto, es necesario establecer las mejores condiciones respecto al tiempo de incubación de las células MDA-MB-231 con los tratamientos combinados de AgNPs y tamoxifeno, para obtener una cantidad adecuada de células que estén iniciando el proceso de muerte celular y sea posible medir la transcripción de los genes asociados a la generación de especies reactivas de oxígeno y apoptosis. Para ello, como una perspectiva a este trabajo, sería realizar una curva de tiempo-respuesta en relación a los tratamientos combinados, para

establecer el tiempo en el que las células inician con el proceso de muerte celular (apoptosis temprana). De esta forma, sería posible establecer cuáles son los mejores tiempos de incubación con las combinaciones de las AgNPs y el fármaco tamoxifeno, para que el efecto de la muerte celular no sea tan abrupto y pueda ser posible obtener una cantidad adecuada de células para el aislamiento del ARN en una calidad óptima y cuantificar mejor el nivel de transcritos de los genes de interés.

Es así que, por el momento, sólo hay evidencias preliminares que apoyan que el gen TP53 se transcribe de forma mayoritaria en las células MDA-MB-231 expuestas a 30 μM de AgNPs en combinación con 25 μM de tamoxifeno, lo que coincide con los ensayos de viabilidad celular por reducción del MTT y los cambios morfológicos observados en las células expuestas a esos tratamientos. Es necesario, entonces realizar experimentos adicionales para comprobar que los niveles de ROS en esos tratamientos estén aumentados y de esta forma, explicar un posible mecanismo por el cual se observa la sinergia en los procesos de muerte celular en esta combinación.

4.4 Daño genotóxico generado en las células MDA-MB-231 por la exposición a los tratamientos de las combinaciones de AgNPs y tamoxifeno con efecto sinérgico

Se realizó la evaluación del daño genotóxico de las células MDA-MB-231 expuestas a los tratamientos donde se determinó un efecto citotóxico sinérgico con las combinaciones de AgNPs y tamoxifeno, y se comparó con el daño genotóxico inducido en las células por los componentes individuales, demostrando con ello un bajo daño genotóxico. Se utilizó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como control positivo de genotoxicidad debido a que es un intermediario de las especies reactivas de oxígeno, y se sabe que causa daño al DNA en varios tipos de células, entre ellas células de humano. El H_2O_2 es producido en varios procesos fisiológicos (fosforilación oxidativa, por ejemplo). El H_2O_2 es una fuente natural de daño oxidativo en las células, causando lesiones al DNA incluyendo rupturas de cadena sencilla y de doble cadena de DNA (Benhusein, 2010). Las concentraciones de 30 μM de AgNPs en combinación con el fármaco tamoxifeno a una concentración de 25 μM y la combinación de 35 μM de AgNPs con 15 μM de tamoxifeno, demostraron generar un menor daño genotóxico en comparación al daño registrado con el H_2O_2 . Además, de la concentración de 50 μM de tamoxifeno, como control positivo de genotoxicidad (Yilmaz et al., 2014). Cabe destacar que, de las combinaciones utilizadas, la concentración de 35 μM de AgNPs con 15 μM de tamoxifeno fue la que mostró menor genotoxicidad.

Con los resultados anteriores, se abre la oportunidad de estudiar y entender los mecanismos cito- y genotóxicos que ocasiona esta combinación en células de mamíferos y células de cáncer, con la posibilidad de utilizar este tipo de nanopartículas en futuras aplicaciones biomédicas en relación al tratamiento del cáncer, ya que, con el modelo de sinergismo de Chou-Talalay podría ser posible cuantificar sinergismo (o adición, antagonismo) en sistemas *in vitro*. Este modelo también es aplicable para determinar sinergismo *in vivo* y en fase clínica (fase I).

Capítulo 5. Conclusiones

Se determinó que existe un efecto antiproliferativo sinérgico *in vitro*, resultante de la combinación de AgNPs con el fármaco antineoplásico tamoxifeno en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.

Las AgNPs pueden potenciar el efecto antiproliferativo del tamoxifeno en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7.

Se determinó un efecto antiproliferativo sinérgico en las células MDA-MB-231 cuando las células fueron tratadas con dos combinaciones a) 35 μM de AgNPs con 15 μM de tamoxifeno y b) 30 μM de AgNPs con 25 μM de tamoxifeno.

Para la línea celular de cáncer de mama MCF-7, se determinó que la combinación del fármaco tamoxifeno a una concentración de 20 μM de AgNPs con 10 μM de tamoxifeno, presentó un efecto sinérgico antiproliferativo.

Se determinó preliminarmente un incremento del nivel de expresión del gen TP53 en la línea celular MDA-MB-231 con una exposición de 30 μM de AgNPs en combinación con 25 μM de tamoxifeno.

Las concentraciones de 30 μM de AgNPs en combinación con el fármaco tamoxifeno a una concentración de 25 μM y la combinación de 35 μM de AgNPs con 15 μM de tamoxifeno demostraron un bajo daño genotóxico en las células MDA-MB-231.

Este trabajo sienta las bases para futuros estudios de optimización de las concentraciones de AgNPs y fármacos antineoplásicos para el tratamiento de otros tipos de cáncer.

Literatura citada

- Abu, N., Akhtar, M. N., Yeap, S. K., Lim, K. L., & Ho, W. Y. (2014). Flavokawain A Induces Apoptosis in MCF-7 and MDA-MB231 and Inhibits the Metastatic Process In Vitro. *PLOS ONE*, *9*(10), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105244>
- Ahmad, I. (2018). European Journal of Medicinal Chemistry Tamoxifen a pioneering drug : An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *143*, 515–531. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.056>
- Ahmadian, E., Maleki, S., Rahimpour, E., & Hasanzadeh, A. (2018). Materials Science & Engineering C Effect of silver nanoparticles in the induction of apoptosis on human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Materials Science & Engineering C*, *93*(August), 465–471. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.027>
- American Cancer Society. (2018). Global Cancer Facts & Figures 4th. *Atlanta: American Cancer Society*, 76.
- Argiris, A., Wang, C. X., Whalen, S. G., & DiGiovanna, M. P. (2004). Synergistic Interactions between Tamoxifen and Trastuzumab (Herceptin). *Clinical Cancer Research*, *10*(4), 1409–1420. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1060-02>
- Asare, N., Instanes, C., Sandberg, W. J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M., & Brunborg, G. (2012). Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells. *Toxicology*, *291*(1–3), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.10.022>
- AshaRani, P. V., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*, *10*, 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-65>
- Brown, K. (2009). Is tamoxifen a genotoxic carcinogen in women? *Mutagenesis*, *24*(5), 391–404. <https://doi.org/10.1093/mutage/geb022>
- Buckley, M. M.-T., & Goa, K. L. (1989). Tamoxifen. *Drugs*, *37*(4), 451–490. <https://doi.org/10.2165/00003495-198937040-00004>
- C, M., Langer, A., & Frenk, J. (2008). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Reproductive Health Matters*, *16*(32), 1–12.
- Castrezana Campos, M. del R. (2017). Geografía del cáncer de mama en México. *Investigaciones Geograficas*, *2017*(93). <https://doi.org/10.14350/rig.56879>
- Chikarmane, S.H. Tirumani, S.A. Howard, J.P. Jagannathan, P. J. D. (2015). Metastatic patterns of breast cancer subtypes: What radiologists should know in the era of personalized cancer medicine. *Clinical Radiology*, *70*, 1–10. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.126.1.78>
- Chou, T.-C. (2006). Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews*, *58*(3), 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>

- Chou, T. (2019). *The Mass-Action Law Based Bio-Dynamics , Equations Digitalized Definitions in Drug Evaluation Guidance. 2019.*
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research, 70*(2), 440–446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
- Chou, T. C. (2014). Frequently asked questions in drug combinations and the mass-action law-based answers. *Synergy, 1*(1), 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.synres.2014.07.003>
- Chou, T. C. (2018). The combination index (CI < 1) as the definition of synergism and of synergy claims. *Synergy, 7*, 49–50. <https://doi.org/10.1016/j.synres.2018.04.001>
- Chou, T., & Talalay, P. (1984). Quantitative Dose-Effect Relationships : the Combined Effects of Multiple. *Advances in Enzyme Regulation, 22*, 27–55.
- Clémence, D., Robin, D., Pierre, D., Corinne, A., Claire, S., Christelle, B., ... Bamdad, M. (2017). Development and cytotoxic response of two proliferative MDA-MB-231 and non-proliferative SUM1315 three-dimensional cell culture models of triple-negative basal-like breast cancer cell lines. *Oncotarget, 8*(56). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20517>
- Collection, A. T. C. (2012). *Thawing, Propagation and Cryopreservation of NCI-PBCF-HTB26 (MDA-MB-231) Protocol* (Vol. 26).
- Comşa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research, 35*(6), 3147–3154.
- Davis, M. E., Chen, Z. G., & Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics : an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews, Drug Discovery, 7*(9), 771–782. <https://doi.org/10.1038/nrd2614>
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies 207, 12*(4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
- Fahrenholtz, C. D., Swanner, J., Ramirez-Perez, M., & Singh, R. N. (2017). Heterogeneous Responses of Ovarian Cancer Cells to Silver Nanoparticles as a Single Agent and in Combination with Cisplatin. *Journal of Nanomaterials, 1–11*. <https://doi.org/10.1155/2017/5107485>
- Ferlini, C., Scambia, G., Distefano, M., Filippini, P., Isola, G., Riva, A., ... Mancuso, S. (1997). Synergistic antiproliferative activity of tamoxifen and docetaxel on three oestrogen receptor-negative cancer cell lines is mediated by the induction of apoptosis. *British Journal of Cancer, 75*(6), 884–891. <https://doi.org/10.1038/bjc.1997.156>
- Ferlini, C., Scambia, G., Marone, M., Distefano, M., Gaggini, C., Ferrandina, G., ... Panici, P. B. (1999). Tamoxifen induces oxidative stress and apoptosis in oestrogen receptor-negative human cancer cell lines. *British Journal of Cancer, 79*(2), 257–263.
- Foran, T. (2011). First line of defence. *Nature Reviews Cancer, 471*(28), 27–28.
- Fraser, T. R. (1872). *An experimental research on the antagonism between the actions of physostigma and atropia*. [https://doi.org/DOI: https://doi.org/10.1017/S0370164600042565](https://doi.org/DOI:https://doi.org/10.1017/S0370164600042565)

- Ge, L., Li, Q., & Li, X. (2014). Nanosilver particles in medical applications : synthesis , performance , and toxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 4(9), 2399–2407.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hu, R., Hilakivi-Clarke, L., & Clarke, R. (2015). Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). *Oncology Letters*, 9(4), 1495–1501. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2962>
- INEGI. (2018). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. *Comunicado de Prensa, INEGI. México.*, 61(18), 1–13.
- J.Magee, Pamela, McGlynn, Hugh, R.Rowland, I. (2004). Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro. *Cancer Letters*, 208(1), 35–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.11.012>
- Jamróz, E., Kopel, P., Juszczak, L., Kawecka, A., Bytesnikova, Z., Milosavljević, V., ... Adam, V. (2018). *Development and characterisation of furcellaran-gelatin films containing SeNPs and AgNPs that have antimicrobial activity.* 83(Food Hydrocolloids 62 2017), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.028>
- Jing, M., Ah, K., Kyung, I., Sun, H., Kim, S., Yun, J., ... Won, J. (2011). Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*, 201(1), 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.010>
- Juarez-Moreno, K., Gonzalez, E. B., Girón-Vazquez, N., Chávez-Santoscoy, R. A., Mota-Morales, J. D., Perez-Mozqueda, L. L., ... Bogdanchikova, N. (2017). Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Human and Experimental Toxicology*, 36(9), 931–948. <https://doi.org/10.1177/0960327116675206>
- Kovács, D., Szoke, K., Igaz, N., Spengler, G., Molnár, J., Tóth, T., ... Kiricsi, M. (2016). Silver nanoparticles modulate ABC transporter activity and enhance chemotherapy in multidrug resistant cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(3), 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.015>
- Lara, H. H., Garza-treviño, E. N., Ixtepan-turrent, L., & Singh, D. K. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(30), 2–9.
- Liapis, E., Mcluckie, K. I. E., Lewis, P. D., & Farmer, P. B. (2008). *Mutagenicity of tamoxifen DNA adducts in human endometrial cells and in silico prediction of p53 mutation hotspots.* 36(18), 5933–5945. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn586>
- Manjunath, P. Pai, Mackenzie, L. Cottrell, Angela, D.M. Kashuba, Joseph, S. B. (2015). *19 - Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anti-infective Agents.*
- Maria-lêda, Martinez-Paino, & Zucolotto, V. (2015). Poly (vinyl alcohol) -coated silver nanoparticles : Activation of neutrophils and nanotoxicology effects in human hepatocarcinoma and mononuclear cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 614–621. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.12.012>

- McShan, Danielle, Ray, Paresh C., Yu, H. (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>
- Mukherjee, SG, O’Claonadh, N, Casey, A, Chambers, G. (2012). Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. *Toxicology in Vitro*, 26(2), 238–251.
- National Clinical Effectiveness Committee. Diagnosis, staging and treatment of patients with breast cancer: national clinical guideline no. 7. Recuperado en marzo de 2019 de: <https://www.lenus.ie/bitstream/handle/10147/577239/Nationalclinicalguidelinebreast.pdf?sequence=1>
- Organization, W. H. (2018). *International Agency for Research on Cancer*. (263), 13–15. Retrieved from http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=6&ages_group%5B%5D=13&nb_items=7&group_
- Ostad, S. N., Dehnad, S., Nazari, Z. E., Fini, S. T., Mokhtari, N., Shakibaie, M., & Shahverdi, A. R. (2010). Cytotoxic activities of silver nanoparticles and silver ions in parent and tamoxifen-resistant T47d human breast cancer cells and their combination effects with tamoxifen against resistant cells. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2(4), 187–196.
- Overgaard, Marie, Jensen, M.-B. (1999). Postoperative radiotherapy in high-risk postmenopausal breast-cancer patients given adjuvant tamoxifen: Danish Breast Cancer Cooperative Group DBCG 82c randomised trial. *The Lancet*, 353(9165), 1641–1648.
- P. Kenakin, T. (2019). *A Pharmacology Primer Chapter 4 - Pharmacological Assay Formats: Binding* (Fifth edit; A. Press, ed.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813957-8.00004-7>
- Palmer, A. C. (2017). Assessing drug synergy in combination therapies Laboratory of Systems Pharmacology Harvard Medical School Outline. *Icsb*.
- Park, MV, Neigh, AM, Vermeulen, JP, de la Fonteyne, LJ, Verharen, HW, Briedé, JJ, van Loveren, H, de Jong, W. (2011). The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32(36), 9810–9817. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.085>
- Patnaik, R., & Padhy, R. N. (2015). Probit analysis of comparative assays on toxicities of lead chloride and lead acetate to in vitro cultured human umbilical cord blood lymphocytes. *Interdisciplinary Toxicology*, 8(1), 35–43. <https://doi.org/10.1515/intox-2015-0007>
- R., Verpoorte, H.K., Kim, Y.H., C. (2018). Synergy: Easier to say than to prove. *Synergy*, 7, 34–35. <https://doi.org/.1037//0033-2909.i26.1.78>
- Rio, Donald, Ares, Manuel, Hannon, Gregory, Nilsen, T. (2010). Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. <https://doi.org/doi:10.1101/pdb.prot5439>
- Salari, S., Bahabadi, S. E., Samzadeh-Kermani, A., & Yosefzaei, F. (2019). In-vitro evaluation of antioxidant and antibacterial potential of green synthesized silver nanoparticles using prosopis farcta fruit extract. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(1), 430–445.

- Samadi, Nasser, Ghanbari, Parisa, Mohseni, Mahsa, Tabasinezhad, Maryam, Sharifi, Simin, Nazemieh, Hossein, Reza, Rashidi, M. (2014). Combination therapy increases the efficacy of docetaxel , vinblastine and tamoxifen in cancer cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(3), 715–721. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139152>
- Sastry, Murali, Mayya, K.S., Bandyopadhyay, K. (1997). pH Dependent changes in the optical properties of carboxylic acid derivatized silver colloidal particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 127(1–3), 221–228.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Turashvili, G., & Brogi, E. (2017). Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Frontiers in Medicine*, 4(December), 227. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00227>
- Wang, Y., Chen, H., Liu, Y., Wu, J., Zhou, P., Wang, Y., ... Zhang, N. (2013). Biomaterials pH-sensitive pullulan-based nanoparticle carrier of methotrexate and combretastatin A4 for the combination therapy against hepatocellular carcinoma. *Biomaterials*, 34(29), 7181–7190. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.081>
- Yang, G., Nowsheen, S., Aziz, K., & Georgakilas, A. G. (2013). Pharmacology & Therapeutics Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. *Pharmacology and Therapeutics*, 139(3), 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.05.005>
- Yilmaz, S., Gönenç, I. M., & Yilmaz, E. (2014). Genotoxicity of the some selective estrogen receptor modulators: A review. *Cytotechnology*, 66(4), 533–541. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9710-7>
- Zhang, Sulin, Li, Ju, Lykotrafitis, George, Bao, Gang, Suresh, S. (2009). Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles. *NIH Public Access*, 71(2), 233–236. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.182>
- Zheng, A., Kallio, A., & Ha, P. (2007). *Tamoxifen-Induced Rapid Death of MCF-7 Breast Cancer Cells Is Mediated via Extracellularly Signal-Regulated Kinase Signaling and Can Be Abrogated by Estrogen*. 148(6), 2764–2777. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1269>
- Zielinska, E., Tukaj, C., Radomski, M. W., & Inkielewicz, I. (2016). Molecular Mechanism of Silver Nanoparticles-Induced Human Osteoblast Cell Death : Protective Effect of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor. *PLOS ONE*, 11(10), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164137>

Anexo 1

Cambios morfológicos inducidos en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 por la exposición a diferentes concentraciones de AgNPs, fármaco tamoxifeno o sus combinaciones.

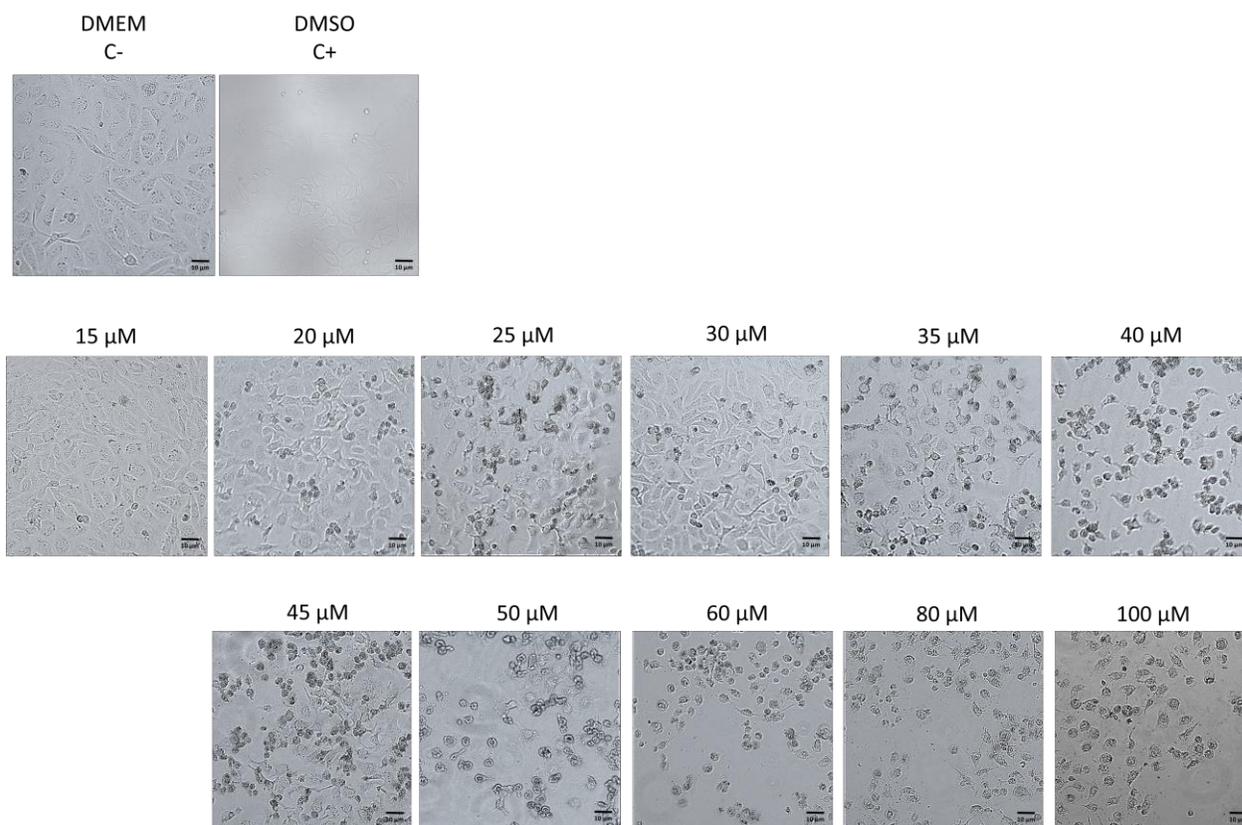


Figura 25. Evaluación morfológica de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de AgNPs en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con respecto al control negativo (células sin tratamiento). Observado mediante microscopía óptica a un aumento de 10x.

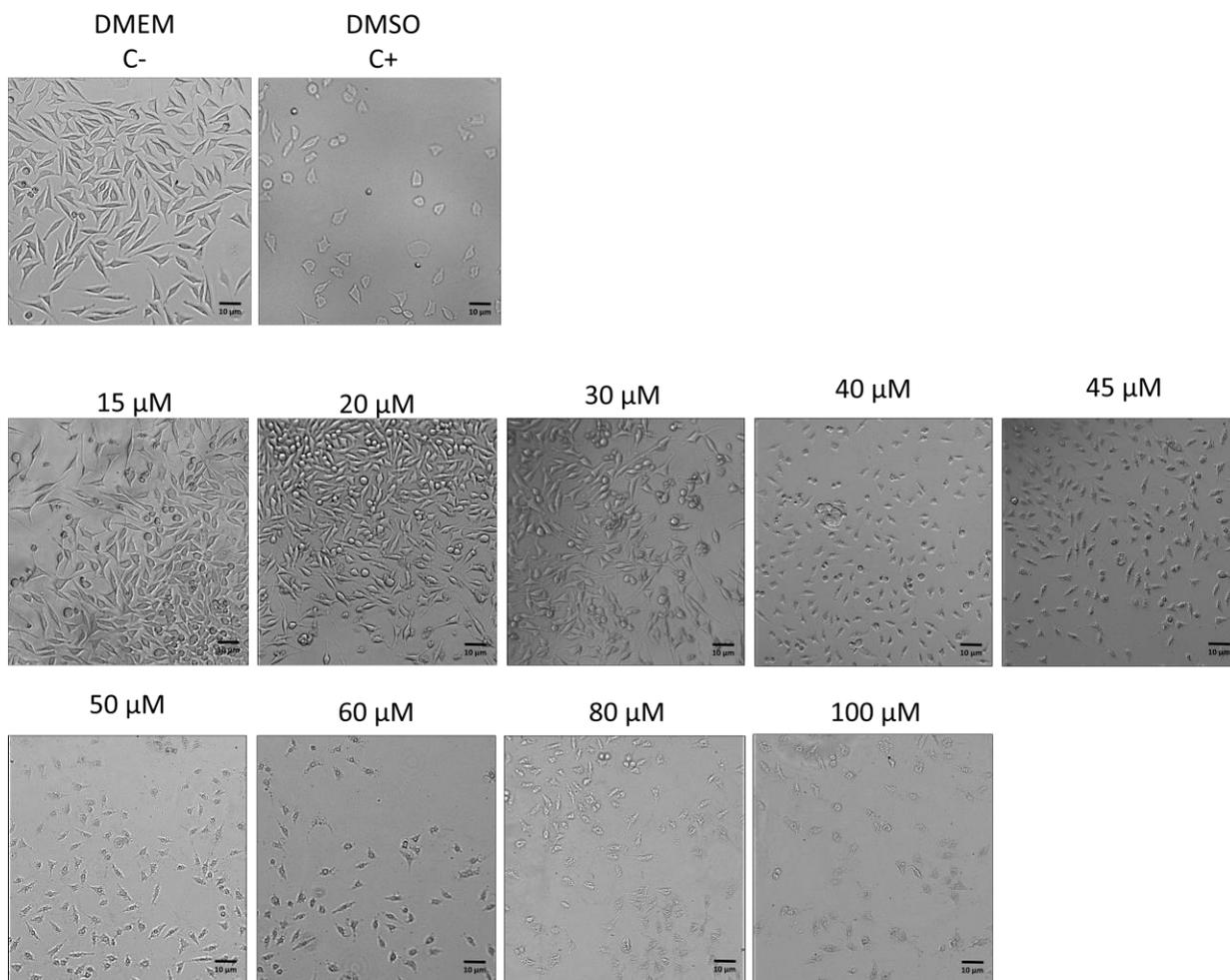


Figura 26. Evaluación morfológica de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de AgNPs en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con respecto al control negativo (células sin tratamiento). Observado mediante microscopía óptica a un aumento de 10x.

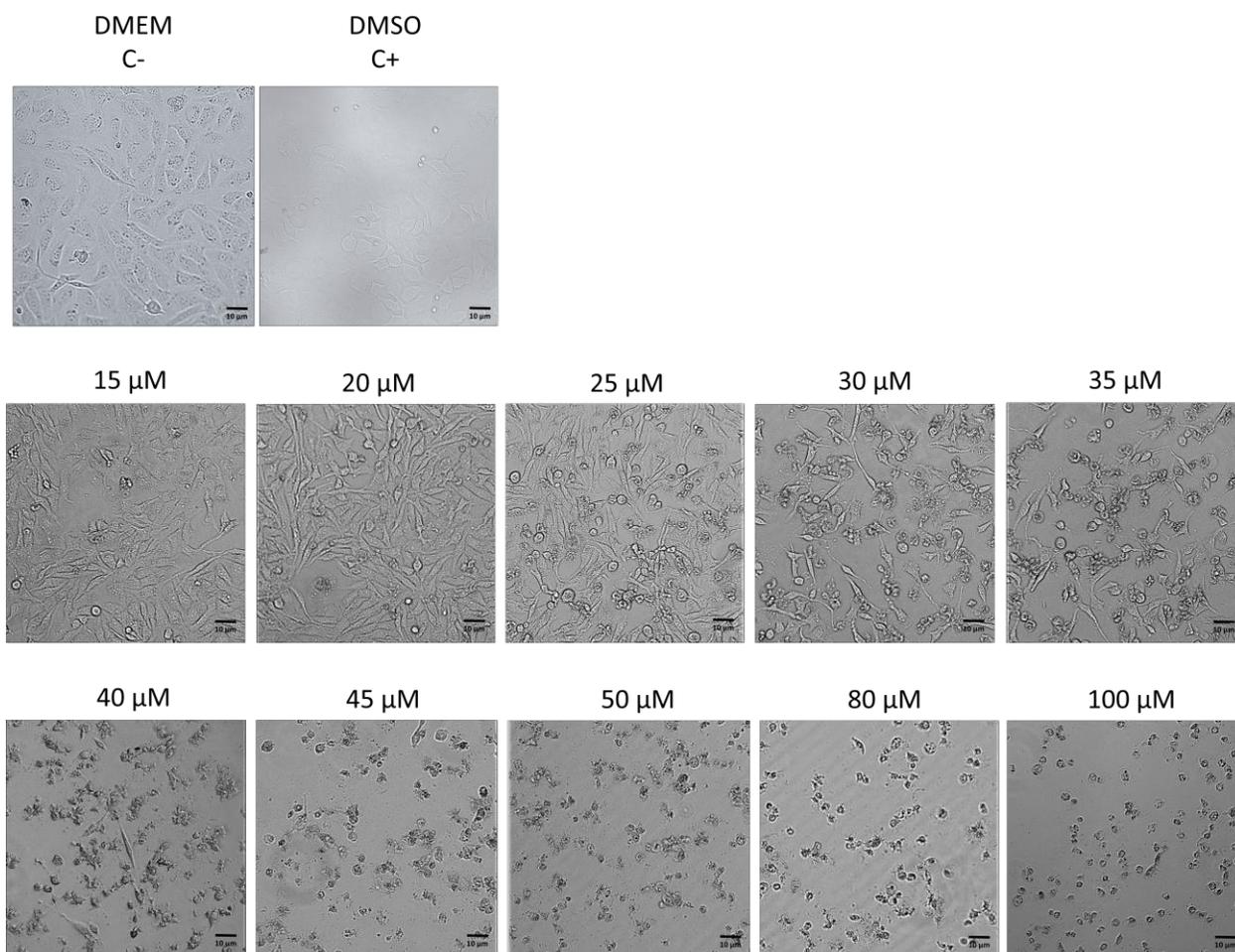


Figura 27. Evaluación morfológica de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de fármaco antineoplásico tamoxifeno en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con respecto al control negativo (células sin tratamiento). Observado mediante microscopía óptica a un aumento de 10x.

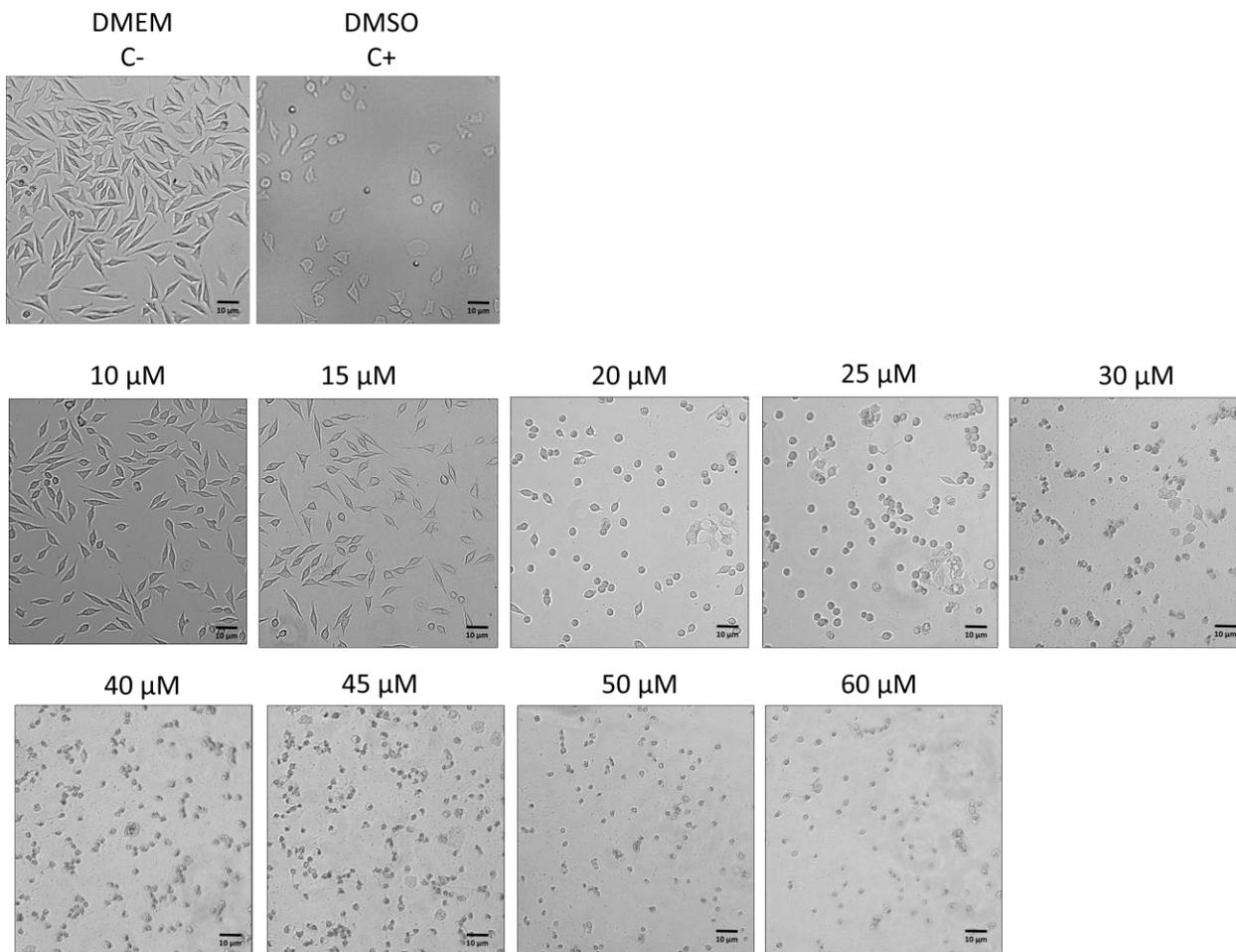


Figura 28. Evaluación morfológica de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de fármaco antineoplásico tamoxifeno en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con respecto al control negativo (células sin tratamiento). Observado mediante microscopía óptica a un aumento de 10x.

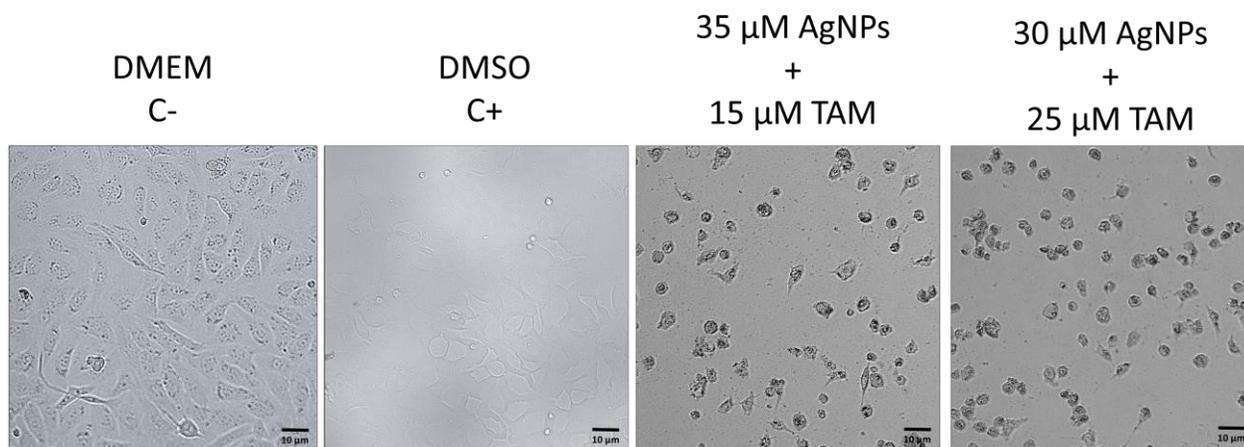


Figura 29. Evaluación morfológica de la citotoxicidad de las concentraciones de AgNPs en combinación con concentraciones del fármaco antineoplásico tamoxifeno que demostraron un efecto sinérgico de acuerdo con el modelo de interacción de Chou-Talalay en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, con respecto al control negativo (células sin tratamiento). Observado mediante microscopía óptica a un aumento de 10x.

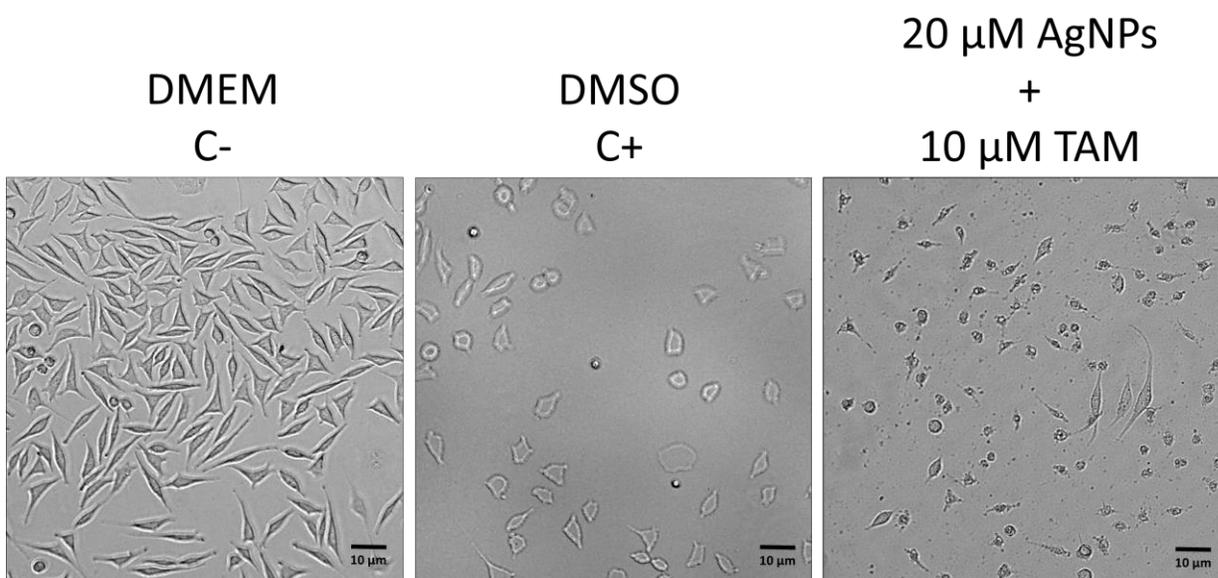


Figura 30. Evaluación morfológica de la citotoxicidad de las concentración de AgNPs en combinación con la concentración del fármaco antineoplásico tamoxifeno que demostró un efecto sinérgico de acuerdo con el modelo de interacción de Chou-Talalay en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, con respecto al control negativo (células sin tratamiento). Observado mediante microscopía óptica a un aumento de 10x.

Anexo 2.

Ensayos de ensayo de formación de colonias para evaluar el efecto antiproliferativo de las combinaciones de AgNPs y tamoxifeno en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7.

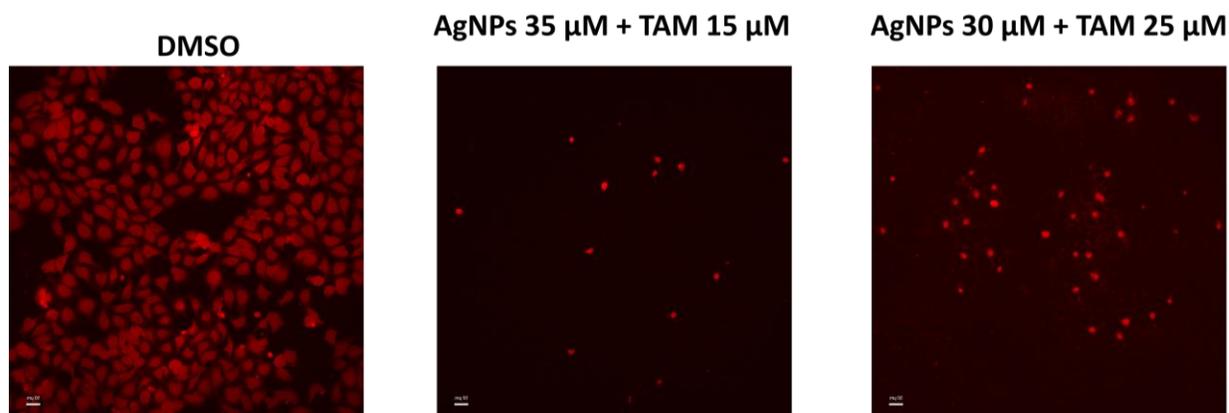


Figura 31. Ensayo de formación de colonias en la línea celular MDA-MB-231 expuestas a las combinaciones con efecto sinérgico de acuerdo con el modelo de interacción de Chou-Talalay. Observado mediante microscopía de fluorescencia a 100x.

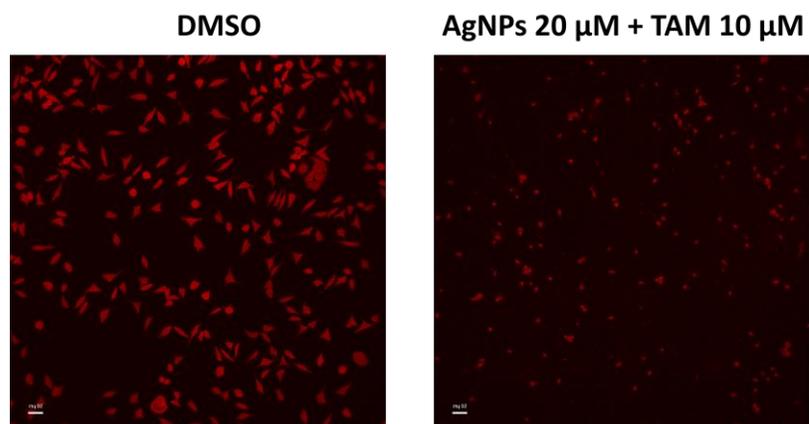


Figura 32. Ensayo de formación de colonias en la línea celular MCF-7 expuesto a la combinación con efecto sinérgico de acuerdo con el modelo de interacción de Chou-Talalay. Observado mediante microscopía de fluorescencia a 100x.

Anexo 3.

Cuantificación de la generación de ROS en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 en presencia de las combinaciones de AgNPs y fármaco tamoxifen, para corroborar el incremento del estrés oxidativo causado en las células por los tratamientos combinatorios.

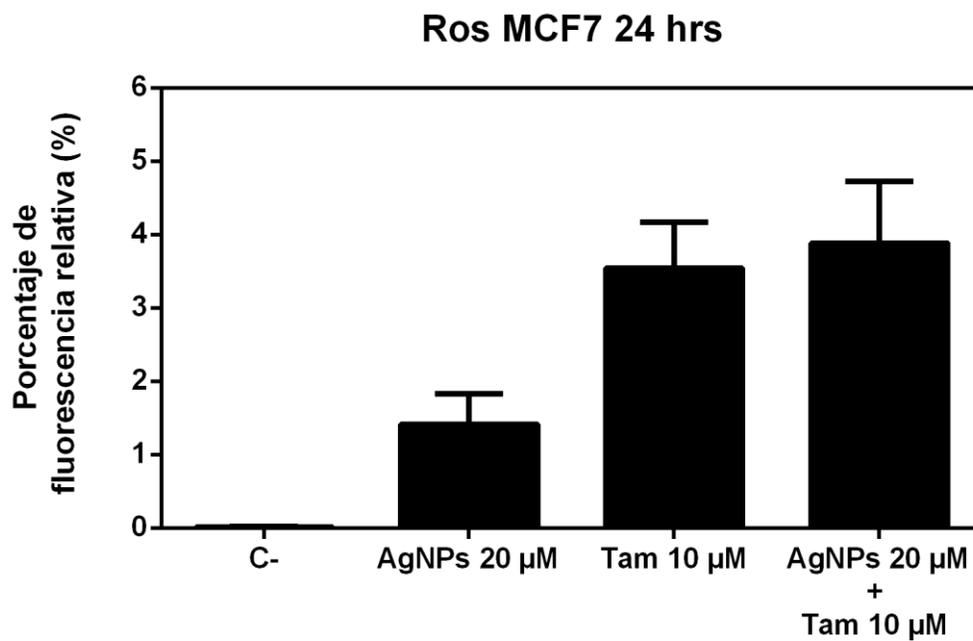


Figura 33. Especies reactivas de oxígeno (ROS) en la línea celular MCF-7. Detectado mediante citometría de flujo.