

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA
DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA: EFECTO DEL ESTABILIZANTE Y
APORTE AL MECANISMO DE ACCIÓN**

Por

QFB. YURIDIA TORRES MARTÍNEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS
con orientación en Farmacia**

Junio 2017.

Revisión de la Tesis:

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA
DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA: EFECTO DEL ESTABILIZANTE Y
APORTE AL MECANISMO DE ACCIÓN”**

**Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Directora de Tesis**

**Dr. Israel Alejandro López Hernández
Co-Director de Tesis**

**Dr. Gildardo Rivera Sánchez
Co-Director de Tesis Externo**

**Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza
Comité Tutorial**

**Dra. Patricia González Barranco
Comité Tutorial**

**Dra. Ivonne A. Camacho Mora
Comité Tutorial**

Aprobación de Tesis:

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA
DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA: EFECTO DEL ESTABILIZANTE Y
APORTE AL MECANISMO DE ACCIÓN”**

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Presidente

Dra. Patricia González Barranco
Secretario

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza
Vocal

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Q.F.B. Yuridia Torres Martínez

Fecha de Graduación: Junio 2017

Universidad Autónoma Nuevo León

Facultad de Ciencias

Químicas

Título del proyecto: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA: EFECTO DEL ESTABILIZANTE Y APOORTE AL MECANISMO DE ACCIÓN

Número de Páginas: 138

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en

Farmacía

Propósito y Método del Estudio: A nivel mundial el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. En el 2012 la Organización Mundial de la Salud reporto 8.2 millones de defunciones. En México para el 2015 se registraron 85, 201 defunciones por cáncer. Para el tratamiento de esta enfermedad existen diversas terapias, las que empleadas son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia; la mayoría de las veces se usa la combinación de ellas para poder combatir esta enfermedad. Las terapias presentan diversos efectos adversos y poca selectividad por lo que se busca mediante investigaciones un nuevo fármaco o terapia más selectiva y con menores efectos adversos, en esta búsqueda se han sumado nuevas tecnologías o ciencias como la nanomedicina la cual emplea nanomateriales. Un ejemplo son las nanopartículas sintetizadas por medio de química verde que han comprobado presentar actividad anticancerígena. En este proyecto se realizó la evaluación de la citotoxicidad de nanopartículas de plata estabilizadas con extractos acuosos de las plantas *Rosmarinus officinalis*, *Petroselinum crispum*, *Mentha spicata* y estabilizadas con citrato sobre la línea celular cancerígena HT-29 y SiHa y la línea celular no cancerígena de hígado de Chang por medio del ensayo con WST-1. Se determinó la producción de especies reactivas de oxígeno por medio de la prueba con diacetato de 2'7'-diclorofluoreceína, la presencia de la apoptosis por la actividad de la caspasa-3, así como el patrón de expresión génica diferencial (microarreglo de DNA) para conocer el posible mecanismo de acción por medio del cual ejercen su efecto ya que en la literatura se describen varios mecanismos de acción.

Contribuciones y conclusiones: Se realizó la evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica de las nanopartículas estabilizadas con extractos de plantas y con citrato donde se seleccionó como la nanopartícula con mejor actividad a la estabilizada con *Mentha spicata* con un IC₅₀ de 26.02, 12.20, 21.37 µg/mL en la línea celular HT-29, SiHa e hígado de Chang respectivamente y la estabilizada con citrato con un IC₅₀ de 31.80, 16.49, 13.25 µg/mL en la línea celular HT-29, SiHa e hígado de

Chang respectivamente. Las nanopartículas seleccionadas no presentaron producción de especies reactivas de oxígeno, así como tampoco actividad por caspasa-3. En el microarreglo se encontraron para la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata* 158 genes reprimidos, 232 genes sobre expresados dando como resultado 31 vías metabólicas reprimidas y 21 vías sobreexpresadas; para la estabilizada con citrato 162 genes reprimidos, 255 genes sobreexpresados con 26 vías metabólicas reprimidas y 24 vías sobreexpresadas, con estos resultados se proponen como posible mecanismo de acción daño a la membrana y la muerte celular por necrosis, se sugiere la realización de determinaciones más específicas para confirmar los resultados del microarreglo.

FIRMA DEL ASESOR: _____

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera

AGRADECIMIENTOS

La Universidad Autónoma de Nuevo León en especial a la **Facultad de Ciencias Químicas** por permitirme formar parte de su alumnado y realizar mis estudios de maestría.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por otorgarme la beca de manutención.

Al **Dr. Isaías Balderas Rentería** por aceptarme en su equipo de trabajo y brindarme su apoyo en todo momento.

Al **Dr. Gildardo Rivera Sánchez** por la recomendación, insistencia y apoyo para formar parte de esta institución y equipo de trabajo.

A la **Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera** por aceptarme como su alumna, por siempre apoyarme, confiar en mí, compartir sus conocimientos, pero sobre todo por el cariño que me ha demostrado siempre, no tengo palabras para decirle lo mucho que le agradezco todo lo que ha hecho por mí.

Al **Dr. Israel Alejandro López Hernández** por el apoyo brindado, los conocimientos compartidos y la paciencia brindada.

Al **Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza** por el apoyo, confianza, paciencia y compartir sus conocimientos conmigo y por siempre estar al pendiente del proyecto, muchas gracias!

A la **Dra. Patricia González Barranco** por compartir conmigo sus conocimientos, por los aportes a este proyecto y por siempre estar al pendiente.

A la **Dra. Ivonne A. Camacho Mora** por las aportaciones, revisión en la realización de este proyecto.

A cada uno de los profesores del posgrado por compartir sus conocimientos conmigo y su apoyo en mis estudios.

DEDICATORIAS

A mis padres **Rosalba Martínez** y **Albino Torres** por siempre apoyarme en cada decisión tomada y siempre alentarme a cumplir mis metas y nunca dejarme sola.

A mi hermana **Génesis Torres** por siempre darme ánimos en los momentos necesarios.

A mis compañeros de generación pero más que eso amigos **Teresa Villanueva** y **Jorge Solís**, por cada momento compartido y su apoyo brindado.

A **Karen Giselle Chávez** por ser mi compañera del posgrado y mi amiga por cada momento compartido, por escucharme, aconsejarme y apoyarme siempre.

A mis compañeros y amigos del INGGEN: Adriana Hernández, Elizeth, Sonia, Silvana, Evelyn, Jorge Zacatecas, Jesús Vélez, David, Diego, Tania y Cecilia.

A mis compañeros y amigos de generaciones anteriores Isaac, Luis Carlos, Alejandra y Annie.

A Adriana Romo, Enrique Cantú, Teresa Vargas, Jessica Gómez, Claudia Barahona por formar parte de mi paso por el posgrado y por cada momento compartido.

A mis amigos de años **San Juana**, **Nesshme Yuridia** y **Guadalupe** por siempre estar para mí, su apoyo, consejos y siempre dándome ánimos a pesar del tiempo y la distancia.

A **Christian Tadeo** por escucharme, apoyarme, darme ánimos y siempre estar pendiente de mí a pesar del tiempo y la distancia.

A **Marcela Medrano** por escucharme, apoyarme, aconsejarme y alentarme a seguir adelante pase lo que pase.

A mis amigos de la licenciatura Maribel, Flor, Karina, Claudia y Reyes por su apoyo siempre.

A mi abuelita, tías, tíos, primos, primas por siempre apoyarme y estar pendiente de mí.

A cada una de las personas que hicieron posible esto y que me apoyaron siempre pero sobre todo gracias a DIOS.

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo
y no en el resultado.*

Un esfuerzo total es una victoria completa.

Mahatma Gandhi

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	21
INTRODUCCIÓN	21
1.1 El cáncer.....	21
1.1.1 Generalidades y epidemiología del cáncer.....	21
1.1.2 Genética del cáncer.....	22
1.1.2.1 Predisposición hereditaria.....	23
1.1.2.2 Activación de oncogenes	23
1.1.2.3 Inactivación de genes supresores de tumores.....	24
1.1.2.4 Desregulación de microARN's.....	27
1.1.2.5 Inestabilidad genética y genes mutantes participantes en la reparación del ADN.....	29
1.1.2.6 Cambios epigenéticos.....	33
1.1.3 Principales causas del cáncer	38
1.1.4 Terapia anticancerígena	39
1.1.4 .1 Cirugía.....	40
1.1.4 .2 Radioterapia.....	41
1.1.4.2.1 Tipos de Radioterapias.....	42
1.1.4 .3 Quimioterapia.....	43
1.1.4.3.1 Farmacos citostaticos.....	44
1.1.4.3.2 Farmacos citotóxicos.....	45
1.1.4 .4 Inmunoterapia	47
1.1.4.5 Terapia hormonal	48
1.1.4.6 Terapia dirigida	49
1.1.5 Efectos adversos de la terapia anticancerígena.....	50
1.1.6 Investigación de nuevos agentes terapéuticos	51
1.1.6.1 Nanopartículas.....	55
1.1.6.2 Síntesis verde o biológica de nanopartículas.....	62
1.2 ANTECEDENTES.....	65
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	70
1.4 HIPÓTESIS	71
1.5 OBJETIVOS	72
1.5.1 Objetivo general	72
1.5.2 Objetivos específicos.....	72
CAPÍTULO II.....	73
MATERIALES Y MÉTODOS	73
2.1 Material, reactivos y equipo en general	73
2.2 Métodos.....	75

2.2.1 Procedimiento para el cultivo de líneas celulares.....	75
2.2.2 Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica de las nanopartículas de plata.	76
2.2.3 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de las nanopartículas de plata mediante la prueba de diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA).....	77
2.2.4 Determinación de la inducción de apoptosis por la actividad de caspasa-3 por las nanopartículas más activas en la línea celular SiHa	79
2.2.5. Análisis del patrón de expresión génica por las nanopartículas más activas (microarreglos de DNA).....	80
2.2.5.1 Extracción de RNA por método convencional	81
2.2.5.2 Marcado del RNA.....	82
2.2.5.3 Hibridización del microarreglo.....	83
2.2.5.4 Lectura de microarreglos	84
2.2.5.5 Análisis bioinformático	85
2.2.6 Manejo de los residuos.....	85
CAPÍTULO III.....	86
RESULTADOS	86
3.1 Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica de las nanopartículas de plata	86
3.1.1 Evaluación de la actividad anticancerígena de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de cáncer de colon HT-29	86
3.1.2 Evaluación de la actividad anticancerígena de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa).	88
3.1.3 Evaluación de la actividad citotóxica de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de hígado de Chang	91
3.2 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de las nanopartículas de plata mediante la prueba de diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA).....	93
3.2.1 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de las nanopartículas de plata en la línea celular SiHa.....	93
3.2.2 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de las nanopartículas de plata en la línea celular de hígado de Chang.....	96
3.3 Determinación de la inducción de apoptosis por la actividad de caspasa-3 por las nanopartículas más activas en la línea celular SiHa.....	100
3.4 Análisis de expresión génica (microarreglo) por las nanopartículas más activas en la línea celular SiHa.....	101
CAPÍTULO IV.....	114
DISCUSIONES	114

4.1 Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica de las nanopartículas de plata	114
4.1.1 Evaluación de la actividad anticancerígena de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de cáncer de colon HT-29.....	114
4.1.2 Evaluación de la actividad anticancerígena de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de cáncer de cervix SiHa.....	116
4.1.3 Evaluación de la actividad citotóxica de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de hígado de Chang.....	118
4.2 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de las nanopartículas de plata mediante la prueba de diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) de las nanopartículas de plata en la línea celular SiHa e hígado de Chang.	120
4.3 Determinación de la inducción de apoptosis por la actividad de caspasa-3 por las nanopartículas más activas en la línea celular SiHa.....	122
4.4 Análisis de expresión génica (microarreglo) por las nanopartículas más activas en la línea celular SiHa.....	123
CAPÍTULO V	127
CONCLUSIONES	127
DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	129
REFERENCIAS	130

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 Genes supresores tumorales	25
2 miARNs sobreexpresados o reprimidos en diversos tipos de tumor	28
3 Porcentaje de viabilidad de células HT-29 tratadas con nanopartículas de plata por 24 horas	87
4 IC ₅₀ de nanopartículas en la línea celular HT-29	88
5 Porcentaje de viabilidad de células SiHa tratadas con nanopartículas de plata por 24 horas	89
6 IC ₅₀ de nanopartículas en la línea celular SiHa	90
7 Porcentaje de viabilidad de células de hígado de Chang tratadas con nanopartículas de plata por 24 horas.	92
8 IC ₅₀ de nanopartículas en la línea celular de hígado de Chang	93
9 Porcentajes de producción de especies reactivas de oxígeno en la línea celular SiHa	95
10 Porcentajes de producción de especies reactivas de oxígeno en la línea celular de hígado de Chang	99
11 Vías metabólicas encontradas de los genes reprimidos por la nanopartícula estabilizada con <i>Mentha spicata</i>	104
12 Vías metabólicas y sus respectivos genes reprimidos por la nanopartícula estabilizada con <i>Mentha spicata</i>	105

13	Vías metabólicas encontradas de los genes sobreexpresados por la nanopartícula estabilizada con <i>Mentha spicata</i>	106
14	Vías metabólicas y sus respectivos genes sobreexpresados por la nanopartícula estabilizada con <i>Mentha spicata</i>	107
15	Vías metabólicas encontradas de los genes reprimidos por la nanopartícula estabilizada con citrato	108
16	Vías metabólicas y sus respectivos genes reprimidos por la nanopartícula estabilizada con citrato	109
17	Vías metabólicas encontradas de los genes sobreexpresados por la nanopartícula estabilizada con Citrato	111
18	Vías metabólicas y sus respectivos genes sobreexpresados por la nanopartícula estabilizada con citrato	112

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Actividad anticancerígena de nanopartículas de plata estabilizadas con extractos de plantas sobre la viabilidad en la línea celular HT-29	88
2	Actividad anticancerígena de nanopartículas de plata estabilizadas con extractos de plantas sobre la viabilidad en la línea celular SiHa	90
3	Actividad citotóxica de nanopartículas de plata estabilizadas con extractos de plantas sobre la viabilidad en la línea celular de hígado de Chang	92
4	Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de la nanopartícula de plata estabilizada con <i>Mentha spicata</i> en la línea celular SiHa	94
5	Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de la nanopartícula de plata estabilizada con citrato en la línea celular SiHa	95
6	Porcentajes de la producción de especies reactivas de oxígeno a las 24 horas para las nanopartículas estabilizadas con <i>Mentha spicata</i> y citrato en la línea celular SiHa	96
7	Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de la nanopartícula de plata estabilizada con <i>Mentha spicata</i> en la línea celular de hígado de Chang	97

8	Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de la nanopartícula de plata estabilizada con citrato en la línea celular de hígado de Chang	98
9	Porcentajes de la producción de especies reactivas de oxígeno a las 24 horas para las nanopartículas estabilizadas con <i>Mentha spicata</i> y citrato en la línea celular de hígado de Chang	99
10	Evaluación de la inducción de la actividad de las caspasa-3 de la nanopartícula de plata estabilizadas, en la línea celular de hígado de Chang	101
11	Electroforesis de RNA's en gel de agarosa al 1%	102
12	Chip de DNA	102

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Porcentaje
<	Menor a
°C	Grados centígrados
±	Mas menos
B	Beta
5´	Cinco prima
3´	Tres prima
C	Carbono
N	Nitrógeno
Nm	Nanómetro
cm ²	Centímetro cuadrado
Mm	Milímetro
Mg	Miligramos
µg	Microgramos
Ng	Nanogramo
µl	Microlitro
mL	Mililitro
L	Litro
mmoL	Milimol
mM	Milimolar
M	Molaridad
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria 50

H	Hora
Rpm	Revoluciones por minuto
A-549	Células de adenocarcinoma de pulmón
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Plata
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Poly ADP-ribosa
APC	Poly ADP-ribosa polimerasa
ANOVA	Análisis de Varianza
ATCC	American Type Culture Collection
BRCA1	Breast cancer 1 (Cáncer de Mama 1)
BCNU	Carmustina
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
Ca ²	Calcio
CCNU	Lomustina
CCL-13	Células de hígado de Chang
cDNA	Complementary DNA (ADNc).
CDMX	Ciudad de México
CO ₂	Dióxido de Carbono
CpG	Citosina fosfato Guanina
CVD	Depósito químico en fase de vapor
DCFDA	Diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína
DE	Desviación Estándar

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT1	DNA metiltransferasa 1
DNMT3a	DNA metiltransferasa 3 alfa
DNMT3b	DNA metiltransferasa 3 beta
DO	Densidad óptica
E2F	Factores de transcripción
E2F-RB	Factor de transcripción del retinoblastoma
EMEM	Eagle's Medio Esencial Mínimo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E.U.A	Estados Unidos de América
eV	Electrón voltio
G1	Fase G1
H3	Histona 3
H4	Histona 4
HepG2	Células de carcinoma hepatocelular
HL-60	Células de leucemia promielocítica aguda
HT-1080	Células de fibrosarcoma
HT-29	Células de cáncer de colon
HTB-35	Células de cáncer de cérvix
HTB-38	Células de cáncer de colon
HTC-15	Células de adenocarcinoma de colon
INK4a	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
K4	Lisina 4

K9	Lisina 9
K20	Lisina 20
K27	Lisina 27
Kev	10 ³ electrón voltio
LOI	Pérdida de imprinting
MAGE	Antígeno asociado a melanoma
MCF-7	Células de cáncer de mama
MDA-MB-231	Células de adenocarcinoma de mama
MLH1	Gen Mut L homólogo 1
MSH2	Gen Mut S homologo 2
miARN's	Micro ARN
MTX	Metotrexato
NCI-H450	Adenocarcinoma de pulmón de células pequeñas
NF1	Neurofibromina 1
NF2	Neurofibromina 2
Np's Ag	Nanopartículas de plata estabilizadas con
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa
PBS	Solución buffer de fosfatos
PTEN	Proteína tirosina fosfatasa
p16	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
p53	Proteína de tumor 53
pH	Potencial de hidrógeno
Pd	Paladio

Pt	Platino
RB	Retinoblastoma
RNA's	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
RNAr28S	RNA ribosomal 28S
RNAr18S	RNA ribosomal 18S
RNAt	RNA de transferencia
ROS	Especies reactivas de oxígeno
R-Ras	Oncogén homólogo relacionado con Ras viral
Ru	Rutenio
S-100	Gen promotor de crecimiento
SiHa	Células de cáncer de cérvix
T	Timina
U	Uracilo
UV	Ultra violeta
VHL	Gen Von Hippel Lindau
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VP-16	Virus de papiloma 16
WST-1	[2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio]
WT1	Gen Tumor de Wilms 1

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 El cáncer

1.1.1 Generalidades y epidemiología del cáncer

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, es producido por una alteración de los mecanismos reguladores de la célula, por modificaciones en la información genética de las mismas. Debido a estas alteraciones, las células crecen y se dividen de manera incontrolada formando tumores, invadiendo los tejidos y los órganos normales para en la mayoría de los casos finalmente diseminarse produciendo metástasis por medio del desprendimiento de células del tumor original que entran a circulación linfática o sanguínea y se propagan a sitios donde establecen tumores secundarios en todo el cuerpo.^{1, 2,3}

A nivel mundial el cáncer es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad, en el 2012 hubo 8.2 millones de defunciones, 14 millones de casos anuales respectivamente y se prevé que para los próximos 20 años aumente en un 70% el número de nuevos casos. Los principales tipos de cáncer que provocaron más muertes fueron: los de pulmón (1.59 millones), hígado (745,000), gástrico (723,000), colorectal (694,000), mamario (521,000) y esófago (400,000).³

En México para el 2015 se registraron 85, 201 defunciones por cáncer.⁴ En el 2012 los primeros tres lugares de tipos de cáncer con mayor mortalidad en nuestro país fueron para el género femenino el cáncer de mama, cérvico-uterino e hígado; para el masculino fueron cáncer de próstata, pulmón y de estómago, respectivamente.^{5, 6}

1.1.2 Genética del cáncer

El cáncer es una enfermedad genética causada por cambios en los genes que controlan la forma en que funcionan nuestras células, incluyendo la acumulación de alteraciones estructurales o funcionales en el ácido desoxirribonucleico (ADN) de estas mismas. El desarrollo del cáncer es un proceso multifactorial en el cual las células se transforman progresivamente en “malignas” a través de la acumulación de alteraciones genéticas como son la predisposición hereditaria, activación de oncogenes, inactivación de genes

supresores de tumores, micro RNA, genes mutantes participantes en la reparación del ADN, inestabilidad genética y cambios epigenéticos.^{7,8}

1.1.2.1 Predisposición hereditaria

El cáncer es una enfermedad multifactorial debido al efecto combinado de factores genéticos y ambientales. Se estima que alrededor del 5% de todos los tumores, tiene un carácter hereditario. Los cánceres hereditarios son la consecuencia de mutaciones germinales en genes concretos que incrementan la susceptibilidad para padecer cáncer. Esta susceptibilidad se transmite entre los miembros de la familia de acuerdo a distintos patrones de herencia. Se hereda la susceptibilidad a padecer cáncer, lo que no implica la certeza de desarrollarlo en todos los casos.⁹

Existen diversos tipos de cáncer hereditario, como lo son el 10% del cáncer de mama y ovario, 5% del cáncer de colon, algunos tumores del útero (endometrio), estómago, intestino delgado, cerebro y piel.

1.1.2.2 Activación de oncogenes

Los oncogenes codifican proteínas que promueven la pérdida del control de crecimiento y la conversión de una célula a su estado maligno. La mayor parte de los oncogenes actúan como aceleradores de la proliferación celular, pero también tienen otras funciones. Los oncogenes pueden ocasionar inestabilidad

genética, impedir que una célula se vuelva víctima de la apoptosis o promover la metástasis.

Las células tienen diversos genes, conocidos como proto-oncogenes, con la capacidad de corromper las propias actividades celulares y conducir las hacia el estado maligno, codifican proteínas que tienen varias funciones en las actividades normales de la célula; pueden convertirse en oncogenes por varios mecanismos:

- El gen puede mutar de tal manera que altere las propiedades del producto del gen para que ya no funcione en forma normal.
- El gen puede duplicarse una o más veces, lo que produce la amplificación y producción excesiva de la proteína codificada.
- Puede haber un nuevo ordenamiento cromosómico que mueva una secuencia de ADN distante en el genoma hasta quedar próxima al gen, lo que modifica la expresión del gen o la naturaleza del producto génico.

Cualquiera de estas alteraciones genéticas puede hacer que una célula pierda capacidad de respuesta al control del crecimiento normal.¹⁰

1.1.2.3 Inactivación de genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores actúan como frenos celulares, codifican proteínas que restringen el crecimiento celular y previenen la transformación maligna de las células.

La ausencia de tales genes se vincula con el desarrollo de un tumor, entonces se infiere que la presencia normal de estos genes suprime la formación de neoplasias.

La transformación de una célula normal a cancerosa se acompaña de la pérdida de la función de uno o más genes supresores tumorales.¹⁰ Ellos codifican para una serie de proteínas localizadas en distintas regiones dentro de la célula, tanto en el citoplasma como en el núcleo. Los dos genes mejor caracterizados de esta clase codifican para las proteínas p53 y RB.¹¹ Por ahora existen aproximadamente dos docenas de genes referidos como supresores tumorales en los seres humanos, algunos se listan a continuación.¹⁰

Tabla 1. Genes supresores tumorales¹⁰

Gen	Tumor primario	Función propuesta
APC	Colorrectal	Se une con la catenina β y actúa como factor de transcripción
BRCA1	Mamario	Reparación de ADN
MSH2, MLH1	Colorrectal	Reparación no coincidente
<i>E-Cadherina</i>	Mamario, colónico	Molécula de adhesión celular
INK4a	Melanoma, pancreático	Inhibidor de p16: inhibidor de Cdk ARF: estabiliza a p53
NF1	Neurofibromas	Activa la GTPasa de Ras
NF2	Meningiomas	Vincula la membrana con el citoesqueleto
TP53	Sarcomas, linfomas	Factor de transcripción (ciclo celular y apoptosis)
PTEN	Mamario, tiroideo	Fosfatasa de PIP ₃
RB	Retiniano	Se une con E2F, regulación de la transcripción en el ciclo celular
VHL	Renal	Ubiquitinación y degradación proteica
WT1	Tumor renal de Wilms	Factor de transcripción
p53	Todos los cánceres	Factor de transcripción, puede detener la división celular e inducir apoptosis.

El gen p53 es considerado como "el guardián del genoma". A partir de este gen se sintetiza una proteína que lleva el mismo nombre y se activa cuando la célula se dispone a dividirse, para vigilar la secuencia normal de acontecimientos genéticos que permiten la proliferación celular. Si el material genético de la célula resulta dañado o si algún sistema de control se desajusta, esta lo detecta e intenta restaurarlo. Si la lesión no es grave, la proteína p53 detiene la división celular y activa los genes reparadores del ADN. Si la proteína p53 estima que el daño es irreparable entonces ordena que se pongan en marcha los mecanismos genéticos para que la célula entre en apoptosis o muerte celular programada. Si el gen p53 sufre alguna mutación, no permite que la célula sea eliminada mediante la muerte programada, tampoco se ocupa de reparar los daños en el ADN y da lugar al inicio del proceso tumoral. Este gen es el más frecuentemente mutado en los cánceres humanos, más de un 50% de los tumores tienen genes p53 anormales, produciéndose una proteína alterada.¹¹

Otro ejemplo de este grupo de genes es el gen supresor de tumores RB, ejerce su efecto durante la primera parte de la fase G1 del ciclo celular. En este período o en las células quiescentes, esta proteína es unida al factor de la transcripción E2F. Este complejo tiene dos funciones, en primer lugar, muchos de los genes cuyos productos son esenciales para la fase S de dicho ciclo dependen de la actividad del factor E2F. Por tanto, el RB, mediante el secuestro de este factor de la transcripción garantiza que la fase S no pueda ser iniciada. En segundo lugar, el complejo E2F-RB reprime la transcripción de otros genes.

En el punto de restricción de la fase G1 del ciclo celular o cerca del mismo el RB es fosforilado por el complejo quinasa / dependiente de ciclinas y esta fosforilación causa la liberación del factor E2F por el RB, el cual entonces activa los genes cuyas funciones son requeridas para la fase S, también reprime otros genes cuya función estaba controlada por el mismo complejo.¹¹

El retinoblastoma es una enfermedad humana infantil que involucra un tumor de retina. La misma es causada por la pérdida de ambas copias del gen RB en la banda q14 del cromosoma 13. En la forma hereditaria un cromosoma tiene una deleción en esta región y la segunda copia es perdida por deleción somática en el individuo. En la forma esporádica, ambas copias se pierden por eventos somáticos individuales.¹¹

1.1.2.4 Desregulación de microARN's

Los microARN (miARN) son secuencias de ARN no codificantes cortos “de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos” que regulan los perfiles de expresión de distintos genes. En consecuencia, los miARN controlan y regulan diversos procesos celulares, como la proliferación, la apoptosis y diferenciación, todos ellos involucrados en el desarrollo y metástasis del cáncer.¹²

Existe evidencia que los miARNs están expresados de forma aberrante en el desarrollo del cáncer, la invasión y la metástasis.⁷ Los miARNs pueden actuar como oncogenes o como supresor de tumores, la represión de la expresión de miARNs con actividad supresora de tumor puede aumentar la traducción de

oncogenes y por lo tanto la formación en exceso de proteínas oncogénicas dando lugar a la formación de tumores. Por otro lado, la sobreexpresión de miARNs oncogénicos puede bloquear genes supresores de tumor y también llevar a la formación de tumores.⁷

Se han realizado análisis de expresión de miARNs que aparecen reprimidos o sobreexpresados en algunos tipos de cáncer y se presentan en el siguiente listado (Tabla 2).

Tabla 2. miARNs sobreexpresados o reprimidos en diversos tipos de tumor¹³

Tipo de Cáncer	miARN sobreexpresado	miARN reprimido
Cáncer de mama	miR-21	miR-125b, miR-145
Cáncer de próstata		<i>let-7c</i> , miR-125b, miR-145
Cáncer de páncreas	miR-21, miR-221, miR-222, miR-181a, miR-181b, miR-181d, miR-155, miR-196a, <i>let-7i</i> , miR-100, miR-301, miR-125b, miR-212, miR376a	miR-217, miR375
Tumor pancreático	miR-103, miR107, miR-23a, miR-26b, miR-342, miR-192, miR204, miR-211, miR-21	miR-155
Cáncer de pulmón	miR-21, miR-205	miR-126
Cáncer de ovario	miR-200a, miR-141	miR-199a, miR-145, miR-140, miR-125b-1
Leiomioma uterino	<i>let-7</i> , miR-21, miR-23b	
Cáncer hepatocelular	miR-21, miR-221, miR-224, miR-18	<i>let-7a</i> , miR-122a, miR-199a, miR-200 ^a

Cáncer de tiroides	miR-197, miR-346 en carcinoma folicular de tiroides relativo a adenoma folicular, miR-221, miR-222, miR-146b	miR-30d, miR-125b, miR-26a, miR-30-5p
Cáncer colorectal	miR-25, miR-92 en estabilidad de microsatélites relativo a alta estabilidad de los microsatélites, miR-31, miR-96, miR-135b, miR-183	miR-133b, miR-145
Adenomas pituitarios	miR-26a, miR-149	miR-21, miR-141, miR-144
Glioblastoma	miR-221, miR-10b	miR-128, miR-181a, miR-181b
Leucemia	miR-128a, miR-128b en leucemia linfoblástica aguda comparado con leucemia mieloide aguda, miR-21, miR-150, miR-155	<i>let-7b</i> , miR-223 en leucemia linfoblástica aguda comparado con leucemia mieloide aguda, miR-92, miR-222, miR-29b, miR-181b en leucemia linfoblástica crónica agresiva con delección 11q, miR-16-1, miR-15a

1.1.2.5 Inestabilidad genética y genes mutantes participantes en la reparación del ADN

La inestabilidad genética juega un papel crucial en el desarrollo del cáncer, ya que favorece la acumulación de mutaciones características del estado canceroso. La hipótesis del fenotipo mutador plantea que la inestabilidad genética surge a principios de la tumorigénesis e incrementa la subsecuente aparición de mutaciones y lesiones genéticas. Las mutaciones en los genes de estabilidad genética (fidelidad de la replicación, reparación del ADN, segregación cromosómica, vigilancia de daños y genes de respuestas celulares

como apoptosis) puede tener diversas manifestaciones, tales como mutaciones puntuales, inestabilidad de microsatélites y la pérdida de la heterocigosidad. La inestabilidad genética se puede clasificar en dos grandes grupos, la inestabilidad a nivel cromosómico y a nivel nucleotídico.⁷

La inestabilidad cromosómica define la existencia de una tasa acelerada de alteraciones cromosómicas, que dan lugar a:

- La ganancia o pérdida de cromosomas completos (aneuploidía). Más de 100 genes que conducen a la inestabilidad cromosómica se han identificado en levaduras, incluidos los que afectan los microtúbulos, cinetocoros, la condensación de cromosomas, la cohesión de cromátidas hermanas, y sitios de control de la mitosis, alteraciones en estos genes conducen a la aneuploidía. Estos cambios se encuentran en casi todos los tumores. Un ejemplo es la pérdida del cromosoma 10 en los glioblastomas y la pérdida del cromosoma 7 en los carcinomas papilares renales.
- Translocaciones cromosómicas. Dos patrones de translocaciones se han observado en los cánceres humanos. El primer patrón de tipo complejo es observado en muchos tumores, éste puede dar lugar a ganancia o pérdida de material cromosómico, así como la generación de productos génicos nuevos, y es probable que sea un componente importante en muchos tumores. El segundo patrón de tipo simple, es caracterizado por reordenamientos distintivos de segmentos cromosómicos. Los análisis moleculares han determinado los puntos de interrupción en muchas

translocaciones y han demostrado que en general estos eventos ocurren dentro de los mismos segmentos en una pequeña porción de ADN. Los reordenamientos en general, conducen a la activación de un oncogén a través de su colocación con un fuerte promotor o su fusión con otro gen.

- Duplicaciones cromosómicas. La amplificación génica es un proceso importante en los cánceres humanos, ya que está claramente asociada con la progresión del tumor. La amplificación de oncogenes se produce en la etapa tardía de los cánceres, y la amplificación de los genes implicados en el metabolismo o en la inactivación de las drogas antineoplásicas es común en muchos cánceres y desencadenan la resistencia a los agentes quimioterapéuticos.
- Deleciones cromosómicas. La pérdida de un cromosoma puede poner de manifiesto genes recesivos, además de causar un desequilibrio cromosómico. El otro gran grupo de inestabilidad genética es la inestabilidad a nivel nucleotídico, estas afectan a una sola base o a algunas pocas bases en el ADN. La inestabilidad a este nivel se produce por los defectos en la reparación del ADN y los defectos en la replicación del ADN. La primera línea de defensa contra la inestabilidad genética es la notable fidelidad de ADN polimerasas y los complejos multienzimáticos que replican el ADN; debido a que mutaciones en los sitios de la polimerización producen cambios en esa fidelidad de la replicación, así como las mutaciones en los sitios de revisión de la correcta replicación, tienen implicación en la inestabilidad genética y por consiguiente en el proceso canceroso.⁷

Los defectos en la reparación del ADN, otra forma de inestabilidad genética, se pueden clasificar en reparación por escisión de un solo nucleótido y en reparación en Mismatch. La reparación por escisión de un solo nucleótido es responsable de reparar los daños causados por muchos mutágenos. Las personas que nacen con defectos en los genes de reparación de un solo nucleótido desarrollan un síndrome conocido como Xeroderma pigmentosa, estas personas tienen una alta susceptibilidad a desarrollar cáncer en las zonas que están expuestas al sol. La reparación de ADN en Mismatch tiene un papel central en el mantenimiento de la estabilidad genómica mediante la reparación de los errores de la replicación del ADN y la inhibición de recombinación entre secuencias homólogas. Defectos en este sistema de reparación resultan en la inestabilidad de los microsatélites (presentes en el 85% de los pacientes de cáncer colorectal hereditario no asociado a pólipos), que se caracteriza por la expansión o contracción del número de repeticiones en tándem, debido al deslizamiento de la polimerasa sobre los microsatélites, estos se producen en todo el genoma. La deficiencia en el sistema de reparación en Mismatch da lugar a cánceres colorrectales, del endometrio y gástricos.⁷

También aumenta la probabilidad de mutaciones en los genes que contienen secuencias repetitivas que regulan el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis.⁷

Si se considera al cáncer como una enfermedad consecutiva a las alteraciones en el ADN de las células somáticas, se infiere que cualquier

actividad que incrementa la frecuencia de las mutaciones genéticas eleva la probabilidad del riesgo de desarrollar cáncer.

Los procesos de reparación del ADN requieren los esfuerzos conjuntos de una cantidad considerable de proteínas, incluidas las que reconocen la lesión, aquellas que retiran una porción de la cadena que contiene la lesión y las que sustituyen el segmento faltante con nucleótidos complementarios. Si cualquiera de estas proteínas es defectuosa, puede esperarse que la célula afectada presente un índice demasiado alto de mutaciones que se describe como “fenotipo mutador”. Es probable que las células con fenotipo mutador incurran en mutaciones, tanto en genes supresores tumorales como en oncogenes, lo que incrementa en forma notable el riesgo de volverse malignas.¹⁰

1.1.2.6 Cambios epigenéticos

La investigación del cáncer se ha centrado principalmente en los cambios genéticos que alteran la secuencia de ADN, aunque esto ha sido de gran utilidad hay otro ámbito en el proceso de carcinogénesis que no implica cambios en la secuencia de ADN, denominados cambios epigenéticos. Los procesos epigenéticos son naturales y esenciales para muchas funciones del organismo, pero si ocurren de forma incorrecta, hay efectos adversos en la salud.¹⁴

En general, las modificaciones epigenéticas son reversibles reordenamientos de la cromatina en las células normales que modulan la expresión de genes, sin

cambiar la secuencia de ADN. Las alteraciones de este equilibrio, que afectan principalmente a los mecanismos de la metilación del ADN, hipermetilación, acetilación de histonas, son frecuentemente implicadas en la génesis del cáncer. En las células neoplásicas, la abundancia de las histonas desacetiladas se asocia generalmente con hipermetilación del ADN y silenciamiento de genes.¹⁴

La metilación del ADN proporciona un mecanismo de silenciamiento de genes, que puede ser por la prevención o promoción del reclutamiento de las proteínas reguladoras del ADN, que determina una función importante en la regulación de la expresión genética y en la arquitectura de la cromatina. Esta metilación se lleva a cabo mediante la modificación covalente de los residuos de la citosina a nivel de los dinucleótidos 5'-CG-3', también denominados dinucleótidos CpG, la distribución de estos nucleótido no es uniforme en el genoma humano, ya que aproximadamente el 70% se localiza de forma dispersa, el 30% restante se localiza en regiones denominadas CpG islands o islas CpG. El resultado de este proceso bioquímico es la formación de una base inestable, por lo que la metilación del ADN puede considerarse como un mutágeno endógeno. Este proceso se caracteriza por ser una reacción reversible que es catalizada por ADN metiltransferasas, de las que se diferencian tres tipos: DNMT1, DNMT3a y DNMT3b.¹⁵

La iniciación y progresión del cáncer se acompaña de profundos cambios en la metilación de ADN, que fueron las primeras alteraciones epigenéticas identificadas en el cáncer. El epigenoma del cáncer se caracteriza por

hipometilación en todo el genoma y la hipermetilación del promotor específico del sitio de las islas CpG.¹⁶

La hipometilación del ADN juega un papel importante en la tumorigénesis y se produce en diversas secuencias genómicas, incluyendo elementos repetitivos, retrotransposones, promotores pobres de CpG, zonas de intrones y genes. La hipometilación de ADN en secuencias repetidas conduce a una mayor inestabilidad genómica mediante la promoción de reordenamientos cromosómicos. La hipometilación de retrotransposones puede resultar en su activación y translocación a otras regiones genómicas, aumentando así la inestabilidad genómica. Además, la hipometilación del ADN puede conducir a la activación de genes promotores del crecimiento como R-Ras y MAPK en cáncer gástrico, S-100 en cáncer de colon, MAGE en melanoma y una pérdida de LOI en tumores. Por lo tanto, la hipometilación del ADN conduce a la activación aberrante de genes y regiones no codificantes a través de una variedad de mecanismos que contribuyen al desarrollo y progresión del cáncer.¹⁶

En contraste con la hipometilación, que aumenta la inestabilidad genómica y activa los proto-oncogenes, la hipermetilación específica de sitio, contribuye a la tumorigénesis silenciando los genes supresores de tumores. Desde el descubrimiento inicial de la hipermetilación de las islas CpG del promotor Rb, también se ha demostrado que varios genes supresores de tumores, incluyendo p16, MLH1 y BRCA1, sufren un silenciamiento específico del tumor mediante hipermetilación. Estos genes están implicados en procesos celulares, que son

parte integral del desarrollo y progresión del cáncer, incluyendo la reparación del ADN, el ciclo celular, la adhesión celular, la apoptosis y la angiogénesis. El silenciamiento epigenético de tales genes supresores de tumores, también puede conducir a la iniciación del tumor sirviendo como el segundo golpe en el modelo de Knudson's. Además de la inactivación directa de los genes supresores de tumores, la hipermetilación del ADN también puede silenciar indirectamente clases adicionales de genes silenciando los factores de transcripción y los genes de reparación del ADN.¹⁶

Gran parte del código epigenético es transportado, a través de las modificaciones químicas post-transcripcionales, a nivel de los aminoácidos de las histonas. Las histonas constan de un dominio globular C-terminal y otro no estructurado N-terminal, los cuales pueden sufrir modificaciones covalentes tras una traducción de tipo metilación, acetilación, fosforilación o ubiquitinización. Estas circunstancias van a determinar la regulación de los procesos celulares de la transcripción, la replicación, la reparación del ADN y la organización cromosómica, mediante la conformación de la estructura y actividad de la cromatina. Estas modificaciones reversibles favorecen bien la forma inactiva de la cromatina (heterocromatina) o bien su configuración activa (eucromatina).¹⁵

El proceso de modificación de las histonas se lleva a cabo a través de diferentes grupos de enzimas (acetiltransferasas, desacetilasas y metiltransferasas) que incorporan o eliminan de una forma dinámica las modificaciones covalentes, regulando así la activación de la cromatina. Estas variaciones en la cromatina incluyen: la pérdida de la acetilación de las histonas

que implica la represión genética, la sobreexpresión de las desacetilasas de las histonas, presentes en diversos tipos tumorales; la alteración de la metilación, asociada con el silenciamiento aberrante de los genes supresores de tumores; la modificación de la expresión de las demetilasas, implicadas en la progresión tumoral.¹⁵

La activación o inhibición de la cromatina depende de los residuos modificados, con el resultado de un silenciamiento genético a través de la formación de una estructura de cromatina compacta. La acetilación de la lisina se relaciona con la activación de la transcripción, mientras que su metilación conlleva una activación o inhibición en función del tipo de metilación: la metilación de H3 en K4 implica una activación de la transcripción, mientras que la metilación de H3 en K9 o en K27 y la metilación de H4 en K20 conlleva a una inhibición de la transcripción. A su vez, estos cambios se ven influenciados por la metilación de la secuencia de ADN en los CpG islands.¹⁵

Las desacetilasas de las histonas ayudan a controlar la estabilidad proteica, ya que las lisinas también son señalizadas por ubiquitinización para luego ser degradadas por la vía del proteasoma, reduciéndose así la vida media de la proteína. La acetilación participa igualmente en la importación y exportación de las proteínas en la membrana nuclear merced a las importinas; además de en otros procesos como la formación de microtúbulos, el control del estrés interno y externo, así como participación en las vías de inflamación, apoptosis y necrosis.¹⁵

1.1.3 Principales causas del cáncer

Las sustancias que causan cáncer se denominan carcinógenos, los cuales desencadenan la enfermedad dependiendo de la frecuencia, intensidad y duración de la exposición; éstos fueron identificados como factores causantes del cáncer mediante estudios en animales de experimentación y mediante análisis epidemiológicos. Dentro de estos agentes cancerígenos se incluyen la radiación, productos químicos, diversos virus, dieta, obesidad, factores de riesgo ambiental y promotores tumorales.^{1, 17}

En el caso de la radiación existen dos tipos principales, la radiación ultravioleta de la luz solar y la radiación ionizante que pueden contribuir al desarrollo del cáncer cuando se expone por un tiempo prolongado a ellas. Entre los productos químicos carcinogénicos encontramos el humo del tabaco, las aflatoxinas, el alcohol y el hollín. Estudios han demostrado que el consumo de alcohol está vinculado a un mayor riesgo de cáncer.^{1, 17}

Algunos virus son capaces de infectar células y transformarlas en células cancerosas. Estos virus se dividen en dos grandes grupos, virus de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Entre los virus ADN capaces de transformar células se encuentra el virus del papiloma humano, el adenovirus hepatitis b, hepatitis c y virus parecidos al herpes. Los virus ARN tumorales o retrovirus que tienen una estructura similar al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).^{2, 17}

Algunos estudios han demostrado que una dieta alta en grasas, proteínas, calorías y carne roja aumentan el riesgo de cáncer colorrectal.¹⁷

El estar expuesto a productos químicos, a la contaminación de agua por arsénico y otras sustancias en el medio ambiente se ha relacionado también con algunos tipos de cáncer.¹⁷

Los promotores tumorales contribuyen al desarrollo del cáncer estimulando la proliferación celular a diferencia de otros carcinógenos que inducen mutación, debido a que en los primeros estadios de desarrollo del tumor se requiere de una población celular proliferativa. Las hormonas, como el estrógeno es un importante promotor de tumores el cual se ve inhibido por medio de la administración de progesterona, sin embargo, la prolongada terapia basada en la combinación de estrógenos y progesterona incrementa el riesgo de cáncer.¹

1.1.4 Terapia anticancerígena

La terapia empleada para el tratamiento del cáncer depende de su tipo, así como de lo avanzado que se encuentre. En la mayoría de los casos puede ser un tratamiento único o la combinación de dos tratamientos, los cuales tienen como objetivo la reducción o desaparición del cáncer.

Entre los tratamientos empleados encontramos la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la inmunoterapia, la terapia génica, la terapia hormonal, el trasplante de células madre, y la terapia dirigida, entre otras terapias. Los

tratamientos más empleados son la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía de forma individual o en combinación.¹⁸

La mayoría de los medicamentos que se utilizan actualmente en el tratamiento del cáncer, dañan o inhiben la replicación del ADN. Por tanto, estos medicamentos no sólo son tóxicos para las células cancerosas, sino también para las células sanas, especialmente para aquellas que experimentan una división celular rápida (por ejemplo, células hematopoyéticas, células epiteliales del tracto gastrointestinal y células del folículo piloso). La acción de los medicamentos anticancerosos contra estas poblaciones de células sanas es la responsable de la mayor parte de la toxicidad asociada a estos medicamentos, y limita su efectividad en el tratamiento del cáncer.¹

1.1.4 .1 Cirugía

La cirugía es la forma de tratamiento más antigua contra el cáncer y juega un papel importante en el diagnóstico, así como en la evaluación de la etapa en la que se encuentra. La cirugía ofrece posibilidades de cura para muchos tipos de cáncer, sobre todo aquellos que no se han diseminado a otra parte del cuerpo y se encuentran en etapas tempranas del desarrollo del tumor; de ahí la importancia del diagnóstico oportuno.

Las cirugías implicadas en el cáncer se pueden dividir en:

- La cirugía preventiva. Se usa para evitar que el cáncer ocurra. Muchos cánceres de colon pueden evitarse extirpando los pólipos precancerosos antes de que se vuelvan malignos.
- La cirugía de diagnóstico (biopsia). En este procedimiento, el cirujano extirpa parte o todo un tumor para examinarlo y determinar si el crecimiento es canceroso.
- La cirugía de estadiaje: Cirugía para determinar la extensión de un cáncer, así como la etapa del proceso canceroso.
- La cirugía curativa. Implica simplemente la extracción de un tumor canceroso.
- La cirugía reconstituyente. Devuelve al cuerpo a su apariencia o funcionamiento normal o casi normal después de un tratamiento anticanceroso.
- La cirugía paliativa. Se usa sólo para aliviar el dolor, incapacidades u otras complicaciones resultantes de los cánceres avanzados. Puede mejorar la calidad de vida, pero no es una cura o tratamiento anticanceroso.⁷

1.1.4 .2 Radioterapia

La radioterapia, también llamada terapia de radiación, es un tratamiento del cáncer que usa altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir tumores.¹⁹

En dosis altas, la radiación destruye células cancerosas o hace lento su crecimiento. La radioterapia se usa para:

- Tratamiento del cáncer: La radiación puede usarse para curar el cáncer, para impedir que regrese o para detener o hacer lento su crecimiento.
- Alivio de los síntomas del cáncer: La radiación puede usarse para reducir un tumor, para tratar el dolor y otros problemas causados por el tumor, como los causados por un tumor en crecimiento, por ejemplo dificultad para respirar o falta de control de los intestinos y de la vejiga.¹⁹

La radioterapia no destruye de inmediato las células cancerosas, se llevan días o semanas de tratamiento antes de que las células cancerosas empiecen a morir; luego, las células cancerosas siguen muriéndose semanas o meses después de terminar la radioterapia.¹⁹

1.1.4.2.1 Tipos de radioterapia

Hay dos tipos principales de radioterapia, de haz externo y radioterapia interna.

- Radioterapia de haz externo: La radioterapia de haz externo procede de una máquina que enfoca la radiación al cáncer, es decir, una parte específica del cuerpo.¹⁹
- Radioterapia interna: La radioterapia interna es un tratamiento en el que la fuente de radiación se pone dentro del cuerpo. La fuente de radiación puede ser sólida o líquida.¹⁹

La radioterapia interna con una fuente sólida se llama braquiterapia. En este tipo de tratamiento, la radiación, en forma de semillas, listones o cápsulas, se coloca en el cáncer o en el tejido cercano a al cáncer.

El paciente recibe radiación líquida por vía intravenosa. La radiación líquida viaja por todo su cuerpo y puede permanecer en el organismo minutos o días.¹⁹

1.1.4 .3 Quimioterapia

La quimioterapia, también llamada “quimio”, es un tipo de tratamiento del cáncer que usa fármacos para destruir células cancerosas.²⁰

Los fármacos quimioterapéuticos pueden evitar que las células comiencen o completen el ciclo celular al interferir con este proceso reproductivo (agentes citostáticos, dirigidos o biológicos) o provocar la muerte celular (agentes citotóxicos).²¹

Como se indicó anteriormente, los fármacos quimioterapéuticos se pueden clasificar generalmente como aquellos que evitan la división celular o el crecimiento del tumor (fármacos citostáticos) o aquellos que llevan a la muerte celular (fármacos citotóxicos). Dentro de estas dos amplias categorías, los fármacos quimioterapéuticos se pueden luego agrupar de acuerdo al trabajo que realizan, el efecto que tienen sobre las células tumorales, y el momento en la vida de las células en el que se considera que son más eficaces.²¹

1.1.4.3.1 Fármacos citostáticos

➤ Inhibidores de la angiogénesis

Un tumor necesita nutrientes para crecer; esos nutrientes se dirigen hacia el tumor a través de un elaborado sistema de vasos sanguíneos que el tumor desarrolla para mantener un adecuado suministro de alimento. El crecimiento de estos vasos sanguíneos alrededor de un tumor se denomina “angiogénesis”, la interferencia de su crecimiento es la “inhibición de la angiogénesis”. La talidomida, el interferón, el bevacizumab (Avastin), la cilengitida (EMD 121974) y el cediranib (Recentin) son fármacos que se están analizando por su potencial de detener el aumento del suministro de sangre al tumor. La inhibición de la angiogénesis se puede combinar con fármacos de quimioterapia tradicionales en un esfuerzo por aumentar la eficacia de ambos.²¹

➤ Fármacos dirigidos a reducir la resistencia farmacológica

En las células normales del organismo se encuentran enzimas que, si están en una alta concentración, podrían ser capaces de hacer que el tumor sea resistente a los fármacos quimioterapéuticos. Se están desarrollando fármacos para inhibir estas enzimas de resistencia. Los inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) son ejemplos de este grupo de fármacos, que se están sometiendo a ensayos clínicos con la esperanza de contrarrestar esta resistencia.²¹

➤ Inhibidores del factor de crecimiento

El crecimiento de las células normales depende de un delicado equilibrio de proteínas y enzimas en el cerebro. Estos “factores de crecimiento” sirven como “alimento” para las células cerebrales y son, en forma simultánea, capaces de controlar el crecimiento de nuevas células. No obstante, los niveles inadecuados de factores de crecimiento podrían causar un crecimiento excesivo de células y el posterior desarrollo de un tumor cerebral. Se están estudiando inhibidores de la tirosina quinasa, como el mesilato de imatinib (Gleevec), y fármacos que interfieren con los receptores del factor de crecimiento, como el gefitinib (Iressa), el erlotinib (Tarceva), el sorafenib (Nexavar) y el cediranib (Recentin).²¹

1.1.4.3.2 Fármacos citotóxicos

- Los agentes alquilantes actúan formando una unión molecular en los cordones de ADN dentro de las células tumorales, que les impide reproducirse. El carboplatino, el cisplatino, la ciclofosfamida y la temozolomida (Temodar) son ejemplos de agentes alquilantes. Las nitrosoureas son una subclase de agentes alquilantes. Evitan que las células tumorales se reparen a sí mismas y por lo tanto las deja incapaces de reproducirse. La carmustina (BCNU) y la lomustina (CCNU) son nitrosoureas.²¹
- Los antimetabolitos evitan que las células tumorales elaboren las enzimas necesarias para el crecimiento de nuevas células. El metotrexato (MTX) es un ejemplo de antimetabolito.²¹

- Los antibióticos antitumorales detienen la acción de las enzimas necesarias para el crecimiento celular y podrían cambiar el ambiente alrededor de la célula. La rapamicina (sirolimus), por ejemplo, es un antibiótico antitumoral.²¹
- Las hormonas pueden ser capaces de interferir con el crecimiento tumoral bloqueando la producción de determinadas proteínas en las células tumorales. Un ejemplo, el tamoxifeno es un fármaco antagonista de receptores de estrógenos que se utiliza para tratar el cáncer de mama. Al estudiar la forma en la que funciona el fármaco, los investigadores observaron que el tamoxifeno podría ser capaz de suprimir algunas de las proteínas que participan en el crecimiento de otros tumores o tipos de cancer.²¹
- Los inhibidores mitóticos suelen ser sustancias naturales a base de plantas que interfieren con la producción de las proteínas necesarias para crear nuevas células. El etopósido (VP-16), el paclitaxel (Taxol) y la vincristina son ejemplos de inhibidores mitóticos.²¹
- Los esteroides se utilizan para disminuir la inflamación alrededor del tumor. Si bien no están diseñados para ser una terapia “citotóxica”, algunos investigadores consideran que los esteroides tienen algunos efectos tóxicos sobre las células tumorales. Si fuera verdad, este efecto probablemente no sería suficiente para matar una cantidad significativa de células. No obstante, una excepción a esto es la del linfoma del sistema nervioso central, que es particularmente sensible a los esteroides. En lugar de controlar el edema, los esteroides destruyen las

células tumorales del linfoma, pero generalmente no proporcionan un control a largo plazo del tumor. Estos tratamientos funcionan en forma diferente que la quimioterapia clásica que daña a la célula durante el proceso de división celular.²¹

1.1.4 .4 Inmunoterapia

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento del cáncer que ayuda al sistema inmunitario a combatir el cáncer. El sistema inmunitario ayuda a su cuerpo a combatir las infecciones y otras enfermedades. Está compuesto de glóbulos blancos de la sangre, órganos y tejidos del sistema linfático.

La inmunoterapia es un tipo de terapia biológica que usa sustancias producidas por organismos vivos para tratar el cáncer.

Muchos tipos diferentes de inmunoterapia se usan para tratar el cáncer. Estos son:

- Anticuerpos monoclonales, los cuales son fármacos diseñados para unirse a blancos específicos en el cuerpo. Pueden causar una reacción inmunitaria que destruye células cancerosas.

Otros tipos de anticuerpos monoclonales pueden "marcar" las células cancerosas para facilitar que el sistema inmunitario las encuentre y las destruya. Es posible referirse a estos tipos de anticuerpos monoclonales como terapias dirigidas.

- Transferencia adoptiva celular, es un tratamiento que intenta reforzar la capacidad natural de las células T para combatir el cáncer.
- Citocinas, las cuales son proteínas producidas por las células del cuerpo, que tienen funciones importantes en la reacción inmunitaria normal del cuerpo y en la capacidad del sistema inmunitario para responder al cáncer. Los dos tipos principales de citocinas usadas son los interferones e interleucinas.
- Vacunas de tratamiento, las cuales trabajan contra el cáncer al reforzar la reacción del sistema inmunitario a las células cancerosas.
- Bacilo de Calmette-Guérin, BCG, es una inmunoterapia que se usa para tratar cáncer de vejiga. Es una forma debilitada de la bacteria que causa la tuberculosis. Cuando se inserta directamente en la vejiga con un catéter, el BCG causa una reacción inmunitaria contra las células cancerosas.²²

1.1.4.5 Terapia hormonal

La terapia hormonal es un tratamiento del cáncer que hace lento o detiene el crecimiento del cáncer que usa hormonas para crecer. La terapia hormonal se llama también tratamiento con hormonas o terapia endocrina.

La terapia hormonal está comprendida en dos grupos amplios; es decir, los que bloquean la capacidad del cuerpo para producir hormonas y los que interfieren en la forma como las hormonas se comportan en el cuerpo.²³

1.1.4.6 Terapia dirigida

La terapia dirigida contra el cáncer son fármacos u otras sustancias que bloquean el crecimiento y la diseminación del cáncer al interferir en moléculas específicas que participan en el crecimiento, el avance y la diseminación del cáncer. Las terapias dirigidas contra el cáncer se llaman algunas veces “fármacos dirigidos molecularmente”, “terapias dirigidas molecularmente”, “medicinas de precisión” o términos semejantes²⁴

Las terapias dirigidas son, en la actualidad, en donde se centra la mayor creación de fármacos contra el cáncer. Son la piedra angular de la medicina de precisión, una forma de medicina que usa información de los genes y proteínas de una persona para prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades.²⁴

La formulación de las terapias dirigidas requiere la identificación de buenos blancos; es decir, blancos que tienen una función clave en el crecimiento y en la supervivencia de las células cancerosas. Por este motivo se dice que las terapias dirigidas son el producto del diseño racional de fármacos.²⁴

Para el tratamiento del cáncer pueden ser empleada cualquiera de las terapias antes mencionadas las que tienen como objetivo erradicar la enfermedad, pero la mayoría de ellas pueden presentar efectos adversos por ser poco selectivas. Actualmente no se cuenta con una terapia que no presente efectos adversos y que sea selectiva a células cancerosas solamente; por lo cual se sigue la búsqueda de nuevos fármacos o terapias para combatir esta enfermedad.

1.1.5 Efectos adversos de la terapia anticancerígena

Los tratamientos empleados para el cancer pueden causar efectos secundarios, los cuales ocurren cuando se afectan tejidos y órganos sanos, estos efectos pueden variar de una persona a otra, de una persona a otra con el mismo tratamiento y de un tratamiento a otro tratamiento. Algunas personas tienen pocos efectos secundarios mientras que otras tienen más. El tipo de tratamiento, la frecuencia de este, la edad y otros padecimientos también determinan los efectos secundarios que se presentan.^{25, 26}

Los efectos adversos pueden presentarse inmediatamente después del tratamiento, o en meses o años, cuando se presentan después de meses o años se les conoce como efectos adversos tardíos.^{25, 26}

Los efectos secundarios más comunes causados por el tratamiento del cáncer son:

- Problemas cardiacos
- Hipertensión
- Problemas pulmonares
- Problemas en el sistema endocrino
- Problemas en los huesos, articulaciones y los tejidos blandos
- Problemas en el cerebro, medula espinal y los nervios
- Problemas de salud dental, bucal y de visión
- Problemas digestivos
- Problemas de aprendizaje, memoria y atención

- Problemas emocionales
- Problemas hematopoyéticos
- Problemas de alopecia
- Cambios en la piel y uñas
- Cáncer secundario

La mayoría de los tratamientos presentan efectos adversos por lo cual se siguen buscando nuevos agentes terapéuticos que sean más efectivos y más selectivos.^{25, 26}

1.1.6 Investigación de nuevos agentes terapéuticos

La problemática que representa el cáncer a nivel mundial ha tenido como consecuencia el incremento de estudios científicos para poder entender el mecanismo por medio del cual se desarrolla la enfermedad y con ello emprender el desarrollo de un posible nuevo fármaco o terapia para tratarla, ya que los actualmente empleados “como se ha mencionado” poseen múltiples efectos adversos y no son selectivos.

Con el paso del tiempo han surgido nuevas ciencias, las cuales buscan su aplicación en el área de la salud.

Dentro de las nuevas ciencias se encuentra la nanociencia que se encarga del estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales de magnitudes atómicas y moleculares, en donde sus propiedades son significativamente diferentes a sus escalas mayores.^{27, 29}

Así mismo, la nanotecnología es la ciencia involucrada en el diseño de materiales, dispositivos y sistemas a escala nanométrica permitiendo la interacción a nivel celular y molecular²⁸. La nanotecnología tiene múltiples aplicaciones en áreas como son: ingeniería química, mecánica, electrónica, y en el área médica.²² Cuando su aplicación se da en el área médica se le conoce como nanomedicina, la cual se puede definir como la ciencia y la tecnología utilizada en el diseño y evaluación de sistemas complejos, a escala nanométrica, formados por al menos dos componentes, uno de los cuales es el principio activo o molécula biológicamente activa y, el segundo, es el propio sistema que permite una función especial relacionada con el diagnóstico, tratamiento, o prevención de una enfermedad³⁰ y emplea nanomateriales, nanoaparatos y nanoestructuras.²⁹

Los nanomateriales se definen así porque uno o más de sus componentes se encuentran en un rango de 1 a 100 nm e incluyen nanotubos, nanofibras y nanopartículas. Las nanopartículas son consideradas como partículas individuales con un diámetro menor a 100 nm, lo que puede originar cambios tanto en las propiedades físicas (tamaño del área de superficie, carga de superficie, forma, tamaño, paso a través de barreras que se consideraban impermeables) como en las químicas (solubilidad, reactividad).²⁹ Las nanopartículas magnéticas son de sumo interés en biomedicina por sus diversas e importantes aplicaciones como para el transporte de fármacos o de radioisótopos, separadores magnéticos de células marcadas, para el catabolismo de tumores vía hipertermia, y como agentes de contraste en aplicaciones de resonancia magnética³¹, también se ha estudiado su actividad

biológica donde se ha encontrado en diversos estudios científicos que poseen actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral y, la más reciente, anticancerígena²⁹.

1.1.6.1 Nanopartículas

Las nanopartículas se producen a partir de diversos materiales orgánicos e inorgánicos (cerámicos, metales, y polímeros) y en el área de la salud se ha dado particular importancia a la obtención de nanopartículas a partir de metales como lo es la plata²⁹.

Las nanopartículas de plata pueden ser sintetizadas por una gran variedad de métodos. Estos métodos según la técnica de aplicación se clasifican en: de arriba hacia abajo (Top-Down) y de abajo hacia arriba (Bottom-Up). La primera consiste en la división de sólidos máxicos en porciones más pequeñas. Este enfoque puede involucrar la molienda o el desgaste, métodos químicos, y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados.³²

Existen varios métodos que utilizan la aproximación de arriba hacia abajo (Top-Down). Los más representativos son³³:

- a) La evaporación térmica que consiste en el calentamiento hasta la evaporación del material que se pretende depositar. Se lleva a cabo en una cámara de vacío en la que se condensa el vapor sobre una lámina fría requiriendo en todo momento un control preciso de las condiciones

de crecimiento para no producir una modificación de la morfología de la capa depositada.³³

- b) El depósito químico en fase vapor (CVD, por sus siglas en inglés) que consiste en la descomposición de uno o varios compuestos volátiles, en el interior de una cámara de vacío (reactor), en o cerca de la superficie de un sólido para dar lugar a la formación de un material en forma de capa delgada o de nanopartículas.
- c) La preparación de clusters gaseosos, que utiliza un láser pulsado de alta potencia para producir vapores atómicos metálicos que son acarreados en un gas inerte y posteriormente son depositados en un óxido monocristalino u otro sustrato, bajo condiciones de ultra-alto vacío.
- d) La implantación de iones, que consiste en que los iones de un material pueden ser implantados en un sólido, cambiando por tanto las propiedades físicas y químicas de este último, ya que el ion implantado puede ser de un elemento distinto al que lo compone, también se pueden causar cambios estructurales en el sólido implantado, puesto que la estructura cristalina del objetivo puede ser dañada. El equipamiento necesario suele consistir en una fuente que produce los iones del elemento deseado, un acelerador donde dichos iones son electrostáticamente acelerados hasta alcanzar una alta energía, y una cámara donde los iones impactan contra el objetivo. Cada ion suele ser un átomo aislado, y de esta manera la cantidad de material que se implanta en el objetivo es en realidad la integral respecto del tiempo de la corriente de ion. Esta cantidad es conocida como dosis. Las corrientes

suministradas suelen ser muy pequeñas (microamperios), y por esto la dosis que puede ser implantada en un tiempo razonable es también pequeña. Por todo esto, la implantación de iones encuentra aplicación en los casos en que el cambio químico necesario es pequeño. Las energías típicas de ion se encuentran en el rango de 10 a 500 keV. La energía de los iones junto con la especie de ion y la composición del objetivo determinan la profundidad de penetración de los iones en el sólido.

- e) La molienda de partículas de tamaño macro o micrométrico, por medio de molinos de alta eficiencia; las partículas resultantes son clasificadas por medios físicos, recuperándose las de tamaño nanométrico. La molienda enérgica y continua de los materiales iniciales puede inferir cambios energéticos en los sólidos, debido a la acumulación de defectos en situación de no equilibrio, lo que puede causar una disminución de las energías de activación, activando los sólidos para llevar a cabo reacciones químicas en estado sólido. La activación mecanoquímica de sólidos cristalinos puede producir también alteraciones y cambios tanto texturales como estructurales, que pueden resultar de gran interés en el desarrollo de materiales. La mecanoquímica por reacción entre metales y óxidos ha sido estudiada en algunos sistemas con el objeto de obtener materiales de compuestos nanoestructurados.

Los métodos que utilizan la aproximación «de arriba hacia abajo», salvo la molienda, requieren de instrumentación compleja, lo cual los hace costosos, por tanto, muchas veces se prefieren los métodos que utilizan la aproximación «de abajo hacia arriba».

La segunda aproximación de abajo hacia arriba, consiste en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos o entidades moleculares en una fase gaseosa o en solución. Este último enfoque es mucho más popular en la síntesis de nanopartículas, las cuales pueden ser soportadas o no. El soporte da estabilidad a las nanopartículas, además de que les puede conferir propiedades específicas.³³

Existen diversos métodos que utilizan la aproximación de “abajo hacia arriba” para la síntesis de nanopartículas, los más empleados son aquellos que utilizan procedimientos químicos. Por lo general, inician con la reducción de los iones metálicos a átomos metálicos, seguido por la agregación controlada de estos átomos. El método químico es el más conveniente para la obtención de nanopartículas uniformes y pequeñas. Los métodos más representativos de esta aproximación son³³:

- a) El método coloidal. Este método consiste en disolver una sal del precursor metálico o del óxido a preparar, un reductor y un estabilizante en una fase continua o dispersante (un líquido en este caso). Este último puede jugar el papel de reductor, de estabilizante o ambos. En principio el tamaño promedio, la distribución de tamaños y la forma o morfología de las nanopartículas pueden ser controlados variando la concentración de los reactantes, del reductor y del estabilizante, así como la naturaleza del medio dispersante. Por este método se pueden formar dispersiones estables por periodos de tiempo muy largos.

b) Reducción fotoquímica y radioquímica. La síntesis de nanopartículas metálicas modificando el sistema químico por medio de altas energías se asocia con la generación de reductores fuertes altamente activos como electrones, radicales y especies excitadas.

La reducción fotoquímica (fotólisis) y la radiación-química (radiólisis) difieren en el nivel de energía utilizado. La síntesis fotoquímica está caracterizada por energías por debajo de 60 eV, mientras que la radiólisis utiliza energías de 10³-10⁴ eV. Los métodos de reducción fotoquímica y radioquímica tienen la ventaja sobre el método de reducción química. Debido a la ausencia de impurezas formadas cuando se usan reductores químicos, estos métodos producen nanopartículas de alta pureza. Además, la reducción fotoquímica y radioquímica permiten producir nanopartículas en condiciones de estado sólido y a bajas temperaturas.

La reducción fotoquímica en solución se emplea frecuentemente para obtener partículas de metales nobles. Estas partículas se obtienen a partir de las correspondientes sales en agua, alcohol o solventes orgánicos.

Se ha descrito también la síntesis de nanopartículas de plata en nanoemulsiones por reducción utilizando radiólisis obteniéndose distribuciones de partícula muy estrechas. Debido a su disponibilidad y reproducibilidad, la reducción por radiación-química para sintetizar nanopartículas está teniendo una gran aceptación. En la fase líquida, las etapas asociadas con la distribución espacial de los productos

intermediarios juegan un papel esencial en la producción de nanopartículas metálicas. En contraste con la fotólisis, la distribución de los intermediarios generados durante el proceso de síntesis es más uniforme, lo que permite obtener partículas con distribuciones de tamaño más estrechas. El método de radiólisis pulsada permite la síntesis de partículas metálicas activas con estados de oxidación inusuales.

La presencia de un electrón unitario en el orbital exterior de un átomo o de un ion metálico determina su alta reactividad química. En el transcurso de la reducción por radiación-química, inicialmente se forman átomos o pequeños clusters metálicos, los cuales son transformados en nanopartículas, para estabilizarlos se pueden agregar aditivos similares a los usados en la reducción química para formar coloides.

- c) Irradiación con microondas. La técnica de irradiación con microondas produce nanopartículas con una muy baja dispersión de tamaño, aunque no siempre se logre un control preciso en la morfología, como pasa en la mayoría de las técnicas de “abajo hacia arriba”. Las microondas actúan como campos eléctricos de alta frecuencia, capaces de calentar cualquier material conteniendo cargas eléctricas como las moléculas polares en un disolvente o iones conductores en un sólido. Los solventes polares se calientan y sus componentes moleculares se ven obligados a girar con el campo y pierden energía en colisiones. Las muestras conductoras y semiconductoras se

calientan cuando los iones y los electrones contenidos en ellas forman una corriente eléctrica y la energía se pierde debido a la resistencia eléctrica del material. En los últimos años, el proceso de calentamiento asistido por microondas se ha utilizado como una alternativa atractiva para la síntesis de materiales a escala nanométrica, dado que es un método rápido, uniforme y efectivo, que permite incrementar las cinéticas de reacción en uno o dos órdenes de magnitud. Nanopartículas coloidales de Pt, Ru, Ag y Pd estabilizados por polímeros han sido preparadas por calentamiento con microondas, a partir de las sales precursoras del metal disueltas en soluciones de etilenglicol. Por otra parte, el calentamiento por microondas de las muestras líquidas permite la disminución de las fluctuaciones de temperatura en el medio de reacción, proporcionando así, un entorno más homogéneo para la nucleación y el crecimiento de las partículas metálicas.

d) Utilización de dendrímeros. La síntesis de nanopartículas también se ha llevado a cabo usando micelas, emulsiones y dendrímeros como nanorreactores que permiten la síntesis de partículas de forma y tamaño definidos. Esto se logra alterando la naturaleza de los dendrímeros. Los dendrímeros son moléculas altamente ramificadas, que incluyen un núcleo central, unidades intermediarias repetitivas y grupos funcionales terminales. Los dendrímeros representan nuevos tipos de macromoléculas que combinan el alto peso molecular y baja viscosidad de sus soluciones con su forma molecular tridimensional y

la presencia de una estructura espacial. El tamaño de los dendrímeros varía de 2 a 15 nm y representan nanorreactores naturales. Los dendrímeros con un número pequeño de unidades intermediarias existen en forma “abierta” mientras que los que involucran muchas unidades forman estructuras esféricas tridimensionales. Los grupos terminales de los dendrímeros pueden ser modificados con grupos hidróxidos, carboxilos, y hidroxicarboxilos, entre otros.

- e) Síntesis solvotermal. Con el nombre general de síntesis solvotermal se agrupan una serie de técnicas en las que un precursor metálico disuelto en un líquido, en un recipiente cerrado, es calentado por encima de su punto de ebullición, lo que genera una presión superior a la atmosférica (normalmente moderada). El líquido habitual es el agua, y de ahí el nombre de “síntesis hidrotermal”; sin embargo, cada vez se van utilizando con mayor frecuencia otros medios líquidos: disolventes orgánicos, amoníaco líquido, hidracina, etc., y tenemos entonces la síntesis solvotermal. En este tipo de técnicas normalmente los tiempos de reacción son largos (comparados con otros métodos químicos).
- f) Método sol-gel. El método sol-gel es un proceso químico en fase húmeda ampliamente utilizado en la ciencia de los materiales. Este método se utiliza principalmente para la fabricación de nanomateriales (normalmente un óxido metálico). Se parte de una solución química o sol que actúa como precursor de una red

integrada ya sea de partículas discretas o de una red de polímeros. Los precursores típicos del proceso sol-gel son los alcóxidos metálicos y los cloruros metálicos, que sufren varias reacciones de hidrólisis y policondensación para formar una dispersión coloidal, que luego de una polimerización lenta forma un gel.

El método sol-gel ha sido usado en los últimos años para preparar una amplia variedad de materiales nanoestructurados. El método es atractivo porque involucra procesos a baja temperatura. También la alta pureza y homogeneidad son atribuibles a su forma de preparación en sistemas multicomponente³³.

Para el caso de abajo hacia arriba (Bottom-Up) se ajusta a la construcción de formas más grandes a partir de la manipulación y ensamblaje de átomos o moléculas por medio de reducción química, evaporación térmica, etc. Dentro de la reducción química, está involucrada la participación de agentes reductores de origen sintético por ejemplo el borohidruro de sodio, citrato de sodio, además de agentes surfactantes como dodecilsulfato de sodio, soluciones poliméricas, etc. Sin embargo, estos presentan un riesgo para la salud humana y el medio ambiente. De aquí parte la importancia de la búsqueda de nuevos métodos de síntesis económicos, simples y seguros como la síntesis biológica o síntesis verde, que involucra el empleo de microorganismos o extractos de plantas medicinales³².

1.1.6.2 Síntesis verde o biológica de nanopartículas

Generalmente, la utilización de los métodos químicos para la producción de nanopartículas suelen ser altamente contaminantes y peligrosos para el ambiente. Frecuentemente, se produce la aglomeración de las nanopartículas generadas conduciendo a la formación de cúmulos de grandes tamaños y baja monodispersidad. Algunas de estas metodologías recurren a la utilización de agentes específicos que evitan la agregación, estabilizando el tamaño de las partículas coloidales del metal. El uso de tales agentes hace que estos sistemas sean complicados y poco amigables con el ambiente.³⁴

La síntesis verde o biológica es útil no solo debido a su menor impacto ambiental en comparación con los diversos métodos antes mencionados, sino también porque puede ser usado para producir grandes cantidades de nanopartículas que estén libres de contaminación y que tienen un tamaño y morfología bien definida. Las rutas biosintéticas pueden realmente proporcionar nanopartículas de un tamaño y morfología mejor definidos que algunos de los métodos físico-químicos de producción.³⁵

Hay una gran cantidad de fuentes naturales para la síntesis de nanopartículas, se han obtenido con plantas, hongos, levaduras y bacterias.³⁵

Muchos de los procesos biológicos empleados como síntesis alternativas se efectúan usando microorganismos por vías intracelulares, lo cual hace que en ocasiones, el aislamiento de las nanopartículas sea difícil. El cultivo de cepas puras de estas especies es costoso, tedioso y requiere de un mantenimiento cuidadoso de las condiciones de esterilidad.³⁴

Actualmente, el método biosintético utilizando extractos de plantas ha recibido más atención que los métodos físicos, químicos y aquellos que implican el uso de bacterias u hongos, donde se requiere mantener un ambiente aséptico. La posibilidad de utilizar extractos de plantas para la síntesis de metales en estado cerovalente, a escala nanométrica, fue reportado inicialmente por *Gardea-Torresdey et al. 2002*. Más tarde, se estudió ampliamente la biorreducción de varios metales a nanomateriales de diferentes morfologías capaces de satisfacer las necesidades de diversas aplicaciones industriales, sin el requerimiento de ningún aditivo o agente protector que evite la agregación o el uso de plantillas de tipo surfactantes. Estos procesos son fácilmente escalables y pueden ser menos costosos en comparación con los métodos basados en procesos microbianos. Es importante mencionar que estas metodologías de síntesis “verde”, son útiles, no sólo debido a su reducido impacto sobre el ambiente, en comparación con algunos otros métodos de producción, sino también porque pueden ser utilizadas para producir grandes cantidades de nanopartículas libres de contaminación, con una morfología y tamaño definido. Las nanopartículas sintetizadas por estos métodos son muy estables y generalmente no hay necesidad de utilizar ningún agente externo que las estabilice. Es conocido que la fuente del extracto de la planta influye en las características de las nanopartículas. Diferentes extractos contienen combinaciones y concentraciones de diversos agentes reductores orgánicos como compuestos fenólicos, terpenos, polisacáridos y flavonas. Por lo general, una biorreducción mediada por extractos de plantas en solución acuosa, bajo la

presencia de la sal metálica precursora, se produce a temperatura y presión ambiental, en tiempos cortos de reacción.³⁴

En general, el biomecanismo de síntesis de nanopartículas metálicas con extractos de plantas incluye tres fases principales:

1. La fase de activación durante la cual se produce la reducción de iones metálicos y la nucleación de los átomos de metal reducido.
2. La fase de crecimiento durante esta las pequeñas nanopartículas adyacentes se unen de forma espontánea formando partículas de mayor tamaño (maduración Ostwald), que se acompaña por un aumento en la estabilidad termodinámica de las nanopartículas.
3. La fase de terminación del proceso, determina la forma final de las nanopartículas.³⁵

A medida que la duración de la fase de crecimiento aumenta, las nanopartículas se agregan para formar nanotubos, nanoprismas, nanohexahedros, y también una variedad de otras nanopartículas de forma irregular. En la fase de terminación, las nanopartículas adquieren la conformación más energéticamente favorable, que está fuertemente influenciada por la capacidad del extracto de la planta utilizado para estabilizar las nanopartículas metálicas.³⁵

La naturaleza del extracto de la planta, su concentración, la concentración de la solución metálica, el tiempo de reacción, el pH y la temperatura afectan la tasa de producción de las nanopartículas, su cantidad, morfología y otras características.³⁵

1.2 ANTECEDENTES

Las nanopartículas sintetizadas por química verde o síntesis biológica con extractos de plantas han sido evaluadas contra líneas celulares cancerígenas donde se ha apreciado que estas poseen actividad anticancerígena. A continuación se mencionan algunos de los estudios realizados de la aplicación de las nanopartículas de plata con las diversas actividades biológicas y su citotoxicidad.

Garza Ocañas y cols (2010), evaluaron la citotoxicidad y estrés oxidativo de nanopartículas de plata en células de hígado de Chang observando que 27 $\mu\text{g/mL}$ disminuyeron más del 60% de la población y a 50 $\mu\text{g/mL}$ mostraron menor cantidad de especies reactivas de oxígeno en comparación con el control xantina oxidasa. En macrófagos se observó un incremento de producción de óxido nítrico de hasta tres veces más que el control.³⁶

Saraniya J y cols (2012) sintetizaron nanopartículas a partir del extracto acuoso de *Gelidiella sp* y evaluaron la actividad sobre la línea celular Hep-2; ellos encontraron inhibición significativa de la proliferación celular a una concentración de IC_{50} de 31.25 $\mu\text{g/mL}$ y además observaron que existía una relación directa entre la dosis y la respuesta.³⁷

Mohammad G y cols (2013) sintetizaron nanopartículas de plata a partir del extracto de *E. Chapmaniana* y realizaron su evaluación en bacterias, levaduras y determinaron la actividad anticancerígena sobre la línea celular HL-60 de leucemia promielocítica aguda. Encontraron que a un tiempo de exposición de

seis horas a las nanopartículas, las células HL-60 disminuyen su población celular hasta en un 50% a una concentración de 2 mmol/L y mientras más tiempo se exponían las células la población disminuía aún más, observando que existe una relación dosis – dependiente³⁸.

Prabhu D. y cols (2013), sintetizaron y evaluaron nanopartículas de plata a partir del extracto de hojas de *Vitex negundo* sobre la línea celular de cáncer de colon HTC-15 reportando un IC₅₀ de 20 µg/mL, lo que sugiere que las nanopartículas pueden ejercer su efecto antiproliferativo mediante la reducción de la síntesis de ADN y la inducción de apoptosis.³⁹

Gurunathan S y cols (2013), sintetizaron y evaluaron nanopartículas de plata en células de cáncer de mama MDA-MB-231 a concentraciones de 5-25 µg/mL encontrando que la inhibición del crecimiento de las células es dependiente de la dosis además de que causan la inducción de apoptosis por caspasa-3⁴⁰.

Sankar R y cols (2013), sintetizaron nanopartículas de plata usando el extracto acuoso de *Origanum vulgare* (orégano), se evaluó su actividad anticancerígena empleando la línea celular A549 de cáncer de pulmón a concentraciones de 10–500 µg/mL, encontrando que las nanopartículas de plata pueden inducir especies reactivas de oxígeno y causar daños a los componentes celulares que conducen a la muerte celular.⁴¹

Sulaiman G y cols (2013), sintetizaron y evaluaron nanopartículas de plata a partir del extracto de *Rosmarinus officinalis*, se evaluó su actividad

antimicrobiana sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas reportando una mayor zona de inhibición en comparación con su control dependiendo de la dosis. Sugieren que tienen una mayor acción antibacteriana en las Gram positiva. La actividad citotóxica se realizó sobre la línea celular de leucemia promielocítica aguda HL60 donde a una concentración de 2 mM y una exposición de dos horas a las nanopartículas se reportó un 80% de muerte celular de manera dosis dependiente.⁴²

Ding Q y cols (2014), sintetizaron y evaluaron nanopartículas de plata en la línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano encontrando que la nanopartícula con extracto de la planta *Agrimoniae herba* presentó muerte celular a una concentración de 38.13 µg/mL, para la nanopartículas de plata sintetizada por síntesis química hubo muerte celular a una concentración de 184.87 µg/mL y para el extracto de la planta sola se presentó la muerte celular a 1.147×10^4 µg/mL concluyendo que la nanopartícula sintetizada con el extracto de la planta posee mayor efecto antineoplásico en las células.⁴³

Castro V y cols (2016), observaron los efectos de los estabilizantes provenientes de plantas, donde se utilizó *Panax ginseng Meyer (P. ginseng)* como extracto estabilizante de nanopartículas de plata, evaluaron su actividad con diferentes líneas de cáncer en humanos, y se observó el efecto de las nanopartículas en la migración celular, la apoptosis y la determinación del mecanismo involucrado, en la línea celular de pulmón A549. Se encontró que el tratamiento con nanopartículas de plata estabilizadas con el extracto de *P. ginseng* inhibió la viabilidad celular e indujo estrés oxidativo para las líneas

celulares de cáncer A549, MCF7 y HepG2. Igualmente, se observó que el tratamiento de nanopartículas induce citotoxicidad y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las líneas celulares de cáncer MCF-7 y HepG2.⁴⁴

Ahmad B y cols (2016) realizaron la síntesis y evaluación antimicrobiana y antifúngica de nanopartículas de plata con extracto de las plantas de *Agave americana*, *Mentha spicata* y *Mangifera indica*, encontrando que las nanopartículas de *A. americana* poseen un potencial antibacteriano significativo y antifúngico. Las nanopartículas de *M. indica* exhibieron una buena actividad antibacteriana y antifúngica. Las nanopartículas de *M. spicata* mostraron un potencial inhibitorio significativo contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, así como también mostraron baja actividad antifúngica, realizaron la determinación de la actividad antioxidante y ellos reportan que las nanopartículas sintetizadas con el extracto de *Mentha spicata* presenta buena actividad antioxidante.⁴⁵

Kummara S y cols (2016) realizaron una comparación de la síntesis de nanopartículas de plata estabilizadas con extracto de hojas de *Azadirachta indica*, obtenidas mediante síntesis verde y nanopartículas estabilizadas con citrato, obtenidas por síntesis química, observando una diferencia en el tamaño de las nanopartículas tanto para las nanopartículas de síntesis verde como para las nanopartículas de síntesis química, también se realizaron pruebas *in vitro* con líneas celulares de fibroblastos de piel humana y para la actividad cancerígena se utilizaron células NCI-H450. Se observó que las nanopartículas

sintetizadas por la técnica de síntesis verde causan una disminución dosis dependiente en la viabilidad celular y un incremento en la generación de ROS. También se demostró un excelente efecto citotóxico y una inducción de apoptosis celular en células NCI-H450.⁴⁶

Por lo anteriormente descrito en los antecedentes de las diversas actividades que presentan las nanopartículas de plata sintetizadas por química verde con extractos de plantas, se propone evaluar la citotoxicidad en células cancerígenas y no cancerígenas de las nanopartículas sintetizadas por química verde con extractos acuosos de *Rosmarinus officinalis*, *Petroselinum crispum* y *Mentha spicata*; y las nanopartículas sintetizadas por método químico con citrato y aportar al mecanismo por medio del cual ejercen su efecto

1.3 JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad con una alta incidencia a nivel mundial, la cual sigue provocando un gran número de muertes al año a pesar de los diversos tratamientos con los que actualmente se cuenta, ya que la mayoría de éstos presentan diversos efectos adversos y son poco selectivos a las células cancerosas; por lo que existe la necesidad de continuar la búsqueda de nuevos fármacos citotóxicos, apoyados con la incorporación de nuevas ciencias como la nanotecnología y con sus nuevos nanomateriales como las nanopartículas las que han mostrado en diversas investigaciones que poseen diversas actividades biológicas importantes entre las que destaca su actividad anticancerígena.

Se pretende evaluar la actividad anticancerígena y citotóxica de nanopartículas de plata sintetizadas por el método químico con citrato y por química verde empleando extractos acuosos de plantas ya que se ha demostrado por medio de investigaciones que los extractos de diversas plantas son buenos estabilizadores para la obtención de las nanopartículas, comparar la actividad de ellas y así como aportar al mecanismo de acción por el cual ejercen su efecto ya que en la actualidad sigue siendo desconocido.

1.4 HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata estabilizadas con moléculas presentes en *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis* y *Mentha spicata* tendrán una mayor actividad anticancerígena y menor citotoxicidad en comparación con las nanopartículas estabilizadas con citrato.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Evaluar y comparar la actividad anticancerígena y citotóxica de nanopartículas de plata estabilizadas con citrato y otros estabilizantes procedentes de *Rosmarinus officinalis*, *Petroselinum crispum* y *Mentha spicata* y aportar al mecanismo de acción de la más activa.

1.5.2 Objetivos específicos

- 1 Evaluar la actividad anticancerígena de las nanopartículas en células de cáncer de cérvix (SiHa) y cáncer de colon (HT-29) mediante el ensayo con WST-1.
- 2 Determinar la citotoxicidad de las nanopartículas en células de hígado de Chang mediante el ensayo con WST-1.
- 3 Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno por las nanopartículas más activas en las líneas celulares SiHa y Chang.
- 4 Determinar la inducción de apoptosis por actividad de la caspasa-3 de las nanopartículas más activas en células SiHa.
- 5 Obtener el patrón de expresión génica inducido por la nanopartícula más activa en células SiHa.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material, reactivos y equipo en general

El material, reactivos y equipos empleados en la realización de este proyecto se encuentran en el laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, empleando lo siguiente: autoclave (All American), campana de flujo laminar(Baker), cámara de electroforesis, centrífuga refrigerada (ThermoScientific), fluorómetro (Fluoroskan Ascent), incubadora con CO₂ (ThermoScientific), invertoscopio (Carl Zeiss), lector de microplacas ELx800 (BIOTEK), microcentrífuga refrigerada (ThermoScientific), ultracongelador (ThermoScientific) y vortex.

Para el microarreglo el equipo empleado fue centrífuga Allegra 6R, sistema speedvac ISS 110, scanner para chip y termociclador, situado en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México en la Ciudad de México.

En la realización de este trabajo las nanopartículas de plata estabilizadas con los extractos de plantas, citrato y los controles de la síntesis fueron proporcionadas por el Dr. Israel Alejandro López Hernández del Departamento de Materiales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de cérvix (células SiHa) con un número de catálogo ATCC: HTB-35, cáncer de colon (células HT-29) con un número de catálogo ATCC: HTB-38, la línea celular no cancerígena de hígado de Chang (celulas Chang) con un número de catálogo ATCC: CCL-13; fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Virginia, E.U.A.).

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de las siguientes compañías: Roche (California, E.U.A), CAISSON (Smithfield, Utah, E.U.A.), Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, E.U.A), Corning (New York, E.U.A), Thermo Fisher Cientific (Waltham, Massachusetts, E.U.A.), Unidad de Microarreglos DNA del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México (Ciudad Universitaria, CDMX, México) y UNIPARTS (Monterrey, Nuevo León, México).

2.2 Métodos

2.2.1 Procedimiento para el cultivo de líneas celulares

Para la evaluación de actividad anticancerígena, citotoxicidad, producción de especies reactivas de oxígeno, apoptosis por caspasa -3 y análisis del patrón de expresión génica se utilizaron las líneas celulares SiHa, HT-29 y de hígado de Chang.

Se descongelaron las células y se colocaron en frascos de cultivo agregando 4 mL de medio esencial mínimo (EMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Los frascos con las células se incubaron a 37 °C en un ambiente de dióxido de carbono al 5% (CO₂) hasta la formación de la monocapa celular, se realizó cambio de medio esencial mínimo cada 3 días.

Cuando el cultivo se encontraba al 80% de confluencia de toda la superficie se desechó el medio de cultivo anterior, las células se lavaron dos veces con 4 mL de una solución de buffer de fosfato salino (PBS), para eliminar células muertas junto con otros residuos. Posteriormente se añadió 1 mL de tripsina-EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) al 0.25%, se incubaron a 37°C por menos de 3 minutos, se neutralizó la tripsina con 2 mL de medio EMEM, se centrifugaron para retirar el medio con tripsina, se agregaron 3 mL de medio EMEM, se resuspendió el pellet formado, se tomó de la suspensión 10 µL para realizar la determinación de la concentración celular mediante el conteo de

células en la cámara de Neubauer, obteniendo la concentración celular, se realizó una dilución de la suspensión para tener una concentración celular de 10 000 células / 0.1 mL que fueron depositados en una placa de 96 pocillos. La placa se incubó a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% hasta la formación de monocapa celular aproximadamente por 24 horas²⁹.

2.2.2 Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica de las nanopartículas de plata.

La actividad anticancerígena fue determinada en las líneas celulares SiHa y HT-29 y la citotóxica en células de hígado de Chang mediante el ensayo con WST-1.

Las líneas celulares antes mencionadas, se colocaron en placas de 96 pocillos en una cantidad de 10,000 células / pocillo aproximadamente, después de la formación de la monocapa se realizó la exposición de las líneas celulares a las nanopartículas de plata estabilizadas con extractos de *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis* y *Mentha sativa*, así como la estabilizada con citrato y sus respectivos controles como lo son los extractos acuosos de dichas plantas y la mezcla de reacción de la síntesis con citrato, agregando 100 µL a una concentración de 400 µg/mL de cada una de las nanopartículas, posteriormente se realizó dilución seriada partiendo de una concentración de 200 µg/mL hasta llegar a la concentración de 3.12 µg/mL, empleando como control positivo Vincristina para la actividad anticancerígena y Tritón X-100 al

1% para la citotoxicidad, como control negativo células con medio y como blanco medio con WST-1[2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio]. Se incubaron por 24 horas a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5% de.

Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con 100 µL de PBS para eliminar la coloración de las nanopartículas. Después de los lavados se adicionaron 100 µL de EMEM fresco al 5% de WST-1, se incubaron por un periodo de 2 horas bajo las mismas condiciones antes mencionadas, para finalmente realizar una lectura de la densidad óptica a 450 nm en un lector de microplacas modelo ELx800, para posteriormente calcular el % de viabilidad celular e IC₅₀.^{7,29, 47}.

Las evaluaciones *in vitro* se realizaron en tres repeticiones con tres réplicas y en tiempos diferentes.

2.2.3 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de las nanopartículas de plata mediante la prueba de diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)

La evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), por sus siglas en inglés se realizó en las líneas celulares de SiHa e hígado de Chang, con las nanopartículas estabilizadas con *Mentha spicata* y citrato previamente seleccionadas en base a su actividad anticancerígena y citotoxicidad.

Se colocaron aproximadamente 10,000 células / pocillo de las líneas celulares antes mencionadas en placa de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C en 5% de CO₂ por 24 horas hasta la formación de monocapa, transcurrido el tiempo se cambió el medio por EMEM fresco dejando la fila H sin medio la cual se empleó para los controles y se realizó la exposición a las nanopartículas de plata agregando 100 µL a una concentración de 400 µg/mL de estas a cada pocillo realizando una dilución seriada partiendo de una concentración de 200 µg/mL hasta una concentración de 3.12 µg/mL, se agregaron 100 µL de DCFDA disuelta en medio de cultivo a todos los pocillos de la placa a excepción de la fila H. En la fila para controles, como control negativo se empleó medio fresco y células, y medio con DCFDA y células, para el control positivo se adicionan 100 µL de medio con DCFDA y 100 µL de xantina oxidasa la que quedó una concentración de 31.25 µg/mL y como blanco se usó medio con DCFDA sin células.

Finalmente, se realizó una lectura al tiempo cero, 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 horas de exposición en un fluorómetro (Fluoroskan Ascent) a una longitud de onda de 485 nm de excitación y a 530 nm de emisión manteniendo en ese tiempo en incubación bajo las mismas condiciones antes mencionadas y en ausencia de luz^{29, 48}.

Las evaluaciones *in vitro* se realizaron en tres repeticiones con tres réplicas y en tiempos diferentes.

2.2.4 Determinación de la inducción de apoptosis por la actividad de caspasa-3 por las nanopartículas más activas en la línea celular SiHa

Las células SiHa se ajustaron a una densidad celular de 1×10^6 células / pocillo en una placa de 6 pocillos y se incubaron por 24 h a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂ hasta la formación de monocapa. Transcurrido este tiempo se cambió el medio por EMEM fresco con las nanopartículas de plata estabilizadas con *Mentha spicata* y citrato previamente seleccionadas a la concentración obtenida en el IC₅₀ que fue de 12.20 µg/mL, medio EMEM con la podofilotoxina a la misma concentración del IC₅₀ como control positivo y como control negativo células sin tratamiento y se incubó por 24 horas bajo las mismas condiciones antes mencionadas.

Transcurrido el tiempo las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en 1 mL de PBS, se centrifugaron y se retiró el sobrenadante, enseguida se agregaron 50 µL de buffer de lisis 1X y se incubaron en hielo por 30 minutos, cumplido el tiempo se centrifugaron a 5 000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 minutos.

Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos y se realizó la determinación de la cantidad de proteínas presente en cada muestra por el método de Bradford, se ajustó la concentración de proteínas a 500 ng de proteína y se colocaron en una placa de 96 pocillos oscura y se completó el volumen a 50 µL con buffer de lisis 1X, posteriormente se agregaron 50 µL de solución de trabajo 2X a cada

pocillo de la placa, se cubrió la placa y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz, se empleó como blanco buffer de lisis 1X.

Cumplido el tiempo se realizó la medida de la fluorescencia en un fluorómetro a 496 nm de excitación y 520 nm de emisión.⁴⁹

Las evaluaciones *in vitro* se realizaron en tres repeticiones con tres réplicas y en tiempos diferentes.

2.2.5. Análisis del patrón de expresión génica por las nanopartículas más activas (microarreglos de DNA)

En el microarreglo de DNA se empleó la línea celular SiHa en dos condiciones experimentales, una donde la línea celular fue sometida a tratamiento con las nanopartículas de plata y la segunda donde la línea celular no es sometida a ningún tratamiento para determinar la expresión génica diferencial.

El estudio se realizó de la siguiente manera, a partir de un cultivo celular de SiHa se ajustó la concentración a dos millones de células y se depositaron en un frasco de cultivo y se incubó a 37 °C a 5% de CO₂ por 24 horas o hasta la formación de la monocapa, transcurrido el tiempo se realizó un cambio de medio por EMEM fresco con la nanopartícula estabilizada con *Mentha sativa* y citrato a una concentración de IC₅₀ de 12.20 µg/mL después del tratamiento las células se incubaron por 24 horas, a la par se colocaron células SiHa sin ningún

tratamiento, seguido de este tiempo se realizó la extracción de RNA convencional, posteriormente se sintetizó el DNA complementario y a la vez se marcó con los fluoróforos correspondientes. El cDNA es hibridado en el microarreglo, después de la hibridación el microarreglo se escaneó para obtener los genes y finalmente se realizó el análisis bioinformático.^{7, 50, 51}.

2.2.5.1 Extracción de RNA por método convencional

El RNA se extrajo de manera convencional usando el reactivo Trizol. La extracción se realizó a partir de una pastilla con aproximadamente 2 millones de células, se añadieron 500 µl de reactivo de Trizol y se homogenizó con vortex, se dejó reposar a temperatura ambiente por 2 minutos, se añadieron 200 µl de cloroformo, se agitó por 15 segundos en vortex y se dejó reposar por 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron las muestras por 8 minutos a 14,000 rpm, se obtuvo una fase orgánica inferior, una interfase sólida y una fase acuosa superior transparente, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo estéril cuidando no tomar de la interfase. Se añadieron 500 µL de isopropanol y se mezcló por inversión, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente para esperar a que precipitara el RNA; después de ese tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos, se pudo observar el RNA precipitado el cual era de color beige.

Posteriormente se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos, se decantó y absorbió el etanol restante con una

servilleta limpia de las paredes del tubo y se dejó secar por 5 minutos a temperatura ambiente, se adicionaron 50 μ L de agua miliQ estéril y se disolvió la pastilla, inmediatamente se realizó un análisis de la integridad del RNA obtenido por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, se cuantificó por medio de un espectrofotómetro Nanodrop 2000 de Thermo Fisher Scientific y se determinó la relación de la densidad óptica (DO) 260/280 y si los valores se encontraban entre 1.8 - 2.0 se consideraba un RNA de calidad.

Luego de realizar las pruebas para confirmar la presencia e integridad del RNA este se preparó para su transporte a la unidad de microarreglo, se llevaron las muestras hasta un volumen final de 50 μ L y se agregaron 5 μ L de acetato de sodio 3M a pH de 5.2, se mezcló en vortex, se agregaron 138 μ L de etanol 100% frío y se mezcló por inversión para que quedara homogéneo, se conservaron a -70 °C durante una noche y finalmente se centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos, se retiró el sobrenadante y finalmente se sellaron los tubos.^{7, 50}

2.2.5.2 Marcado del RNA

Para el marcado del RNA (sonda) se utilizó la síntesis *in vitro* de DNA complementario donde se emplearon desoxinucleótidos T marcados con una molécula fluorescente Alexafluor 555 y 647 para las muestras no tratadas y las tratadas, se agregó transcriptasa inversa a la mezcla, la cual sintetiza el cDNA a partir del RNAm, incorporando el desoxinucleótido U o T marcado en dos

reacciones, se dejó incubando toda la noche, transcurrido el tiempo se realizó la hidrólisis del RNA. Se purificó el Aminoalyl cDNA por medio de columnas Qiagen, posteriormente se realizó la reacción de conjugación y finalmente se realizó la purificación del cDNA marcado por medio de columnas Qiagen para eliminar el desoxinucleótido fluorescente no incorporado al cDNA y se tiene la sonda marcada, lista para probarla en el microarreglo.⁵¹

2.2.5.3 Hibridización del microarreglo

Antes de realizar la hibridización del microarreglo se realiza un pretratamiento a este, en el cual se hidrato la laminilla exponiendo el lado impreso al vapor de agua a 60 °C por 10 segundos tres veces dejando secar entre cada repetición, se fijó con dos ciclos de luz U.V. 0.12 j x cm², se prehibridizo la laminilla, las muestras fueron previamente ajustadas a la concentración deseada, finalmente se aplicó la solución de hibridación con las sondas sobre la laminilla y se cubrió con un cubreobjetos para permitir que la solución cubra todo el microarreglo, los microarreglos fueron colocados en cámaras húmedas y se incubaron por 18 horas a 42 °C en baño de agua para evitar la evaporación.⁵¹

Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron lavados del microarreglo hibridado y se secó por centrifugación para realizar la lectura del chip⁵¹.

2.2.5.4 Lectura de microarreglos

Se utilizó un equipo lector de microarreglos que emplea un láser para excitar las moléculas fluorescentes unidas al cDNA y poder obtener la imagen de cada una de las muestras contenidas en el microarreglo. Este procedimiento se realizó para cada uno de los fluoróforos obteniéndose dos imágenes, una para el fluoróforo Alexa 555 (rojo) y otra para el fluoróforo Alexa 647 (verde). Para la obtención de estas imágenes se ajustó la intensidad del láser y la sensibilidad de la cámara o de los fotomultiplicadores según sea el tipo de lector, de tal forma que ambas imágenes dieron valores semejantes de fluorescencia total. Comúnmente para lograr esto, en los microarreglos se colocan controles o marcadores que se utilizan para ajustar la señal de fluorescencia para ambos fluoróforos. Una vez obtenidas estas imágenes, se combinaron para obtener un aspecto visual del microarreglo. Para la obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia contenidas en el microarreglo, se realizó la cuantificación de las imágenes mediante el uso de software (Genarise). Con el cual se logran encontrar los genes que se encuentran sobreexpresados e inhibidos con un zscore mayor o menor a ± 1.5 desviación estándar, según sea el caso.⁵¹

2.2.5.5 Análisis bioinformático

A través del programa en línea David (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) se determinó en qué posibles rutas metabólicas están involucrados los genes sobreexpresados e inhibidos en el ensayo del microarreglo^{51, 52}.

2.2.6 Manejo de los residuos

Se manejaron residuos químicos como lo fueron soluciones salinas, residuos de trizol, cloroformo, etanol e isopropanol, así como de cultivo celular los cuales fueron esterilizados y dispuestos en bolsa roja.

Los contenedores usados fueron:

A. Soluciones salinas pH 6.8, soluciones de: sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, orgánicos y bases inorgánicas.

E. Muy tóxico, cancerígeno orgánico.

Bolsa roja: residuos de cultivo celulares biológico – infecciosos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica de las nanopartículas de plata

3.1.1 Evaluación de la actividad anticancerígena de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de cáncer de colon HT-29

Se realizó la determinación de la actividad anticancerígena de los extractos acuosos de las plantas de *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis* y *Mentha spicata* sobre las líneas celulares HT-29 y SiHa y no se encontró actividad anticancerígena de estos por lo que la actividad no se atribuye a los extractos acuosos de dichas plantas.

Se determinó la actividad anticancerígena de las nanopartículas de plata estabilizadas con extractos acuosos de *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha spicata* y la estabilizada con citrato mediante el ensayo con

WST-1 presentando los resultados en la tabla 3, estos se presentan en porcentajes de viabilidad celular y en la figura 1 se puede observar el gráfico de comportamiento de dosis-respuesta para cada nanopartícula.

Mediante un análisis de varianza (ANOVA) fue determinada la diferencia significativa donde si el valor de p es <0.05 se consideró que existía diferencia significativa, en este caso no hubo diferencia significativa entre los resultados obtenidos para cada nanopartícula.

Se realizó la determinación del IC_{50} para cada nanopartícula los resultados se presentan en la tabla 4.

Tabla 3. Porcentajes de viabilidad de células HT-29 tratadas con nanopartículas de plata por 24 horas

Concentraciones $\mu\text{g/mL}$	Nanopartículas estabilizadas			
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Mentha spicata</i>	Citrato
	% Viabilidad \pm DE			
3.12	58.3 \pm 3.1	54.6 \pm 1.9	55.0 \pm 2.1	54.3 \pm 1.9
6.25	56.3 \pm 1.5	54.3 \pm 2.8	55.0 \pm 2.1	55.0 \pm 1.5
12.5	58.3 \pm 1.5	55.3 \pm 1.1	55.3 \pm 2.0	54.3 \pm 2.5
25	58.0 \pm 2.4	56.6 \pm 1.6	54.3 \pm 1.6	55.6 \pm 1.6
50	55.0 \pm 2.5	50.3 \pm 0.6	52.3 \pm 1.8	56.6 \pm 2.1
100	50.3 \pm 0.7	45.0 \pm 0.4	49.3 \pm 0.9	42.0 \pm 21.2
200	45.6 \pm 0.3	44.0 \pm 0.3	44.3 \pm 0.2	46.3 \pm 0.9

ANOVA: $n=7$, $p < 0.05$ comparación entre las nanopartículas, no hubo diferencia significativa entre ninguna, valor de $p=0.66$.

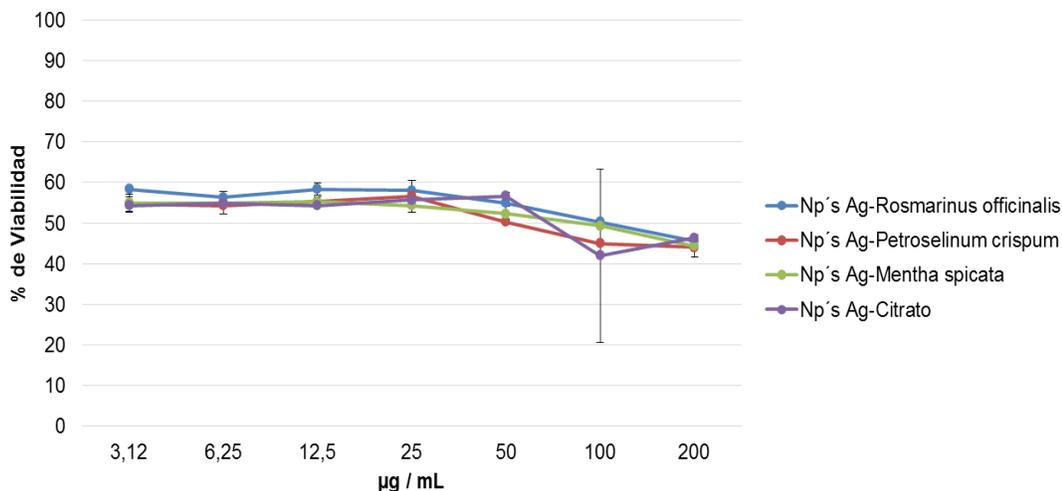


Figura 1. Actividad anticancerígena de nanopartículas de plata estabilizadas con extractos acuosos de plantas y citrato sobre la viabilidad en la línea celular HT-29.

Tabla 4. IC₅₀ de nanopartículas en la línea celular HT-29

Nanopartícula	IC ₅₀
<i>Rosmarinus officinalis</i>	37.69 ± 20.92
<i>Petroselinum crispum</i>	23.68 ± 14.42
<i>Mentha spicata</i>	26.02 ± 7.93
Citrato	31.80 ± 16.76

3.1.2 Evaluación de la actividad anticancerígena de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa).

De igual forma que en la línea celular antes mencionada se realizó la determinación de la actividad anticancerígena de las nanopartículas de plata estabilizadas con extractos acuosos de *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha spicata* y la estabilizada con citrato, mediante el ensayo con WST-1, los resultados se presentan en porcentaje de viabilidad en la tabla 5

para cada una de las nanopartículas. En la figura 2 se puede observar el gráfico de comportamiento de dosis-respuesta para cada nanopartícula.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) donde se determinó si había diferencia significativa entre las nanopartículas, donde se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Se encontró diferencia significativa entre las nanopartículas por lo que se realizó la prueba de Tukey para poder identificar las nanopartículas entre las que existía diferencia significativa, se encontró que la diferencia era la nanopartícula estabilizada con *Rosmarinus officinalis* y la estabilizada con *Petroselinum crispum* y entre las nanopartículas estabilizadas con *Rosmarinus officinalis* y la estabilizada con *Mentha spicata*.

Tabla 5. Porcentaje de viabilidad de células SiHa tratadas con nanopartículas de plata por 24 horas

Concentraciones µg/mL	Nanopartículas estabilizadas			
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Mentha spicata</i>	Citrato
	%Viabilidad ± DE			
3.12	69.3 ± 8.3	54.0 ± 4.4	57.0 ± 6.4	65.0 ± 3.6
6.25	65.7 ± 3.9	36.0 ± 1.5	35.7 ± 2.1	58.7 ± 3.5
12.5	63.0 ± 2.2	31.0 ± 0.5	34.7 ± 2.9	36.0 ± 3.3
25	61.7 ± 1.5	28.7 ± 0.6	35.0 ± 2.5	33.3 ± 0.9
50	54.7 ± 2.5	27.7 ± 0.4	29.7 ± 2.6	31.3 ± 0.4
100	53.0 ± 4.4	28.0 ± 0.7	29.0 ± 0.8	25.3 ± 9.7
200	31.0 ± 2.3	28.0 ± 0.7	28.3 ± 0.9	27.3 ± 1.0

ANOVA: $n = 7$, $p < 0.05$ comparación entre las nanopartículas, se encontró diferencia significativa entre las nanopartículas, valor de $p = 0.005$. Prueba Tukey para comparación entre nanopartículas y las diferentes fueron

Rosmarinus officinalis y *Petroselinum crispum*, y *Rosmarinus officinalis* y *Mentha spicata*.

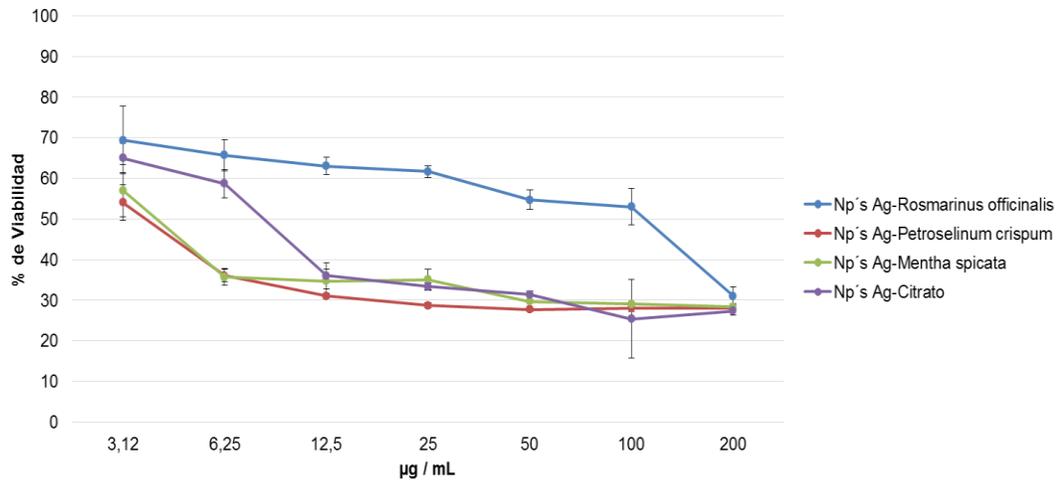


Figura 2. Actividad anticancerígena de nanopartículas de plata estabilizadas con extractos acuosos de plantas y citrato sobre la viabilidad en la línea celular SiHa.

Se determinaron los IC_{50} de las nanopartículas de plata para la línea celular SiHa los cuales se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. IC_{50} de nanopartículas en la línea celular SiHa

Nanopartícula	IC_{50}
<i>Rosmarinus officinalis</i>	47.12 ± 12.88
<i>Petroselinum crispum</i>	8.94 ± 6.36
<i>Mentha spicata</i>	12.20 ± 10.21
Citrato	16.49 ± 9.96

3.1.3 Evaluación de la actividad citotóxica de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de hígado de Chang

Se realizó la determinación de la citotoxicidad de los extractos acuosos de las plantas de *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis* y *Mentha spicata* sobre la línea de hígado de Chang y no se encontró inhibición de la proliferación celular por lo que se consideran no citotóxicos.

Se realizó la evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas de plata estabilizadas con extractos acuosos de *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha spicata* y la estabilizada con citrato mediante el ensayo con WST-1, los resultados se presentan en porcentaje de viabilidad en ambos casos en la tabla 7 para las nanopartículas estabilizadas con extractos acuosos de plantas y la estabilizada con citrato. En la figura 3 se puede observar el gráfico de comportamiento de dosis-respuesta para cada nanopartícula.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) donde se determinó si había diferencia significativa entre las nanopartículas, donde se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Se encontró que no hay diferencia significativa entre las nanopartículas.

Tabla 7. Porcentaje de viabilidad de células de hígado de Chang tratadas con nanopartículas de plata por 24 horas.

Concentraciones µg/mL	Nanopartículas estabilizadas			
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Petroselinum crispum</i>	<i>Mentha spicata</i>	Citrato
	%Viabilidad ± DE			
3.12	50.0 ± 2.3	47.0 ± 3.4	53.3 ± 2.9	51.7 ± 1.1
6.25	52.7 ± 4.6	48.0 ± 1.9	52.3 ± 2.6	48.3 ± 3.9
12.5	56.3 ± 1.4	47.3 ± 3.0	49.0 ± 4.1	47.7 ± 1.3
25	52.3 ± 6.4	44.3 ± 3.8	43.3 ± 2.1	42.3 ± 2.0
50	54.7 ± 2.2	36.3 ± 2.5	43.0 ± 2.3	34.3 ± 1.5
100	50.3 ± 5.6	47.7 ± 2.7	40.3 ± 1.3	21.3 ± 9.3
200	37.0 ± 2.8	17.0 ± 0.2	30.7 ± 1.5	22.0 ± 0.6

ANOVA: n= 7, p <0.05 comparación entre las nanopartículas, no hubo diferencia significativa entre ninguna, valor de p=0.14.

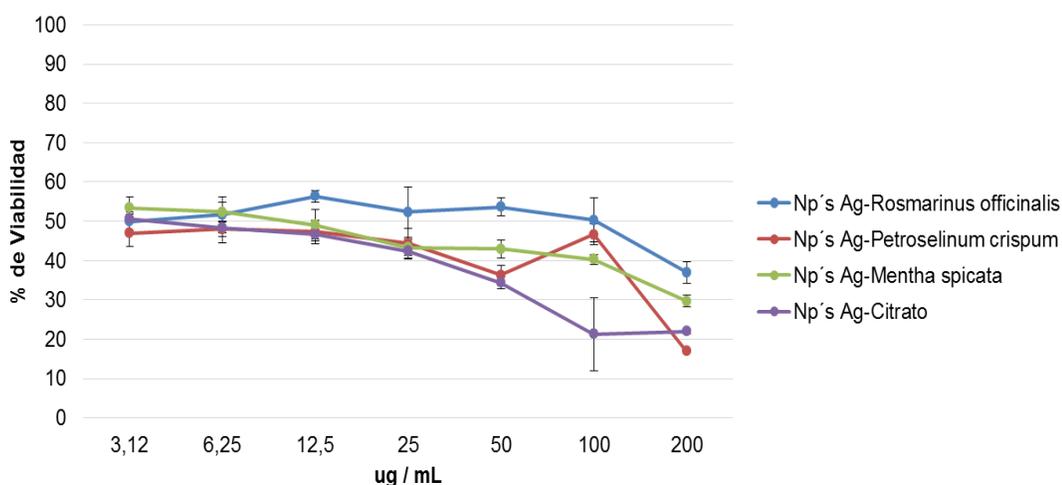


Figura 3. Actividad citotóxica de nanopartículas de plata estabilizadas con extractos acuosos de plantas y citrato sobre la viabilidad en la línea celular de hígado de Chang.

Se determinaron los IC₅₀ de las nanopartículas de plata para la línea celular de hígado de Chang los cuales se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. IC₅₀ de nanopartículas en la línea celular de hígado de Chang

Nanopartícula	IC ₅₀
<i>Rosmarinus officinalis</i>	61.86 ± 14.96
<i>Petroselinum crispum</i>	14.40 ± 3.41
<i>Mentha spicata</i>	21.37 ± 10.96
Citrato	13.25 ± 7.14

3.2 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de las nanopartículas de plata mediante la prueba de diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA)

3.2.1 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de las nanopartículas de plata en la línea celular SiHa.

Se realizó la producción de especies reactivas de oxígeno en la línea celular SiHa a varias concentraciones, se emplearon las nanopartículas más activas las cuales fueron la estabilizada con *Mentha spicata* y citrato, los resultados obtenidos se presentan en intensidad de fluorescencia, en la figura 4 se presentan los resultados de la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata* y el control positivo (xantina oxidasa) para comparación. En la figura 5 se presentan los resultados de la producción de especies reactivas de oxígeno por la nanopartícula estabilizada con citrato y el control positivo (xantina oxidasa)

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) donde se determinó si había diferencia significativa entre las nanopartículas y el control positivo (xantina oxidasa), se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Se encontró que sí hay diferencia estadísticamente significativa por lo que se realizó la prueba de Tukey para identificar entre que grupos existía diferencia significativa, se encontró que la diferencia era entre la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata* y el control xantina oxidasa así como entre la nanopartícula estabilizada con citrato y el control xantina oxidasa.

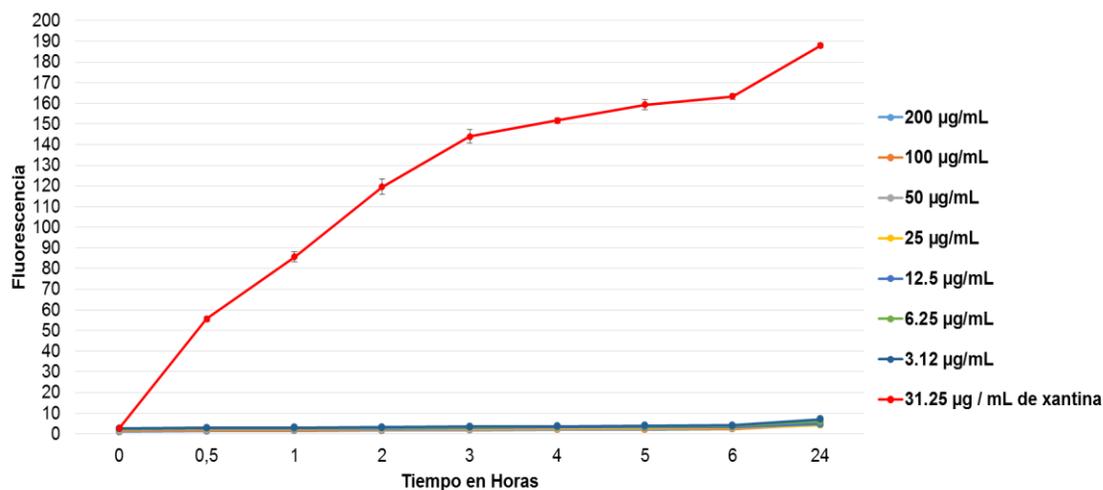


Figura 4. Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de la nanopartícula de plata estabilizada con el extracto acuoso de *Mentha spicata* en la línea celular SiHa.

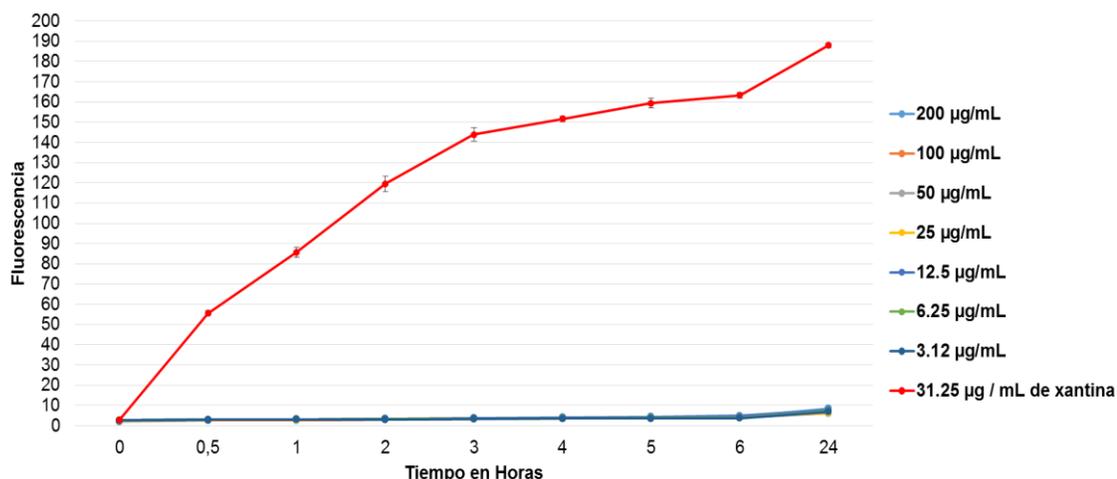


Figura 5. Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de la nanopartícula de plata estabilizada con citrato en la línea celular SiHa

Se obtuvo el porcentaje de producción de especies reactivas de oxígeno en base a la producción de estas por la xantina oxidasa a las 24 horas de exposición para las nanopartículas estabilizadas con *Mentha spicata* y citrato, en la tabla 9 podemos observar que los porcentajes son menores al 5% confirmando que la producción es muy escasa por ambas nanopartículas.

Tabla 9. Porcentajes de producción de especies reactivas de oxígeno en la línea celular SiHa

Concentración µg / mL	% de producción de especies reactivas de oxígeno ± DE	
	Np's Ag- <i>Mentha spicata</i>	Np's Ag-citrato
3.12	3.78 ± 0.05	3.61 ± 0.07
6.25	3.20 ± 0.09	3.83 ± 0.02
12.5	2.36 ± 0.11	4.12 ± 0.13
25	2.27 ± 0.09	3.31 ± 0.05
50	2.31 ± 0.03	3.25 ± 0.01
100	2.38 ± 0.11	3.72 ± 0.09
200	2.70 ± 0.27	4.15 ± 0.33

En la figura 6 se puede apreciar el gráfico del porcentaje de la producción de especies reactivas de oxígeno a las 24 horas para las nanopartículas estabilizadas con *Mentha spicata* y citrato en la línea celular SiHa en base a lo producido por la xantina oxidasa, donde podemos observar que los porcentajes de producción de acuerdo a la concentración de nanopartículas comparado con la xantina oxidasa son mucho menores.

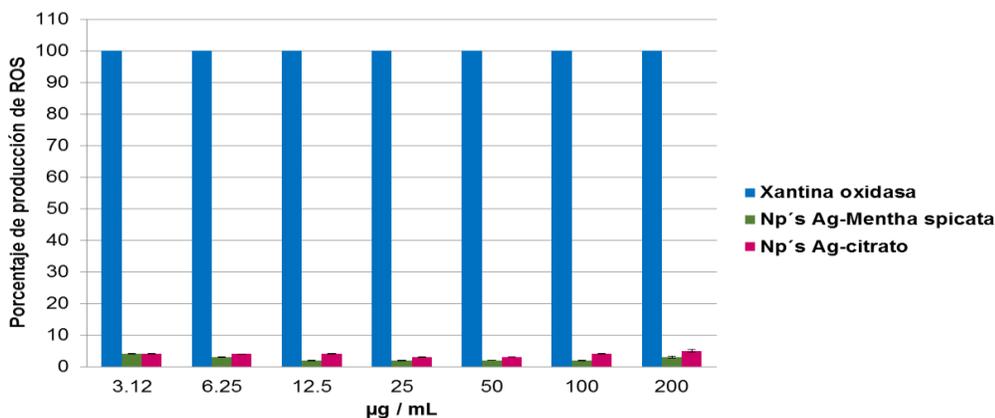


Figura 6. Porcentaje de la producción de especies reactivas de oxígeno a las 24 horas para las nanopartículas estabilizadas con *Mentha spicata* y citrato en la línea celular SiHa

3.2.2 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de las nanopartículas de plata en la línea celular de hígado de Chang.

De igual forma se realizó la producción de especies reactivas de oxígeno en la línea celular de hígado de Chang a las mismas concentraciones y exponiéndolas a las mismas nanopartículas; los resultados obtenidos se presentan en intensidad de fluorescencia, en la figura 7 se presentan los resultados de la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata* y el control positivo. En la figura 8 se presentan los resultados de la producción de

especies reactivas de oxígeno por la nanopartícula estabilizada con citrato y el control positivo.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) donde se determinó si había diferencia significativa entre las nanopartículas y el control positivo (xantina oxidasa), se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Se encontró que sí hay diferencia estadísticamente significativa por lo que se realizó la prueba de Tukey para identificar entre qué grupos existía diferencia significativa, se encontró que la diferencia era entre la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata* y el control xantina oxidasa así como entre la nanopartícula estabilizada con citrato y el control xantina oxidasa.

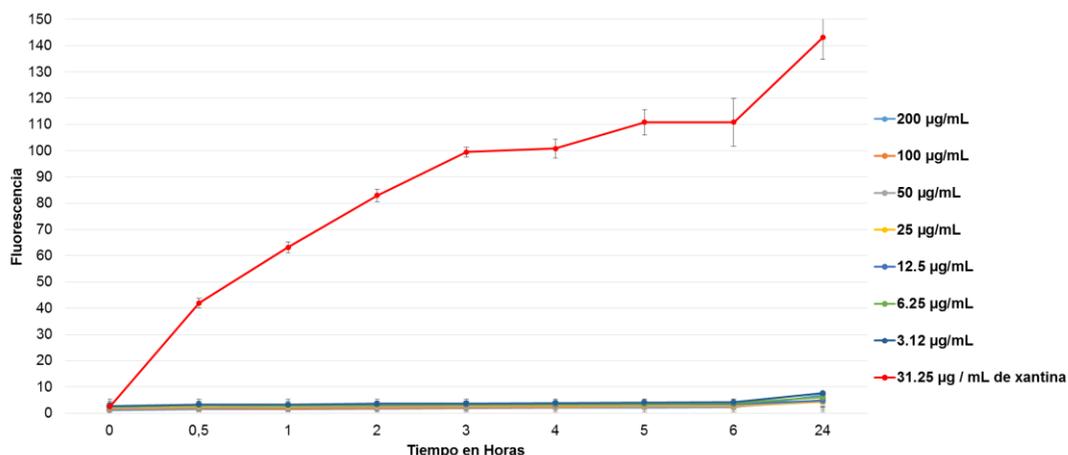


Figura 7. Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de la nanopartícula de plata estabilizada con extracto acuoso de *Mentha spicata* en la línea celular de hígado de Chang.

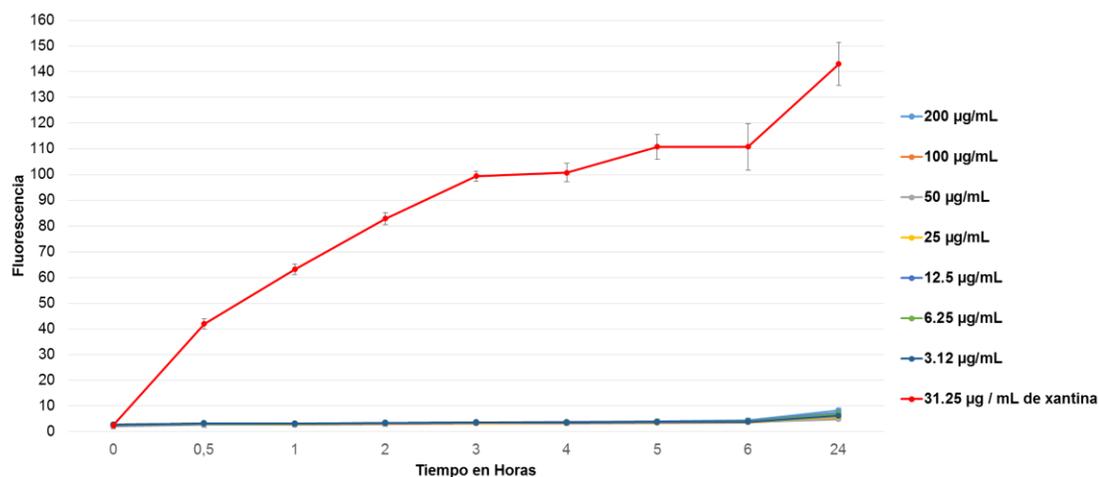


Figura 8. Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de la nanopartícula de plata estabilizada con citrato en la línea celular de hígado de Chang.

De igual forma se determinó el porcentaje de producción de especies reactivas de oxígeno por las nanopartículas estabilizadas con *Mentha spicata* y citrato a las 24 horas en base a lo producido por la xantina oxidasa a las 24 horas, en la tabla 10 podemos observar que los porcentajes de producción de especies reactivas de oxígeno es menor a 6% por lo que podemos confirmar que no hay producción de especies aun a las 24 horas de exposición. En la figura 9 se puede apreciar la producción de especies reactivas de oxígeno a diversas concentraciones en comparación con la xantina oxidasa a un a la mayor concentración de nanopartículas.

Tabla 10. Porcentajes de producción de especies reactivas de oxígeno en la línea celular de hígado de Chang

Concentración µg / mL	% de producción de especies reactivas de oxígeno ± DE	
	Np's Ag-Mentha spicata	Np's Ag-citrato
3.12	5.32 ± 0.14	4.33 ± 0.39
6.25	4.26 ± 0.19	4.79 ± 0.08
12.5	3.33 ± 0.38	5.04 ± 0.07
25	3.05 ± 0.70	4.05 ± 0.16
50	3.07 ± 0.84	3.42 ± 0.48
100	3.51 ± 1.18	3.60 ± 0.55
200	4.84 ± 2.20	5.77 ± 1.26

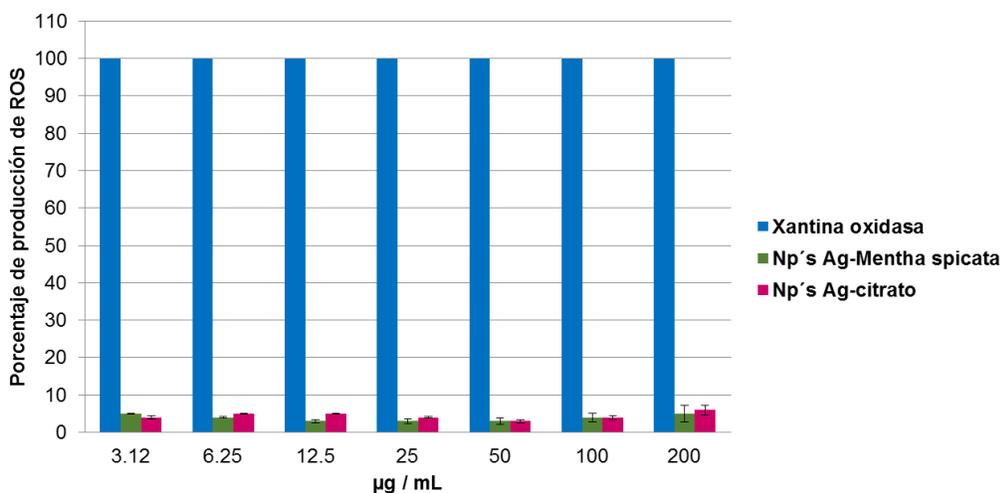


Figura 9. Porcentaje de la producción de especies reactivas de oxígeno a las 24 horas para las nanopartículas estabilizadas con Mentha spicata y citrato en la línea celular de hígado de Chang

3.3 Determinación de la inducción de apoptosis por la actividad de caspasa-3 por las nanopartículas más activas en la línea celular SiHa

Se realizó la determinación de la inducción de la apoptosis por la actividad de la caspasa-3 empleando una concentración de 12.20 µg/mL de la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata* y citrato, para la determinación de la actividad de la caspasa-3 se usaron 500 ng/mL de lisado proteico de ambos tratamientos y de los controles tanto del positivo que fue la podofilotoxina y del control negativo, los resultados obtenidos se presentan en intensidad de fluorescencia en la figura 10.

Se determinó el análisis de varianza (ANOVA) donde se consideró que había diferencia estadísticamente significativa si el valor de p era <0.05, se encontró que sí había diferencia estadísticamente significativa, por lo que se realizó la prueba de Tukey para identificar entre qué grupos existía diferencia significativa, se obtuvo que había diferencia entre la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata* y el control positivo podofilotoxina y entre la nanopartícula estabilizada con citrato y el control positivo podofilotoxina.

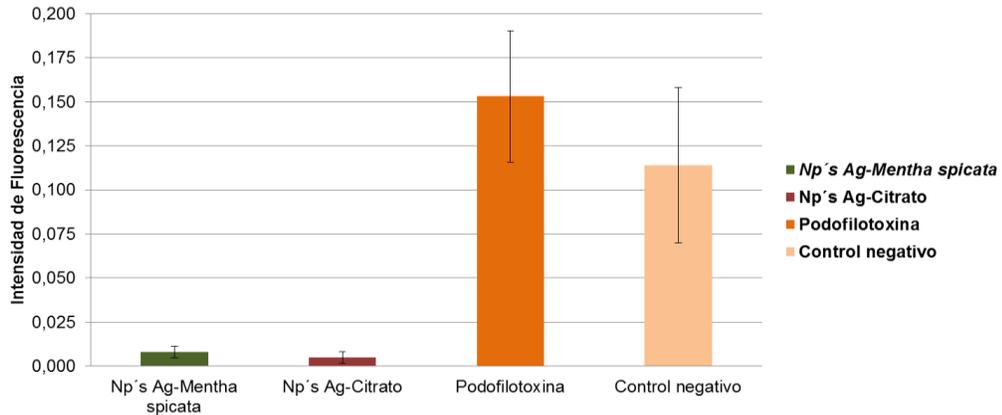


Figura 10. Evaluación de la inducción de la actividad de las caspasa-3 de las nanopartículas de plata en la línea celular SiHa.

3.4 Análisis de expresión génica (microarreglo) por las nanopartículas más activas en la línea celular SiHa

Se determinó el análisis de expresión génica diferencial en la línea celular SiHa con dos tratamientos, el primero fue de la nanopartícula de plata estabilizada con *Mentha spicata* y el segundo con la nanopartícula de plata estabilizada con citrato ambas a una concentración de 12.20 µg/mL y se comparó con un control el cual fueron células sin someter a ningún tratamiento, para esto primero se obtuvieron los RNA's de las muestras, estos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% para ver la integridad del RNA el cual se muestra en la figura 11, se cuantificó y se obtuvo la relación de la densidad óptica y se comprobó que la calidad de los RNA's era buena ya que se encontró dentro de los rangos de 1.8 – 2.0, con un valor de 1.9, en la figura 12 se presenta la imagen de un chip de DNA de los experimentos realizados.

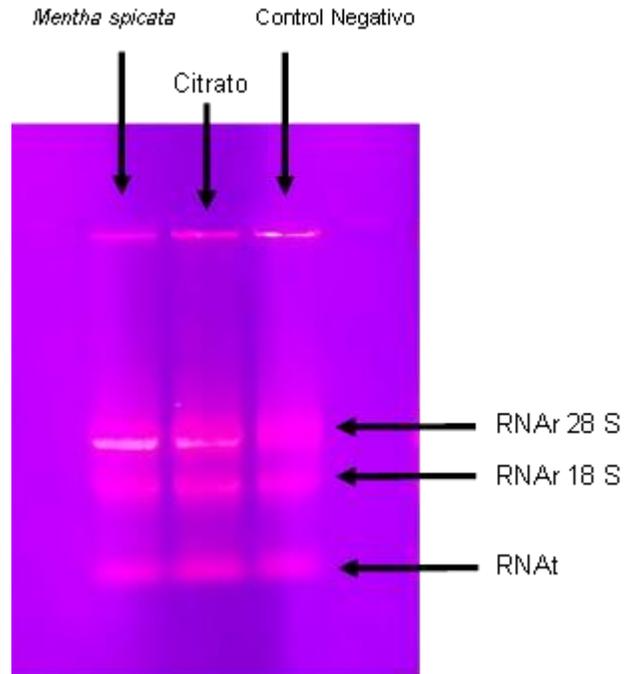


Figura 11. Electroforesis de RNA's en gel de agarosa al 1%.

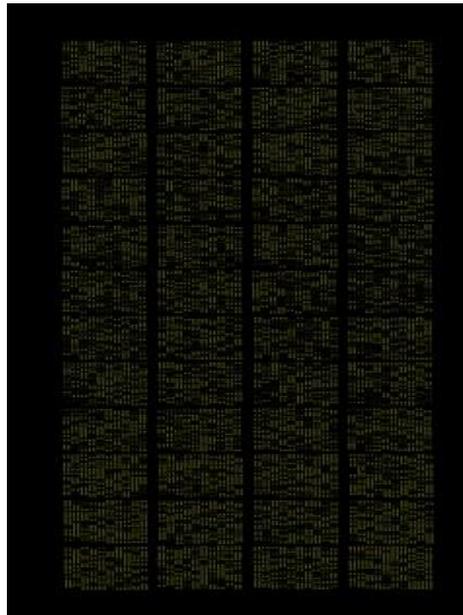


Figura 12. Chip de DNA.

El chip fue escaneado y cuantificado para obtener los genes sobreexpresados y reprimidos en cada tratamiento, se consideró un z-score de ± 2 DE como valor significativo para el análisis bioinformático encontrando para el caso de la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata* 158 genes reprimidos y 232 genes sobreexpresados y para la nanopartícula estabilizada con citrato 162 genes reprimidos y 255 genes sobre expresados.

Posteriormente se realizó el análisis bioinformático de los genes sobreexpresados y reprimidos con la ayuda del programa en línea DAVID el cual asocia los genes a las vías metabólicas en las que intervienen y así ver los cambios que provocan los tratamientos en las vías metabólicas.⁵⁰

Para la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata* se encontraron “de acuerdo a la expresión de los genes” 31 vías metabólicas reprimidas que pueden apreciarse en la tabla 11 y los principales genes de algunas vías en la tabla 12 y 21 vías metabólicas sobreexpresadas las cuales se pueden ver en la tabla 13 así como los principales genes de algunas vías metabólicas en la tabla 14.

Tabla 11. Vías metabólicas encontradas de los genes reprimidos por la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata*.

Vía metabólica	Número de genes
Lisosoma	5
Transducción del gusto	3
Sinapsis serotoninérgica	4
Infección herpes simplex	5
Vía de señalización de quimiocinas	5
Vía de señalización del cAMP	5
Señalización de células epiteliales en la infección por helicobacter pylori	3
Pertussis	3
Interacción de receptor citosina – citosina	5
Sistema renina – angiotensina	2
Biosíntesis del anclaje de glicosilfosfatidilinositol	2
Vía de señalización de MAPK	5
Interacción ligando – receptor neuroactivo	5
Proteoglicanos en cáncer	4
Citotoxicidad mediada por células natural killer	3
Regulación endocrina y otros factores de reabsorción del calcio	2
Factores de transcripción basal	2
Absorción mineral	2
Sinapsis dopaminérgica	3
Activación plaquetaria	3
Malaria	2
Vía de señalización Ras	4
Infección de <i>Staphylococcus aureus</i>	2
Legionelosis	2
Vía de señalización Jak – STAT	3
Hepatitis B	3
Enfermedad hepática grasa no alcohólica	3
Apoptosis	2
Vía de señalización PI3K – Akt	5
Carcinoma de células renales	2
Endocitosis	4

Tabla 12. Vías metabólicas y sus respectivos genes reprimidos por la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata*

Vía metabólica	Genes reprimidos
Lisosoma	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Complejo relacionado a la proteína activadora 1 subunidad 2 gamma. ➤ Catepsina A. ➤ Cadena ligera clatrina B. ➤ Mucopolipina 1. ➤ Miembro de la familia de portadores de soluto 11.
Vía de señalización de quimiocina	<ul style="list-style-type: none"> ➤ El ligando 8 de quimiocina motivo C - C. ➤ El receptor 1 de quimiocina motivo C - X - C. ➤ Proteína G subunidad cinco beta. ➤ Miembro de la familia oncogénica RAS. ➤ P21 kinasa 1 activada.
Interacción del receptor citosina – citosina	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ligando quimiocina 8 motivo C – C. ➤ Receptor de quimiocina 1 motivo C – X – C. ➤ Eritropoyetina. ➤ Receptor de Interleucina 4. ➤ Receptor alfa del factor inhibidor de la leucemia.
Biosíntesis de Glucosilfosfatidilinositol	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Biosíntesis de anclaje clase B fosfatidilinositolglicano. ➤ Biosíntesis de anclaje clase C fosfatidilinositolglicano.
Factores de transcripción basal	<ul style="list-style-type: none"> ➤ MNAT1, CDK la activación de la quinasa del factor de montaje. ➤ TATA-box unión proteína asociada a factor 5.

Apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Receptor TNF asociado al factor 2. ➤ Caspasa-3
Endocitosis	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ArfGAP con dominio RhoGAP, repetición de anquirina y dominio PH 3. ➤ El receptor 1 de quimioquina motivo C - X - C. ➤ Cadena ligera clathrin B. ➤ Receptor de folato 1.

Tabla 13. Vías metabólicas encontradas de los genes sobreexpresados por la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata*

Vía metabólica	Número de genes
Vía de señalización MAPK	8
Diferenciación de osteoclastos	5
Metabolismo del éter lipídico	3
Interacción ligando – receptor neuroactivo	7
Meiosis ovocitaria	4
Vía de señalización mTOR	3
Sinapsis serotoninérgica	4
Sinapsis glutamatérgica	4
Vía de señalización PPAR	3
Ciclo celular	4
Contracción del músculo cardíaco	3
Metabolismo del ácido alfa – linoléico	2
Moléculas de adhesión celular	4
Metabolismo del ácido linoleico	2
Metabolismo de nicotinamida y nicotinato	2
Vía de señalización de Hippo	4
Vía de señalización de glucagón	3
Digestión y absorción de grasas	2
Metabolismo del triptófano	2
Resistencia a la insulina	3
Esteroidogénesis ovárica	2

Tabla 14. Vías metabólicas y sus respectivos genes sobreexpresados por la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata*

Vía metabólica	Genes sobreexpresados
Metabolismo del éter lipídico	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fosfolipasa A2 Grupo IVC. ➤ Fosfolipasa A2 Grupo VI. ➤ Factor de activación de plaquetas acetilhidrolasa 1b subunidad catalítica 3.
Ciclo Celular	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Quinasa de punto de control 2. ➤ Ciclina quinasa dependiente de inhibidor 2B. ➤ Complejo de reconocimiento de replicación complejo 5. ➤ Proteína de activación tirosina 3-monooxigenasa / triptófano 5-monooxigenasa.
Metabolismo del ácido alfa-linolénico	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fosfolipasa A2 Grupo IVC. ➤ Fosfolipasa A2 Grupo VI.
Metabolismo del ácido linoleico	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fosfolipasa A2 Grupo IVC. ➤ Fosfolipasa A2 Grupo VI.
Vía de señalización Hippo	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Factor de transcripción de dominio TEA 4. ➤ Miembro de la familia Wnt 8B. ➤ Proteína de activación tirosina 3-monooxigenasa / triptófano 5-monooxigenasa.
Vía de señalización Glucagón	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 6-fosfofructo-2-quinasa / fructosa-2,6-bifosfatasa 1. ➤ Receptores activados por proliferación de peroxisomales receptor alfa. ➤ Proteína fosfatasa 3 catalítica subunidad gamma.

En el caso de la nanopartícula estabilizada con citrato se encontraron “de acuerdo a la expresión de los genes” 26 vías metabólicas reprimidas que pueden apreciarse en la tabla 15 así como los principales genes de algunas vías en la tabla 16 y, 24 vías metabólicas sobreexpresadas las cuales se pueden ver en la tabla 17 y los principales genes de algunas vías en la tabla 18.

Tabla 15. Vías metabólicas encontradas de los genes reprimidos por la nanopartícula estabilizada con citrato

Vía metabólica	Número de genes
Receptor Fc gamma mediador de fagocitosis	4
Secreción salival	4
Interacción ligando – receptor neuroactivo	7
Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico	5
Vía de señalización de quimiocinas	5
Vía de señalización cAMP	5
Metabolismo de fenilalanina	2
Biosíntesis del anclaje de glucosilfosfatidilinositol	2
Enfermedad de Huntington	4
Metabolismo de tirosina	2
Sinapsis serotoninérgica	3
Metabolismo de glicina, serina y treonina	2
Citotoxicidad mediada por células natural killer	3
Sinapsis dopaminérgica	3
Regulación endocrina y otros factores de reabsorción del calcio	2
Adicción a la cocaína	2
Enfermedad de parkinson	3
Infección de <i>Vibrio cholerae</i>	2
Infección de <i>Staphylococcus aureus</i>	2
Enfermedad hepática grasa no alcohólica	3
Biosíntesis de hormonas esteroides	2
Apoptosis	2
Endocitosis	4
Adicción a las anfetaminas	2
Vía de señalización p53	2
Metabolismo de fármacos – citocromo P450	2

Tabla 16. Vías metabólicas y sus respectivos genes reprimidos por la nanopartícula estabilizada con citrato.

Vía metabólica	Genes reprimidos
Receptor Fc gamma mediador de fagocitosis	<ul style="list-style-type: none"> ➤ P21 kinasa 1 activada. ➤ Fosfolipasa D2. ➤ Proteína quinasa C delta. ➤ Factor de intercambio de nucleótidos de guanina 2.
Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico	<ul style="list-style-type: none"> ➤ BCL2 X asociado, regulador de la apoptosis. ➤ UDP-glucosa glicoproteína glucosiltransferasa 2. ➤ Glucosidasa II subunidad alfa.
Vía de señalización de quimiocinas	<ul style="list-style-type: none"> ➤ El ligando 8 de quimioquina motivo C - C. ➤ Motivo de receptor de Quimiocina 4 de CXC. ➤ P21 kinasa 1 activada. ➤ Proteína quinasa C delta. ➤ Factor de intercambio de nucleótidos guanina 2.
Vía de señalización de cAMP	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ATPasa de membrana plasmática transporte de Ca². ➤ P21 kinasa 1 activada.

	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fosfolipasa D2. ➤ Factor de intercambio de nucleótidos guanina 2.
Biosíntesis de Glucosilfosfatidilinositol	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Biosíntesis de anclaje clase B fosfatidilinositol glicano. ➤ Biosíntesis de anclaje clase C fosfatidilinositol glicano.
Apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> ➤ BCL2 X asociado, regulador de la apoptosis. ➤ Caspasa-6.
Endocitosis	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ArfGAP con dominio RhoGAP, repetición de anquirina y dominio 3. ➤ Motivo de receptor de quimiocina 4. ➤ Cadena ligera clatrina B. ➤ Fosfolipasa D2.
Vía de señalización p53	<ul style="list-style-type: none"> ➤ BCL2 X asociado, regulador de la apoptosis. ➤ Proteína de transmembrana asociada a la autofagia.

Tabla 17. Vías metabólicas encontradas de los genes sobreexpresados por la nanopartícula estabilizada con citrato.

Vía metabólica	Número de genes
Biosíntesis de folatos	3
Endocitosis	9
Vía de señalización PPAR	4
Carcinogénesis viral	7
Diferenciación de osteoclastos	5
Metabolismo de glicerofosfolípidos	4
Infección de <i>Staphylococcus aureus</i>	3
Resistencia a la insulina	4
Vía de señalización mTOR	3
Vía de señalización VEGF	3
Vía de señalización del Calcio	5
Infección de HTLV-1	6
Invasión bacteriana de células epiteliales	3
Proteoglicanos en cáncer	5
Moléculas de adhesión celular	4
Metabolismo nicotinamida y nicotinato	2
Regulación de citoesqueleto de actina	5
Rechazo de aloinjerto	2
Vía de señalización de glucagón	3
Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico	4
Meiosis ovocitaria	3
Reabsorción de agua regulada por vasopresina	2
Vías metabólicas	19
Vía de señalización MAPK	5

Tabla 18. Vías metabólicas y sus respectivos genes sobreexpresados por la nanopartícula estabilizada con citrato.

Vía metabólica	Genes sobreexpresados
Endocitosis	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ArfGAP con dominio GTPasa, repetición de anquirina y dominio 1. ➤ Factor asociado ESCRT-III. ➤ Adrenoreceptor beta 1. ➤ Receptor de lá tirosina quinasa 3. ➤ Adaptador de transducción de señal de la molécula. ➤ Factor de crecimiento transformante beta receptor I.
Metabolismo de los glicerofosfolípidos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa. ➤ CDP-diacilglicerol - inositol 3-fosfatidiltransferasa. ➤ Acetilcolinesterasa. ➤ Colin fosfatocitidiltransferasa beta 1
Vía de señalización de calcio	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Adrenoceptor beta 1. ➤ Receptor tirosina quinasa 3. ➤ Oxido nítrico sintasa 3. ➤ Proteína fosfatasa 3 catalítica subunidad gamma. ➤ Troponina C2, musculo esquelético.

<p>Proteoglicanos en el cáncer</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Miembro de la familia Wnt 8B. ➤ Receptor tirosina quinasa 3. ➤ Paxillin. ➤ Radixina. ➤ Proteína ribosomal S6 quinasa B2.
<p>Regulación del citoesqueleto de actina</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Actinina alfa 3. ➤ Factor de crecimiento de fibroblastos 6. ➤ Integrina L subunidad alfa. ➤ Paxillin. ➤ Radixina.
<p>Vía de señalización Glucagón</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Receptores activados por proliferación peroxisomales alfa. ➤ Fosfogliceratomutasa 1. ➤ Proteína fosfatasa 3 catalítica subunidad gamma.
<p>Procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ BCL2 asociado antanogene 1. ➤ Proteína del citoesqueleto. ➤ Parkin proteína ubiquitina ligasa E3. ➤ Selenoproteína S (Selenos).

CAPÍTULO IV

DISCUSIONES

4.1 Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica de las nanopartículas de plata

4.1.1 Evaluación de la actividad anticancerígena de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de cáncer de colon HT-29.

Se pudo apreciar que las nanopartículas estabilizadas con los diferentes extractos acuosos de *Rosmarinus officinalis*, *Petroselinum crispum* y *Mentha spicata* poseen actividad anticancerígena ya que en un periodo de 24 horas podemos observar en los gráficos y en la tabla de viabilidades, que la viabilidad disminuyó hasta en más de un 50% en concentraciones mayores, mientras que a concentraciones de 3.12 µg/mL se pudo apreciar que la nanopartícula estabilizada con citrato disminuye la viabilidad celular hasta quedar en un 54%, la estabilizada con *Petroselinum crispum* hasta un 55%, la estabilizada con

Rosmarinus officinalis hasta un 58% y la estabilizada con *Mentha spicata* en un 55%, de acuerdo a lo reportado por . Prabhu D. y cols en el 2013 [39] nuestros porcentajes de la viabilidad celular resulta ser menores ya que el a las 24 horas de exposición reporta porcentajes de viabilidad celular de entre el 95% y el 75%, por lo que podemos confirmar que las nanopartículas estabilizadas con los extractos de plantas de *Rosmarinus officinalis*, *Petroselinum crispum* y *Mentha spicata* no solo tienen actividad anticancerígena sino que ésta resulta ser mayor a lo ya reportado en la literatura.

Con los resultados obtenidos en el gráfico podemos apreciar que no hay una relación dosis – respuesta.

Se calcularon los IC₅₀ para las nanopartículas y se puede apreciar que el mejor fue para *Petroselinum crispum* con 23.68 ± 14.42 y *Mentha spicata* con 26.02 ± 7.93 y el más alto el de la nanopartícula estabilizada con *Rosmarinus officinalis* con un IC₅₀ de 37.69 ± 20.92 , que de acuerdo con el IC₅₀ de 20 µg/mL reportado por Prabhu D. y cols en el 2013 [39] en la línea de cáncer de colon resultan ser mayores, sería de importancia realizar una determinación del IC₅₀ a las 48 horas de exposición a las nanopartículas para apreciar si este disminuye en alguna de las nanopartículas ya que lo reportado es en 48 horas de exposición por lo cual se propone que a un mayor tiempo de exposición estos puedan disminuir.

El análisis de varianza entre las nanopartículas nos confirmó que no existía diferencia significativa entre las nanopartículas en cuanto a los resultados de viabilidad, lo cual nos confirma que todas poseen actividad anticancerígena.

4.1.2 Evaluación de la actividad anticancerígena de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de cáncer de cérvix SiHa.

De igual forma en cuanto a los resultados obtenidos para la línea celular SiHa podemos confirmar que las nanopartículas estabilizadas con los extractos acuosos de las plantas y citrato poseen actividad anticancerígena desde concentraciones mayores y a concentraciones de 3.12 $\mu\text{g/mL}$ siguen presentando una notable actividad ya que la estabilizada con *Rosmarinus officinalis* presenta 69% de viabilidad celular, *Petroselinum crispum* con 54%, *Mentha spicata* con 57% y citrato con 65% respectivamente, comparado con lo descrito por Jeyaraj M. y cols en el 2013 [53] quien a concentraciones de aproximadamente 26 $\mu\text{g/mL}$ obtuvo una viabilidad en la línea celular Hela de 50% resultando ser menor la concentración empleada de nanopartículas estabilizadas con las plantas antes descritas para eliminar el 50% de la población, por lo que podemos hacer mención que las nanopartículas empleadas en este trabajo presentan una mayor actividad a concentraciones menores en comparación con lo descrito, ellos también describen que existe una dosis dependiente lo cual en nuestros resultados no se aprecia.

En cuanto a la obtención de los IC_{50} para esta línea celular encontramos que la nanopartícula estabilizada con *Petroselinum crispum* presenta el mejor IC_{50} el cual es de 8.94 ± 6.36 y la nanopartícula estabilizada con *Mentha spicata* presenta un IC_{50} de 12.20 ± 10.21 siendo las dos nanopartículas con mejor resultado.

El análisis de varianza entre las nanopartículas nos confirmó que si existía diferencia significativa en cuanto a los resultados de viabilidad por lo que se realizó la prueba de Tukey donde se encontró que la nanopartícula estabilizada con *Rosmarinus officinalis* es el grupo diferente y presenta menor actividad anticancerígena que las demás, por eso existía diferencia significativa.

De acuerdo a los antecedentes revisados y a los resultados presentados en este trabajo podemos hacer mención que las nanopartículas presentan una buena y similar actividad anticancerígena a las nanopartículas sintetizadas por método químico (citrate) y las nanopartículas sintetizadas por química verde con otros extractos de plantas que han sido evaluadas en otras líneas celulares.

Pudimos observar que dicha actividad no es dependiente de la dosis ya que se observa muy poco el incremento de la viabilidad celular al disminuir la dosis.

También se encontró que los extractos de las plantas por si solos no presentan actividad anticancerígena con lo que podemos hacer mención que la actividad de las nanopartículas no es por el extracto presente en ellas si no por la nanopartícula.

4.1.3 Evaluación de la actividad citotóxica de las nanopartículas de plata sobre la línea celular de hígado de Chang.

En cuanto a la evaluación de la citotoxicidad se observó que a concentraciones mayores la viabilidad celular era menor a 40% y a concentraciones menores de 3.12 $\mu\text{g/mL}$ esta era de 50% para la nanopartícula estabilizada con *Rosmarinus officinalis*, de 47% para la de *Petroselinum crispum*, de 53% para la de *Mentha spicata* y 52% para la estabilizada con citrato, por lo que se consideran citotóxicas ya que la viabilidad no incrementa más del 50%. De acuerdo a los resultados del IC_{50} encontramos que la nanopartícula menos citotóxica es la estabilizada con *Rosmarinus officinalis* con un IC_{50} de 61.86 ± 14.96 seguida de ella encontramos a la estabilizada con *Mentha spicata* con un IC_{50} de 21.37 ± 10.96 y la más citotóxica fue la estabilizada con citrato con un IC_{50} de 13.25 ± 7.14 .

Las nanopartículas estabilizadas con los extractos de plantas presentaron una mayor citotoxicidad en comparación con lo descrito por Kummara y cols en 2016 [46] donde ellos reportan que las nanopartículas sintetizadas por el método de química verde empleando el extracto de *Azadirachta indica* reportan más del 80% de viabilidad celular a la máxima concentración evaluada mientras que en nuestro caso a la máxima concentración todas las viabilidades son menores al 40%. En cuanto a la sintetizada por método químico tiene un comportamiento muy similar a la que ellos usaron en su estudio comparativo, buena actividad anticancerígena pero alta citotoxicidad.

Kummara en 2016 reporta en su estudio comparativo que las nanopartículas sintetizadas con extractos de plantas son capaces de inducir toxicidad selectiva a células cancerígenas, debido a que en células normales no se observan cambios significativos en la viabilidad celular y presentan una actividad dependiente de la dosis, en los resultados obtenidos en este trabajo no se observó el mismo comportamiento ya que en ambas líneas celulares tanto en las cancerígenas como en la no cancerígena hay una marcada disminución de la viabilidad celular a un a concentraciones menores. En cuanto a las nanopartículas sintetizadas por el método químico en este trabajo se encontró que presentan actividad anticancerígena pero también una alta citotoxicidad a células normales lo cual es comparable

Las nanopartículas por ser buenos citotóxicos a células cancerígenas de igual forma resultan citotóxicos para células normales en cantidades similares en nuestro caso se optó por seleccionar como la mejor nanopartícula estabilizada con extracto de planta a la estabilizada con *Mentha spicata* por poseer actividad y poca citotoxicidad, ya que las otras presentaban buena actividad anticancerígena pero elevada citotoxicidad en células normales.

La nanopartícula de citrato también fue seleccionada para comparar entre ambas cual presentaba mejores actividades de acuerdo a su método de síntesis, elucidar el posible mecanismo de acción y realizar una comparación para apreciar si son iguales o similares los mecanismos de acción.

4.2 Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno de las nanopartículas de plata mediante la prueba de diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) de las nanopartículas de plata en la línea celular SiHa e hígado de Chang.

En cuanto a los resultados de la producción de especies reactivas de oxígeno de la línea celular SiHa expuesta a las nanopartículas estabilizadas con *Mentha spicata* y citrato a concentraciones de 200 a 3.12 µg/mL no se observó una producción de especies reactivas de oxígeno a ninguna concentración, después de 24 horas de exposición la producción solo se incrementó un poco pero a comparación del control positivo xantina oxidasa su producción fue demasiado escasa, lo cual no apoya la propuesta presentada en cada uno de los antecedentes documentados en este trabajo que afirman que la producción de especies reactivas de oxígeno es uno de los principales mecanismos de acción por medio del cual ejercen su actividad las nanopartículas sintetizadas tanto por método químico como las sintetizadas por química verde.

De acuerdo con resultados presentados por Ahmad B. y cols en 2016 [45] donde sintetizaron y evaluaron nanopartículas por el método de química verde empleando el extracto de *Mentha spicata* y además realizaron la evaluación de la actividad antioxidante resultando que las nanopartículas presentaron muy buena actividad antioxidante lo cual podría influir en los resultados encontrados en nuestro trabajo debido a que la actividad antioxidante de estas nanopartículas no permite la producción de especies reactivas de oxígeno ya

que como se describe en el trabajo de Ahmad B. éstas presentan muy buenos efectos protectores por los antioxidantes presentes en el extracto de la planta.

Para el caso de las nanopartícula estabilizada con citrato, su comportamiento fue similar, no hubo producción de especies reactivas lo cual no concuerda con lo propuesto por diversos autores donde estas nanopartículas sí presentan una muy buena producción de especies reactivas y hasta se propone esto como un posible mecanismo de acción

En el caso de la línea celular de hígado de Chang, se realizó la exposición bajo las mismas condiciones, tiempo de incubación y lectura, pero los resultados fueron iguales a los obtenidos en la línea celular SiHa, no hubo producción de especies y no es comparable con el control positivo, los resultados fueron muy similares en las dos líneas celulares por lo que se descarta la producción de especies reactivas de oxígeno como un probable mecanismo de acción.

La utilización de la línea cancerígena fue para comprobar si el mecanismo de acción por el cual ejerce su actividad es por medio de la producción de especies reactivas de oxígeno y la línea no cancerígena fue empleada para ver si la citotoxicidad era debida a la producción de especies reactivas de oxígeno.

4.3 Determinación de la inducción de apoptosis por la actividad de caspasa-3 por las nanopartículas más activas en la línea celular SiHa

En cuanto a los resultados obtenidos para la determinación de apoptosis por la actividad de la caspasa-3 en la línea celular SiHa sometida a los dos tratamientos y el control positivo podofilotoxina a una concentración de 12.20 µg/mL y con base a lo observado en la gráfica podemos confirmar que no hay una muerte celular por medio de la actividad de la caspasa-3 como lo han propuesto en trabajos previos otros autores donde afirman que puede ser uno de los posibles mecanismos de acción implicados en la respuesta al tratamiento con las nanopartículas.

No se encontró que la muerte celular sea debida a apoptosis por caspasa-3. Castor V y cols en el 2016 [44] encontraron que la muerte celular era debida a apoptosis por caspasa-3 la cual era activada por la producción de especies reactivas de oxígeno, pero también encontró que la apoptosis podría ser producida por la vía de las MAP kinasas (MAPK) al activarse las kinasas JNK, ERK y p38 conduciendo a la fosforilación de diversas proteínas controlando así el estado activo de estas y produciendo la actividad biológica y considerando como uno de los principales mecanismos de acción la apoptosis.

En este trabajo no se encontró la inducción de la apoptosis por la actividad de la casapa-3 por lo que se debe analizar el microarreglo para poder proponer un posible mecanismo de acción por medio del cual ejercen su actividad las nanopartículas ya que de acuerdo a los antecedentes la producción de especies

reactivas de oxígeno y la inducción de la apoptosis por la actividad de la caspasa-3 son unos de los principales mecanismos de acción.

4.4 Análisis de expresión génica (microarreglo) por las nanopartículas más activas en la línea celular SiHa

En el análisis de expresión génica se evaluaron las nanopartículas y después de ser analizados los genes podemos observar que hubo más genes reprimidos en la estabilizada con *Mentha spicata* en comparación con la estabilizada con citrato, para los genes sobreexpresados se obtuvo casi la misma cantidad de vías metabólicas. Entre las vías sobreexpresadas encontramos que las más importantes son la vía de los lisosomas, factores de transcripción, la Janus quinasas - Transductores y Activadores de las Señales de Transcripción (Jak-STAT), fosfatidilinositol-3-quinasa-protein quinasa B (PI3K-Akt), endocitosis, las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), proteína de tumor 53 (p53), la vía de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), la vía objetivo mecanicista de la rapamicina (mTOR), vía de señalización del Calcio, procesamiento del retículo endoplásmico, vía Hippo, ciclo celular y adhesión celular.

Los resultados de estas vías nos confirman que el mecanismo de acción por medio del cual ejercen su efecto ambas nanopartículas no es por apoptosis, tampoco por autofagia, de acuerdo a las vías se propone que estas llevan a la muerte celular por medio de daño a la membrana y necrosis.

La apoptosis no es un mecanismo implicado por medio del cual ejercen su efecto las nanopartículas ya que en el caso de la nanopartículas estabilizadas con el extracto acuoso de *Mentha spicata* en las vías reprimidas encontramos la vía de la apoptosis y en cuanto a los genes encontramos específicamente la caspasa-3, en cuanto a la nanopartícula estabilizada con citrato también podemos mencionar que no está implicada la apoptosis por la presencia de la vía de la apoptosis específicamente la de caspasa-6, también se confirma que el mecanismo de apoptosis no está implicado debido a que vías como la MAPK, Jak-STAT, PI3K-Akt, procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico, entre otras, están reprimidas en ambos microarreglos y estas también desencadenan apoptosis.^{54, 55, 56}

La autofagia tampoco está implicada en el mecanismo de acción debido a que la vía de lisosomas y endocitosis se encuentran reprimidas en ambas nanopartículas.

En base a los resultados obtenidos proponemos que actividad anticancerígena y citotoxicidad en las líneas celulares está dada por necrosis. La necrosis está definida como un tipo de muerte celular considerada generalmente como incontrolada, en la actualidad y en base a investigaciones se ha sugerido que esta ocurre de una manera estrictamente regulada, puede desencadenarse por señalización o daño. Puede ser activada por eventos como la hipoxia, agotamiento de adenosin tri fosfato, alteraciones funcionales de la bomba de sodio / potasio y movilización de calcio, especies reactivas de

oxígeno y nitrógeno, activación de enzimas dependientes de calcio como las fosfolipasasa A2, proteasas y activación del sistema inmune.^{57, 58}

Dentro de las vías sobre expresadas como son el metabolismo del éter lipídico, metabolismo del ácido alfa linolénico y metabolismo del ácido linolénico encontramos el gen de la fosfolipasa A2 en común en estas vías, lo cual nos indica que para el caso de la nanopartícula estabilizada con el extracto de *Mentha spicata* el mecanismo por medio del cual causan la muerte celular es daño a la membrana ya que cuando la fosfolipasa A2 es activada nos indica que está siendo dañada la membrana y su sobreexpresión es para la producción de ácidos grasos que serán empleados en la reparación de esta, el daño causado no puede ser reparado y se da la interacción de esta fosfolipasa con el calcio, que en consecuencia activan la necrosis celular, por lo que podemos proponer para esta nanopartícula como mecanismo el daño a la membrana y necrosis.^{58, 59}

En cuanto a la nanopartícula estabilizada con citrato podemos proponer que la muerte celular se da por necrosis ya que en los genes sobre expresados encontramos la vía de señalización del calcio y la vía de VEGF que en común tienen la sobre expresión de la enzima óxido nítrico sintasa, por consecuencia produce óxido nítrico, el cual puede inhibir la capasa-3 y producir especies reactivas de nitrógeno y esto desencadena la necrosis celular.^{59, 60}

Los antecedentes presentados en este trabajo presentan como mecanismo de acción de las nanopartículas la generación de especies reactivas de oxígeno y la muerte celular por apoptosis, en nuestro caso podemos proponer como

mecanismo de acción el daño a la membrana, producción de especies reactivas de nitrógeno y como consecuencia de estos la muerte celular por necrosis, estas propuestas deben ser confirmadas por medio de ensayos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- Las nanopartículas estabilizadas con extractos de plantas de *Rosmarinus officinalis*, *Petroselinum crispum* y *Mentha spicata* poseen actividad anticancerígena para las líneas celulares HT-29 y SiHa a una concentración de 3.12 µg/mL de 58%, 54% y 55% para HT-29 y 69%, 54% y 57% para SiHa.
- La nanopartícula estabilizada con citrato presentó actividad anticancerígena para la línea HT-29 de 54% y para la línea SiHa de 65%.
- Todas las nanopartículas presentaron citotoxicidad en la línea celular de hígado de Chang.
- La hipótesis propuesta es rechazada ya que la actividad anticancerígena y citotóxica de las nanopartículas es semejante.

- Las nanopartículas más activas y con menos citotoxicidad fueron la estabilizada con *Mentha spicata* y citrato con un IC₅₀ de 12.20 y 16.49 para actividad anticancerígena y de 21.37 y 13.25 para la línea no cancerígena.
- Las nanopartículas estabilizadas con *Mentha spicata* y citrato no presentaron la producción de especies reactivas de oxígeno tanto en la línea celular cancerígena y la línea celular de hígado de Chang.
- Las nanopartículas estabilizadas con *Mentha spicata* y citrato no presentaron inducción de apoptosis por caspasa-3.
- Con base en los resultados obtenidos por el microarreglo se propone que el posible mecanismo de acción involucrado es por daño a la membrana y en consecuencia a esta necrosis.

DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

- **Ponente del trabajo libre – oral:** Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica de nanopartículas de plata estabilizadas con citrato, *Petroselinum sativum*, *Rosmarinus officinalis* y *Mentha spicata* dentro del III Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y I Simposio Nacional de Microbiología Aplicada, llevado a cabo en el Centro de Convenciones de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL el 1 y 2 de septiembre del 2016.
- **Poster:** Evaluation of anticancer activity and cytotoxic silver nanoparticles synthesized with *Petroselinum crispum*, *Rosmarinus officinalis* and *Mentha spicata* en el XIV International Congress of Toxicology in conjunction whit the X Mexican Congress of Toxicology Merida, Mexico, octubre 2-6, 2016.
- **Ponente del trabajo libre – oral:** Aportaciones al mecanismo de acción de nanopartículas de plata estabilizadas con *Mentha spicata* y citrato con actividad anticancerígena dentro del IV Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y II Simposio Nacional de Microbiología Aplicada, llevado a cabo en el Centro de Convenciones de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL el 27 y 28 de abril del 2017.
- **Poster:** Evaluación de la actividad citotóxica de nanopartículas de plata estabilizadas con *Mentha spicata* y aporte al mecanismo de acción en el IV Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde Desarrollo Sustentable, Salud y Ambiente del 6 al 8 de septiembre del 2017 (Aprobado).

REFERENCIAS

1. Cooper, G., Hausman, R. La Célula, 5ª Ed. Pág. Marban Libros, S.L. ISBN: 978-84-7101-811-3. 2011.
2. Gerald, K. Biología Celular y Molecular, Conceptos y Experimentos, 5ª Ed. Pág. 662-686. Mc Graw Hill. ISBN 13:978-970-10-6925-7. 2008.
3. Organización Mundial de la Salud “Cáncer” (2015). Nota descriptiva No. 297. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (Consultado abril 2017).
4. Instituto Nacional de Estadística y Geografía “Cáncer” http://www.inegi.org.mx/lib/olap/consulta/general_ver4/MDXQueryDatos.asp?c=11144 (Consultado abril 2017).
5. Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> Fecha de actualización: 25/Marzo/2014 (Consultado abril 2017).
6. INFOCANCER México <http://www.infocancer.org.mx/cncer-en-cifras-con487i0.html> (Consultado abril 2017).
7. Arredondo, E. (2014) Síntesis de porfirinas y metaloporfirinas no simétricas funcionalizadas con L-Glutamato y evaluación de sus propiedades fotodinámicas y anticancerígena (tesis de doctoral), Universidad Autónoma de Nuevo León.

8. Instituto Nacional del Cáncer
<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica>
(Consultado abril 2017).
9. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
<https://www.cnio.es/es/programas/prog504a1.asp> (Consultado abril 2017).
10. Gerald, K. Biología Celular y Molecular, Conceptos y Experimentos,
7ª Ed. Pág. 664-698. Mc Graw Hill. ISBN 978-607-15-1137-9. 2014.
11. Ríos H, M A., Hernández, M. (2001) Los genes supresores de tumores y el cáncer Rev Cubana Oncol. Vol. 17:65-71.
12. Tume L., Cisneros C., Sevillano J., Pacheco-Tapia R., Matos D., Acevedo-Espínola R., Rodríguez W. (2016). Desregulación de microARN en el cáncer: un enfoque terapéutico y diagnóstico. Gaceta Mexicana de Oncología. Vol. 15: 298-304.
13. Lee Y., Dutta A. (2009). MicroRNAs in cancer. Annual Review of Pathological Mechanical Disease. Vol. 4: 199-227.
14. Tume-Farfán, L. F. (2014). Las alteraciones epigenéticas en la progresión del cáncer. Gaceta Mexicana de Oncología. Vol. 13: 236-243.
15. Menéndez P., Villarejo P., Padilla D., Menéndez J. M., Montes, J. A. R. (2012). Epigenética y cáncer colorrectal. Cirugía Española. Vol. 90: 277-283.
16. Sharma S., Kelly T. K., Jones P. A. (2010). Epigenetics in cancer. Carcinogenesis. Vol. 31: 27-36.

17. Instituto Nacional de Cáncer E.U.A. (2015): PDQ® Aspectos generales de la prevención del cáncer. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Última actualización 22 de mayo del 2014. <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/prevencion/aspectosgenerales/Patient>. (Consultado marzo 2017).
18. Instituto Nacional de Cáncer <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos> (Consultado abril 2017).
19. Instituto Nacional de Cáncer <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia> (Consultado abril 2017).
20. Instituto Nacional de Cáncer <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia> (Consultado abril 2017).
21. American Brain Tumor Association <http://www.abta.org/resources/spanish-language-publications/quimioterapia.pdf> (Consultado abril 2017).
22. Instituto Nacional de Cáncer <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia> (Consultado abril 2017).
23. Instituto Nacional de Cáncer <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-hormonal> (Consultado abril 2017).

24. Instituto Nacional de Cáncer
<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida> (Consultado abril 2017).
25. Instituto Nacional de Cáncer
<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/efectos-secundarios> (Consultado junio 2017).
26. Cancer. Net <http://www.cancer.net/es/sobrevivencia/efectos-secundarios-largo-plazo-del-tratamiento-del-cancer>
(Consultado junio 2017).
27. Borm, JA. et al. (2006) "The potential risks of nanomaterials a review carried out for ECETOC", Particle and Fibre Toxicology. Vol. 3:1-35.
28. Diccionario de nanotecnología disponible en:
<http://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologias/diccionario/diccionario.htm> (Consultado abril 2017).
29. Ramírez C, MA., (2010)., Evaluación de la cinética de distribución y toxicidad de las nanopartículas de plata. (tesis de doctoral), Universidad Autónoma de Nuevo León.
30. Irache, JM., (2008)., Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas. An. Sist. Sanit. Navar. Vol. 31:7-10.
31. Hernando G, A., (2007). Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: la física actual en lucha contra la enfermedad. Rev.R. Acad.Cienc. Exact.Fís. Nat. Vol.101: 321-327.

32. Landeros P, JL., Rosas T, GA. Biosíntesis de nanopartículas de plata usando extracto acuoso de *Sedum praealtu*, Instituto de investigaciones metalúrgicas, UMSNH, Morelia, Michoacán.
33. Zanella R., (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*. Vol. 5: 69-81.
34. Sifontes Á. B., (2014). Biosíntesis de nanomateriales: hacia el avance de la nanotecnología verde. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*. Vol. 7: 56-68.
35. Pallasco T., Ignacio A., (2017). Síntesis verde y caracterización de nanopartículas de oro y plata mediante el uso de algunas plantas endémicas del Ecuador (Tesis de licenciatura) Escuela Politécnica Nacional, Quito 2017.
36. Garza-Ocañas L., Ramírez-Cabrera M., Zanatta-Calderon T., Lujan-Rangel R., Ferrer DA., Yacaman MJ., (2010). *In vitro* toxicity assessment of silver nanoparticles in Chang liver cells and J-774 macrophages. *Toxicology Letters*. Vol. 196.
37. Devi, S., Bhimba, V., Ratnam, K., (2012). *In vitro* anticancer activity of silver nanoparticles synthesized using the extract of *Gelidiella sp.* *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 4: 710-715.
38. Mohammad, G., Hatif, W., Radam, T., Amir, A., (2013). Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Vol. 3: 58-63.

39. Prabhu, D., Arulvasu, C., Babu, G., Manikandan, R., Srinivasan, P., (2013). Biologically synthesized green silver nanoparticles from leaf extract of *Vitex negundo* L. induce growth-inhibitory effect on human colon cancer cell line HCT15. *Process Biochemistry*. Vol. 48: 317-324.
40. Gurunathan S., Han J. W., Eppakayala V., Jeyaraj M., Kim, J. H. (2013). Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *BioMed research international*. Vol. 2013: 1-10.
41. Sankar R., Karthik A., Prabu A., Karthik S., Subramanian K., Ravikumar V., (2013). *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 108: 80-84.
42. Sulaiman G. M., Mohammad A. A., Abdul-Wahed H. E., Ismail M. M. (2013). Biosynthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Rosmarinus officinalis* extract. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures*. Vol. 8: 273-280.
43. Ding Q., Sun W., Chen Y., Zhou J., Liu C., (2014). synthesis and *in vitro* antineoplastic evaluation of silver nanoparticles mediated by *Agrimoniae herba* extract. *International Journal of Nanomedicine*. Vol. 9: 1871-1882.
44. Castro-Aceitunoa V., Ahna S., Yesmin Simub S., Singhb P., Mathiyalaganb R., Leea HA., Chun Yanga D., (2016). Anticancer activity of silver nanoparticles from *Panax ginseng* fresh leaves in

- human cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Vol. 84: 158–165.
45. Ahmad B., Shireen F., Bashir S., Khan I., Azam S. (2016). Green synthesis, characterisation and biological evaluation of AgNPs using *Agave americana*, *Mentha spicata* and *Mangifera indica* aqueous leaves extract. *IET Nanobiotechnology*. Vol. 10: 281-287.
46. Kummara S., Patil MB., Uriah T., (2016) Synthesis, characterization, biocompatible and anticancer activity of green and chemically synthesized silver nanoparticles – A comparative study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Vol. 84: 10–21.
47. Cell Proliferation Reagent WST-1. Colorimetric Assay (WST-1 based) for the nonradio active quantification of cell proliferation, cell viability and cytotoxicity. ROCHE Diagnostics GmbH. Roche Applied Science.
48. Bass D. A., Parce J. W., Dechatelet L. R., Szejda P., Seeds M. C., Thomas M. (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *The Journal of Immunology*. Vol. 130: 1910-1917.
49. EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #2. Molecular Probes (2003).
50. Favela Hernández JMJ., (2012). Aislamiento y caracterización de los compuestos antibacterianos y antituberculosos de *Larrea tridentata*, determinación de su toxicidad y mecanismo de acción del compuesto más activo. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León.
51. Ramírez J., Chávez L., Santillán J. L., Guzmán S. (2003). Microarreglos de DNA. *Mensaje Bioquímico*. Vol. 27: 97-120.

52. DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis. David.ncifcrf.gov. URL:<https://david.ncifcrf.gov/> (Consultado abril y mayo 2017).
53. Jeyaraj M., Rajesh M., Arun R., MubarakAli D., Sathishkumar G., Sivanandhan G., Ganapathi A. (2013). An investigation on the cytotoxicity and caspase-mediated apoptotic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using *Podophyllum hexandrum* on human cervical carcinoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 102: 708-717.
54. Iracheta M. L. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.* Vol. 101: 1-33.
55. Angosto M. C. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. Vol. 69: 36-64.
56. Rojas M., Salmen S., Berrueta L. (2009). Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*. Vol. 4: 92-106.
57. Golstein P., Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical Sciences*. Vol. 32: 37-43.
58. Agudelo M. E. R., López, M. R. (2012). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*. Vol. 23: 166-177.
59. Festjens N., Berghe T. V., Vandenabeele P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*. Vol. 1757: 1371-1387.

60. De Toro G. (2006). Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. Actas Hispanoamericanas de patología. Vol. 1: 1-6.