

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



NANOPARTÍCULAS DE PLATA RECUBIERTAS DE GLUCOSA PARA  
DETERMINAR MUERTE INMUNOGENICA EN CÁNCER MAMA.

POR

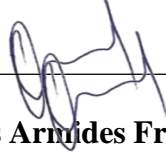
Q.B.P. CRISTIAN NAVIL PADILLA ESPARZA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2022

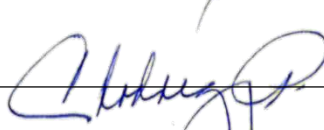
NANOPARTÍCULAS DE PLATA RECUBIERTAS DE GLUCOSA PARA  
DETERMINAR MUERTE INMUNOGÉNICA EN LÍNEAS CELULARES DE  
CÁNCER DE MAMA.

**Comité de tesis**



**Dr. Moisés Armides Franco Molina**

Presidente



**Dra. Cristina Rodriguez Padilla**

Secretario



**Dr. Pablo Zapata Benavides**

Vocal



**Dra. Diana Ginette Zarate Triviño**

Vocal

DIANA  
CABALLERO

**Dra. Diana Caballero Hernández**

Vocal



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

**Dra. Katiushka Arévalo Niño**

Subdirector de Posgrado

NANOPARTÍCULAS DE PLATA RECUBIERTAS DE GLUCOSA COMO  
INDUCTOR DE ALARMINAS RELACIONADAS CON EL MECANISMO DE  
MUERTE INMUNOGÉNICA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

**Dirección de tesis**



---

**Dr. Moisés Armides Franco Molina**

Director de tesis

DERECHOS RESERVADOS©  
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## I. Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) le agradezco su apoyo por la beca número 1007665 otorgada durante los dos años de la maestría. A la Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por darme la oportunidad de realizar mis estudios dentro de esta facultad.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, por permitirme usar las instalaciones y ser parte fundamental de mi formación. Especialmente a la Dra. María Cristina Rodríguez Padilla por brindar el apoyo necesario.

Al Dr. Moisés Armides Franco Molina por la oportunidad de formar parte de su equipo, su apoyo y comprensión durante este tiempo, gracias por entenderme, por ayudarme a no darme por vencida y por ese empujón que necesitaba.

A mi comité de tesis Dr. Pablo Zapata Benavides, Dra. Diana Ginette Zarate Triviño y Dra. Diana Caballero Hernández por su apoyo y colaboración en esta investigación, ayudándome con su conocimiento, sus sugerencias y accesibilidad.

A Dios por ser el centro de mi vida, por darme la capacidad de soñar y culminar mis metas, por su bendición y protección, gracias.

A mi familia por ser parte fundamental de mi vida, por su apoyo incondicional por locos que suenen mis sueños, por su guía, por su formación, por creer en mí más de lo que yo lo hago.

A mis amigos Gracia, Nidia, Karen, Lucero, Ana Cecilia, Oscar gracias por estar presente en este proceso, por estar para mí, en especial a Gabriel, amigo gracias por abrirme las puertas de ese remolque hace 2 años nunca voy a olvidar me abriste las puertas de tu casa cuando lo único que tenía era una Sentra 99 lleno de sueños.

A mis compañeros del laboratorio L6 Silvia, Max, Pedro, Michell, Gustavo, Mario, Natanael, que siempre estuvieron para ayudarme, guiarme y formar parte de esta meta.

A todos gracias, hasta aquí nos ha bendecido Dios.

## **II. Dedicatoria**

Este trabajo va dedicado a mi familia, en especial a mi papá Juan Padilla Rodríguez, juntos comenzamos este sueño y aun que no celebremos juntos físicamente la culminación sé que está presente en cada meta cumplida y esta no es la excepción, gracias por luchar por mí, no estaría aquí si no fuera por ese amor tan grande. A mi mamá Rita Esparza que a pesar de todas las adversidades que ha enfrentado sigue de pie dándolo todo, admiro su fortaleza y determinación, gracias por su amor incondicional. A mi mamá Lorena Arredondo, gracias por ser parte de este sueño, por tu apoyo y amor. A mis hermanos Laura, Rita, José Esteban, Brayan, Francisco, Alexis y Edmundo gracias por cada palabra de apoyo y estar presentes en este tiempo. A mis sobrinos y cuñados Valentín, Eduardo, Oscar, Rut, Daniel y Jahaziel. Familia, gracias por ser parte de mi formación, por ser pieza clave de mi desarrollo personal, académico y profesional. Sin ustedes cumplir este sueño no sería posible, LOS AMO.

Además, dedico esta tesis a cada persona que tiene el sueño de superarse día a día y cumplir el sueño de tener un posgrado, espero que el conocimiento que está en esta tesis sea de ayuda para su formación y desarrollo profesional.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	5
<b>2.1 Cáncer</b> .....	5
<b>2.2 Cáncer de mama</b> .....	5
<b>2.3 Tratamientos en cáncer de mama</b> .....	8
<b>2.4 Inmunoterapia</b> .....	8
<b>2.5 Muerte inmunogénica</b> .....	10
<b>2.6 Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)</b> .....	11
<b>2.7 Inductores de muerte inmunogénica</b> .....	13
<b>2.8 Aplicaciones de las nanopartículas</b> .....	14
<b>2.9 Nanopartículas de plata</b> .....	15
<b>2.10 Métodos de síntesis para AgNP</b> .....	15
<b>2.11 Toxicidad de AgNPs</b> .....	16
<b>2.12 Toxicidad inducida por AgNP</b> .....	16
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>4. HIPOTESIS</b> .....	19
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	19
<b>5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	19
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	20
<b>6.1 Síntesis de nanopartículas de plata empleando <math>\beta</math>-D-glucosa como agente reductor</b> ....	20
<b>6.2 Caracterización de las nanopartículas de plata sintetizadas con <math>\beta</math>-D-glucosa</b> .....	20
<b>6.3 Cultivo celular</b> .....	21
<b>6.4 Ensayo de toxicidad celular</b> .....	21
<b>6.5 Tinción de naranja de acridina y bromuro de etidio (AO/EB)</b> .....	21
<b>6.6 Ensayo de ciclo celular</b> .....	22
<b>6.7 Evaluación de exposición de calreticulina</b> .....	22
<b>6.8 Evaluación de la secreción de ATP al medio extracelular</b> .....	22
<b>6.9 Evaluación de la secreción de HMGB1 al medio extracelular</b> .....	23
<b>6.10 Co-cultivo de esplenocitos y 4T1</b> .....	23

6.11 Análisis estadístico .....	23
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
7.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa. .....	24
7.2 Las nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa afectan la viabilidad celular de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1. 24	
7.3 Las nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa inducen muerte celular en las líneas de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1 .....	25
7.4 Las nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa tienen un efecto en el ciclo celular de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231 y SKBR3. .....	28
7.5 Exposición de la calreticulina por el efecto de las nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231. .....	28
7.6 Las nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa promueven la secreción de la proteína HMGB1 y ATP en las líneas celulares de cáncer de mama.....	30
7.7 Esplenocitos co-cultivados con células 4T1 lisadas con nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa promueven la muerte celular en la línea 4T1. ....	31
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>36</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>37</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>3</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	Página
<b>Figura 1.</b> Incidencia del cáncer en el mundo (GCO,2021).....	5
<b>Figura 2.</b> Esquema de Inducción de Muerte Inmunogénica y activación de sistema inmune .....	11
<b>Figura 3.</b> Efecto citotóxico de Nanopartículas de Plata en células tumorales .....	17
<b>Figura 4.</b> (A) Espectro de absorbancia UV-vis de la solución de AgNP-G. (B) Valores del tamaño, PDI y potencial Z fueron obtenidos del equipo Zetasizer y (c) micrografía por TEM.....	24
<b>Figura 5.</b> Ensayo de viabilidad celular. Las células de cáncer de mama (a) 4T1, (b) MDAMB231, (c) SKBR3, (d) MCF7 y (e) BT474, fueron tratadas con AgNP-G a diferentes concentraciones durante 7 H. Se utilizó el ensayo con resazurina para obtener el porcentaje de viabilidad celular. ....	25
<b>Figura 6.</b> Evaluación de muerte celular por medio de la tinción de naranja y acridina y bromuro de etidio en líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1 tratadas con su dosis letal 50 y 100 durante 7 H .....	27
<b>Figura 7.</b> Análisis del efecto de las AgNP-G sobre las fases del ciclo celular en las líneas celulares de cáncer de mama a) BT474, b) MDAMB231, c) MCF7 y d) SKBR3 tratadas durante 7 horas. ....	28
<b>Figura 8.</b> Evaluación de la exposición de la calreticulina a la membrana celular. Las células tratadas fueron teñidas usando un anticuerpo monoclonal anti-ratón para calreticulina conjugado con PE, para analizarlas por citometría de flujo. ....	29
<b>Figura 9.</b> Ensayo de muerte celular por 7AAD por citometría de flujo en células 4T1 co-cultivadas con esplenocitos expuestos con lisado tumoral de células 4T1 tratadas con AgNP-g.....	32

## ÍNDICE DE TABLAS

### CONTENIDO

### Página

<i>TABLA 1. Caracterización de cuatro subtipos principales de tumores de mama, prevalencia poblacional y características clínicas (Anderson et al. 2014).....</i>	<i>5</i>
---	----------

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$	Microlitro
AgNP-G	Nanopartículas de plata sintetizadas con $\beta$ -D-glucosa
AO	Naranja de acridina
APC	Células presentadoras de antígeno
ATP	Trifosfato de adenosina
BE	Bromuro de etidio
CRT	Calreticulina
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DC	Células dendríticas
DL	Dosis letal
ER	Receptor de estrógeno
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
HMGB1	Proteína de alta movilidad de la caja 1
HPS70	Proteína de shock termino de 70 kDa
HPS90	Proteína de shock termino de 90 kDa
IL1- $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
INF- $\gamma$	Interferón gamma
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NK	Células asesinas naturales

NM	Nanomateriales
NP-s	Nanopartículas
PR	Receptor de progesterona
RE	Retículo endoplásmico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
TAA	Antígenos asociados a tumor

## RESUMEN

El mecanismo de muerte celular predilecto al momento de la administración de tratamientos contra el cáncer es el de muerte celular inmunogénica ya que se caracteriza por activar la respuesta inmune innata y adaptativa generando memoria inmunológica en contra de la recidiva del tumor. Esta respuesta es generada por la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que son moléculas que normalmente se encuentran asiladas del sistema inmune ya que se encuentran dentro de las células. Actualmente el cáncer se considera un problema de salud pública debido a sus altos índices de mortandad a nivel mundial. Hoy en día se buscan nuevas alternativas para el tratamiento. La síntesis de nanopartículas tiene una aplicación terapéutica importante contra el cáncer. Las nanopartículas de plata tienen diversas propiedades citotóxicas gracias a la liberación intracelular de los iones  $Ag^+$  y su generación de especies reactivas de oxígeno. Estudios anteriores nos demuestran que las nanopartículas de plata tienen una actividad antitumoral contra diversas líneas celulares de cáncer, entre ellas líneas celulares de cáncer de mama. En este estudio se evaluó si las nanopartículas de plata sintetizadas con glucosa tienen la capacidad de inducir muerte celular inmunogénica sobre las líneas tumorales de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1 *in vitro* y evitar la recidiva del cáncer. Se realizaron ensayos para determinar la citotoxicidad y el efecto de las nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -D-glucosa sobre la inducción de alarminas (calreticulina, HSP70, HSP90, HMGB1 y ATP) en las líneas tumorales de cáncer de mama.

Nuestros resultados muestran que las nanopartículas de plata disminuyeron la proliferación celular, así como la inducción de muerte celular en las líneas celulares de cáncer de mama. Las líneas celulares MCF7 y BT474 expresaron la molécula de calreticulina en su membrana al ser tratadas con las nanopartículas de plata. Las nanopartículas de plata tienen el potencial para inducir la expresión de la proteína HMGB1 y la molécula de ATP al espacio extracelular en las líneas celulares de cáncer de mama. Por lo tanto, las nanopartículas de plata tienen la capacidad de inducir citotoxicidad en las diversas líneas celulares y promueven la liberación de moléculas asociadas con la muerte celular inmunogénica.

## ABSTRACT

Cell death mechanism that is preferred to be induced when cancer treatments are administered is immunogenic cell death since it is characterized by activating the innate and adaptive immune response, generating immunological memory against tumor recurrence. The response is generated by release of damage-associated molecular patterns (DAMPs), which are molecules that are normally isolated from the immune system as they are found within cells. Cancer is currently considered a public health problem due to its high death rates worldwide. Nowadays, new alternatives for treatment are being sought, synthesis of nanoparticles has an important therapeutic application against cancer. Silver nanoparticles have various cytotoxic potential thanks to the intracellular release of Ag<sup>+</sup> ions and their generation of reactive oxygen species. Previous studies of silver nanoparticles demonstrate antitumor activity against various cancer cell lines, including breast cancer cell lines. In this study, we evaluated silver nanoparticles synthesized with glucose potential to induce immunogenic cell death on breast cancer tumor lines MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 and 4T1 and prevent cancer recurrence. Assays careened out to determine the cytotoxicity and the effect of silver nanoparticles synthesized with  $\beta$ -D-glucose on induction of calreticulin, HSP70, HSP90, HMGB1 and ATP in breast cancer cell lines. Results show that silver nanoparticles decreased cell proliferation and the induction of cell death in breast cancer cell lines. Cell lines MCF7 and BT474 expressed calreticulin molecule in their membrane when treated with silver nanoparticles. Silver nanoparticles have potential to induce the expression of HMGB1 protein and ATP molecule to the extracellular space in breast cancer cell lines. Therefore, silver nanoparticles have the potential to induce cytotoxicity in cell lines and promote release of molecules associated with immunogenic cell death.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad donde existe un crecimiento descontrolado de células con un genoma dañado y sin la posibilidad de que sea reparado o que estas sean dirigidas a apoptosis. Con la capacidad de invadir otros tejidos por medio del sistema circulatorio y los ganglios linfáticos. El cáncer genera la pérdida de la homeostasis en el organismo y posteriormente conduce a la muerte (NIH 2015; Hanahan y Weinberg, 2000).

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte a nivel mundial (GCO 2018). Comienza con el crecimiento anormal de las células de la unidad ductal-lobular terminal o bien en las células de los lobulillos de la mama (glándulas mamarias) (INEGI 2019). El tratamiento para el cáncer de mama depende de la capacidad de invadir otros tejidos, pero en general se encuentran las quimioterapias y la radioterapia como tratamientos de primera instancia (Waks y Winer 2019).

Aunque el sistema inmune es capaz de generar una respuesta para atacar las células cancerosas en ocasiones no es suficiente, por lo tanto se han creado quimioterapéuticos que desencadenan una muerte celular inmunogénica, para persuadir al sistema inmune de la presencia de células tumorales moribundas, gracias a la liberación de antígenos asociados a tumores (AAT), patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), citocinas proinflamatorias, favoreciendo el reconocimiento antígenos de las células del sistema inmune adaptativas para así generar una respuesta inmune específica contra diversos tumores en especial tumores sólidos (Krysko *et al.* 2012; Kroemer *et al.* 2013). Esto brinda la oportunidad de convertir las células moribundas en “Vacunas” y generar una respuesta inmunológica innata y adaptativa (Guo *et al.* 2013; Inoue y Tani 2014).

Las nanopartículas inorgánicas son una fuente para inducir la muerte inmunogénica o potenciar el efecto del tratamiento y gracias a los campos de energía externos minimiza el daño a tejidos no tumorales. En particular las nanopartículas metálicas se consideran biocompatibles ya que tienen un comportamiento intrínseco, sensibilidad magnética y estabilidad coloidal (Reddy *et al.* 2012; Dykman y Khlebtsov 2012).

Las nanopartículas de plata (AgNP) tienen propiedades ópticas, electrónicas y antibacterianas (Habouti *et al.* 2010). Su actividad biocida brinda una alternativa para tratar a las células cancerosas, y estudios demuestran que las nanopartículas tienen la capacidad de unirse a tratamientos contra el cáncer y la formación de este complejo aumenta su efectividad (Goodman *et al.* 2010; Braun *et al.* 2014)

La endocitosis es la vía más común en la que las células captan las AgNP pero aun así la captación será dependiente del tamaño de la nanopartícula (Zhang *et al.* 2014; AshaRani *et al.* 2009). Cuando la nanopartícula tiene contacto con el medio intracelular se crea un efecto citotóxico ya que se comienzan a generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chang *et al.* 2012). Esto provoca daños oxidativos en las proteínas, en el DNA y también induce la difusión en la mitocondria por su alta reactividad y tener como resultado la muerte celular (Zhang *et al.* 2014; Almofti *et al.* 2003).

En el presente estudio se evaluó si las AgNP sintetizadas con  $\beta$ -D-glucosa pueden inducir la muerte inmunogénica en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1; por medio de la inducción de DAMPs (Calreticulina, HSP70, HSP90, HMGB-1 y ATP).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cáncer

El cáncer se define como enfermedades correlacionadas que tienen por característica la división descontrolada de células anormales y tiene la capacidad de invadir otros tejidos (metástasis) por medio del sistema circulatorio y linfático (NIH 2015; WHO 2020). En la actualidad se considera un problema de salud pública ya que es una de las principales causas de muerte que afecta un alto porcentaje de la población a nivel mundial, se estima que en el año 2020 se produjeron 19,3 millones de nuevos casos de cáncer y casi 10,0 millones de muertes por cáncer. El cáncer de mama se encuentra desplazando al cáncer de pulmón como el cáncer más comúnmente diagnosticado (Fig. 1), y se estima que hay 2,3 millones de casos nuevos (11,7%), seguidos por los cánceres de pulmón (11,4%), colorrectal (10,0%), de próstata (7,3%) y de estómago (5,6%). El cáncer de pulmón sigue ocupando la principal causa de muerte por cáncer, con un estimado de 1,8 millones de muertes (18%), seguido de los cánceres colorrectal (9,4%), de hígado (8,3%), de estómago (7,7%) y de mama femenino (6,9%) (Sung *et al.* 2021).

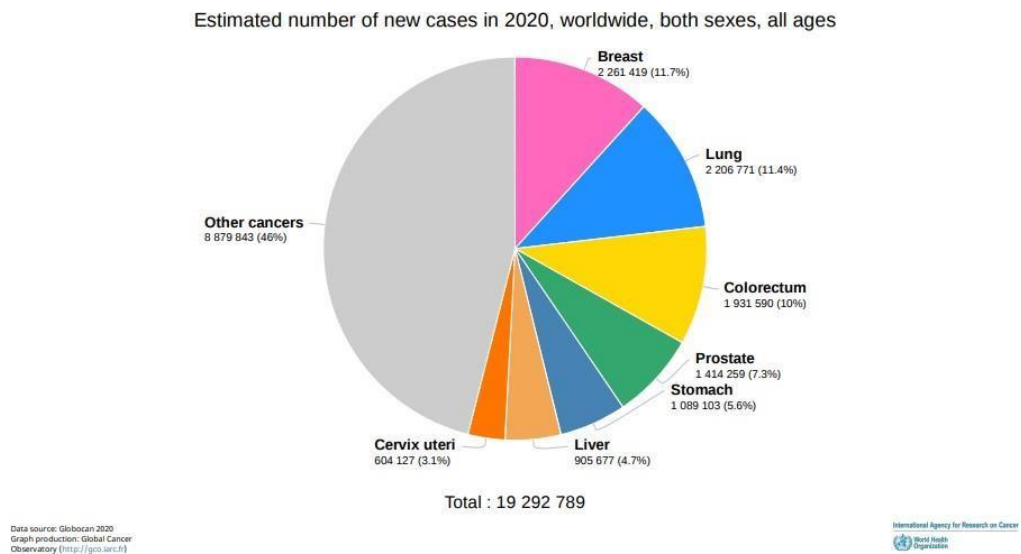


Figura 1. Incidencia del cáncer en el mundo (GCO,2021)

### 2.2 Cáncer de mama

En el año 2020 el cáncer de mama fue la principal causa de incidencia mundial de cáncer, con un valor estimado de 2,3 millones de nuevos casos, y con 685,000 muertes ocupando la quinta causa principal de mortalidad por cáncer en el mundo. Esto nos indica que 1 de cada 4 mujeres presenta casos de cáncer y 1 de cada 6 mujeres muere a causa de este en el mundo, por ende, ocupa el primer lugar en incidencia en la mayor parte de los países (Sung *et al.* 2021).

El cáncer de mama comienza con un crecimiento anormal ya sea de las células de la unidad ductal-lobular terminal (conductos que llevan la leche hasta el pezón) o en las mismas glándulas mamarias productoras de la leche o sea en los lobulillos de la mama, lo que se denomina cáncer de mama ductal y cáncer de mama lobular respectivamente (INEGI, 2019). Es una enfermedad formada por comportamientos biológicos y características patológicas específicas (Spitale *et al.* 2009). Las neoplasias en la mama tienen características distintivas como su señalización constante de la proliferación, la inmortalidad replicativa, el escape de los factores supresores de crecimiento, la evasión de la muerte celular, la creación de vasos sanguíneos nuevos, la capacidad de invadir otros tejidos, el reajuste del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune (Hanahan y Weinberg 2011). Existen factores que el microambiente tumoral utiliza para estimular o inhibir el crecimiento tumoral como lo son los estrógenos, progestágenos, andrógenos y factores de crecimiento transformantes alpha y beta. Diferentes citocinas, prostaglandina E y la hormona paratiroidea conducen a un desarrollo de metástasis ósea. La diseminación metastásica del cáncer de mama es gracias a la interacción del tumor con el estroma y el tejido normal circundante ya que este tipo de tumor puede crear nuevos vasos sanguíneos (Hortobagyi 1998). Se han determinado distintos subtipos en el cáncer de mama que se pueden diferenciar por la presencia o la ausencia de receptores hormonales como el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) (Moon *et al.* 1981). Estos receptores se utilizan como marcadores basales y de proliferación. Los tumores de la mama se agrupan en cuatro subgrupos básicos de acuerdo con estos marcadores, es decir, [ER + | PR +] HER2- (tumores con positividad ER o PR, y negatividad HER2) o también nombrado Luminal A, [ER + | PR +] HER2 + (tumores con positividad ER o PR y positividad HER2) LuminalB con menor incidencia pero peor pronóstico, ER-PR-HER2 + (tumores con negatividad

ER y PR, y positividad HER2 sobre expresado, también denominada HER2 positiva), ER-PR-HER2- (tumores con negatividad ER, PR, HER2, también denominada triple negativa). En general, los tumores ER-PR- (tumores con negatividad ER y PR) tienen un pronóstico relativamente peor que los cánceres [ER + | PR +] (Spitale *et al.* 2009).

La proteína nuclear Ki-67 es un indicador de proliferación celular que está presente en las fases tardías de G1, S, G2 y M en el ciclo celular (Cattoretti *et al.* 1992). La expresión alta de Ki-67 está asociada con la recaída y menor supervivencia en pacientes con cáncer de mama con el subtipo Luminal A y Luminal B (De Azambuja *et al.* 2007).

**Tabla 1 Caracterización de cuatro subtipos principales de tumores de mama, prevalencia poblacional y características clínicas (Anderson *et al.* 2014).**

Subtipos	Características moleculares / genéticas	Prevalencia (%)	Características clínicas
Luminal A	ER + y / o PR +, HER2-, Ki67 bajo	40	De crecimiento lento, menos agresivo, baja recurrencia, alta supervivencia, mejor pronóstico de todos los subtipos, responde a la terapia endocrina.
Luminal B	ER + y / o PR +, HER2 + (o HER2- con Ki67 alto)	10-20	Altas tasas de proliferación, peor pronóstico que Luminal A, responde a la terapia endocrina.
HER2 sobreexpresando	Positivo para la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR2), ER, PR-	10	Tienden a crecer y diseminarse de manera más agresiva, es más probable que sean de alto grado y ganglios positivos, pobre supervivencia a corto plazo, existen terapias dirigidas.
TNBC	ER-, PR-, HER2-	10-20	Menor edad en el momento del diagnóstico, alto grado histológico, tasas más altas de recurrencia a distancia después de la cirugía, mal pronóstico a corto plazo, carece de terapia dirigida.

El sexo, la edad y los antecedentes familiares pueden ser considerados como factores de riesgo de contraer cáncer de mama. Aunque el riesgo de desarrollar cáncer de mama se ve aumentado desde la aparición de la primera menstruación, la menopausia, el tratamiento

hormonal en esta, hasta la ausencia de embarazos a lo largo de la vida de la mujer. El riesgo se reduce si la mujer ha tenido hijos y los ha amamantado (Anderson et al. 2014).

### **2.3 Tratamientos en cáncer de mama**

Actualmente la manera de tratar el cáncer de mama depende de la capacidad del tumor de invadir otros tejidos. Para el cáncer de mama no metastásico la terapia se centra en eliminar el tumor del seno quirúrgicamente y también los ganglios linfáticos cercanos como los son los ganglios axilares esto para tratar de prevenir que el cáncer vuelva a desarrollarse, algunas veces se complementa con terapias de radiación después de la operación. También se puede aplicar una terapia sistémica antes de la operación, esta se denomina terapia neoadyuvante o después de la operación, terapia adyuvante o en algunos casos se aplican ambas. Ya que dependiendo del subtipo del tumor se determinará la terapia que se debe de aplicar. Para los tumores HR positivos se aplica una terapia endocrina en algunos casos en combinación con quimioterapias o terapias con anticuerpos dirigidos contra ERBB2 (trastuzumab). En el caso de los tumores triples negativos solo se administran quimioterapias. En el cáncer de mama metastásico aún no se ha encontrado una terapia que pueda ayudar a la supervivencia de las pacientes, se le retira el tumor de la mama quirúrgicamente y se le aplica radiación, pero esto solo ayuda a la paciente a sentirse mejor y mejorar su calidad de vida (Waks y Winer 2019).

### **2.4 Inmunoterapia**

La inmunoterapia contra el cáncer es un tratamiento en el que se podría lograr un resultado efectivo al emplearla en cánceres recurrentes y con metástasis. Existen diferentes tratamientos de inmunoterapia como los que usan anticuerpos monoclonales que bloquean la actividad del punto de control inmunitario, para mediar una respuesta adaptativa de las células efectoras T con actividad antitumoral (Farkona *et al.* 2016).

La inmunoterapia tiene como objetivo generar una respuesta inmune donde se produce la estimulación de las células efectoras CD8<sup>+</sup> (citotóxicas), ya que estas tienen la capacidad de eliminar las células tumorales al igual que generar una respuesta de memoria por las células T efectoras CD4<sup>+</sup> para lograr una inmunidad a largo plazo.

Cuando se despierta una respuesta inmune habitual las células dendríticas (DC) son las encargadas de reconocer y captar los antígenos, cuando esto ocurre las DC se activan y maduran para proceder a la presentación del antígeno en forma de péptido por medio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a las células T en los ganglios linfáticos, esto activa a las células T vírgenes para producir células T efectoras ( $CD8^+$ ,  $CD4^+$ ) que migran hacia los sitios de infección, lesión o inflamación. La producción de  $IFN-\gamma$  y GM-CSF es un factor importante en la maduración de las DC y en la activación de los macrófagos. Las DC comienzan la producción de citocinas como IL- $1\beta$ , IL-6, IL-12 o TNF son reconocidas por las células natural killer (NK) y los linfocitos T para generar una respuesta inmunológica. Las células T efectoras y las NK son estimuladas por la producción IL-2 y captación por su receptor, esta citocina aumenta su supervivencia y proliferación acompañado de la producción de  $INF-\gamma$ . La producción de citocinas como IL-10 y TGF- $\beta$  limita la actividad de las células T y los macrófagos ya que disminuye el proceso proinflamatorio y regula la respuesta inmune para proteger al huésped de una respuesta autoinmune. (Beatty y Gladney 2015).

Las células tumorales tienen la facilidad de inhibir la respuesta inmune ya que son células propias del huésped y aun que tengan la capacidad de expresar antígenos estos son poco inmunogénicos lo que crea una tolerancia inmunogénica. Y cambiar el equilibrio de las citocinas inhibitoras por las citocinas activadoras para poder generar la respuesta necesaria para proteger el organismo es un desafío importante para una inmunoterapia exitosa (Schumacher y Schreiber 2015).

Como se ha observado el sistema inmune tiene la capacidad de eliminar las células neoplásicas y gracias a esto se ha tratado de explotar este potencial y de esto se deriva la inmunoterapia contra el cáncer, que aprovecha la especificidad del sistema inmune para atacar los tumores específicamente, debido a que los tumores humanos presentan antígenos específicos de tumor en las membranas celulares que el sistema inmune es capaz de reconocer (Palucka y Banchereau 2012).

Aun así, aunque el sistema inmune tenga la capacidad de eliminar las células tumorales, estas utilizan estrategias por las cuales adquieren resistencia a la muerte celular y favorecen la supresión de la vigilancia inmunológica. Por lo tanto, las estrategias para atacar de mejor manera a las células tumorales consisten en infligir un máximo daño sobre

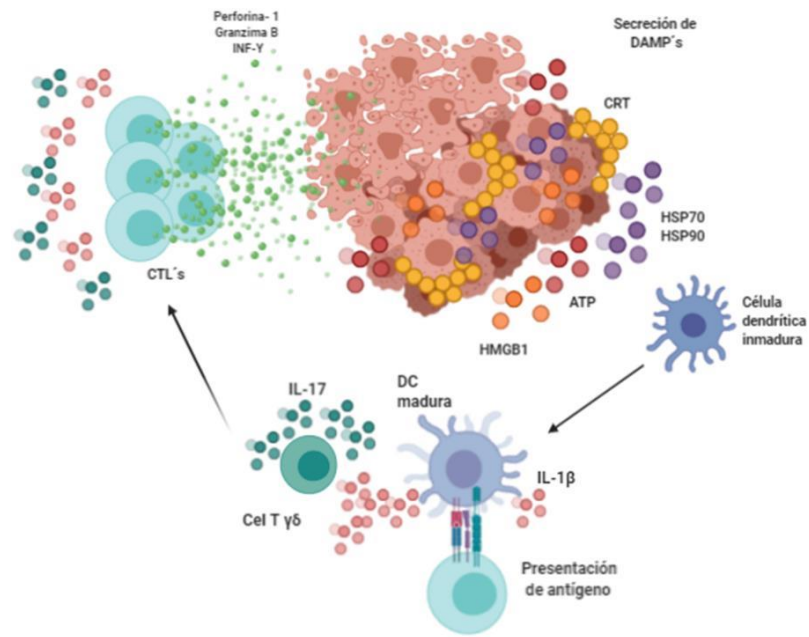
las células cancerosas para aumentar la susceptibilidad a la muerte celular y con esto inhibir la supresión del sistema inmune y aumentar o reacondicionar el reconocimiento inmunológico de las células cancerosas poco inmunogénicas (Tesniere *et al.* 2008). Utilizando estas dos estrategias podemos crear una terapia que garantizaría la destrucción completa o extensa de las células cancerosas y a su vez disminuiría potencialmente la recurrencia del cáncer. Estas estrategias terapéuticas serían capaces de inducir la muerte celular inmunogénica (Kepp *et al.* 2009).

### **2.5 Muerte inmunogénica**

La muerte celular inmunogénica (ICD) se define por la exposición crónica de Patrones Asociados a Daño (DAMP) en el microambiente tumoral (TME), que estimula el sistema inmunológico antitumoral disfuncional alargando la duración de la protección antitumoral (Zhou *et al.* 2019). En los últimos años se han creado quimioterapéuticos que desencadenan una muerte celular inmunogénica, para así persuadir al sistema inmunológico de la presencia de células tumorales moribundas. La muerte inmunogénica podría tener un potencial terapéutico ya que podría convertir las células moribundas en “vacunas” para estimular al sistema inmunológico por medio de la activación de las células T y las células dendríticas y potencial la actividad de citotóxicas de las células NK (Guo *et al.* 2013; Inoue y Tani 2014).

La muerte inmunogénica está caracterizada por inducir apoptosis en las células cancerosas generando inflamación y muerte celular. Las células moribundas comienzan con la liberación de antígenos asociados a tumores (TAA), patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y citocinas proinflamatorias, favoreciendo el reconocimiento de antígenos de las células del sistema inmune adaptativas para así generar una respuesta inmune específica contra diversos tumores sólidos especialmente (Krysko *et al.* 2012; Kroemer *et al.* 2013; Zhou *et al.* 2019). Durante la muerte inmunogénica las células dendríticas y los macrófagos serán los encargados de procesar los DAMPs y los TAA para presentarlos a las células inmunes adaptativas linfocitos CD4<sup>+</sup> y Linfocitos CD8<sup>+</sup> (Rubartelli y Lotze 2007). Para que la ICD pueda generarse es necesario un factor de estrés en la célula donde el retículo endoplásmico (RE) responde al estrés activando una vía de señalización

combinada con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), estos componentes causan la exposición de los diferentes DAMP al espacio extracelular (So, 2018).



**Figura 2.** Esquema de Inducción de Muerte Inmunogénica y activación de sistema inmune.

## 2.6 Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)

Los DAMPs son moléculas que se encuentran dentro de las células vivas (aislados del sistema inmune), durante el proceso de muerte celular, los DAMPs pueden ser expuestas o secretadas al exterior (Rubartelli y Lotze 2007). Existen diferentes factores inmunogénicos que se pueden identificar como DAMPs, como es el caso de la exposición de la calreticulina en la superficie celular (Obeid *et al.* 2007; Panaretakis *et al.* 2008), la liberación de ATP (Garg *et al.* 2012; Martins *et al.* 2014) y posteriormente la salida de la proteína de la caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB-1) (Apetoh *et al.* 2007; Scaffidi 2002) como las proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90) (Binder 2014; Tesniere 2008). Las células presentadoras de antígeno (APC) serán reclutadas por la liberación del ATP por su capacidad quimioatrayente mientras que la calreticulina actuará como una señal “cómeme” en las células tumorales moribundas que será reconocida mediante los receptores de las APC, como las células dendríticas ayudando a su maduración, activación y procesamiento de antígeno (Obeid *et al.* 2007; Seong, y Matzinger 2004). Finalmente,

la presentación de antígeno en las células T será estimulada por HMGB-1 y las HSPs (Apetoh *et al.* 2007; Green *et al.* 2009).

Para que pueda ocurrir la muerte inmunogénica, es necesario que haya un estrés en el retículo endoplasmico (RE) mediado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Garg *et al.* 2012), la acción combinada de estos factores activa distintas vías intracelulares que son las encargadas de llevar a los DAMPs al espacio extracelular (Obeid *et al.* 2007; Zitvogel *et al.* 2010a.; Panaretakis *et al.* 2009). Como es el caso de la calreticulina (CRT) que se encuentra “anclada” en el retículo endoplasmico por su secuencia KDEL en su dominio C-terminal. Esta proteína tiene varias funciones, como su actividad de chaperona, la regulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{+2}$  y de señalización. Además, la CRT es una de las encargadas tanto en el ensamblaje del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I) como la carga del péptido antigénico en este en el RE (Solheim 1999). La CRT no solo tiene actividades dentro del RE sino también fuera de él como la regulación del transporte nuclear, la proliferación y la migración celular (Garg *et al.* 2010; Gol *et al.* 2010). Cuando la CRT es traslocada en la superficie de las células tumorales facilita el reconocimiento de las células dendríticas y generar la respuesta de las células T citotóxicas (Hong *et al.* 2010).

La secreción o la liberación extracelular de ATP es un indicador de muerte celular (Rapaport y Fontaine 1989). Las células dendríticas reconocen el ATP extracelular por medio de sus receptores purinérgicos P2X7 para así activar el inflammasoma NALP3-ASC-e y comenzar la producción de IL-1 $\beta$ . La presentación de antígeno y la producción de IL-1 $\beta$  darán como resultado la polarización de las células T efectoras CD8<sup>+</sup> que a su vez estas producirán IFN- $\gamma$  y así generar una respuesta inmunológica adaptativa (Ghiringhelli *et al.* 2009). Para que el ATP extracelular pueda ser considerado DAMP es necesario que haya una secreción suficiente para establecer un gradiente quimioatrayente adecuado y haya una acción del ATP sobre los receptores (Ravichandran 2011; Mortensen *et al.* 2011; Picher *et al.* 2004).

Otra proteína asociada con DAMPs es la proteína nuclear HMGB1, esta coordina la actividad transcripcional de varias proteínas, como los receptores de hormonas esteroides, p53, NF-kB entre otras funciones (Müller *et al.* 2004) que al igual que la CRT sus funciones dependen del lugar en el que se encuentre dentro o fuera de la célula. En el



citosol la HMGB1 interviene en la autofagia cuando interactúa con la proteína beclina-1 (Tang *et al.* 2010; Huang *et al.* 2012). La proteína HMGB1 también puede ser secretada como una citocina por los macrófagos y monocitos activados por la IL-1 $\beta$ , Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y LPS. (Garg *et al.* 2010; Müller *et al.* 2004). La HMGB1 extracelular se une a células inmunes específicas, promueve la fagocitación y la presentación de productos muerte celular de células patogénicas y estimula la respuesta inmune (Lotze y Tracey 2005). HMGB1 se une a receptores específicos en células dendríticas o presentadoras de antígenos, como el receptor multiligando RAGE y los receptores tipo toll 4 (TLR4) (Bianchi 2009).

Finalmente tenemos los DAMPs como las proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90) que son una familia de proteínas chaperonas ATP-dependientes, estas son las encargadas del plegamiento de las proteínas recién sintetizadas tanto del repliegamiento de las proteínas que han sido afectadas por algún tipo de estrés (Lanneau *et al.* 2008). Normalmente podemos encontrar estas proteínas en el citoplasma, en la mitocondria y en el retículo endoplasmico. Si la célula se encuentra bajo condiciones de estrés las proteínas de shock termico pueden trastocarse a la membrana celular (Tesniere *et al.* 2008). Estas proteínas al traslocarse en la membrana de las células moribundas adquieren una actividad inmunoestimuladora (Spisek y Dhodapkar 2007). Esta actividad inmunoestimuladora se debe a que tiene la capacidad de interactuar con receptores de superficie en las APCs (Bartůňková y Špíšek 2009) como CD91, LOX1 y CD40 (Spisek y Dhodapkar 2007) esto facilita la presentación de antígenos asociados a tumores (TAA) por el MCH I y despierta la respuesta inmunológica de las células T CD8<sup>+</sup> (Doody *et al.* 2004; Schild *et al.* 1999; Binder *et al.* 2001).

## **2.7 Inductores de muerte inmunogénica**

Actualmente desde que se conocen los beneficios de la destrucción de las células tumorales por medio de ICD y el efecto que tiene sobre las células del sistema inmune se busca encontrar inductores de muerte inmunogénica. Existen dos tipos de inductores de ICD. Los inductores de muerte inmunogénica tipo I son tratamientos que se caracterizan por *indirectamente* promover el estrés en el RE, tienen como objetivo el ADN y proteínas

de la maquinaria de reparación, proteínas citosólicas, membrana plasmática o proteínas nucleicas que están dirigidas por agentes quimioterapéuticos como las antraciclinas (oxaplatino (OXP), mitoxantona, doxorubicina, idarrubicina) (Casares *et al.* 2005). Los tratamientos que promueven directamente con el estrés del RE son inductores de muerte inmunogénica tipo II, como la terapia fotodinámica que destruye las células cancerosas con la manipulación de fotosensibilizadores y oxígeno para generar ROS o los virus oncológicos que se dirigen al RE para provocar la muerte celular (Inoue y Tani 2014; Kryska *et al.* 2012; Inoue y Tani 2014). Usualmente se utilizan los inductores de muerte inmunogénica que cuentan con estas características para la creación de vacunas contra el cáncer y como terapia para evitar la reincidencia del cáncer (Rodríguez-Salazar 2017). En las vacunas contra el cáncer *in situ* es necesario que el inductor de muerte inmunogénica se dirija directamente a las células tumorales. Actualmente la nanotecnología nos ofrece la oportunidad de controlar este efecto, ya que nos facilita la entrega eficiente de la dosis óptima de los inductores de muerte inmunogénica hacia las células específicas potenciando el impacto de la vacuna y reduciendo los efectos secundarios (Irvine *et al.* 2015; Jo *et al.* 2017; Ng *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2009).

## **2.8 Aplicaciones de las nanopartículas**

Las nanopartículas (NPs) pueden transportar consigo diversos componentes, proteger las cargas útiles de la degradación y la liberación temprana, e ingresar a las células tumorales de forma activa o pasiva mediante el efecto de la permeabilidad y retención mejorado o modificación de la superficie celular con sus ligandos correspondientes (Zheng *et al.* 2005; Shao *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2014). Las NPs inorgánicas se usan como una fuente para el tratamiento inductor de muerte inmunogénica o intensificar el tratamiento gracias a campos de energía externos para minimizar el daño a células no tumorales. Las NPs metálicas se eligen gracias a su biocompatibilidad y comportamiento intrínseco, su sensibilidad magnética y su estabilidad coloidal (Reddy *et al.* 2012; Dykman y Khlebtsov 2012). Existen NPs con funciones de imagen que tienen como utilidad monitorear la localización y el efecto en tiempo real. Por otro lado, existen NPs que tienen una función inmunomoduladora ya sea como adyuvantes o potenciadores inmunes. Una ventaja de las

NPs es su capacidad de modificar su tamaño, forma, estructura, carga útil como sus propiedades de superficie para su transporte al igual que sus cargas a través de las barreras biológicas y mejorar su acumulación en las células de tumores sólidos (Duan y Li 2013; Hong *et al.* 2018; Sun y Xia2002; Lu et al. 2002).

## **2.9 Nanopartículas de plata**

En particular las nanopartículas de plata (AgNP) son utilizadas gracias a sus propiedades ópticas, electrónicas y antibacterianas (Habouti *et al.* 2010). Su actividad antimicrobiana de amplio espectro nos brinda una amplia gama de productos donde se emplean AgNPs como recipientes para alimentos, aerosoles antisépticos, catéteres, vendajes entre otros. El tamaño y el recubrimiento de la AgNP es lo que le brinda su actividad biocida. Actualmente se ha implementado el uso de AgNPs para crear terapias alternativas antitumorales. Ya que se han visto resultados prometedores al incorporar AgNPs a los tratamientos contra el cáncer (Goodman *et al.*2010; Braun *et al.* 2014).

## **2.10 Métodos de síntesis para AgNP**

Existen diferentes métodos para la síntesis de AgNPs, como los métodos químicos (Zhang *et al.* 2011; Roldán *et al.* 2013; Sotiriou y Pratsinis 2010; Sotiriou *et al.* 2011), físicos (El-Nour *et al.* 2010; Tien *et al.* 2008; Kosmala *et al.* 2011; Asanithi *et al.* 2012) y biológicos (Shivaji *et al.* 2011; Li *et al.* 2012). Los métodos químicos se subdividen en reducción química (Zhang *et al.* 2011), técnicas electroquímicas (Roldán *et al.* 2013), métodos químicos asistidos por irradiación (Sotiriou y Pratsinis 2010) y pirolisis (Sotiriou *et al.* 2011). La síntesis de nanopartículas de plata en solución contiene tres componentes principales: un precursor metálico, un agente reductor y un agente estabilizador o protector (Sotiriou y Pratsinis 2010). Los métodos físicos no involucran productos químicos tóxicos y por lo general su tiempo al producir las nanopartículas es rápido. Los métodos físicos pueden ser con condensación física de vapor (El-Nour *et al.* 2010), descarga de arco (Tien *et al.* 2008), método de molienda de bolas de energía (Kosmala *et al.* 2011) y pulverización de magnetron de corriente continua (Asanithi *et al.* 2012). En el caso de la síntesis biológica, los agentes reductores y los estabilizadores tóxicos se

remplazan por moléculas que no son tóxicas como proteínas, carbohidratos, antioxidantes que estas pudieran ser producidas en algunos casos por bacterias (Shivaji *et al.* 2011), hongos (Li *et al.* 2012) y levaduras (Mourato *et al.* 2011). Uno de los métodos más amigables con el medio ambiente para la síntesis de AgNP es mediante extractos de plantas como *Aloe vera*, algas, té, hierba de limón entre una variedad muy amplia (Ge *et al.* 2014).

### 2.11 Toxicidad de AgNPs

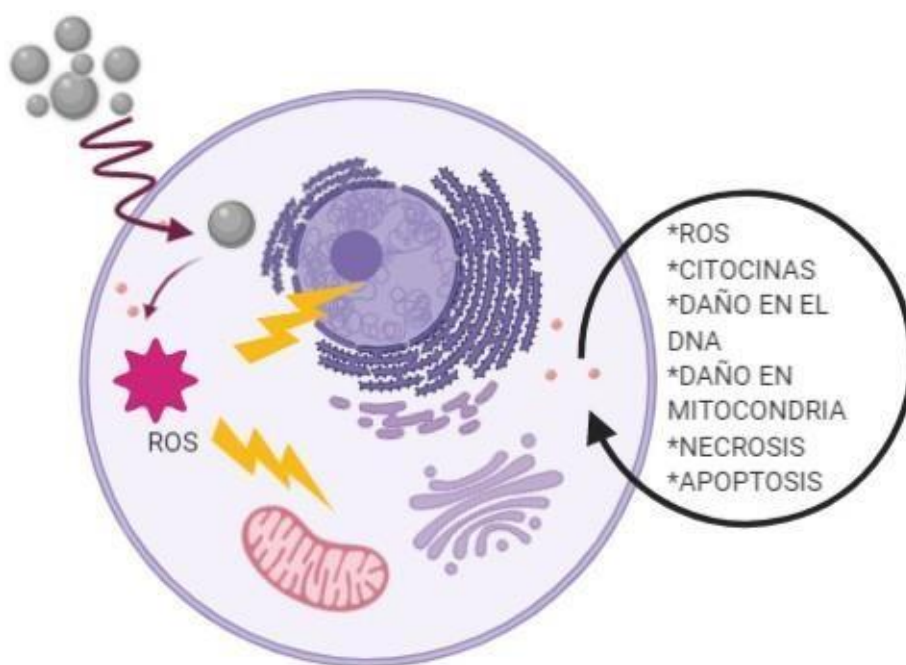
Existen diferentes formas en las que los pacientes pueden ser expuestos a las AgNP, como el contacto dérmico, de forma oral, por medio de inhalación o por la circulación sanguínea. Dentro del cuerpo humano las primeras células en estar en contacto con las AgNP son los macrófagos (Pratsinis *et al.* 2013).

Las propiedades toxicológicas de las AgNP serán dependiendo del método de síntesis por el cual se crearon, el tamaño, si están presentes o ausentes los métodos de protección y los organismos o las células de cultivo. Es necesario evaluar el riesgo en cada caso particular para determinar el grado de toxicidad.

### 2.12 Toxicidad inducida por AgNP

Los problemas relacionados con la toxicidad inducida por las AgNP dependen de varios factores como la interacción de la AgNP con las células, la captación celular, así como la respuesta de la AgNP dentro de la célula. La principal forma en la que las células absorben las AgNP es por medio de endocitosis, pero también depende del tiempo, la dosis y la energía (Zhang *et al.* 2014; AshaRani *et al.* 2009). Las NP tienen la capacidad de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) directamente una vez que están en interacción con el ambiente ácido del lisosoma (Chang *et al.* 2012). En las ROS encontramos aniones superóxido ( $O_2^-$ ), radicales hidroxilos (OH) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Se cree que *in vivo* cuando  $H_2O_2$  y las AgNP reaccionan conducen a la liberación de iones de  $Ag^+$  probablemente la reacción química sería de esta manera  $2Ag + H_2O_2 + 2H^+ \rightarrow 2Ag^+ + 2H_2O$  (AshaRani *et al.* 2009). La reacción puede ocurrir en medio

de cultivo o con proteínas del citoplasma. Cuando se generan las ROS provocan daños oxidativos en las proteínas, en el DNA y también pueden inducir una disfunción en la mitocondria ya que estas son altamente reactivas. Las AgNP y los iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) pueden escapar de los lisosomas y potenciar la generación de ROS intracelular estas interactuar preferentemente con los grupos tiol de las moléculas que están presentes en el citoplasma, en la membrana celular y en la membrana interna de las mitocondrias (Zhang *et al.* 2014; Almofti *et al.* 2003). Cuando ocurre un daño en la membrana celular esto provoca que se liberen componentes del citoplasma y da como resultado la muerte celular no programada (necrosis) mientras que la ruptura de las membranas del lisosoma activa la muerte programada (apoptosis mediada por lisosomas). Además, la apoptosis dependiente de las mitocondrias se puede presentar debido a que la transferencia de electrones se ve afectada (Arora *et al.* 2008).



**Figura 3.** Efecto citotóxico de Nanopartículas de Plata en células tumorales.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El cáncer de mama es el más frecuente en mujeres en nuestro país con una tasa incidencia de 27,283 en el año 2018, constituyendo un problema de salud pública importante. Los tratamientos oncológicos actuales necesitan ser complementados con nuevas propuestas de drogas y técnicas las cuales garanticen incrementar su efectividad y disminuir su toxicidad. Además de inducir una memoria inmunológica específica del tumor que evite la recurrencia del cáncer en el paciente. La muerte inmunogénica es un tipo de muerte celular que permite generar una respuesta adaptativa específica del tumor.

A la fecha no existen estudios relacionados con el empleo de la administración de las nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -D-Glucosa y la capacidad de generar muerte inmunogénica en las células tumorales. Por lo que en el presente estudio se evalúa si las nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -D-Glucosa como reductor tienen la capacidad de generar muerte inmunogénica en las células tumorales de cáncer de mama.

#### **4. HIPOTESIS**

El tratamiento con nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -D-glucosa tienen la capacidad de inducir la producción de alarminas (calreticulina, HMGB1 y ATP) relacionadas con la muerte inmunogénica en líneas celulares de cáncer de mama.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar si las nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -D-glucosa tienen la capacidad de inducir moléculas relacionadas con la Muerte Celular Inmunogénica sobre las líneas tumorales de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1 *in vitro*.

##### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Sintetizar las nanopartículas de plata con  $\beta$ -D-glucosa, caracterizarlas y determinar su estabilidad.
2. Determinar el efecto citotóxico de las nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -D-glucosa sobre las líneas tumorales de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1.
3. Determinar el efecto de las nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -D-glucosa sobre el ciclo celular de las líneas tumorales de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1.
4. Determinar el efecto de las nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -D-glucosa sobre la inducción de alarminas (calreticulina, HMGB1 y ATP) en las líneas tumorales de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Síntesis de nanopartículas de plata empleando $\beta$ -D-glucosa como agente reductor

Se empleó  $\text{AgNO}_3$  (2.5 mM) como agente oxidante,  $\beta$ -D-glucosa (0.1 M) y NaOH (0.3 M) como agentes reductores para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNP-g). Se vertieron 1 ml de  $\text{AgNO}_3$  en un vaso de precipitado y se colocó 5 minutos en una plancha de calor a 117 °C con agitación de 60 rpm, al minuto 4 se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de NaOH. En el minuto 5 se agregó por goteo 500  $\mu\text{L}$  de la solución de  $\beta$ -D-glucosa. Cuando la solución adquirió un color amarillo fue el primer indicador de la síntesis de AgNP-g.

### 6.2 Caracterización de las nanopartículas de plata sintetizadas con $\beta$ -D-glucosa

Para la caracterización de las AgNP-g se preparó una dilución 1:1 de la solución de AgNP-g y se midió la absorbancia de la banda de resonancia de plasmón superficial en 400-480 nm aproximadamente de longitud de onda para corroborar la correcta síntesis de estas. Este ensayo se realizó mediante espectroscopia de luz ultravioleta visible (UV-Vis) en el equipo Nanodrop (Thermo scientific Nanodrop, 2000c) con un intervalo de longitudes de onda de 350 a 800 nm. Se evaluó el tamaño y potencial Z de las AgNP-g por medio de dispersión de luz dinámica (DLS) en el equipo Zetasizer. Por lo tanto, se realizaron diluciones previas de 1:10, 1:100, 1:1000 con agua desionizada. El tamaño se obtuvo al cuantificar la dispersión de la luz provocada por la velocidad y movimientos aleatorios de las partículas basado en el movimiento browniano de las mismas. El potencial Z es una medición sumamente importante con la que se determina la fuerza de repulsión entre las partículas, lo que nos permite saber si estas tienden a aglomerarse o mantenerse dispersas en la solución de forma homogénea.

La morfología y la estabilidad de las NP se observaron por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de alta resolución. Las muestras se prepararon para ser observadas en TEM colocando pequeñas gotas de soluciones de AgNPs-G en una rejilla de cobre de 600 mesh con soporte de carbono estándar y secadas al aire. La distribución del tamaño de partículas se obtuvo utilizando el programa ImageJ (US NIH, Beverly, EE. UU.).



### **6.3 Cultivo celular**

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama humano: BT-474, MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 [SKBR3] y 4T1 murino. Cultivadas en medio DMEM con 10 % de suero fetal bovino y 1 % de antibiótico-antimicótico a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y 85 % de humedad, para la activación de la proliferación celular y su estabilización.

### **6.4 Ensayo de toxicidad celular**

Para evaluar el efecto citotóxico de las AgNP-g se sembraron por triplicado una concentración de 5,000 células por pozo en una placa de 96 pozos en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, las líneas celulares de cáncer de mama: BT-474, MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 [SKBR3] y 4T1 murino y se dejaron adherir por 24 h a una atmosfera de 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> para permitir que las células se adhirieran a la placa. Posteriormente se desechó el medio de cultivo y se agregaron distintas concentraciones de AgNP-g. A las 7 h de tratamiento se logró observar un efecto citotóxico gracias a la morfología celular y se adiciono a cada pozo 100 µL de medio DMEM sin suplementar con la resarsurina al 10 % (V/v) y se incubaron durante una hora en condiciones estándar. Cuando se cumplió el tiempo de incubación se leyeron las placas a una longitud de onda de excitación de 535 nm y de emisión de 595 nm en el lector de placas Synergy HT™ (BioTek Instruments, INC., Winooski, VT, USA).

### **6.5 Tinción de naranja de acridina y bromuro de etidio (AO/EB)**

Se cultivaron  $5 \times 10^5$  células por pozo sobre un cubreobjetos de las líneas celulares de cáncer de mama BT-474, MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 [SKBR3] y 4T1 murino en placa de 6 pozos y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Posterior a estose trataron con AgNP-g durante 7 h con la IC<sub>50</sub> y la IC<sub>100</sub> de cada una de las líneas y dejando un control sin nanopartículas solo con DMEM. Se lavó con PBS y se dejaron en un 2 mL de PBS. Se agregó a cada pozo 10 µL de una mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio en una proporción 1:1. Se visualizaron con un microscopio de fluorescencia confocal. La naranja de acridina tiñe las células de verde y el bromuro de etidio solo puede teñir el DNA cuando la célula permite que se internalice cuando la membrana celular esta permeabilizada por los procesos de muerte celular.

### **6.6 Ensayo de ciclo celular**

Después del tratamiento, las células fueron colectadas y lavadas con PBS (buffer de fosfatos) a un PH de 7.2, posteriormente fijadas en etanol al 70 % y almacenadas a -20 °C. Para el análisis de ciclo celular, las muestras fueron lavadas con PBS e incubadas en Triton-X100 al 0.5% v/v y una solución de (7-AAD) 7-amino actinomicina D (10 µg/mL) en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 min. El contenido del DNA fue determinado mediante el citometro de flujo FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Para el análisis del ciclo celular y el pico de evaluación SubG0, un total de 20,000 eventos del area de 7-AAD-area vs. el ancho del gate de 7-AAD fueron adquiridas. Los resultados fueron analizados empleando el software FlowJo (Becton Dickinson).

### **6.7 Evaluación de exposición de calreticulina**

Se evaluó la exposición de calreticulina en las líneas celulares de cáncer de mama después de ser tratadas con AgNP-g por 7 h. Las células BT-474, MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3 [SKBR3] y 4T1 murino se cultivaron a una concentración de  $1 \times 10^5$  células, en placas de 12 pozos, se incubaron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> toda la noche para permitir la adherencia de las células a la placa, al día siguiente se retiró el medio de cultivo y se añadió el tratamiento, dejando pozos sin tratamiento como control. Posteriormente las células se recolectaron en tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 1600 rpm por 10 min, se desechó el sobrenadante y se lavó con PBS suplementado con Albumina dos veces, se agregó el anticuerpo monoclonal de anti-ratón para la detección de calreticulina conjugado con el fluorocromo ficoeritrina usando una dilución del anticuerpo 1:100 en 50 µL de PBS suplementado, se incubaron por 1 h a temperatura ambiente protegidas de la luz. Finalmente, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo.

### **6.8 Evaluación de la secreción de ATP al medio extracelular**

Se evaluaron los niveles de ATP extracelular en sobrenadantes de las líneas celulares de cáncer de mama tratadas con AgNP-g por 7 h. Se utilizó un kit de detección cuantitativo por quimioluminiscencia (ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence

Detection Kit for ATP Measurement, PROMEGA). Y la lectura de las muestras se realizó en el equipo Microplate Autoreader EL311 (BioTek Instruments, USA).

### **6.9 Evaluación de la secreción de HMGB1 al medio extracelular**

Se evaluaron los niveles de HMGB1 extracelular en sobrenadantes de las líneas celulares de cáncer de mama tratadas con AgNP-g por 7 h. Se utilizó un kit de detección Kit ELISA HMGB-1 (High mobility group protein B1, US Biological Life Science Salem, MA, USA).

### **6.10 Co-cultivo de esplenocitos y 4T1**

Se extirpo el bazo de 3 grupos de ratones: Ratones sin tumor, con tumor y ratones vacunados con lisado de células 4T1 tratadas con AgNP-G y se cultivaron los esplenocitos. Se cultivaron 50, 000 células de 4T1 por pozo en una placa de 6 pozos. Se agregaron los esplenocitos a las células 4T1 1, 250,000 de linfocitos por 50,000 4T1 y se dejaron 24 h incubando a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> se recolecto el sobrenadante y las células se lavaron con PBS y se re suspendieron en 500 µL PBS y se agregó 5 µL de 7AAD y se analizó por citometría de flujo en un citómetro Accuri C6 (Becton Dickenson, San Jose, CA, USA).

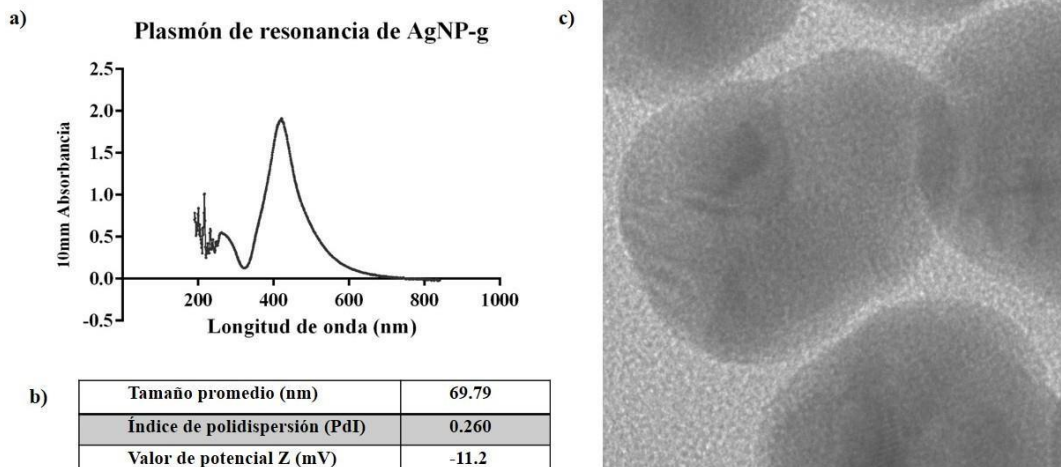
### **6.11 Análisis estadístico**

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, el análisis estadístico se realizó usando análisis de varianza (ANOVA). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si el valor de  $P < 0.05$  ó  $<0.001$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa.

La síntesis de las nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa se confirmó por medio de espectrofotometría UV-vis al observar la banda del plasmón de resonancia a una longitud de onda de 420 nm ya que es característica de la plata (Fig. 4a). Presentan un tamaño promedio de 69.79 nm con un índice de polidispersión de 0.260 y un valor de potencial Z de -11.2 mV; aproximadamente el 74 % de las nanopartículas de plata miden 69.79 nm con una carga negativa y una estabilidad moderada (Fig. 4b). Mediante microscopía electrónica de transmisión se pudo observar que las nanopartículas poseen una forma esférica (Fig. 4c).

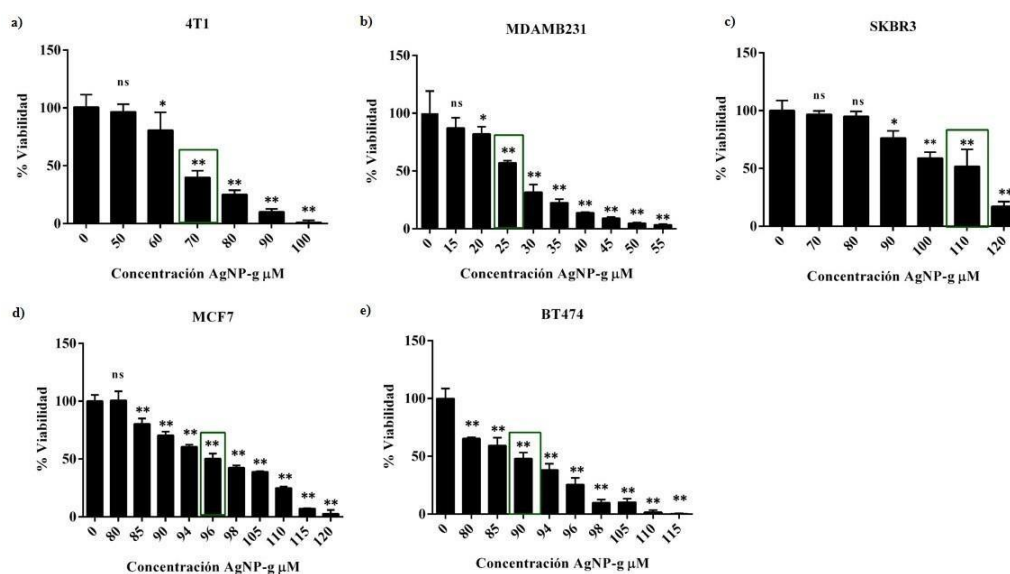


**Figura 4.** (A) Espectro de absorción UV-vis de la solución de AgNP-G. (B) Valores del tamaño, PdI y potencial Z fueron obtenidos del equipo Zetasizer y (c) micrografía por TEM.

### 7.2 Las nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa afectan la viabilidad celular de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1.

Las nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa disminuyeron la proliferación celular de las líneas celulares MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1 *in vitro* a las 7h del tratamiento. Se observó que la disminución de la viabilidad es dependiente de la concentración y del tiempo

En la figura 5 se muestra que la línea celular más sensible al tratamiento fue la línea celular MDAMB231 (Fig. 5b) representante del subtipo Triple negativo humano con una IC<sub>50</sub> en una concentración de 25 μM y la línea SKBR3 mostraron más resistencia al tratamiento con las nanopartículas con una IC<sub>50</sub> de 110 μM.



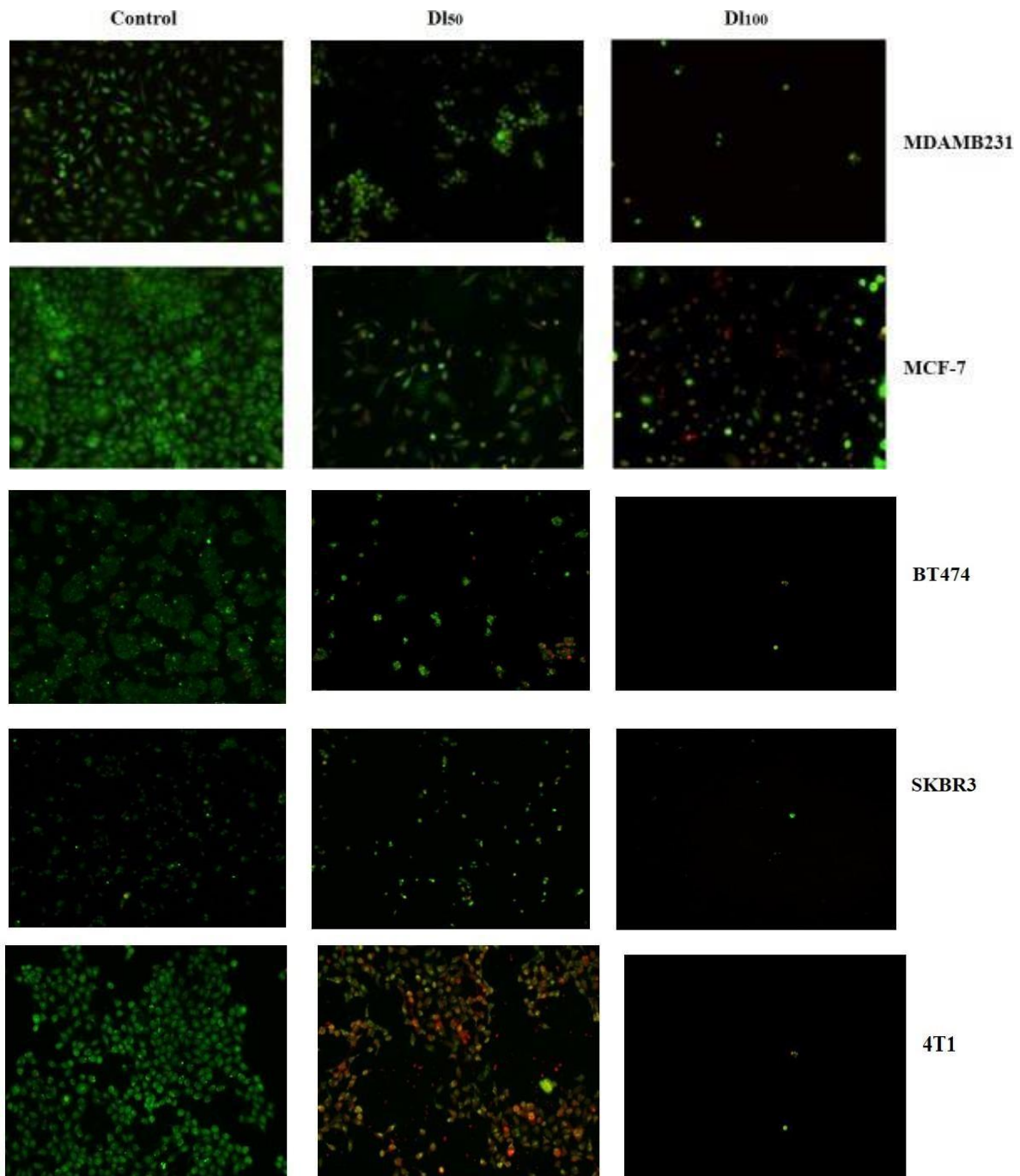
**Figura 5.** Ensayo de viabilidad celular. Las células de cáncer de mama (a) 4T1, (b) MDAMB231, (c) SKBR3, (d) MCF7 y (e) BT474, fueron tratadas con AgNP-G a diferentes concentraciones durante 7 H. Se utilizó el ensayo con resazurina para obtener el porcentaje de viabilidad celular.

### 7.3 Las nanopartículas de plata reducidas con β-D-glucosa inducen muerte celular en las líneas de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1.

Mediante la prueba de bromuro de etidio y naranja de acridina pudimos confirmar que el tratamiento con AgNP-G induce muerte células en las diferentes líneas de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1 en un período de tiempo de 7 h. Al teñir las células con naranja de acridina y bromuro de etidio (AO/EB) se puede observar claramente su morfología y los cambios que se generan al ser tratadas con AgNP-G. Encontrando que el tratamiento de AgNP-G en las líneas celulares SKBR3 y MDAMB231 indujo la muerte celular mediante apoptosis característica por la coloración naranja. Por otra parte, en las líneas celulares MCF-7, BT-474 y 4T1 se aprecia que se indujo una

muerte celular inducida por apoptosis y necrosis, característica de la presencia de células con color naranja (apoptosis) o rojo (necrosis).

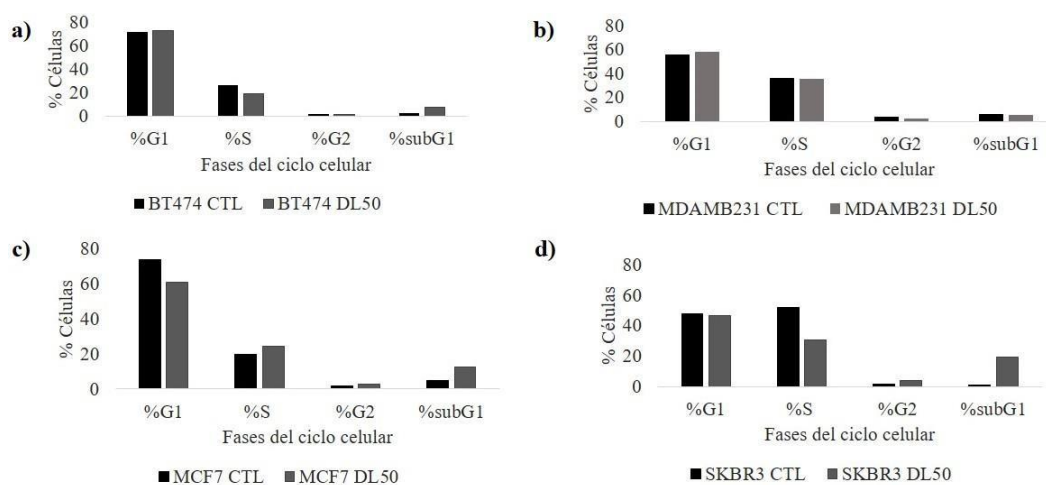
La naranja de acridina tiñe la célula completa y se puede observar la membrana celular, el núcleo y los nucléolos ya que estos se tiñen de verde mientras que el bromuro de etidio es un intercalante del DNA que solo se podrá unir si la membrana se ve comprometida generando una señal de fluorescencia de color rojiza. En el grupo control de las líneas celulares se puede observar la morfología característica de las líneas celulares extendidas con una confluencia abundante. Mientras que en las células tratadas con la  $DL_{50}$  se observa que la cantidad de células disminuye y su morfología cambia a células circulares donde se puede observar que algunas presentan coloración anaranjada/rojiza donde se puede entender que el bromuro se está uniendo al DNA y finalmente con la  $DL_{100}$  se observan una menor cantidad de células y se observan células necróticas presentando una coloración rojiza debido a los daños estructurales del proceso de muerte. Por lo tanto, el tratamiento con nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa inducen muerte celular.



**Figura 6.** Evaluación de muerte celular por medio de la tinción de naranja y acridina y bromuro de etidio en líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231, SKBR3 y 4T1 tratadas con las concentraciones inhibitorias 50 y 100 durante 7.

#### 7.4 Las nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa tienen un efecto en el ciclo celular de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231 y SKBR3.

Las fases del ciclo celular (Síntesis del DNA (S), GAP 2/M (G2/M), GAP1 (G0/G1), células muertas y restos celulares) fueron analizadas. Se observó que las nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa tuvieron un efecto sobre las fases de ciclo celular de la línea SKBR3 ya que disminuye el porcentaje hasta un 20 % de células en la fase de síntesis y aumenta el porcentaje celular en las células muertas hasta un 18% con respecto al control. En la línea celular MCF7 se puede apreciar que hay una disminución hasta un 12 % en la fase G0/G1 con respecto al control y un aumento del porcentaje celular de 15% en la fase de síntesis y 8 % en las células muertas. En las líneas celulares MDAMB231 Y BT474 no se observa alguna diferencia en comparación al control (Figura 7).

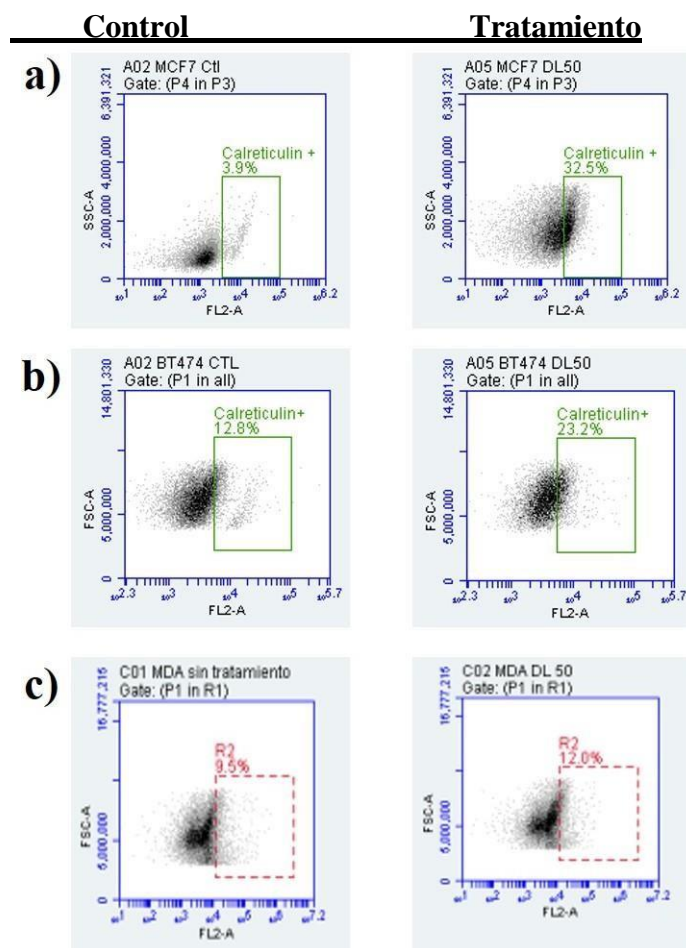


**Figura 7.** Análisis del efecto de las AgNP-G sobre las fases del ciclo celular en las líneas celulares de cáncer de mama a) BT474, b) MDAMB231, c) MCF7 y d) SKBR3 tratadas durante 7 horas.

#### 7.5 Exposición de la calreticulina por el efecto de las nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT474, MDAMB231.



Las nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa indujeron la exposición de la calreticulina hacia la membrana celular en las líneas MCF7 (28.6 %) y BT474 (10.4 %) a las 7 h con la concentración de la  $IC_{50}$  con respecto al control (Fig. a y b). Sin embargo, no se vio una señal aumentada en la línea celular MDAMB231 (2.5 %) con respecto al control (Fig. 8c).



**Figura 8.** Evaluación de la exposición de la calreticulina a la membrana celular. Las células tratadas fueron teñidas usando un anticuerpo monoclonal anti-ratón para calreticulina conjugado con PE, para analizarlas por citometría de flujo.

## 7.6 Las nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa promueven la secreción de la proteína HMGB1 y ATP en las líneas celulares de cáncer de mama.

Se determinó la producción de HMGB1 y ATP, en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, encontrando que el tratamiento con AgNPs-glu indujo de manera significativa la producción de HMGB1 y ATP de una manera dependiente de línea celular comparado con su respectivo control (Figura 9 y 10)

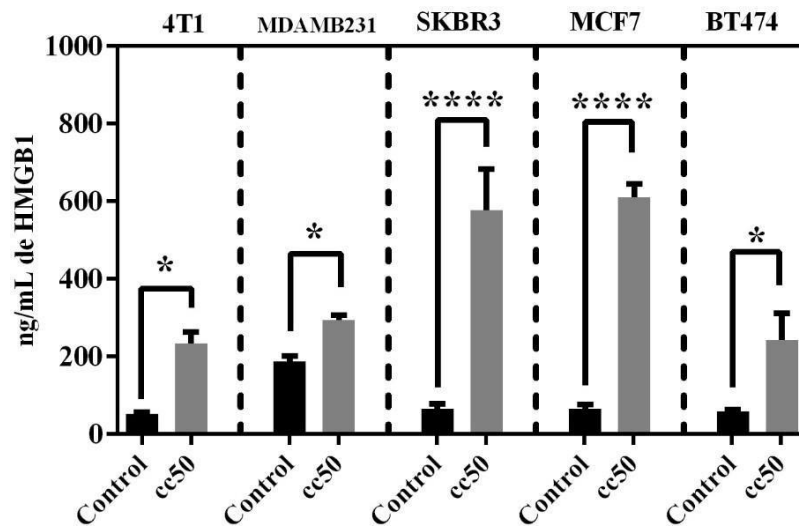


Figura 9. Secreción de la proteína HMGB1 en el sobrenadante de las líneas celulares de cáncer de mama tratadas con nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa.

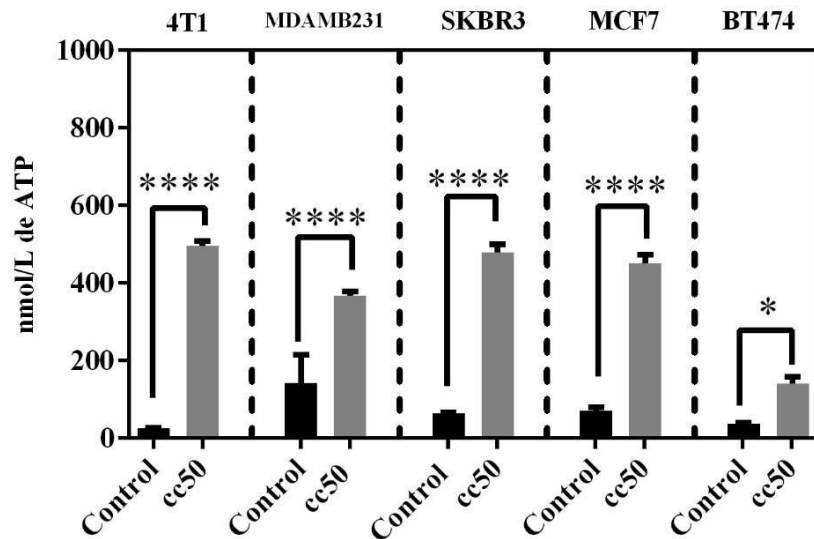
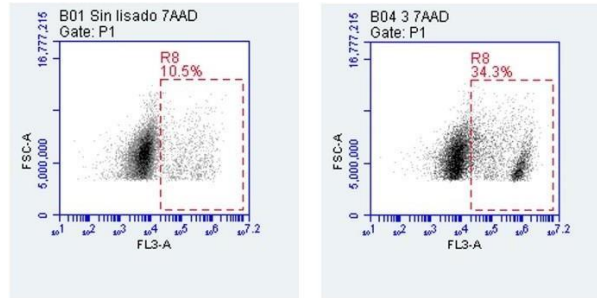


Figura 10. Liberación de ATP al medio extracelular en líneas celulares de cáncer de mama tratadas con AgNP-G durante 7 h.

### 7.7 Esplenocitos co-cultivados con células 4T1 lisadas con nanopartículas de plata reducidas con $\beta$ -D-glucosa promueven la muerte celular en la línea 4T1.

Se co-cultivaron esplenocitos con células dendríticas previamente diferenciadas y maduras con lisado tumoral y se retaron con la línea celular 4T1 en una dilución 1:10 durante 24 h, usando como control esplenocitos que no fueron expuestos con lisado de células 4T1. Se observó que las células 4T1 co-cultivadas con esplenocitos que no fueron sensibilizados al lisado de células 4T1 tratadas con AgNP-glu, la viabilidad celular no fue afectada, sin embargo, en las 4T1 co-cultivadas con esplenocitos sensibilizados al lisado de células 4T1 tratadas con AgNP-glu, la viabilidad celular se afectó en un 24.3 %, comparado con el control.



**Figura 11.** Ensayo de muerte celular por 7AAD por citometría de flujo en células 4T1 co-cultivadas conesplenocitos expuestos con lisado tumoral de células 4T1 tratadas con AgNP-g.

## 8. DISCUSIÓN

En los últimos años se han establecido nanopartículas multifuncionales “todo en uno”, que amplifican los efectos anticancerígenos desde diferentes aspectos, como inducir la muerte celular inmunogénica en las células tumorales, al mismo tiempo que reclutan células inmunes o regulan el microambiente tumoral, para mejorar la eficacia de la inmunoterapia del cáncer. Por estas razones el presente estudio está basado en demostrarla actividad de las AgNps-Glu en la inducción de moléculas relacionadas a la inducción de muerte inmunogénica (Sun *et al.* 2021).

Por otra parte, se ha demostrado que los bloqueos de los puntos de control inmunitarios benefician a los pacientes de diferentes neoplasias malignas. Sin embargo, solo 20 a 30% de los pacientes con cáncer muestran respuestas clínicas a la inmunoterapia actual. Las terapias combinadas con quimioterapia / radioterapia que induzcan muerte inmunogénica e inmunoterapias han demostrado eficacia clínica en estudios preclínicos y ensayos clínicos.

Se estandarizo, caracterizo y evaluó la síntesis nanopartículas de plata de un tamaño de 69.79 nm en un espectro de UV-Vis de 420 nm característico de la plata coincidiendo con Elisa Pansarini y colaboradores en el 2017 que demostró que es posible sintetizar estas partículas esféricas con  $\beta$ -D-glucosa como reductor con una estabilidad de hasta 10 días y que son capaces de internalizarse en el citoplasma de las células HeLa gracias a que la glucosa da dirección a la partícula (Pansarini *et al.*, 2017). El potencial Z es el potencial eléctrico que se encuentra entre la capa interna de Helmholtz cerca de la capa de la nanopartícula y el medio de la solución donde está suspendida. Este parámetro nos indica la estabilidad de la partícula por su carga superficial y entre más alejada al 0 las cargas iguales se repelerán ya sean positivas o negativas y evitara la aglomeración de las nanopartículas en la solución (Wangoo *et al.*, 2010) El potencial Z de las AgNP-g sintetizadas es de -11.2 lo que nos indica que la estabilidad de nuestra molécula es moderada.

Estudios demuestran que la citotoxicidad y la velocidad de la captación celular *in vitro* de las AgNP-g esta mediada por el tamaño de la nanopartícula. Liu y colaboradores demostraron que las nanopartículas de 5 y 20 nm eran más citotóxicas para las células que

las de 50 nm en diversas líneas celulares humanas de cáncer entre ellas la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, ya que las AgNP de menor tamaño pueden pasar con mayor facilidad dentro de la membrana celular (Liu et al. 2010). Ortega *et al.*, en el 2015 observo que las AgNP sintetizadas con levaduras tenían la capacidad de disminuir la viabilidad en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y T47D por medio de muerte celular por apoptosis. Lo que puede corroborar con los resultados obtenidos con la tinción de naranja de acridina y bromuro de etidio, donde se puede observar que las AgNP-G desencadenaron la muerte de las líneas de cáncer de mama BT474, MCF7, MDAMB231, SK-BR-3 y 4T1.

Por otro lado se puede observar que las AgNP-G pueden afectar las fases del ciclo celular como en el caso de las líneas MCF7 y SKBR3 donde se observó un aumento en las células muertas y un secuestro en la fase G0/G1 y G2/M a las 7 h mientras que las nanopartículas de plata reducidas con extracto de hoja de Carica papaya (AgNPs-PLE) por Surya P. Singh *et al.* 2021 en la línea celular de cáncer de próstata humana DU145 este efecto se puede observar a las 48 h del tratamiento (Singh *et al.* 2021).

También se pudo observar que el tratamiento con AgNP-G tiene el potencial de inducir la translocación de la calreticulina hacia la membrana plasmática en las líneas de cáncer de mama MCF7 y BT474, esta translocación tiene como función dar una señal “cómeme” a las células del sistema inmunológico para llevar acabo la presentación de antígenos por lo tanto se ha observado en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) donde los blastos malignos presentaban una exposición de la calreticulina y presentaban una acumulación de células presentadoras de antígeno y una activación de células NK (asesinas naturales) (Fucikova *et al.* 2020). Además, la calreticulina o ecto-CRT es un indicador de la muerte celular inmunogénica en las neoplasias malignas estimulando la fagocitosis y activando al sistema inmune adaptativo siendo crucial para la detección de las células cancerosas (Radogna & Diederich, 2018).

Las células sometidas a ICD liberan patrones moleculares asociados al daño (DAMP) como calreticulina, proteínas de choque térmico (HSP) y High Mobility Group Box 1 (HMGB1) (y otros según el contexto). En este estudio encontramos que el tratamiento con AgNps indujo la liberación extracelular de las células de HMGB1 corroborando *in vitro* el potencial de las AgNps de inducir moléculas relacionadas a muerte inmunogénica.

Cuando se exponen, las chaperonas HSP70 y HSP90 estas son responsables de la interacción entre las células cancerosas y las células inmunes mediante la unión de receptores tipo Toll (TLR) en DC y NKG2A en células asesinas naturales (NK) (Montico *et al.* 2018).

Los DAMPs se pueden dividir en tres grandes subclases basados en su estado y sitio de localización o liberación. 1. DAMPs expuestos sobre la membrana plasmática son las HSP70, HSP90 y calreticulina; 2. DAMPs secretados extracelularmente son la HMGB1, ácido úrico y citocinas proinflamatorias y 3. DAMPs liberados como productos de degradación final como el ATP, DNA y RNA (Montico *et al.* 2018).

Por otra parte, cuando se desafiaron células mononucleares sensibilizados con el lisado de células 4T1 inducida por el tratamiento de AgNps-glu en contra de las células 4T1 estas indujeron una inmunidad específica en contra de la línea 4T1 caracterizada por la inducción de muerte celular. Se ha determinado que la liberación de los DAMPs desempeña un papel espacio temporal en el proceso de muerte celular inmunogénica.

Como consecuencia de estos estímulos múltiples y organizados temporalmente recibidos de la célula moribunda, los fagocitos profesionales digieren los fragmentos de la célula sometida a ICD y los antígenos de presencia cruzada derivados de ellos en la célula apropiada y en la ubicación apropiada. El efecto final es el desarrollo de clones de células T CD8 que reconocen péptidos no propios (ya sea del patógeno o de antígenos asociados a tumores) y matan las células que los exponen. Una interacción tan compleja y finamente coreografiada entre las células moribundas y el sistema inmunológico asegura que los antígenos no propios sean reconocidos con prioridad en un contexto de “peligro”, es decir, cuando una célula está muriendo de manera intempestiva (Matzinger 2002).

El uso de fármacos inductores de muerte celular inmunogénica encuentra una gran oportunidad en el tratamiento del cáncer con un supuesto gran beneficio clínico para los pacientes con esta enfermedad.

## 9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se sintetizaron nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa esféricas con un tamaño promedio de 69.79 nm y un valor de carga superficial de -11.2 m/V. Estas presentan un efecto citotóxico en las líneas celulares de cáncer de mama BT474, MCF7, MDAMB231, SK-BR-3 y 4T1 tanto en la disminución de la proliferación celular como desencadenando muerte celular aún no se confirma el mecanismo de acción. El tratamiento con nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa afectan las fases del ciclo celular con un secuestro en la fase G0/G1 y un aumento en el porcentaje de células muertas de las líneas MCF7 y SKBR3.

El tratamiento con nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa induce la exposición de la calreticulina en las líneas de cáncer de mama MCF7 y BT474.

El tratamiento con nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa induce la exposición de la proteína HMGB1 al exterior de la célula, al igual que la molécula ATP en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, SKBR3, MDAMB231, BT474 y 4T1.

En este estudio se logró demostrar que las AgNps-Glu tiene la capacidad de inducir citotoxicidad en diversas líneas celulares de cáncer de mama humana y de ratón acompañadas con la liberación de moléculas relacionadas a promover muerte celular inmunogénica, que promueven una inmunidad específica en contra de la línea celular 4T1.



## 10. PERSPECTIVAS

- Evaluar el mecanismo de muerte de las nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa.
- Evaluar la expresión de la calreticulina en las líneas celulares de cáncer de mama SKBR3 y 4T1.
- Determinar la respuesta inmunológica *in vivo* en un modelo murino por medio de lisado tumoral tratado con nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

A. J. 2004. Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I-and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *The Journal of Immunology*, 172(10), 6087-6092.

ACS (AMERICAN CANCER SOCIETY) 2018. Datos y cifras mundiales sobre el cáncer. Disponible en: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/global.html#:~:text=According%20to%20estimates%20from%20the,9.5%20million%20cancer%20deaths%20worldwide.>

Almofti, M. R., Ichikawa, T., Yamashita, K., Terada, H., & Shinohara, Y. 2003. Silver ion induces a cyclosporine a-insensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome C. *Journal of biochemistry*, 134(1), 43-49.

amalgamation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1805(1), 53-71.

Anderson, K. N., Schwab, R. B., & Martinez, M. E. 2014. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast cancer research and treatment*, 144(1), 1-10.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Criollo, A., Ortiz, C., Lidereau, R. & André, F. 2007. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunological reviews*, 220(1), 47-59.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A. & Yang,

Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M., & Paknikar, K. M. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies. *Toxicology letters*, 179(2), 93-100.

Asanithi, P., Chaiyakun, S., & Limsuwan, P. 2012. Growth of silver nanoparticles by DC magnetron sputtering. *Journal of Nanomaterials*, 2012.

Asanithi, P., Chaiyakun, S., & Limsuwan, P. 2012. Growth of silver nanoparticles by DC magnetron sputtering. *Journal of Nanomaterials*, 2012.

AshaRani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano*, 3(2), 279-290.

Bartůňková, J., & Špišek, R. 2009. Impact of tumour cell death on the activation of anti-tumour immune response. In *Phagocytosis of Dying Cells: From Molecular Mechanisms to Human Diseases* (pp. 347-370). Springer, Dordrecht.

Beatty, G. L., & Gladney, W. L. 2015. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clinical cancer research*, 21(4), 687-692.

Bianchi, M. E. 2009. HMGB1 loves company. *Journal of leukocyte biology*, 86(3), 573-576.

Binder, R. J. 2014. Functions of heat shock proteins in pathways of the innate and adaptive immune system. *The Journal of Immunology*, 193(12), 5765-5771.

Binder, R. J., Blachere, N. E., & Srivastava, P. K. 2001. Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 17163-17171.

Braun, G. B., Friman, T., Pang, H. B., Pallaoro, A., De Mendoza, T. H., Willmore, A. M. A., ... & Reich, N. O. 2014. Etchable plasmonic nanoparticle probes to image and quantify cellular internalization. *Nature materials*, 13(9), 904-911.

Casares, N., Pequignot, M. O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., ... & Kroemer, G. 2005. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *The Journal of experimental medicine*, 202(12), 1691-1701.

Cattoretti, G., Becker, M.H., Key, G., Duchrow, M., Schliuter, C., Galle, J. y Gerdes, J. (1992). Los anticuerpos monoclonales contra partes recombinantes del antígeno Ki - 67 (MIB 1 y MIB 3) detectan células en proliferación en cortes de parafina fijados con formalina procesados por microondas. *Revista de patología* , 168 (4), 357-363.

Chang, Y. N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., & Xing, G. 2012. The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*, 5(12), 2850-2871.

De Azambuja, E., Cardoso, F., de Castro, G., Colozza, M., Mano, M. S., Durbecq, V., ... & Paesmans, M. 2007. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *British journal of cancer*, 96(10), 1504-1509.

Doody, A. D., Kovalchin, J. T., Mihalyo, M. A., Hagymasi, A. T., Drake, C. G., & Adler,

- Duan, X., & Li, Y. 2013. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. *Small*, 9(9-10), 1521-1532.
- Dykman, L., & Khlebtsov, N. 2012. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2256-2282.
- El-Nour, K. M. A., Eftaiha, A. A., Al-Warthan, A., & Ammar, R. A. 2010. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian journal of chemistry*, 3(3), 135-140.
- F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*.
- Farkona, S., Diamandis, E. P., & Blasutig, I. M. 2016. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer?. *BMC medicine*, 14(1), 73.
- FIBROSIS. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20234-20241.
- Fucikova, J., Kline, J. P., Galluzzi, L., & Spisek, R. (2020). Calreticulin arms NK cells against leukemia. *Oncoimmunology*, 9(1), 1671763.
- G. 2007. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of  $\gamma$ -irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 14(10), 1848-1850.
- Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Vandenabeele, P., Krysko, D. V., & Agostinis, Garg, A. D., Krysko, D. V., Verfaillie, T., Kaczmarek, A., Ferreira, G. B., Marysael, T., & Annaert, W. 2012. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATPsecretion in immunogenic cancer cell death. *The EMBO journal*, 31(5), 1062-1079.
- Garg, A. D., Nowis, D., Golab, J., Vandenabeele, P., Krysko, D. V., & Agostinis, P. 2010. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging
- GCO (GLOBAL CANCER OBSERVATORY) 2021. Tasas estimadas de casos nuevos estandarizadas por edad (Mundo) en 2020, en todo el mundo, ambos sexos, todas las edades Disponible en: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&population\\_s=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&population_s=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0).
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., ... & Perfettini,

Gold, L. I., Eggleton, P., Sweetwyne, M. T., Van Duyn, L. B., Greives, M. R., Naylor, S. M., ... & Murphy-Ullrich, J. E. 2010. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *The FASEB Journal*, 24(3), 665-683.

Goodman, A. M., Cao, Y., Urban, C., Neumann, O., Ayala-Orozco, C., Knight, M. W., ... & Halas, N. J. 2014. The surprising in vivo instability of near-IR-absorbing hollow Au–Ag nanoshells. *ACS nano*, 8(4), 3222-3231.

Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L., & Kroemer, G. 2009. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature Reviews Immunology*, 9(5), 353-363.

Guo, C., Manjili, M. H., Subjeck, J. R., Sarkar, D., Fisher, P. B., & Wang, X. Y. 2013. Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. In *Advances in cancer research* (Vol. 119, pp. 421-475). Academic Press.

H. 2007. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature medicine*, 13(9), 1050-1059.

Habouti, S., Solterbeck, C. H., & Es-Souni, M. 2010. Synthesis of silver nano-fir-twigs and application to single molecules detection. *Journal of Materials Chemistry*, 20(25), 5215-5219.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.  
Hong, C., Qiu, X., Li, Y., Huang, Q., Zhong, Z., Zhang, Y., ... & Gao, X. M. 2010. Functional analysis of recombinant calreticulin fragment 39–272: implications for immunobiological activities of calreticulin in health and disease. *The Journal of Immunology*, 185(8), 4561-4569.

Hong, E., Halman, J. R., Shah, A. B., Khisamutdinov, E. F., Dobrovolskaia, M. A., & Afonin, K. A. 2018. Structure and composition define immunorecognition of nucleic acid nanoparticles. *Nano letters*, 18(7), 4309-4321.

Hortobagyi, GN 1998. Treatmen of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 339 (14), 974–984.

Huang, J., Liu, K., Yu, Y., Xie, M., Kang, R., Vernon, P. J., ... & Ni, J. 2012. Targeting

- HMGB1-mediated autophagy as a novel therapeutic strategy for osteosarcoma. *Autophagy*, 8(2), 275-277.
- Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology*, 4(3), 319-330.
- INEGI (INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA Y GEOGRAFIA) 2019. Infocancer, Estadísticas 2018. (En línea). Disponible en: <https://www.infocancer.org.mx/?c=cancer-cifras&a=estadisticas-2018>
- Inoue, H., & Tani, K. 2014. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death & Differentiation*, 21(1), 39-49.
- Irvine, D. J., Hanson, M. C., Rakhra, K., & Tokatlian, T. 2015. Synthetic nanoparticles for vaccines and immunotherapy. *Chemical reviews*, 115(19), 11109-11146.
- J. L. 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nature medicine*, 15(10), 1170.
- Jo, S. D., Nam, G. H., Kwak, G., Yang, Y., & Kwon, I. C. 2017. Harnessing designed nanoparticles: current strategies and future perspectives in cancer immunotherapy. *Nano Today*, 17, 23-37.
- Kepp, O., Tesniere, A., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2009). The immunogenicity of tumor cell death. *Current opinion in oncology*, 21(1), 71-76.
- Kosmala, A., Wright, R., Zhang, Q., & Kirby, P. 2011. Synthesis of silver nano particles and fabrication of aqueous Ag inks for inkjet printing. *Materials Chemistry and Physics*, 129(3), 1075-1080.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., & Zitvogel, L. 2013. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual review of immunology*, 31, 51-72.
- Krysko, D. V., Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., & Vandenabeele, L. 2014. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 21(1), 79-91.
- Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., & Garrido, C. 2008. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *Journal of cellular and*

molecular medicine, 12(3), 743-761.

Li, G., He, D., Qian, Y., Guan, B., Gao, S., Cui, Y., ... & Wang, L. 2012. Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*. *International journal of molecular sciences*, 13(1), 466-476.

Li, G., He, D., Qian, Y., Guan, B., Gao, S., Cui, Y., ... & Wang, L. 2012. Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*. *International journal of molecular sciences*, 13(1), 466-476.

Liu, W., Wu, Y., Wang, C., Li, H. C., Wang, T., Liao, C. Y., ... & Jiang, G. B. 2010. Lotze, MT y Tracey, KJ 2005. Proteína de la caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1): arma nuclear en el arsenal inmune. *Nature Reviews Immunology* , 5 (4), 331-342.

Lu, Y., Yin, Y., Mayers, B. T., & Xia, Y. 2002. Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol– gel approach. *Nano letters*, 2(3), 183-186.

M. T. 2010. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *Journal of Cell Biology*, 190(5), 881-892.

Martins, I., Wang, Y., Michaud, M., Ma, Y., Sukkurwala, A. Q., Shen, S., ... & Zitvogel, Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *science*, 296(5566), 301-305.

Montico, B., Nigro, A., Casolaro, V., & Dal Col, J. 2018. Immunogenic apoptosis as a novel tool for anticancer vaccine development. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 594.

Moon, R. C., Pike, M. C., Siiteri, P. K., & Welsch, C. W. 1981. Influence of pregnancy and lactation on experimental mammary carcinogenesis. *Banbury report*, 8, 353-364.

Mortensen, S. P., Thaning, P., Nyberg, M., Saltin, B., & Hellsten, Y. 2011. Local release of ATP into the arterial inflow and venous drainage of human skeletal muscle: insight from ATP determination with the intravascular microdialysis technique. *The Journal of physiology*, 589(7), 1847-1857.

Mourato, A., Gadanho, M., Lino, A. R., & Tenreiro, R. 2011. Biosynthesis of crystalline

silver and gold nanoparticles by extremophilic yeasts. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2011.

Müller, S., Ronfani, L., & Bianchi, M. E. (2004). Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *Journal of internal medicine*, 255(3), 332-343.

Ng, K. K., Lovell, J. F., & Zheng, G. 2011. Lipoprotein-inspired nanoparticles for cancer theranostics. *Accounts of chemical research*, 44(10), 1105-1113.

NHI (NATIONAL CANCER INSTITUTE) 2015. Estadísticas del cáncer, (En línea). Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>

Obeid, M., Panaretakis, T., Joza, N., Tufi, R., Tesniere, A., Van Endert, P., ... & Kroemer, Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., ... & Métivier, D. 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature medicine*, 13(1), 54-61.

P. 2012. ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression?. *Trends in molecular medicine*, 18(10), 589-598.

P. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(12), 860-875.

PAHO (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION) 2020. Cáncer en las Américas, (En línea). Disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=15687:world-cancer-day-2020-i-am-and-i-will&Itemid=39809&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15687:world-cancer-day-2020-i-am-and-i-will&Itemid=39809&lang=es)

Palucka, K. y Banchereau, J. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*, 12 (4), 265–277.

Panaretakis, T., Joza, N., Modjtahedi, N., Tesniere, A., Vitale, I., Durchschlag, M., ... & Van Endert, P. 2008. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death & Differentiation*, 15(9), 1499-1509.

Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A. C., Chapman, D. C., ... & Yuan, J. (2009). Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *The EMBO journal*, 28(5), 578-590.



- Panzarini, E., Mariano, S., Vergallo, C., Carata, E., Fimia, G. M., Mura, F., ... & Dini, L. 2017. Glucose capped silver nanoparticles induce cell cycle arrest in HeLa cells. *Toxicology In Vitro*, 41, 64-74.
- Picher, M., Burch, L. H., & Boucher, R. C. 2004. Metabolism of P2 Receptor Agonists in Human Airways IMPLICATIONS FOR MUCOCILIARY CLEARANCE AND CYSTIC Pratsinis, A., Hervella, P., Leroux, J. C., Pratsinis, S. E., & Sotiriou, G. A. 2013. Toxicity of silver nanoparticles in macrophages. *Small*, 9(15), 2576-2584.
- Radogna, F., & Diederich, M. 2018. Stress-induced cellular responses in immunogenic cell death: Implications for cancer immunotherapy. *Biochemical pharmacology*, 153, 12-23.
- Rapaport, E., & Fontaine, J. (1989). Anticancer activities of adenine nucleotides in mice are mediated through expansion of erythrocyte ATP pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(5), 1662-1666.
- Ravichandran, K. S. 2011. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity*, 35(4), 445-455.
- Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J., & Couvreur, P. 2012. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical reviews*, 112(11), 5818-5878.
- Rodríguez-Salazar, M. D. C., Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Martínez-Torres, A. C., Zapata-Benavides, P., López-González, J. S., ... & Rodríguez-Padilla, C. 2017. The novel immunomodulator IMMUNEPOTENT CRP combined with chemotherapy agent increased the rate of immunogenic cell death and prevented melanoma growth. *Oncology letters*, 14(1), 844-852.
- Roldán, M., Pellegrini, N., & de Sanctis, O. 2013. Electrochemical method for Ag-PEG nanoparticles synthesis. *Journal of Nanoparticles*, 2013
- Roldán, M., Pellegrini, N., & de Sanctis, O. 2013. Electrochemical method for Ag-PEG nanoparticles synthesis. *Journal of Nanoparticles*, 2013.
- Rubartelli, A., & Lotze, M. T. 2007. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in immunology*, 28(10), 429-

436.

Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M. E. 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418(6894), 191-195.

Schild, H., Arnold-Schild, D., Lammert, E., & Rammensee, H. G. (1999). Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Current opinion in immunology*, 11(1), 109-113.

Schumacher, TN y Schreiber, RD 2015. Neoantígenos en inmunoterapia contra el cáncer. *Science*, 348 (6230), 69-74.

Seong, S. Y., & Matzinger, P. (2004). Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 4(6), 469-478.

Shao, S., Geng, J., Yi, H. A., Gogia, S., Neelamegham, S., Jacobs, A., & Lovell, J. F. 2015. Functionalization of cobalt porphyrin–phospholipid bilayers with his-tagged ligands and antigens. *Nature chemistry*, 7(5), 438.

Shivaji, S., Madhu, S., & Singh, S. 2011. Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria. *Process Biochemistry*, 46(9), 1800-1807.

Shivaji, S., Madhu, S., & Singh, S. 2011. Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria. *Process Biochemistry*, 46(9), 1800-1807.

Singh, R. P., & Ramarao, P. 2012. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicology letters*, 213(2), 249-259.

Singh, S. P., Mishra, A., Shyanti, R. K., Singh, R. P., & Acharya, A. (2021). Silver nanoparticles synthesized using *Carica papaya* leaf extract (AgNPs-PLE) causes cell cycle arrest and apoptosis in human prostate (DU145) cancer cells. *Biological trace element research*, 199(4), 1316-1331.

So, J. S. 2018. Roles of endoplasmic reticulum stress in immune responses. *Molecules and cells*, 41(8), 705.

Solheim, J. C. 1999. Class II MHC molecules: assembly and antigen presentation. *Immunological reviews*, 172(1), 11-19.

Sotiriou, G. A., & Pratsinis, S. E. 2010. Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environmental science & technology*, 44(14), 5649-5654.

Sotiriou, G. A., Teleki, A., Camenzind, A., Krumeich, F., Meyer, A., Panke, S., & Pratsinis, S. E. 2011. Nanosilver on nanostructured silica: Antibacterial activity and Ag surface area. *Chemical Engineering Journal*, 170(2-3), 547-554.

Sotiriou, G. A., Teleki, A., Camenzind, A., Krumeich, F., Meyer, A., Panke, S., & Pratsinis, S. E. 2011. Nanosilver on nanostructured silica: Antibacterial activity and Ag surface area. *Chemical Engineering Journal*, 170(2-3), 547-554.

Sotiriou, GA y Pratsinis, SE 2010. Actividad antibacteriana de iones y partículas nanosilver. *Ciencia y tecnología ambiental* , 44 (14), 5649-5654.

Spisek, R., & Dhodapkar, M. 2007. Towards a better way to die with chemotherapy: role of heat shock protein exposure on dying tumor cells. *Cell Cycle*, 6(16), 1962-1965.

Spitale, A., Mazzola, P., Soldini, D., Mazzucchelli, L., & Bordoni, A. 2009. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Annals of oncology*, 20(4), 628-635.

Sun, Y., & Xia, Y. 2002. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *science*, 298(5601), 2176-2179.

Sun, Y., Feng, X., Wan, C., Lovell, J. F., Jin, H., & Ding, J. 2021. Role of nanoparticle-mediated immunogenic cell death in cancer immunotherapy. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 16(2), 129-132.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, Tang, D., Kang, R., Livesey, K. M., Cheh, C. W., Farkas, A., Loughran, P., ... & Lotze, Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. 2008. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death & Differentiation*, 15(1), 3-12.

Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. 2008. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death & Differentiation*, 15(1), 3-12.

Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. 2008. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death & Differentiation*, 15(1), 3-12.

Tien, D. C., Tseng, K. H., Liao, C. Y., Huang, J. C., & Tsung, T. T. 2008. Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method. *Journal of alloys and compounds*, 463(1-2), 408-411.

Tien, D. C., Tseng, K. H., Liao, C. Y., Huang, J. C., & Tsung, T. T. 2008. Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method. *Journal of alloys and compounds*, 463(1-2), 408-411

Waks, A. G., & Winer, E. P. 2019. Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3), 288-300.

Wangoo, N., Kaushal, J., Bhasin, K. K., Mehta, S. K., & Suri, C. R. 2010. Zeta potential based colorimetric immunoassay for the direct detection of diabetic marker HbA1c using gold nanoprobe. *Chemical communications*, 46(31), 5755-5757.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) 2020. Cáncer, (En línea). Disponible en: <https://www.who.int/topics/cancer/es/>

Zhang, Q., Li, N., Goebel, J., Lu, Z., & Yin, Y. 2011. A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a “magic” reagent?. *Journal of the American Chemical Society*, 133(46), 18931-18939.

Zhang, Q., Li, N., Goebel, J., Lu, Z., & Yin, Y. 2011. A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a “magic” reagent?. *Journal of the American Chemical Society*, 133(46), 18931-18939.

Zhang, T., Wang, L., Chen, Q., & Chen, C. 2014. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei medical journal*, 55(2), 283-291.

Zhang, Y., Jeon, M., Rich, L. J., Hong, H., Geng, J., Zhang, Y., ... & Seshadri, M. 2014. Non-invasive multimodal functional imaging of the intestine with frozen micellar naphthalocyanines. *Nature nanotechnology*, 9(8), 631.

Zhang, Z., Cao, W., Jin, H., Lovell, J. F., Yang, M., Ding, L., ... & Zheng, G. 2009. Biomimetic nanocarrier for direct cytosolic drug delivery. *Angewandte Chemie*

International Edition, 48(48), 9171-9175.

Zheng, G., Chen, J., Li, H., & Glickson, J. D. 2005. Rerouting lipoprotein nanoparticles to selected alternate receptors for the targeted delivery of cancer diagnostic and therapeutic agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(49), 17757-17762.

Zhou, J., Wang, G., Chen, Y., Wang, H., Hua, Y. y Cai, Z. (2019). Muerte de células inmunogénicas en la terapia del cáncer: inductores presentes y emergentes. *Revista de medicina celular y molecular* , 23 (8), 4854-4865.

Zitvogel, L., Kepp, O., & Kroemer, G. 2010. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell*, 140(6), 798-804.

Zitvogel, L., Kepp, O., Senovilla, L., Menger, L., Chaput, N., & Kroemer, G. 2010. Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway. *Clinical Cancer Research*, 16(12), 3100-3104.