

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE UN TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EMPLEANDO
NANOPARTICULAS DE PLATA REDUCIDAS CON β -D-GLUCOSA PARA
EL CONTROL DE RECURRENCIA EN UN MODELO MURINO DE
CÁNCER DE MAMA POR 4T1

POR

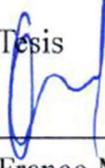
L.B.G. DAVID REDING HERNÁNDEZ

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

2023

EVALUACIÓN DE UN TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EMPLEANDO
NANOPARTICULAS DE PLATA REDUCIDAS CON β -D-GLUCOSA PARA EL CONTROL
DE RECURRENCIA EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA POR 4T1

Comité de Tesis



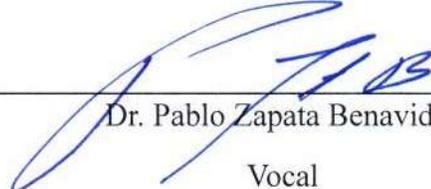
Dr. Moisés Armides Franco Molina

Presidente



Dra. Diana Elia Caballero Hernández

Secretario



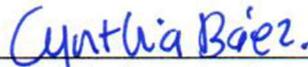
Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal



Dra. Diana Ginette Zárate Triviño

Vocal



Dra. Cynthia Aracely Alvizo Báez

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
DIRECCIÓN DE POSGRADO

Subdirector de Posgrado

EVALUACIÓN DE UN TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EMPLEANDO
NANOPARTICULAS DE PLATA REDUCIDAS CON β -D-GLUCOSA PARA
EL CONTROL DE RECURRENCIA EN UN MODELO MURINO DE
CÁNCER DE MAMA POR 4T1

Dirección de tesis

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'M' and 'F' combined, positioned above a horizontal line.

Dr. Moisés Armides Franco Molina

Director

AVISO DE DERECHOS DE AUTOR

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.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el “Fondo Sectorial de Investigación para la Educación”, A1-S-35951, CONACYT, México.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis fue posible gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradecimiento a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, jefa del Laboratorio de Inmunología y Virología, por permitirme el uso de sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Moisés, por aceptarme en su laboratorio y darme la confianza para realizar una tesis con él, gracias a esto pude empezar a desarrollarme como investigador; sé que aún me queda mucho camino por recorrer, pero ahora me siento más preparado. Gracias.

A la Dra. Diana Zarate, que siempre tuvo la mejor disposición para apoyarme en el área de las nanopartículas, por toda la valiosa retroalimentación que recibía para mi proyecto y por dejarme trabajar en su laboratorio cuando lo necesitaba.

A la Dra. Silvia, por ser una de las primeras personas en enseñarme y apoyarme cuando llegué al laboratorio.

A mis amigos y compañeros del L6, Paola, Bety, Kenia, Gus, Nato y Pedro, que siempre tuvieron la mejor disposición para ayudarme, aconsejarme, por creer en mí, por todas las veces que me ayudaron durante horas o hasta la noche con mis ratones y siempre lo hicieron de la mejor manera, por su amistad y los buenos momentos. Gracias a ustedes este camino fue más ameno.

A mi amigo Josué, que pudimos vivir otro semestre de procrastinación, estrés y tendencias autodestructivas, y que a pesar de que en segundo semestre ya no teníamos clases juntos igual seguíamos platicando para quejarnos de todo.

DEDICATORIA

A mi mamá, que a pesar de las circunstancias vividas en estos últimos años siempre estuvo ahí para apoyarme y escucharme en momentos que fueron muy difíciles para mí. Sin ti todo esto hubiera sido muy complicado.

ÍNDICE

| | | |
|------|--|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. | ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 | Cáncer | 3 |
| 2.2 | Cáncer de mama y su incidencia..... | 3 |
| 2.3 | Cáncer triple negativo | 3 |
| 2.4 | Recurrencia tumoral..... | 3 |
| 2.5 | Terapia neoadyuvante..... | 4 |
| 2.6 | Nanomateriales..... | 5 |
| 2.7 | Nanopartículas metálicas | 5 |
| 2.8 | Nanopartículas de plata..... | 6 |
| 2.9 | Efecto citotóxico | 7 |
| 2.10 | Terapia dirigida contra cáncer con nanopartículas | 8 |
| 3 | JUSTIFICACIÓN | 10 |
| 4 | HIPÓTESIS | 11 |
| 5 | OBJETIVO GENERAL | 12 |
| 5.1 | OBJETIVOS ESPECIFICOS | 12 |
| 6 | MATERIAL Y MÉTODOS | 13 |
| 6.1 | Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs-G) reducidas con β -D-glucosa..... | 13 |
| 6.2 | Ensayo de viabilidad por Rezasurina..... | 13 |
| 6.3 | Inducción de tumor..... | 13 |
| 6.4 | Estudios de dosis de nanopartículas de plata | 14 |
| 6.6 | Terapia neoadyuvante y modelo de resección..... | 15 |
| 6.7 | Análisis estadístico | 16 |
| 7 | RESULTADOS | 17 |
| 7.1 | Las nanopartículas de plata disminuyen la viabilidad de células 4T1 <i>in vitro</i> 17 | 17 |
| 7.2 | Efecto citotóxico de las nanopartículas de plata sobre un tumor <i>in vitro</i> . 17 | 17 |
| 7.3 | Biodistribución de plata..... | 18 |
| 7.4 | Efecto neoadyuvante de las AgNPs-G sobre un modelo murino..... | 19 |

| | | |
|-----|---|----|
| 7.5 | Terapia neoadyuvante con AgNPs-G reduce la recurrencia tumoral..... | 20 |
| 7.6 | Las AgNPs-G disminuyen metástasis a pulmón | 22 |
| 8 | DISCUSIÓN | 23 |
| 9 | CONCLUSIÓN | 27 |
| 10 | REFERENCIAS..... | 28 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Disminución de la viabilidad celular de la línea 4T1 | 17 |
| Figura 2 El efecto citotóxico de las AgNPs-G disminuye contra un tumor sólido | 18 |
| Figura 3 Acumulación de plata en organos | 19 |
| Figura 4 Disminución de volumen tumoral | 20 |
| Figura 5 Monitoreo de recurrencia tumoral y peso de los ratones | 21 |
| Figura 6 Conteo de nódulos metastásicos | 22 |

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AgNPs-G: nanopartículas de plata reducidas con β -D-glucosa

Ag: plata

TNBC: cáncer de mama triple negativo

i.v.: intra venosa

i.t.: intra tumoral

DOX: doxorrubicina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ER: receptor de estrógeno

PR: receptor de progesterona

RESUMEN

La recurrencia tumoral que se presenta de manera postoperatoria representa una problemática debido a que estos nuevos tumores presentan resistencia a tratamientos convencionales, por esto la importancia de utilizar tratamientos efectivos de manera preoperatoria. Las nanopartículas han representado una gran área de oportunidad debido a sus múltiples usos en el tratamiento contra el cáncer. En este estudio evaluamos el efecto de AgNPs-G (nanopartículas de plata reducidas con β -D-glucosa) para reducir el volumen tumoral y prevenir la recurrencia tumoral.

Se evaluó el efecto citotóxico de las AgNPs-G sobre la viabilidad de células de la línea 4T1 mediante el método de rezasurina, así como evaluar su efectividad de manera *ex vivo* en un tumor previamente removido de un ratón. Posteriormente en un modelo *in vivo* de ratones portadores de tumor, se registró el volumen tumoral de los ratones que recibían diferentes concentraciones de AgNPs-G. Finalmente, después de remover quirúrgicamente el tumor de los ratones, se monitoreó la aparición de nuevos tumores y se comprobó la presencia de nódulos metastásicos en pulmón al teñirlos con solución de Bouin.

Las AgNPs-G mostraron ser efectivas al reducir la viabilidad en un 100% en un periodo de 24h a una concentración de 8.1 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, este efecto disminuye frente a un tumor sólido, debido a que solo se reduce la viabilidad en un 68% con las condiciones previamente descritas, por lo tanto, se utilizaron concentraciones más altas en los modelos *in vivo*. En ratones portadores de tumor se observó una disminución del volumen tumoral que llegó hasta los 100 mm^3 , además de que no se observó presencia de recurrencia en los ratones tratados con AgNPs-G, sin embargo, si se observó la presencia de nódulos metastásicos en pulmón, con un conteo máximo de 6 nódulos en los grupos de AgNPs-G, y un conteo máximo de 10 en el grupo control.

Las AgNPs-G demostraron ser eficaces al disminuir la viabilidad de células de la línea 4T1, así como disminuir el volumen tumoral de ratones portadores de tumor y mejorar su sobrevivencia al disminuir la recurrencia tumoral.

ABSTRACT

Tumor recurrence that occurs postoperatively represents a problem since these new tumors are resistant to conventional treatments, hence the importance of using effective treatments preoperatively. Nanoparticles have represented a great area of opportunity due to their multiple uses in cancer treatment. In this study we evaluated the effect of AgNPs-G (silver nanoparticles reduced with β -D-glucose) to reduce tumor volume and prevent tumor recurrence.

The cytotoxic effect of the AgNPs-G on the viability of cells of the 4T1 line was evaluated using the rezasurin method, as well as evaluating its effectiveness *ex vivo* in a tumor previously removed from a mouse. Subsequently, in an *in vivo* model of tumor-bearing mice, the tumor volume of mice receiving different concentrations of AgNPs-G was recorded. Finally, after surgically removing the tumor from the mice, the appearance of new tumors was monitored and the presence of metastatic nodules in the lung was confirmed by staining them with Bouin's solution.

The AgNPs-G showed to be effective by reducing viability by 100% in a period of 24h at a concentration of 8.1 $\mu\text{g/mL}$, however, this effect decreases against a solid tumor, because viability is only reduced in 68% with the conditions previously described, therefore, higher concentrations were used in the *in vivo* models. In tumor-bearing mice, a decrease in tumor volume was observed that reached up to 100 mm^3 , in addition to the fact that no recurrence was observed in mice treated with AgNPs-G, however, the presence of metastatic nodules in the lung was observed. , with a maximum count of 6 nodules in the AgNPs-G groups, and a maximum count of 10 in the control group.

The AgNPs-G proved to be effective in reducing the viability of cells of the 4T1 line, as well as decreasing the tumor volume of tumor-bearing mice and improving their survival by decreasing tumor recurrence.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama tiene una estimación de 2.3 millones de casos nuevos al año y ocupa el quinto lugar de decesos por cáncer (Sung, et al. 2021), además en México, Nuevo León, presenta una de las tasas más altas de mortalidad en 2020 por cáncer de mama de acuerdo con el INEGI. Dentro de los diferentes subgrupos moleculares en los que se divide el cáncer de mama, el subtipo triple negativo (TNBC) se caracteriza por la ausencia de los receptores ER, PR y HER2, siendo este considerado uno de los más agresivos debido a su rápida proliferación además de que las opciones terapéuticas se ven reducidas (Dai, et al., 2015). Además del pobre pronóstico que pueden presentar los pacientes con cáncer de mama triple negativo, también tienen que enfrentarse a la recurrencia tumoral. Este es un problema de gran importancia y se define como el cáncer que vuelve a reaparecer después de un tratamiento (NCI,2020) y representa una de las principales causas de muerte relacionadas al cáncer de mama (Moody et al, 2005). Comparado a otros subtipos moleculares de cáncer de mama, el cáncer triple negativo generalmente está asociado a un alto riesgo de recurrencia local y distante (Chacón y Costanzo,2010). Una terapia neoadyuvante para cáncer de mama se considera como una opción terapéutica segura y efectiva para tratar tumores primarios grandes y para cáncer de mama avanzado (Thompson y Moulder, 2012). En esta terapia los pacientes reciben un tratamiento sistémico o local antes de remover el tumor de manera quirúrgica (Selli y Sims,2019). Una terapia neoadyuvante presenta ventajas como: reducción de tumor, incrementar la operabilidad, erradicación o prevención de micro metástasis, además permite a los pacientes una cirugía para conservar el seno en lugar de realizar mastectomía (McElnay, 2014; Selli, 2019). Dentro de las terapias previas que el paciente puede recibir se encuentra la quimioterapia y la radioterapia, sin embargo, existe evidencia de cómo las células cancerosas son capaces de resistir estas terapias, esta resistencia puede ocurrir debido a mecanismos intrínsecos o adaptativos (Echeverria, et al; 2019). La resección de tejido tumoral es de gran

importancia para contribuir a un plan de tratamiento efectivo. Sin embargo, existe evidencia la cual reporta que en algunos pacientes se pueden presentar consecuencias negativas debido a un trauma quirúrgico que por más mínimo que sea puede desencadenar problemas postoperatorios como hemorragias, infecciones en el sitio de la herida, además de provocar procesos fisiológicos los cuales a su vez pueden promover metástasis postoperatoria y recurrencia tumoral, esto no es indicativo de que los procesos quirúrgicos deben ser abandonados, ya que estos efectos negativos solo se presentan en algunos pacientes. Además de esto los tratamientos locales y sistémicos convencionales que son administrados de manera postoperatoria pueden causar inmunosupresión y contribuir a la supervivencia de células tumorales aunado a un retraso en la sanación de la herida (Deptula, 2019; Alieva, 2018).

Dentro de los diferentes nanomateriales que han emergido como opciones terapéuticas, las nanopartículas de plata (AgNPs) han sido empleadas en varias aplicaciones clínicas debido al potencial antimicrobiano que presentan, así como su capacidad citotóxica contra células de mamífero. Además, se ha demostrado que estas poseen un efecto antitumoral *in vivo* en ratones inmunocompetentes, indicando que estas nanopartículas activan inmunidad antitumoral en un microambiente tumoral (Kovács,2022;Riaz,2017). A pesar de que ya se tiene reportado el efecto citotóxico de las nanopartículas de plata, múltiples investigaciones han evaluado su uso en el cuidado de heridas, con esto se ha demostrado que a ciertas concentraciones son capaces de contribuir a la regeneración de tejido al estimular fibroblastos que residen en la herida, además de células inmunes y queratinocitos (Gunasekaran, et al,2012), sin embargo, no existen pruebas que evalúen su capacidad en el cuidado de herida postoperatoria para remover un tumor sólido.

En este estudio, evaluamos la capacidad de nanopartículas de plata reducidas con β -D-glucosa para emplearse como tratamiento neoadyuvante para reducir tamaño tumoral y su control en recurrencia tumoral de manera postoperatoria, además de su capacidad para contribuir al cuidado de una herida quirúrgica la cual fue hecha con el propósito de realizar una resección de tumor.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación celular descontrolada y diseminación a otras partes del cuerpo (NCI,2021). A nivel celular, el desarrollo del cáncer puede verse como un proceso el cual sigue varios pasos e involucra mutación y selección de células las cuales incrementan su capacidad para proliferar, supervivencia y metástasis. Uno de los primeros pasos en este proceso es la iniciación del tumor, dada por alteraciones genéticas que llevan a un aumento en la población celular; la progresión del tumor continúa con mutaciones adicionales las cuales pueden conferir ciertas características como un rápido crecimiento (Cooper,2000).

2.2 Cáncer de mama y su incidencia

De igual manera, como se mencionó anteriormente, el cáncer de mama se desarrolla debido a daños en el ADN y mutaciones genéticas influenciadas por la exposición a estrógeno; aunado a esto, genes pro cancerosos como BRCA1 y BRCA2 aumentan el riesgo de desarrollo de este tipo de cáncer (Alkabban y Ferguson;2021). Este cáncer se puede presentar diferentes clasificaciones moleculares, esto basándose en la expresión de ciertos receptores; se han identificado diferentes subtipos los cuales se han clasificado como Luminal, HER-2 enriquecido, Basal y Normal (Perou, et al;2000).

2.3 Cáncer triple negativo

Este tipo de cáncer se caracteriza por la falta de expresión de los receptores ER, PR y HER2, además este tipo de cáncer constituye alrededor del 20% de todos los cánceres de mama, aunado a su prevalencia en mujeres menores a 40 años (Foulkes, et al;2010; Lukasiewicz, et al;2021; Plasilova, et al;2016). Debido a la falta de expresión de los receptores previamente mencionados, las opciones terapéuticas para este cáncer disminuyen, haciendo que este sea un cáncer más agresivo y tienda para relacionarse más con un peor pronóstico (Newman, et al; 2014).

2.4 Recurrencia tumoral

La recurrencia tumoral sucede cuando el tratamiento primario no remueve por completo a las células cancerosas (NIH,2020). Dentro de los diferentes subtipos

de cáncer de mama, se ha reportado que el TNBC es el que presenta más recurrencia en comparación de otros subtipos. Dent y colaboradores observaron que durante un periodo de 10 años, 200 pacientes con cáncer triple negativo mostraron una tasa de recurrencia más alta en comparación de los subtipos que no eran triple negativo. Esta recurrencia suele ser temprana en órganos como pulmones principalmente y cerebro, aparte la supervivencia de los pacientes con TNBC es menor en comparación de otros subtipos (Pogoda, et al,2013).

Debido a la problemática que representa la recurrencia tumoral, han surgido modelos animales los cuales permiten la investigación eficaz de tratamientos contra recurrencia tumoral local o distante. Los modelos de trasplantes de aloinjertos se originan a partir de células o tumores derivados de ratón los cuales son trasplantados a un ratón. El uso de estos modelos permite prevenir el rechazo del huésped hacia el tejido y la evaluación del sistema inmune en la progresión del cáncer para de esta manera identificar nuevas oportunidades terapéuticas (Serrels et al; 2015).

Li y colaboradores utilizaron ratones LSL-Kras^{G12D}, Trp53 y Pdx1-Cre y la técnica de trasplante de tejido tumoral, de esta manera construyeron un modelo murino con aloinjertos implantados de manera subcutánea/ortotópico. Se implementó el uso de gemcitabina para evaluar la respuesta quimioterapéutica de los aloinjertos. Observaron que estos aloinjertos fueron capaces de replicar la patología histológica y la alta proliferación de células de adenocarcinoma ductal pancreático. Por lo tanto, llegan a la conclusión de que estos aloinjertos son efectivos para investigar la progresión y tratamiento del cáncer.

2.5 Terapia neoadyuvante

Una terapia neoadyuvante o terapia preoperatoria, se define como la administración de un tratamiento sistémico o local antes de un procedimiento quirúrgico para remover un tumor sólido (Mieog, et al; 2007). Este esquema de tratamiento preoperatorio empezó a usarse en pacientes con cáncer de mama alrededor de los 80s, debido a las diferentes ventajas dentro de las cuales se encuentran: reducir el tamaño del tumor lo que a su vez mejora la operabilidad, erradica o previene la micrometástasis, además de que permite que pacientes de

cáncer de mama sean candidatos a una cirugía conservativa de mama en vez de una mastectomía, lo cual se asocia con menor morbilidad además de que mejora la imagen corporal (Kiebert, 1991; McElnay, 2014).

Diferentes estudios han investigado la eficacia que puede presentar un esquema de tratamiento neoadyuvante. En una revisión presentada por Mieog y colaboradores, discuten sobre resultados de diferentes investigaciones en los cuales se muestra que una terapia neoadyuvante en general tiene un ratio de supervivencia equivalente a aquellos pacientes con una terapia adyuvante, sin embargo, en pacientes con cáncer de mama una terapia neoadyuvante les permite ser candidatos a cirugías conservativas de seno en vez de una mastectomía, además de que este esquema de tratamiento está asociado con una disminución en efectos adversos.

2.6 Nanomateriales

Las nanopartículas, son partículas de al menos una dimensión más pequeña de 1µm, sin embargo, este umbral de tamaño varía dependiendo del tipo de material y no debería ser base para la clasificación de nanopartículas. Estas pueden tener formas amorfas o cristalinas, y sus superficies pueden actuar como acarreadores de gotas de líquidos o gases. Las propiedades únicas que presentan las nanopartículas las hacen ideales para aplicarlas en múltiples campos, dentro del cual se encuentra la medicina; estas pueden mejorar el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

Dentro de las aplicaciones médicas que se les puede dar a las nanopartículas están como nanofibras, las cuales se pueden utilizar para reparar células del sistema nervioso central y posiblemente otros órganos (Ellis, et al; 2006). Además de esto, nanopartículas de plata y dióxido de titanio tienen un efecto antimicrobiano y tienen uso como revestimiento para máscaras quirúrgicas (Li, et al; 2006). Otra aplicación de gran relevancia es la entrega de fármacos, esto debido a su capacidad de penetrar de manera específica órganos y células (Uhrich, et al; 1999).

2.7 Nanopartículas metálicas

Dentro de las diferentes nanopartículas metálicas que continuamente se han usado y modificado, se encuentran las de óxido férrico. Debido a su tamaño, a

sus propiedades magnéticas y biocompatibilidad, estas nanopartículas han surgido como candidatos a diferentes aplicaciones biomédicas, entre las cuales se encuentra su uso como agentes de contraste para imagen de resonancia magnética, esto se debe a que al tener una gran magnetización pueden proveer de imágenes de alta calidad, además de otros sus para detección temprana de inflamación, cáncer, diabetes y aterosclerosis (Morales, 2003; Kooi, 2003).

Debido a las propiedades ópticas que presentan las nanopartículas de oro, estas son sujetos de numerosas investigaciones, y aplicaciones que varían desde electrónica, ciencia de materiales y biología (Rao, et al.; 2000). Sin embargo, también se ha establecido su uso contra el cáncer, ya sea como terapia o para entrega de fármacos (Cai y Sun,2008). Se ha reportado que cuando las nanopartículas de oro son irradiadas con pulsos láser enfocados a una longitud de onda adecuada, estas nanopartículas son capaces de eliminar células cancerosas (Zharov, et al; 2006)

2.8 Nanopartículas de plata

Dentro de los diferentes tipos de nanomateriales usados, las nanopartículas de plata han destacado debido a su capacidad antimicrobiana y su uso en varios aspectos clínicos (Galindo et al.; 2020), esto debido a que su naturaleza nano les permite ser aprovechadas para funciones como acarreadores de fármacos hacia un tejido específico, modificar su superficie para usos los cuales sean convenientes, además de que las nanopartículas de plata presentan una capacidad intrínseca de citotoxicidad debido a iones de Ag (Kovács, et al; 2022). Sin embargo, su principal desventaja es la misma capacidad citotóxica que estas mismas poseen, esto se debe a que son capaces de afectar células sanas también, debido a esto, se prefiere que estas sean administradas o se acumulen en el tejido canceroso, esto con el fin de evitar daño a otros órganos. Para lograr esto, las nanopartículas de plata pueden dirigirse al tumor de manera pasiva o activa, de esta manera se acumulan a altas concentraciones en el tumor.

La acumulación pasiva se debe a una arquitectura única que presentan los tumores, esto debido a la angiogénesis derivada del tumor que da lugar a una capa endotelial atípica y una vasculatura fenestrada, que en conjunto con un

sistema linfático deteriorado es capaz de guiar la penetración y acumulación de las nanopartículas en el tejido tumoral (Maeda, et al; 2013).

La acumulación activa, en comparación de la pasiva, se basa en la integración de compuestos a la superficie de la nanopartícula, usualmente se utilizan anticuerpos los cuales recubren las nanopartículas, sin embargo, estos no llegan a incrementar la localización del tumor, sino que incrementan la internalización de esta, esto da lugar a un efecto terapéutico mejorado lo cual es de gran importancia en tratamiento contra el cáncer (Kirpotin, et al;2006).

2.9 Efecto citotóxico

Una vez que las nanopartículas de plata llegan al sitio del tumor estas ejercen su función al interactuar con las células cancerosas y otros componentes que se encuentran en el ambiente tumoral. Una vez que estas llegan a la célula, su efecto citotóxico comienza con la internalización de la misma nanopartícula, la cual puede suceder principalmente por endocitosis (Zhang, et al;2014).

Una vez que las nanopartículas son internalizadas, estas pueden encontrarse en organelos como mitocondrias o en el núcleo, sin embargo, esta localización es dependiente del tamaño de la nanopartícula y de modificaciones que está presente en la superficie (AshaRani, et al;2009). Ya que las nanopartículas están internalizadas, estas pueden causar diversos efectos, entre los cuales están el estrés oxidativo, deterioro de la membrana celular que seguido de este, arresto del ciclo celular, respuestas inflamatorias, daño al ADN y apoptosis (Zhang, et al;2014).

Diferentes estudios han mostrado la capacidad antitumoral de las nanopartículas de plata sobre diferentes líneas celulares cancerosas, pero con gran interés en líneas de cáncer de mama. Swanner y colaboradores estandarizaron una síntesis de nanopartículas de plata, el resultado fueron nanopartículas de diferentes tamaños (5,25,50 y 75 nm) y forma esférica. Al ser administradas de manera sistémica se comprobó que estas no tienen un efecto tóxico, además de que estas actuaban de manera selectiva contra células cancerosas en un modelo murino con xenoinjertos.

Artiukh y colaboradores observaron que su síntesis de nanopartículas de plata ocasiona cambios morfológicos en la línea celular Hep-2, además de esto observaron que el efecto citotóxico en una línea celular sana como es BHK-21 requería una concentración mayor de nanopartículas en comparación de las células cancerosas, ya que, para alcanzar una concentración citotóxica media, la línea Hep-2 requería de 2.19 ug/mL de nanopartículas, mientras que la línea BHK-21 requería de 10.92 ug/mL.

Como se ha observado, las nanopartículas de plata han presentado una actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares cancerosas, sin embargo, son pocos los reportes que se tienen de la efectividad de las nanopartículas de plata en ensayos clínicos. Singh y colaboradores, reportaron el caso de un paciente de 77 años el cual presentaba cáncer de células escamosas en cabeza y cuello, con metástasis a pulmón e hígado. Tratamientos convencionales como cirugía, radioterapia y quimioterapia no fueron efectivos eliminando el cáncer, por lo tanto, el paciente se encontraba en hospicio. Al ver que todos los tratamientos no habían sido eficaces, el paciente decidió empezar la ingesta de nanopartículas de plata, esto de manera diaria durante 3 meses. Mediante la caracterización de estas nanopartículas se observó que estas presentaban tamaños que iban desde los 3 hasta 12 nm. No se observaron efectos citotóxicos en el paciente, además presentó una regresión total de su cáncer. Después de 18 meses el paciente seguía con ausencia de cáncer.

2.10 Terapia dirigida contra cáncer con nanopartículas

Uno de los métodos más comunes para la síntesis de nanopartículas de plata es a través de la reducción química de iones de plata en una solución con diferentes agentes reductores, entre los cuales se encuentran el citrato de sodio, glucosa, formamida y el aminoácido tirosina. Esto da la posibilidad de controlar o influir en aspectos físicos de las nanopartículas como tamaño y forma, además de incluir grupos funcionales en su superficie haciendo que estas sean atractivas para diferentes aplicaciones (Pettegre, et al., 2014).

Las células cancerosas se caracterizan por membranas anormales, cambios en su metabolismo, presencia de receptores de lectina y sobreexpresión de

transportadores de glucosa (GLUT), dichas características permiten que se desarrollen nuevas estrategias con nanopartículas modificadas para incrementar la interacción de las nanopartículas con las células (Torres-Perez, et al;2020).

Wang y colaboradores sintetizaron nanopartículas a partir de manosa, esto con el fin de usarlas para la detección de cáncer. Observaron que estas nanopartículas eran capaces de interactuar de manera preferente a células cancerosas de líneas celulares HepG-2 y MCF-7.

Hasta nuestro conocimiento, todavía no hay investigaciones las cuales evalúen el efecto citotóxico que ejercen nanopartículas de plata reducidas con algún monosacárido contra células cancerosas, sin embargo, Pettegrew y colaboradores (2014) elaboraron una síntesis de nanopartículas de plata utilizando diferentes monosacáridos como ribosa, fructosa, sorbosa, glucosa, xilosa y galactosa. A partir de sus resultados concluyen que sus nanopartículas reducidas con glucosa reducen de manera más efectiva el crecimiento microbiano en comparación con otros monosacáridos.

3 JUSTIFICACIÓN

Debido a la resistencia que las células cancerosas pueden desarrollar contra tratamientos actuales, además de los efectos adversos que presentan los mismos, es de gran relevancia la evaluación de nuevas terapias las cuales sean efectivas en eliminar estas células, ya que las mismas pueden ser capaces de volver a formar un tumor sólido, esto se conoce como recurrencia y puede ser tanto local como distante. Nosotros proponemos el uso de nanopartículas de plata debido al efecto citotóxico que están tienen sobre células cancerosas, esto con el objetivo de ser utilizadas en una terapia neoadyuvante.

4 HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata reducidas con β -D-glucosa empleadas como terapia neoadyuvante disminuyen la recurrencia de cáncer de mama en el modelo murino 4T1.

5 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto sobre la recurrencia tumoral empleando AgNPs reducidas con β -D-glucosa en un modelo murino de cáncer de mama.

5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar diferentes concentraciones de AgNPs reducidas con β -D-glucosa sobre la viabilidad de células 4T1.
- Evaluar el efecto citotóxico *ex vivo* de las AgNPs reducidas con β -D-glucosa sobre fragmentos tumorales.
- Determinar la reincidencia tumoral en ratones BALB/c con AgNPs reducidas con β -D-glucosa empleada como terapia neoadyuvante y posterior una resección de tumor.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs-G) reducidas con β -D-glucosa

La síntesis de AgNPs-G se realizó siguiendo la metodología descrita por Panzarini E et al. (2017) y Felix Piña *et al*; (2023) con algunas modificaciones que se detallan a continuación. Se colocaron 10 ml de solución acuosa 0,3 M de β -D-glucosa en un vaso de precipitados expuesto a un baño de agua en glicerol a 120 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron gota a gota 100 μ L de solución de AgNO₃ 2.5 mM y 10 μ L de solución de NaOH 0.1 M hasta observar un cambio de color amarillo, indicativo de la formación de AgNPs-G. En todas las preparaciones se utilizó agua desionizada preparada con un sistema integral de purificación de agua Milli-Q (Merck Millipore, Billerica, MA, EE. UU.).

6.2 Ensayo de viabilidad por Rezasurina

Se cultivaron 5,000 células de la línea 4T1 por pozo en placas de 96 pozos, permitiendo su adherencia.

Posterior a 2 días las células se trataron a las concentraciones de 0, 5.4, 6,75, 8.1, 9.45, 10.8, 12.3, 13.5 y 16.2 μ g/mL de AgNPs-G durante 24h. Después del tiempo de incubación, se retiró el tratamiento y se realizaron lavados con PBS 1X para administrar 100 μ L de medio DMEM con resazurina al 20% y se incubó por un periodo de 2 horas en condiciones estándar. Una vez cumplido el tiempo de incubación las placas fueron leídas a una longitud de onda de excitación de 535 y 595 nm de emisión en un lector TECAN.

6.3 Inducción de tumor

Los tumores se generaron mediante inyección subcutánea (s.c.) de 1×10^6 células tumorales 4T1 en el lomo afeitado del ratón.

El ratón fue sacrificado mediante dislocación cervical para posteriormente extirpar el tumor el cual fue lavado con PBS 1X y seccionado en partes iguales con un volumen aproximado de 700 mm³.

6.4 Estudios de dosis de nanopartículas de plata

A partir de la metodología anterior, se tomaron tumores de un volumen de 700mm³ de los cuales fueron incubados a concentraciones 8.1 y 16.2 µg/mL de AgNPs-G durante un día en tubos eppendorf de 2mL. Después del tiempo de incubación los tumores fueron retirados del tratamiento para posteriormente mediante maceración del tumor aislar células y realizar un conteo total de células utilizando una cámara de Neubauer.

6.5 Determinación de plata en diferentes órganos

Ratones de la cepa BALB/c serán divididos en dos grupos, ratones que reciban AgNPs-G de manera i.v. y ratones que las reciban de manera i.t. Para los ratones que recibieron el tratamiento vía i.v. se administraron 50µL a una concentración de 32.4 µg/mL de manera diaria durante dos semanas. Para los ratones que recibieron el tratamiento de manera i.t., primero se inducirá un tumor como se describió previamente, posterior a esto se administraron 50µL a una concentración de 32.4 µg/mL de manera diaria e i.t. durante un periodo de dos semanas. Una vez finalizado el periodo de dos semanas, los ratones fueron sacrificados para remover los siguientes órganos: corazón, pulmones, piel, hígado, riñón, vesícula, bazo, tibia y tumor para los ratones portadores de tumor. Los órganos fueron mantenidos a una temperatura de -20°C para posteriormente realizar la detección de plata mediante espectrometría de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo. Las muestras se prepararon al homogenizarlas individualmente mediante molienda. Posteriormente se pesaron 0.5g de la muestra en un matraz de 100mL para un sistema de digestión por microondas, añadir 5mL de HNO₃ en el matraz para el sistema de digestión y posteriormente añadir 5mL H₂O₂ y se cubrió el matraz sin sellarlo. Se realizó una predigestión de 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la digestión en el sistema de digestión por microondas a 200°C durante 20 min. Al finalizar el

tiempo de digestión se dejó enfriar el matraz para posteriormente añadir 5mL de HCL a 35% (w/v) en el matraz durante 20 min. Se transfirió la muestra a un matraz de 50mL para diluir ese volumen en H₂O. Después de esto, las muestras fueron filtradas por un filtro sin ceniza para muestras turbias que contenían grasas, posteriormente se descartaron los primeros 20mL y se recolectó el sobrante. Finalmente se hará la detección de plata en un espectrómetro de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo.

6.6 Terapia neoadyuvante y modelo de resección

Siguiendo la metodología anterior, se realizó una inducción de tumor en un ratón para posteriormente extraerlo y ser seccionado en fragmentos tumorales con un volumen aproximado de 700 mm³.

Para la implantación de los fragmentos tumorales se utilizaron ratones de la cepa Balb/C los cuales fueron anestesiados con ketamina (75 mg/kg)/xylazine (15 mg/kg) para posteriormente realizar una incisión de 1cm en el lomo afeitado del ratón, después de introducir el fragmento tumoral la herida fue cerrada con sutura de Nylon 4-0 y el área fue limpiada con H₂O₂.

Después de 6 días posterior a la implantación de los fragmentos tumorales, los ratones que tenían tumores 4T1 recibieron inyecciones intratumorales (i.t.) de agua inyectable, AgNPs-g (16.2 y 32.4 µg/mL), dosis única de doxorubicina (10mg/kg vía intraperitoneal) de manera diaria durante 15 días después de la implantación del tumor. Todos los volúmenes de inyección fueron de 50 uL.

Los tumores fueron extirpados el día 16 como se describió previamente. Brevemente, los ratones fueron anestesiados utilizando ketamina (75 mg/kg)/xylazine (15 mg/kg) y el área alrededor del tumor se afeitó utilizando una recortadora. El área quirúrgica fue luego desinfectada con etanol al 70 %. Posteriormente se extirpó el tumor primario levantando el tumor con fórceps y cortando alrededor de la base usando un bisturí

quirúrgico. Se cauterizaron los vasos sanguíneos que alimentan el tumor primario y el sitio de resección se cerró con suturas de Nylon 4-0.

Después de la resección del tumor primario, los ratones fueron monitoreados diariamente para la recurrencia del tumor primario y la morbilidad. Cualquier ratón que experimentó una recurrencia del tumor primario se excluyó del estudio. Cualquier ratón que experimente una pérdida de peso significativa o dificultad para respirar fue sacrificado y los pulmones fueron retirados para confirmar la muerte debido a la enfermedad metastásica. Los ratones que sobrevivieron 170 días después de la resección se consideraron curados.

6.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron validados mediante el análisis estadístico ANOVA de una vía, seguido de una prueba post-hoc con una significancia estadística de $p < 0.05$ utilizando el programa Graph Pad 9.

7 RESULTADOS

7.1 Las nanopartículas de plata disminuyen la viabilidad de células 4T1 *in vitro*

La exposición de las nanopartículas de plata a células de la línea 4T1 causa un decremento dependiente de concentración en la viabilidad de las células 4T1 (Figura 1). Existe una diferencia altamente significativa entre la viabilidad de todas las concentraciones de nanopartículas que fueron utilizadas con respecto al control. Además de esto se puede observar que no existe una diferencia significativa entre las concentraciones 8.1 hasta 16.2 $\mu\text{g/mL}$. Se estableció la concentración de 8.1 $\mu\text{g/mL}$ como la CC100.

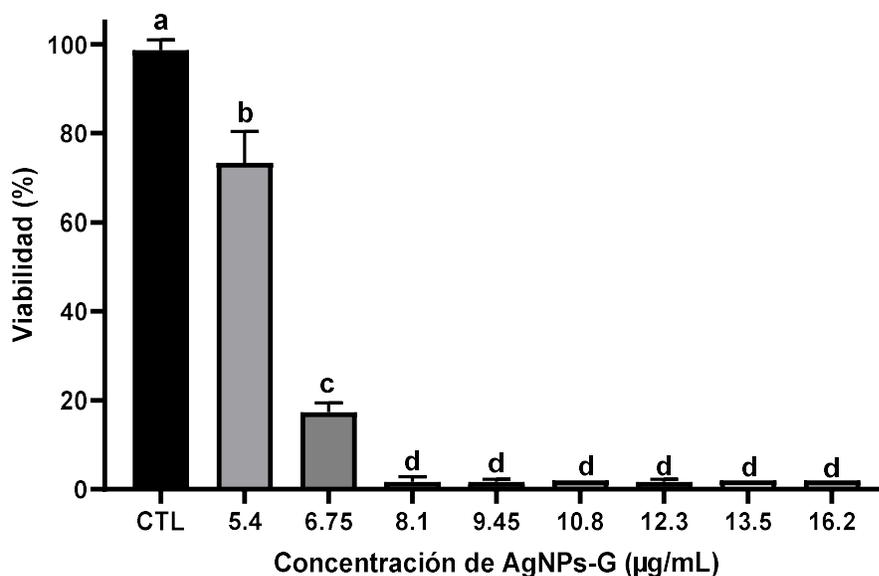


Figura 1. Disminución de la viabilidad celular de la línea 4T1 por inducido por las nanopartículas de plata reducidas con β -D-glucosa (AgNPs-G). Las células fueron tratadas a diferentes concentraciones de AgNPs-G durante un periodo de 24 horas y posteriormente la viabilidad fue determinada mediante el método de Rezasurina. Letras (a,b,c y d) representan diferencia significativa ($p < 0.05$). Los resultados fueron analizados a partir de una prueba ANOVA.

7.2 Efecto citotóxico de las nanopartículas de plata sobre un tumor *in vitro*.

Tumores formados a partir de una línea celular 4T1 con un volumen aproximado de 700 mm fueron expuestos a las concentraciones 8.1 y 16.2 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs-G durante un periodo de 24 h (Figura 2). A partir de un conteo total de células por azul tripán se observó que la concentración de 8.1 $\mu\text{g/mL}$ es menos efectiva al reducir la viabilidad de células tumorales cuando es expuesta a un tumor sólido

de células 4T1, sin embargo, la concentración de 16.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mantiene un mejor efecto citotóxico sobre las células del tumor. Por lo tanto, se utilizaron las concentraciones más altas (16.2 y 32.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para los posteriores estudios de la terapia neoadyuvante.

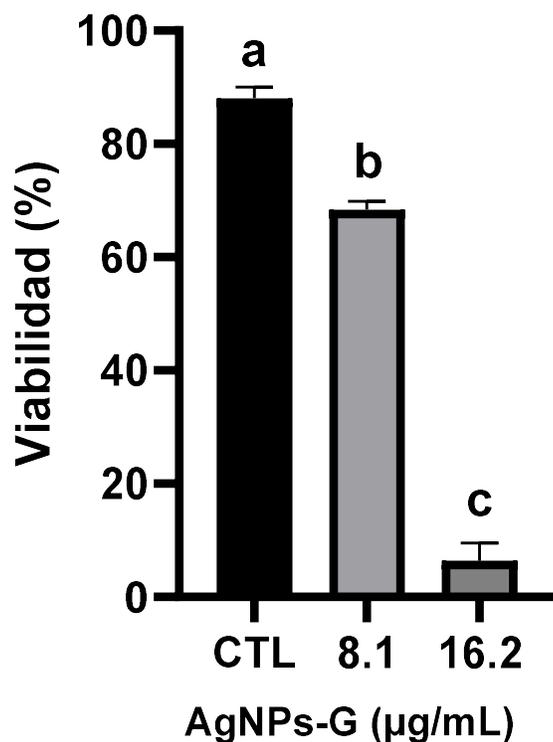


Figura 2. El efecto citotóxico de las AgNPs-G disminuye contra un tumor sólido. Tumores formados a partir de células 4T1 con un volumen aproximado de 700 mm^3 fueron tratados con las concentraciones de 8,1 y 16.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas posteriormente el tejido fue disgregado por perfusión y la viabilidad de las células se determinó por azul tripán. Letras (a,b y c) representan diferencia significativa ($p < 0.05$). Los resultados fueron analizados a partir de una prueba de ANOVA.

7.3 Biodistribución de plata

Al administrar de forma i.v. nuestras AgNPs-G se observa que hay una distribución de estas hacia diferentes órganos, acumulándose de manera preferente en vesícula, bazo y riñón (Figura 3). Sin embargo, cuando son administradas de manera i.t. se observa una gran acumulación de plata en el tumor. A partir de estos resultados se optará por una vía de administración i.t. para de esta forma tener un efecto local de las AgNPs-G.

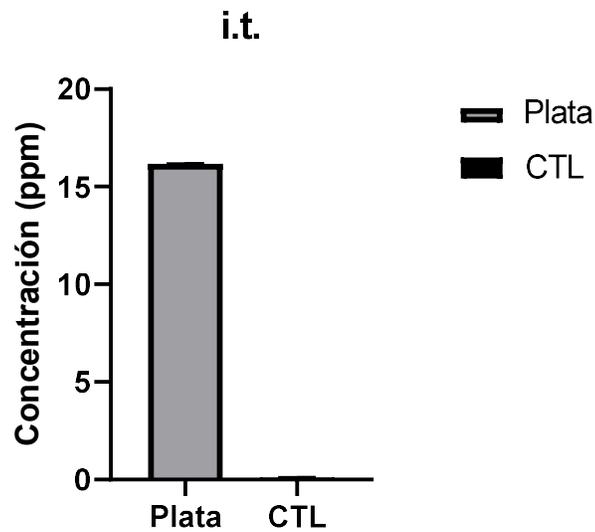
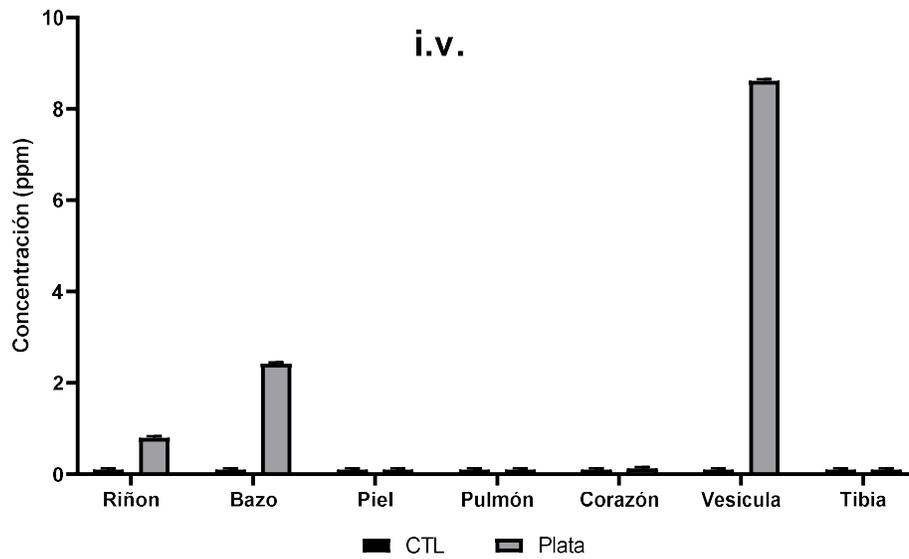


Figura 3. La plata se acumula en diferentes órganos al administrarse i.v. pero de manera i.t. existe una gran acumulación de plata en tumor. Ratones BALB/c fueron administrados con AgNPs a una concentración de 32.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un periodo de dos semanas.

7.4 Efecto neoadyuvante de las AgNPs-G sobre un modelo murino

A partir del día 6 existe una diferencia altamente significativa entre los tratamientos con respecto al control (Figura 3). En los días posteriores se observa un aumento en el volumen tumoral del grupo control, esto hasta el día 16 en el

cual se removió quirúrgicamente el tumor. Para el último día de tratamiento, el volumen final de los tumores de ratones que recibieron tratamientos con las AgNPs-G o DOX, oscilaba en un rango entre 100 y 200 mm³, por otra parte, el grupo control alcanzó en promedio un volumen final de 2125 mm³. A partir de estos resultados se puede observar que las concentraciones empleadas a partir de las AgNPs disminuyen el volumen tumoral, además de presentar un efecto similar a quimioterapias convencionales como la DOX.

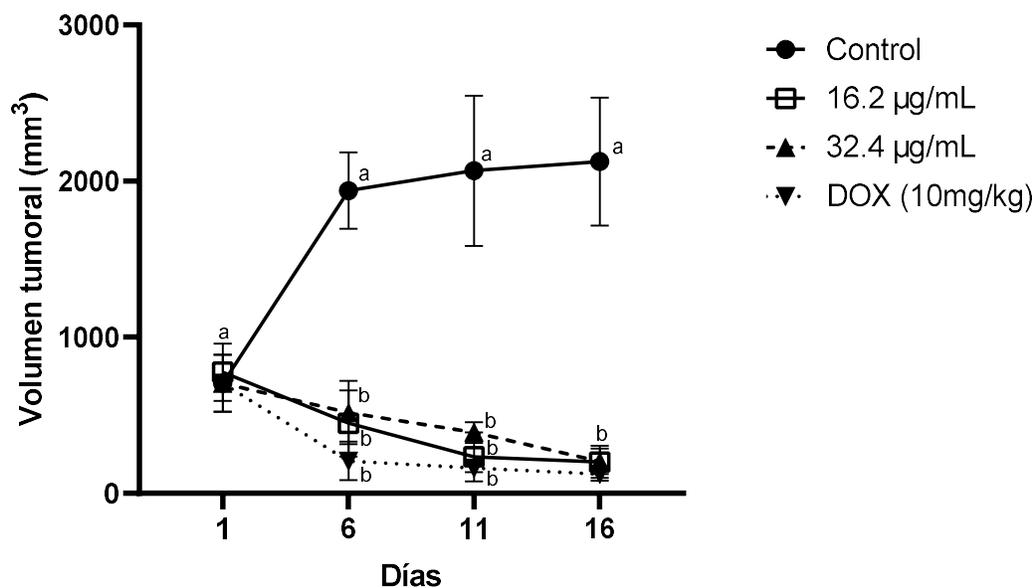


Figura 4. Las AgNPs-G disminuyen el volumen tumoral al ser empleadas de manera neoadyuvante. Ratones portadores de tumor fueron tratados intratumoralmente de manera diaria durante 16 días (n=5). El volumen tumoral fue medido cada 5 días. El grupo control solo se administró solución fisiológica, los grupos con AgNPs-G consistieron dos concentraciones de 16.2 y 32 µg/mL, además de DOX. Letras (a y b) representan diferencia significativa (p <0.05). Los resultados fueron analizados a partir de una prueba de ANOVA.

7.5 Terapia neoadyuvante con AgNPs-G reduce la recurrencia tumoral

Después de la administración de los tratamientos, se realizó una resección del tumor. Los ratones se mantuvieron vivos por un periodo de 170 días. Durante el tiempo de monitoreo se registró el peso corporal de los ratones, a partir del día 17 se observó un aumento en el peso de los ratones, sin embargo, ningún grupo presentó una pérdida significativa de peso durante el monitoreo (Fig. 4B). Ratones portadores de tumor que recibieron inyecciones i.t. de solución

fisiológica presentaron una recurrencia distante a partir del día 60 del monitoreo. Por otra parte, los grupos al los que se administró AgNPs-G a una concentración de 16.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 32.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y DOX no mostraron una recurrencia evidente durante el periodo de monitoreo, demostrando que las AgNPs-G administradas mejoran la supervivencia de los ratones al disminuir la recurrencia (Fig. 4A).

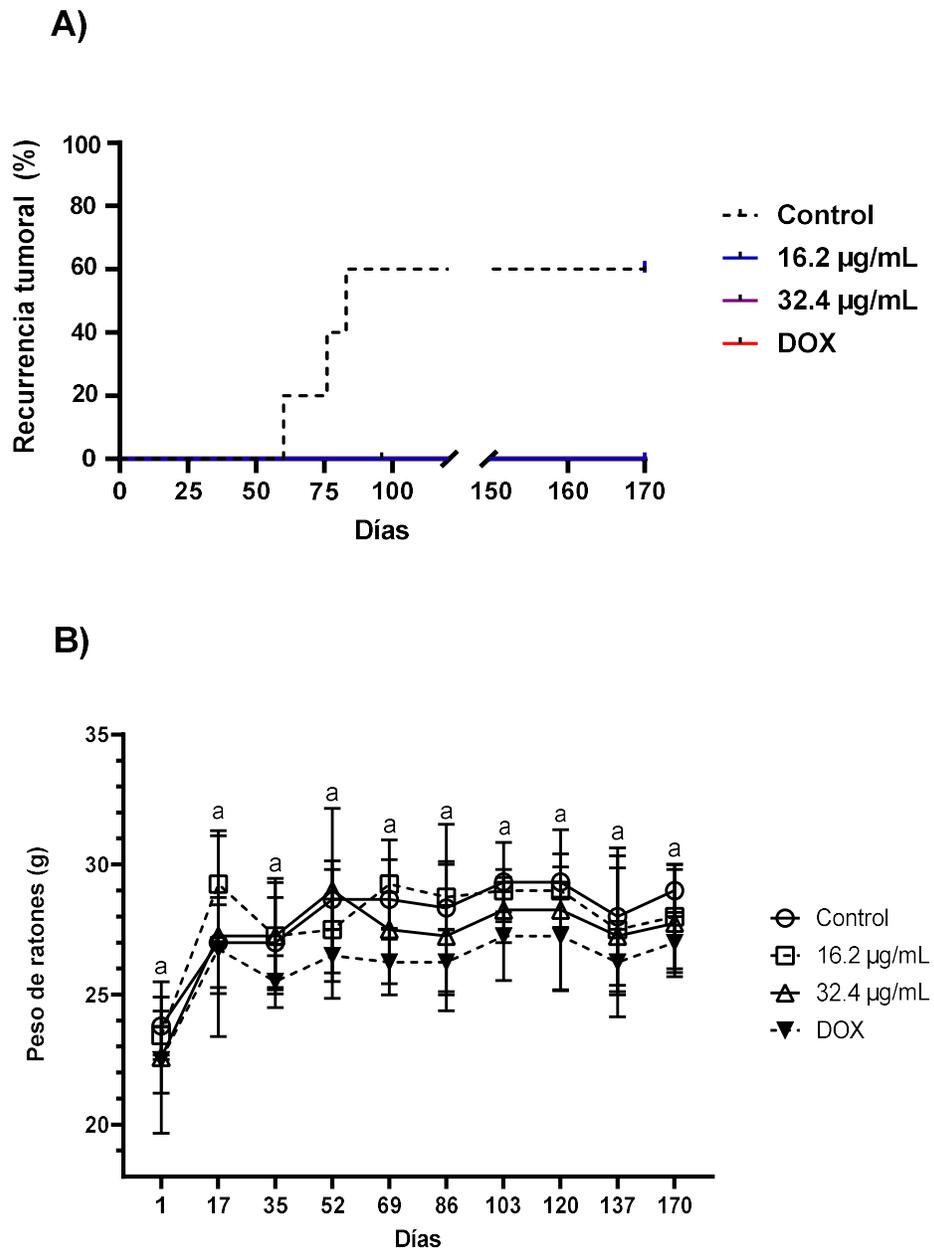


Figura 5. AgNPs-G administradas de manera neoadyuvante reducen la recurrencia. A) Monitoreo del peso de los ratones durante 170 días posterior a la resección del tumor. B) Se siguió el desarrollo de recurrencia en ratones BALB/c posterior a la resección del tumor; ratones que

presentaron dificultades para respirar o un crecimiento tumoral evidente fueron sacrificados y se confirmó la presencia de metástasis en pulmón. Se registró la recurrencia durante 170 días.

7.6 Las AgNPs-G disminuyen metástasis a pulmón

A los ratones sacrificados se les hizo una numeración de nódulos metastásicos en pulmón. El grupo control fue el que presentó un mayor número de nódulos metastásicos (Fig. 5A). Cabe destacar que dos de los ratones tratados con solución fisiológica, solo presentaron tres nódulos metastásicos, sin embargo, pareciera que estos nódulos crecieron de manera junta, por lo tanto, llegando a formar un solo nódulo con mayores dimensiones en comparación de otros, esto puede ocasionar una subestimación en el conteo de los nódulos metastásicos (Fig.5B). Dos de cinco ratones que recibieron 16.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AgNPs presentaron nódulos metastásicos en pulmón con diferencia significativa con respecto al control. Tres de cinco ratones que recibieron 27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AgNPs presentaron nódulos metastásicos en pulmón, además de que no existe diferencia significativa entre este grupo con respecto al control. Uno de cinco ratones que recibieron DOX presentaron nódulos metastásicos con diferencia significativa con respecto al control.

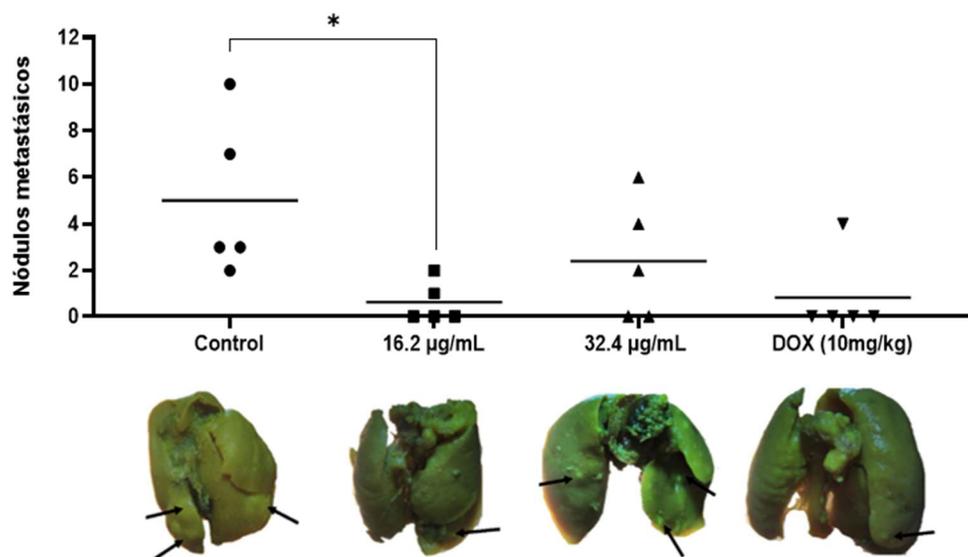


Figura 6. AgNPs administradas de manera neoadyuvante reducen la aparición de nódulos metastásicos en pulmón. A) Número de nódulos metastásicos visibles en pulmones posterior a la resección del tumor. B) Imágenes representativas de pulmones de cada uno de los grupos experimentales.

8 DISCUSIÓN

Nanopartículas sintetizadas a partir de precursores de plata, pueden ser implementadas en un ambiente clínico debido a las diferentes investigaciones que se han realizado en donde se demuestra su capacidad para inducir un efecto citotóxico contra diferentes tipos de tumor, incluyendo el cáncer de mama triple negativo (Kovács,2022).

Los estudios *in vitro* realizados en este trabajo demuestran que nuestras nanopartículas de plata reducidas con β -D-glucosa, disminuyen en gran medida la viabilidad de células de cáncer de mama de la línea 4T1. El uso de diferentes agentes reductores influye en el resultado de la síntesis de la nanopartícula, lo que a su vez influye en el efecto que estas tendrán sobre las células cancerosas. Pucelik y su equipo de trabajo (2022) sinterizaron AgNPs utilizando tetrahidrobórato de sodio; al evaluar el efecto citotóxico que éstas tienen sobre la línea celular 4T1, se obtuvo una disminución del 86% de la viabilidad en un periodo de 24 h, utilizando 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Por otro parte Kumar y colaboradores (2018) utilizaron como agente reductor extracto de *Madhuca lonafolia* para su síntesis de AgNPs, después de 24h obtuvieron una CC50 utilizando 1.50 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs, esto sobre una línea celular 4T1. Por último, Hussein y colaboradores (2020) a partir de sobrenadante de *Lactobacillus pantarum*, dando como resultado una síntesis que necesita de 19.95 $\mu\text{g/mL}$ durante 24h para alcanzar una CC50.

Los resultados obtenidos de metodologías *in vitro* no suelen ser representativos de lo que sucederá en modelos animales o en un ambiente clínico (Sun et al; 2021). Es por esto por lo que se decidió evaluar el efecto de la CC100 obtenida, así como concentraciones más altas. Líneas celulares cancerosas adherentes que se trabajan de manera *in vitro*, normalmente suelen crecer en una monocapa que cubre la superficie en donde están siendo cultivadas. Los tumores sólidos difieren en gran manera de tejidos sanos, esto debido a que la matriz extracelular de un tumor es anormalmente densa y los tumores, además de esto, niveles altos en colágeno con polisacáridos estabilizadores incrementan la resistencia al transporte intersticial, esto ocasiona que el transporte y efecto de diferentes

moléculas y nanopartículas sea muy lento y hasta cierto punto inefectivo (Jain,1999; Shemi,2015), es por esto que se puede apreciar una disminución en el efecto citotóxico de las nanopartículas, esto ocasiona que se tengan que utilizar mayores concentraciones o se tengan que aumentar los tiempos de tratamientos.

Antes de administrar nuestras AgNPs-G para tratar a ratones portadores de tumor, decidimos evaluar la biodistribución de estas partículas. De acuerdo con lo reportado por Felix-Piña (2023) las AgNPs-G utilizadas en este estudio tienen un tamaño promedio de 5nm, estas al administrarse de manera i.v. se observó una acumulación en órganos como bazo, riñón y vesícula, esto concuerda con resultados previamente ya reportados, en donde se ha observado que las nanopartículas de hasta 14nm se acumulan de manera preferente en hígado, riñón y bazo (Blanco,2016; Ferdous,2020). Esto concuerda con otras investigaciones en donde se ha visto que nanopartículas de plata como lo son de oro y plata de tamaños menores a 21 nm, se acumulan de manera preferente en hígado, bazo y riñón al administrarse de manera i.v., pero al ser administradas de manera i.t. estas se acumulan en tumor (Yook, 2006; Ferdous,2019). A partir de esto se decidió administrar las AgNPs-G de manera i.t.

Los beneficios que proporciona una terapia neoadyuvante son de gran relevancia para pacientes de mama debido al impacto que tiene sobre la cirugía a la que los pacientes son sometidos para remover el tumor sólido. Al ser utilizada para tratar tumores grandes, permite que el volumen de estos disminuya y los pacientes sean candidatos a cirugías conservativas de seno en vez de una mastectomía (Selli y Sims, 2019). Debido al efecto citotóxico de las AgNPs, estas resultan de gran interés para evaluar su efecto en tumores *in vivo*. Swanner y colaboradores (2019) evaluaron la capacidad de su síntesis de AgNPs reducidas con povidona para disminuir el volumen tumoral de cáncer de mama en ratones portadores de tumor, observaron que al administrar sus AgNPs, los tumores disminuyeron hasta un volumen promedio de 100 mm³. Sin embargo, Brószka y su equipo de trabajo (2022), evaluaron la capacidad de disminuir el volumen tumoral de sus AgNPs

recubiertas de citrato sobre un tumor de células 4T1, en donde observaron que sus AgNPs no disminuyen el volumen del tumor.

Posterior a la remoción quirúrgica del tumor previamente tratado, se procedió a monitorear a los ratones durante un periodo de 170 días. Cance y colaboradores (2002) realizaron un estudio en donde se monitorearon pacientes que recibieron terapia neoadyuvante para cáncer de mama local avanzado; al finalizar el estudio observaron que, en un periodo de 5 años, solo un 14% de los pacientes presentó recurrencia en seno, pared torácica y en nodos linfáticos axilares o supraclaviculares. Esta investigación, junto con nuestros resultados, resaltan las ventajas de tratar tumores de cáncer de mama de manera neoadyuvante. Se empleó el uso de otras nanopartículas metálicas como son las de oro. Yook y su equipo de trabajo (2006) utilizaron nanopartículas de oro de manera neoadyuvante sobre ratones portadores de tumor de cáncer de mama, en un periodo de monitoreo de 120 días no observaron una disminución en la supervivencia de los ratones debido a una recurrencia. Sin embargo, el periodo de monitoreo es menor al establecido en nuestro estudio y en otros previamente ya reportados. Además de nanopartículas, se han implementado otro tipo de agentes terapéuticos como la inmunoterapia, la cual es una terapia contra el cáncer la cual tiene como objetivo ayudar al sistema inmune a montar una respuesta contra el cáncer (NIH, 2019). Vo y su equipo de trabajo (2015) probaron una inmunoterapia de quitosano e interleucina 12 en ratones que fueron portadores de tumor 4T1, durante un periodo de monitoreo de 80 días, la supervivencia de los ratones disminuyó hasta un 75% debido a la recurrencia que presentaron algunos ratones.

De manera adicional, observamos una disminución en la presencia de nódulos metastásicos en pulmones de ratón que fueron sometidos a una terapia neoadyuvante con nuestras nanopartículas. Uno de los beneficios que se tiene reportado de una terapia neoadyuvante, es la prevención o erradicación de una recurrencia distante (McElnay, 2014). A pesar de que no existen muchas investigaciones evaluando la capacidad de agentes terapéuticos y/o

nanopartículas para prevenir una recurrencia distante posterior a una terapia neoadyuvante, si existen investigaciones donde se evalúa su capacidad para prevenir la diseminación de células cancerosas de cáncer de mama hacia pulmón. En una investigación realizada por Brzoska y su equipo de trabajo (2022) evaluaron la capacidad de inhibir metástasis de células de la línea 4T1 empleando nanopartículas de plata reducidas con citrato; a partir de una administración oral, obtuvieron en promedio un conteo de alrededor de 11 nódulos metastásicos en pulmón. Comparado con la investigación realizada por Vo y su equipo de trabajo (2015) en donde se pudo observar que al utilizar una inmunoterapia de quitosano e IL-12 de manera neoadyuvante, hay hasta un conteo de alrededor de 100 nódulos metastásicos en ratones tratados con esta inmunoterapia. A partir de estos resultados se puede observar que las nanopartículas de plata muestran un mejor efecto en comparación de otro tipo de terapias como lo es una inmunoterapia. Sin embargo, las nanopartículas utilizadas en este estudio son las que muestran un mejor efecto al reducir el conteo de nódulos metastásicos en pulmón. Además, un menor número de nódulos metastásicos, en las imágenes obtenidas de los pulmones de los ratones tratados con las AgNPs-G, se puede apreciar que el volumen de los nódulos tumorales es evidentemente menor en comparación del control; en un ambiente clínico, esto presentaría una gran ventaja, debido a que nódulos metastásicos menores de 6mm no se consideran cancerosos. Sin embargo, mediciones de los volúmenes de los nódulos metastásicos encontrados en los pulmones para posteriormente realizar análisis estadísticos sería ideal.

9 CONCLUSIÓN

Esta investigación demostró la efectividad de las AgNPs-G en reducir el volumen tumoral previo a remover quirúrgicamente un tumor, lo que se conoce como terapia neoadyuvante. De manera adicional, estas nanopartículas fueron capaces de aumentar la sobrevivencia de los ratones al prevenir la recurrencia y reducir el número de nódulos metástasis, así como su volumen.

10 REFERENCIAS

Alieva, M., van Rheenen, J., & Broekman, M. L. D. (2018). Potential impact of invasive surgical procedures on primary tumor growth and metastasis. *Clinical & experimental metastasis*, 35(4), 319–331. <https://doi.org/10.1007/s10585-018-9896-8>

Alkabban FM, Ferguson T. Breast Cancer. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482286/>

Artiukh, L., Povnitsa, O., Zahorodnia, S., Pop, C. V., & Rizun, N. (2022). Effect of Coated Silver Nanoparticles on Cancerous vs. Healthy Cells. *Journal of toxicology*, 2022, 1519104. <https://doi.org/10.1155/2022/1519104>

AshaRani, P. V.; Low Kah Mun, Grace; Hande, Manoor Prakash; Valiyaveetil, Suresh (2009). *Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells*. *ACS Nano*, 3(2), 279–290. doi:10.1021/nm800596w

Blanco J., Tomás-Hernández S., García T., Mulero M., Gómez M., Domingo J.L., Sánchez D.J. Oral exposure to silver nanoparticles increases oxidative stress markers in the liver of male rats and deregulates the insulin signalling pathway and p53 and cleaved caspase 3 protein expression. *Food Chem. Toxicol.* 2018;115:398–404. doi: 10.1016/j.fct.2018.03.039.

Brzóska, K., Wojewódzka, M., Szczygiel, M., Drzał, A., Sniegocka, M., Michalczyk-Wetula, D., Biela, E., Elas, M., Kucińska, M., Piotrowska-Kempisty, H., Kapka-Skrzypczak, L., Murias, M., Urbańska, K., & Kruszewski, M. (2022). Silver Nanoparticles Inhibit Metastasis of 4T1 Tumor in Mice after Intragastric but Not Intravenous Administration. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(11), 3837. <https://doi.org/10.3390/ma15113837>

Brzóska, K., Wojewódzka, M., Szczygiel, M., Drzał, A., Sniegocka, M., Michalczyk-Wetula, D., Biela, E., Elas, M., Kucińska, M., Piotrowska-Kempisty, H., Kapka-Skrzypczak, L., Murias, M., Urbańska, K., & Kruszewski, M. (2022). Silver Nanoparticles Inhibit Metastasis of 4T1

Tumor in Mice after Intra-gastric but Not Intravenous Administration. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(11), 3837. <https://doi.org/10.3390/ma15113837>

Cai, W., Gao, T., Hong, H., & Sun, J. (2008). Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnology, science and applications*, 1, 17–32. <https://doi.org/10.2147/nsa.s3788> Camins, A.; et al. Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: An overview. *Nanomaterials* 2020, 10, 292.

Cance, W. G., Carey, L. A., Calvo, B. F., Sartor, C., Sawyer, L., Moore, D. T., Rosenman, J., Ollila, D. W., & Graham, M., 2nd (2002). Long-term outcome of neoadjuvant therapy for locally advanced breast carcinoma: effective clinical downstaging allows breast preservation and predicts outstanding local control and survival. *Annals of surgery*, 236(3), 295–303. <https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000027526.67560.64>

Chacón, R. D., & Costanzo, M. V. (2010). Triple-negative breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 12 Suppl 2(Suppl 2), S3. <https://doi.org/10.1186/bcr2574>

Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Causes of Cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>

Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., & Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research*, 5(10), 2929–2943

Deptuła, M., Zieliński, J., Wardowska, A., & Piękna, M. (2019). Wound healing complications in oncological patients: perspectives for cellular therapy. *Postępy dermatologii i alergologii*, 36(2), 139–146. <https://doi.org/10.5114/ada.2018.72585>

Echeverria, G. V., Ge, Z., Seth, S., Zhang, X., Jeter-Jones, S., Zhou, X., Cai, S., Tu, Y., McCoy, A., Peoples, M., Sun, Y., Qiu, H., Chang, Q., Bristow, C., Carugo, A., Shao, J., Ma, X., Harris, A., Mundi, P., Lau, R., ... Piwnicka-Worms, H. (2019). Resistance to neoadjuvant chemotherapy in triple-

negative breast cancer mediated by a reversible drug-tolerant state. *Science translational medicine*, 11(488), eaav0936. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav0936>

Félix-Piña, P., Franco Molina, M. A., Zarate Triviño, D. G., García Coronado, P. L., Zapata Benavides, P., & Rodríguez Padilla, C. (2023). Antitumoral and Immunogenic Capacity of β -D-Glucose-Reduced Silver Nanoparticles in Breast Cancer. *International journal of molecular sciences*, 24(10), 8485. <https://doi.org/10.3390/ijms24108485>

Ferdous, Z., & Nemmar, A. (2020). Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2375.

Gunasekaran, T., Nigusse, T., & Dhanaraju, M. D. (2012). Silver nanoparticles as real topical bullets for wound healing. *The journal of the American College of Clinical Wound Specialists*, 3(4), 82–96. <https://doi.org/10.1016/j.jcws.2012.05.001>

Jain R.K. Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. *Annu Rev Biomed Eng.* 1999;1:241–263.

Kirpotin, D. B., Drummond, D. C., Shao, Y., Shalaby, M. R., Hong, K., Nielsen, U. B., Marks, J. D., Benz, C. C., & Park, J. W. (2006). Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer research*, 66(13), 6732–6740. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4199> Kooi ME, Cappendijk VC, Cleutjens KB, Kessels AG, Kitslaar PJ, Borgers M. Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation.* 2003;107:2453–8.

Kovács, D., Igaz, N., Gopisetty, M. K., & Kiricsi, M. (2022). Cancer Therapy by Silver Nanoparticles: Fiction or Reality?. *International journal of molecular sciences*, 23(2), 839. <https://doi.org/10.3390/ijms23020839>

Kumar, Brajesh; Smita, Kumari; Cumbal, Luis; Debut, Alexis (2015). *Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract. Saudi Journal of Biological Sciences*, (), S1319562X15002016–. doi:10.1016/j.sjbs.2015.09.006

Liu, M., Li, Y., Xing, W. *et al.* Monosaccharide-mediated rational synthesis of a universal plasmonic platform with broad spectral fluorescence enhancement for high-sensitivity cancer biomarker analysis. *J Nanobiotechnol* 20, 184 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01359-z>

Maeda, H.; Nakamura, H.; Fang, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor

McElnay, P., & Lim, E. (2014). Adjuvant or neoadjuvant chemotherapy for NSCLC. *Journal of thoracic disease*, 6 Suppl 2(Suppl 2), S224–S227. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2014.04.26>

Moody, S. E., Perez, D., Pan, T. C., Sarkisian, C. J., Portocarrero, C. P., Sterner, C. J., Notorfrancesco, K. L., Cardiff, R. D., & Chodosh, L. A. (2005). The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer cell*, 8(3), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.07.009>

Morales MP, Bomati-Miguel O, de Alejo RP, Ruiz-Cabello J, Veintemillas-Verdaguer S, O’Grady K. Contrast agents for MRI based on iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis. *J Magn Magn Mater*. 2003;266:102–9.

Nasir GA, Najm MA, Hussein AL. The Effect of Silver Nanoparticles on BRAF Gene Expression. *SRP*. 2020; 11(10): 570-575. doi:10.31838/srp.2020.10.85

Paladini, F., & Pollini, M. (2019). Antimicrobial Silver Nanoparticles for Wound Healing Application: Progress and Future Trends. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(16), 2540. <https://doi.org/10.3390/ma12162540>

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>

Pettegrew, Colin; Dong, Zheng; Muhi, M. Zubayed; Pease, Scott; Mottaleb, M. Abdul; Islam, M. Rafiq (2014). *Silver Nanoparticle Synthesis Using Monosaccharides and Their Growth Inhibitory Activity against Gram-Negative and Positive Bacteria*. *ISRN Nanotechnology*, *2014*(), 1–8. doi:10.1155/2014/480284

Pucelik, B., Sułek, A., Borkowski, M., Barzowska, A., Kobielski, M., & Dąbrowski, J. M. (2022). Synthesis and Characterization of Size- and Charge-Tunable Silver Nanoparticles for Selective Anticancer and Antibacterial Treatment. *ACS applied materials & interfaces*, *14*(13), 14981–14996. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c01100>

R. G. Ellis-Behnke, Y. X. Liang, S. W. You, D. K. Tay, S. Zhang, K. F. Rao RC, Kulkarni GU, Thomas JP, Edwards PP. Metal nanoparticles and their assemblies. *Chem Soc Rev*. 2000;29:27–35.

Recurrent Cancer: When Cancer Comes Back. (2020). National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/types/recurrent-cancer>

Riaz Ahmed, K. B., Nagy, A. M., Brown, R. P., Zhang, Q., Malghan, S. G., & Goering, P. L. (2017). Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, *38*, 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.10.012>

Sánchez-López, E.; Gomes, D.; Esteruelas, G.; Bonilla, L.; Lopez-Machado, A.L.; Galindo, R.; Cano, A.; Espina, M.; Ettcheto, M.;

Selli, C., & Sims, A. H. (2019). Neoadjuvant Therapy for Breast Cancer as a Model for Translational Research. *Breast cancer : basic and clinical research*, 13,

1178223419829072.<https://doi.org/10.1177/1178223419829072>

Shemi, A., Khvalevsky, E. Z., Gabai, R. M., Domb, A., & Barenholz, Y. (2015). Multistep, effective drug distribution within solid tumors. *Oncotarget*, 6(37), 39564–39577.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.5051>

Singh, Jasmine; Moore, William; Fattah, Farjana; Jiang, Xingya; Zheng, Jie; Kurian, Pamela; Beg, Muhammad S.; Khan, Saad A. (2018). *Activity and pharmacology of homemade silver nanoparticles in refractory metastatic head and neck squamous cell cancer. Head & Neck*, (), hed.25492–. doi:10.1002/hed.25492

So, and G. E. Schneider, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 5054 2006.

Sung, H., Freedman, R. A., Siegel, R. L., Hyun, N., DeSantis, C. E., Ruddy, K. J., & Jemal, A. (2021). Risks of subsequent primary cancers among breast cancer survivors according to hormone receptor status. *Cancer*, 127(18), 3310–3324. <https://doi.org/10.1002/ncr.33602>

Swanner, Jessica; Fahrenholtz, Cale D.; Tenvooren, Iliana; Bernish, Brian W.; Sears, James J.; Hooker, Allison; Furdui, Cristina M.; Alli, Elizabeth; Li, Wencheng; Donati, George L.; Cook, Katherine L.; Vidi, Pierre-Alexandre; Singh, Ravi (2019). *Silver nanoparticles selectively treat triple-negative breast cancer cells without affecting non-malignant breast epithelial cells in vitro and in vivo. FASEB BioAdvances*, 1(10), 639–660. doi:10.1096/fba.2019-00021

Thompson, A. M., & Moulder-Thompson, S. L. (2012). Neoadjuvant treatment of breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 23 Suppl 10(Suppl 10), x231–x236. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds324>

Uhrich, Kathryn E.; Cannizzaro, Scott M.; Langer, Robert S.; Shakesheff, Kevin M. (1999). *Polymeric Systems for Controlled Drug Release.* , 99(11), 3181–3198. doi:10.1021/cr940351u .

uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, 65, 71–79.

Vo, J. L., Yang, L., Kurtz, S. L., Smith, S. G., Koppolu, B. P., Ravindranathan, S., & Zaharoff, D. A. (2015). Neoadjuvant immunotherapy with chitosan and interleukin-12 to control breast cancer metastasis. *Oncoimmunology*, 3(12), e968001. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.968001>

What is a Lung Nodule? (2023) Brigham and Women’s Hospital. <https://www.brighamandwomens.org/lung-center/diseases-and-conditions/lung-nodules#:~:text=Nodules%20between%206%20mm%20and,referred%20to%20as%20lung%20masses>.

Y. Li, P. Leung, L. Yao, Q. W. Song, and E. Newton, *J. Hosp. Infect.* 62, Yook, S., Cai, Z., Lu, Y., Winnik, M. A., Pignol, J. P., & Reilly, R. M. (2016). Intratumorally Injected ¹⁷⁷Lu-Labeled Gold Nanoparticles: Gold Nanoseed Brachytherapy with Application for Neoadjuvant Treatment of Locally Advanced Breast Cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 57(6), 936–942. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.168906>

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