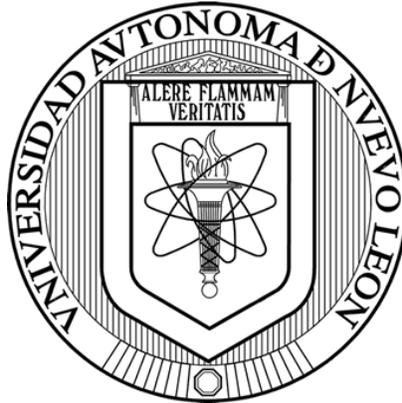


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE LA SINERGIA DE UN NANOSISTEMA TERANÓSTICO  
BASADO EN NANOPARTÍCULAS DE ORO FUNCIONALIZADAS CON  
APTÁMEROS COMBINADO CON TERAPIA FARMACOLÓGICA EN CÉLULAS  
DE CÁNCER DE MAMA QUE SOBREENPRESAN HER2**

**Por**

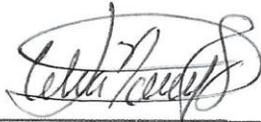
**L.B.G. ELENA YARELI GALLEGOS GONZÁLEZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**Agosto, 2025**

Evaluación de la sinergia de un nanosistema teranóstico basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con aptámeros combinado con terapia farmacológica en células de cáncer de mama que sobreexpresan HER2

Aprobación de la Tesis:



---

Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

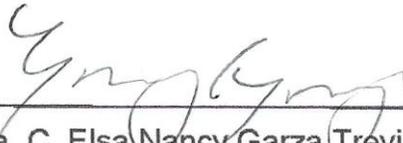
Directora de Tesis



---

Dra. Med. Paulina Delgado González

Codirectora de Tesis



---

Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño

Miembro de la comisión



---

Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

*“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño que se enfrenta a fenómenos naturales que le impresionan como cuentos de hada”*

- Marie Curie

## **Agradecimientos**

A la Dra. Celia Nohemí Sánchez Domínguez, por aceptarme como tesista y depositar su confianza en mí, por escuchar cada una de mis dudas, comentarios y problemas. Sin su apoyo y paciencia no habría logrado crecer personal y profesionalmente como lo hice durante este año. No hay palabras que describan lo agradecida que me siento.

A la Dra. Paulina Delgado González, por sus porras, consejos y sonrisas a lo largo de la maestría y el desarrollo de este trabajo. Siempre me sentí bienvenida.

A la Dra. Elsa Nancy Garza Treviño, por recibirme con los brazos abiertos cada vez que acudí con alguna duda. Aprendí mucho de sus observaciones y consejos, gracias por apoyarme en el más mínimo detalle.

Al Dr. Hugo Gallardo Blanco, por su apoyo y confianza, sus consejos y recomendaciones fueron fundamentales para terminar el proyecto.

A la Dra. Montserrat López Carrizales, por su apoyo desde el primer día, por escuchar cada problema y ayudarme a resolverlos de manera efectiva, este trabajo no habría sido posible sin tu ayuda.

A mis padres y hermanos, gracias por permitirme volver a la ciencia después de 5 años y no dejarme sola en este proceso. Gracias por llevarme a la facultad todos los días, por preguntar siempre cómo me había ido, por comprender mis horarios locos y por estar al pendiente de mis experimentos.

A mis compañeros de posgrado que se convirtieron en amistades, recorrimos un camino difícil pero nunca faltaron las risas. Estoy infinitamente agradecida por su apoyo durante estos dos años y espero que nuestros caminos se crucen nuevamente.

A mis amistades incondicionales, por acompañarme durante toda la maestría y nunca dudar de mi capacidad.

**Título del estudio:** Evaluación de la sinergia de un nanosistema teranóstico basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con aptámeros combinado con terapia farmacológica en células de cáncer de mama que sobreexpresan HER2

Este trabajo de tesis fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Nanomedicina del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), donde se llevaron a cabo los experimentos principales y el análisis de resultados.

Asimismo, se contó con la valiosa colaboración del Laboratorio de Química Coloidal e Interfacial aplicada a Nanomateriales del Centro de Investigación de Materiales Avanzados (CIMAV), para realizar la caracterización fisicoquímica de los nanomateriales utilizados.

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UANL, bajo la clave de registro P125-00039. Esta investigación recibió financiamiento a través de la convocatoria PROACTI 2023 y 2024 UANL Etapas 1 y 2 (178-MCS-2023 y 47-MCS-2024).

## Tabla de contenido

Contenido	Página
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xiv
1. Introducción.....	1
1.1 Cáncer.....	1
1.2 Cáncer de mama.....	1
1.2.1 Epidemiología del cáncer de mama.....	1
1.2.2 Factores de riesgo.....	3
1.2.3 Subtipo molecular del cáncer de mama.....	4
1.3 Características del cáncer de mama HER2+.....	5
1.3.1 Epidemiología en México.....	5
1.3.2 Biología del receptor HER2.....	6
1.3.3. Señalización de HER2 en la progresión del cáncer.....	7
1.4 Terapias contra cáncer de mama HER2+.....	9
1.4.1 Tratamientos convencionales para cáncer de mama.....	9
1.4.2 Terapias dirigidas a cáncer de mama HER2+.....	12
1.5 Nanomedicina en cáncer.....	15
1.5.1 Nanopartículas de oro en cáncer.....	17
2. Antecedentes.....	19
2.1 Terapias con nanosistemas dirigidos a HER2.....	19
2.2 Antecedentes directos.....	21
3. Justificación.....	23
4. Hipótesis.....	24

5. Objetivos .....	24
5.1 Objetivo General .....	24
5.2 Objetivos específicos .....	24
6. Metodología.....	25
6.1 Esquema general de trabajo .....	25
6.2 Materiales .....	25
6.2.1 Material Biológico.....	25
6.2.2 Terapias farmacológicas.....	25
6.2.3 Equipos.....	26
6.2.4 Reactivos .....	26
6.2.5 Materiales .....	27
6.3 Métodos .....	27
6.3.1 Diseño de nanosistema .....	27
6.3.2 Reducción y purificación de aptámero .....	27
6.3.3 Conjugación de nanopartículas de oro .....	28
6.3.4 Caracterización física.....	28
6.3.5 Líneas celulares.....	29
6.3.7 Evaluación de la citotoxicidad de los tratamientos individuales .....	30
6.3.8 Evaluación de citotoxicidad de los tratamientos en combinación .....	31
6.3.9 Determinación de Sinergia.....	32
6.3.10 Análisis estadístico .....	32
7. Resultados .....	33
7.1 Caracterización física de AuNP-PEG-AptHER2.....	33
7.1.1 Espectroscopia UV-VIS .....	33
7.1.2 Diámetro hidrodinámico .....	34
7.1.3 Potencial Z.....	34
7.2 Evaluación de la viabilidad celular de los tratamientos individuales.....	35
7.2.1 Estandarización del número de células para ensayos experimentales..	35
7.2.2 Tratamiento de 5-Fluorouracilo a diferentes tiempos.....	36
7.2.3 Tratamiento de TTZ a diferentes tiempos .....	40
7.2.4 Tratamiento de AuNP-PEG-AptHER2.....	44
7.3 Tratamiento en combinación .....	46

7.3.1 Tratamiento en combinación con 5-FU .....	46
7.3.2 Tratamiento en combinación con TTZ .....	48
7.3.3 Tratamiento en combinación de 5-FU y TTZ .....	50
8. Discusión.....	54
9. Conclusiones.....	62
10. Referencias .....	64

## Lista de Figuras

- Figura 1. Incidencia de cáncer de mama en México por entidad federativa
- Figura 2. Señalización mediada por HER2
- Figura 3. Metabolismo y mecanismo de acción completo del 5-fluorouracilo al ser administrado
- Figura 4. Mecanismos de acción del anticuerpo Trastuzumab
- Figura 5. Esquema de los diferentes componentes del nanosistema AuNP-PEG-AptHer2
- Figura 6. Estrategia general de trabajo correspondiente a los objetivos específicos
- Figura 7. Espectro de absorción UV-VIS de los componentes del nanosistema
- Figura 8. Grafica representativa del diámetro hidrodinámico de AuNP-PEG-AptHER2
- Figura 9. Grafica representativa del potencial Z de AuNP-PEG-AptHER2
- Figura 10. Curvas de crecimiento tras siembra con distintas densidades celulares
- Figura 11. Viabilidad celular con tratamiento de 5-FU en la línea celular HCC-1954 a diferentes tiempos
- Figura 12. Segundo rango de tratamiento con 5-FU en la línea celular HCC-1954 a 24 y 48 horas
- Figura 13. Curva dosis-efecto para concentración media inhibitoria de 5-fluorouracilo en HCC-1954
- Figura 14. Viabilidad celular con tratamiento de 5-FU en la línea celular Vero CCL-81 a diferentes tiempos
- Figura 15. Segundo rango de tratamiento con 5-FU en la línea celular Vero CCL-81 a 24 y 48 horas
- Figura 16. Curva dosis-efecto para concentración media inhibitoria de 5-fluorouracilo en Vero CCL-81

Figura 17. Viabilidad celular con tratamiento de TTZ en la línea celular HCC-1954 a diferentes tiempos

Figura 18. Segundo rango de tratamiento con TTZ en la línea celular HCC-1954 a 24 y 48 horas

Figura 19. Curva dosis-efecto para concentración media inhibitoria de trastuzumab en HCC-1954

Figura 20. Viabilidad celular con tratamiento de TTZ en la línea celular Vero CCL-81 a diferentes tiempos

Figura 21. Segundo rango de tratamiento con TTZ en la línea celular Vero CCL-81 a 24 y 48 horas

Figura 22. Curva dosis-efecto para concentración media inhibitoria de trastuzumab en Vero CCL-81

Figura 23. Viabilidad celular con tratamiento de AuNP-PEG-AptHER2 en ambas líneas celulares

Figura 24. Viabilidad celular en el tratamiento combinado de AuNP-PEG-AptHER2 y 5-FU

Figura 25. Viabilidad celular en el tratamiento combinado de AuNP-PEG-AptHER2 y TTZ

Figura 26. Viabilidad celular en el tratamiento combinado de 5-FU y TTZ en HCC-1954

Figura 27. Viabilidad celular en el tratamiento combinado de 5-FU y TTZ en Vero CCL-81

## Lista de Tablas

Tabla 1. Factores de riesgo involucrados en cáncer de mama

Tabla 2. Tratamientos comunes para cáncer de mama y sus efectos adversos

Tabla 3. Tratamientos dirigidos al receptor HER2 en cáncer de mama

Tabla 4. Concentraciones a evaluar de manera individual en ambas líneas celulares

Tabla 5. Concentraciones a evaluar en combinación por cada línea celular

Tabla 6. Índice de combinación obtenido para el tratamiento de AuNP-PEG-AptHER2 y 5-FU

Tabla 7. Índice de combinación obtenido para el tratamiento de AuNP-PEG-AptHER2 y TTZ

Tabla 8. Índice de combinación obtenido para el tratamiento de TTZ y 5-FU en HCC-1954

Tabla 9. Índice de combinación obtenido para el tratamiento de TTZ y 5-FU en Vero CCL-81

## Lista de abreviaturas

- 5-FU - 5-Fluorouracilo
- ADCC - Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
- ADNs - Nanopartículas anticuerpo-fármaco
- AKT – Proteína quinasa B
- AptHER2 - Aptámero dirigido a Her2
- AuNPs-PEG - Nanopartículas de oro recubiertas con polietilenglicol
- AuNPs - Nanopartículas de oro
- CI – Índice de combinación
- DLS - Dispersión dinámica de la luz
- DPD - Dihidropirimidina deshidrogenasa
- dTMP - Timidina monofosfato
- DTT - Ditiotreitól
- dUMP - Desoxiuridina monofosfato
- EMT – Transición epitelio-mesenquimal
- EPR – Efecto de permeabilidad y retención mejorada
- ER – Receptor de estrógeno
- FdUMP – Fluorodesoxiuridilato
- GSK3 - Glucógeno sintasa quinasa 3
- HER2 - Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
- IC50 - Concentración inhibitoria media
- IGF-IR - Factor de crecimiento semejante a insulina tipo I
- INEGI - Instituto Nacional de Estadística y Geografía
- NIR – Rango de infrarrojo cercano
- PEG – Polietilenglicol
- PKC – Proteína quinasa C
- PLGA - Ácido poliláctico-co-glicólico
- PR - Receptor de progesterona
- TS – Timidilato sintasa
- TTZ -Trastuzumab
- VEGF – Factor de crecimiento vascular

## Resumen

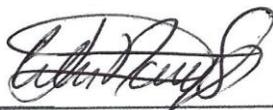
Elena Yareli Gallegos González

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**Título del estudio:** Evaluación de la sinergia de un nanosistema teranóstico basado en nanopartículas de oro funcionalizadas con aptámeros combinado con terapia farmacológica en células de cáncer de mama que sobreexpresan HER2

El cáncer de mama HER2 positivo se caracteriza por una alta tasa de proliferación, agresividad y un pronóstico poco favorable. Aunque existen tratamientos dirigidos como el trastuzumab (TTZ), persisten múltiples desafíos clínicos como toxicidad sistémica, resistencia adquirida y efectos adversos intensos. Las nanopartículas de oro se han posicionado como una alternativa prometedora gracias a sus propiedades fisicoquímicas únicas; pero es necesario profundizar en su eficacia terapéutica. Esta investigación propuso que la combinación de nanopartículas de oro con terapias farmacológicas podría ejercer un efecto sinérgico en la reducción de la viabilidad celular. Para ello, se construyó un nanosistema conformado por nanopartículas de oro recubiertas con PEG y un aptámero específico para el receptor HER2 (AuNP-PEG-AptHER2); cuya conjugación se confirmó por espectroscopia de absorción. La caracterización mostró un diámetro hidrodinámico de  $65.30 \pm 1.1$  nm y una carga superficial de  $-8.4 \pm 0.43$  mV. Posteriormente, se evaluó el efecto citotóxico de AuNP-PEG-AptHER2, trastuzumab (TTZ) y 5-fluorouracilo (5-FU) mediante el ensayo de MTT en las líneas celulares: HCC-1954 (HER2+) y Vero CCL-81 (células no tumorales). Los tratamientos con 5-FU y TTZ mostraron un efecto citotóxico dependiente de dosis y tiempo, con una eficiencia mayor a las 72 horas de exposición. La IC<sub>50</sub> de 5-FU fue de 1,334  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 416  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en HCC-1954 y Vero CCL-81, respectivamente. El tratamiento con TTZ mostró una IC<sub>50</sub> de 3,856  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 4,457  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en HCC-1954 y Vero CCL-81, respectivamente. El AuNP-PEG-AptHER2 mostró una disminución moderada en ambas líneas celulares a las 72 h, presentando un mayor efecto a bajas concentraciones en HCC-1954. Las combinaciones de AuNP-PEG-AptHER2 con 5-FU mostró un efecto antagonista en ambas líneas celulares, sin embargo, la combinación con TTZ presentó un efecto aditivo en HCC-1954 y un efecto sinérgico en Vero CCL-81. La combinación de AuNP-PEG-AptHER2 con 5-FU y TTZ no mostró una reducción significativa en células de cáncer de mama HER2+; sin embargo, los resultados sugieren seguir explorando diferentes concentraciones y fármacos para promover una nueva estrategia terapéutica.



---

Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

Directora de tesis

## Abstract

Elena Yareli Gallegos González

Universidad Autónoma de Nuevo León

School of medicine

**Title:** Synergistic evaluation of a theranostic nanosystem based on gold nanoparticles functionalized with aptamers in combination with pharmacological therapy in HER2 overexpressing breast cancer cells.

HER2-positive breast cancer is characterized by a high proliferation rate, aggressiveness, and an unfavorable prognosis. Although targeted treatments such as trastuzumab are available, multiple clinical challenges persist, including systemic toxicity, acquired resistance, and severe adverse effects. Gold nanoparticles have emerged as a promising alternative due to their unique physicochemical properties; however, further studies are needed to fully understand their therapeutic efficacy. This research proposed that combining gold nanoparticles with pharmacological therapies could exert a synergistic effect in reducing cell viability. For this purpose, a nanosystem was constructed consisting of gold nanoparticles coated with PEG and a HER2-specific aptamer (AuNP-PEG-AptHER2), whose conjugation was confirmed by spectroscopy. Characterization revealed a hydrodynamic diameter of  $65.30 \pm 1.1$  nm and a surface charge of  $-8.4 \pm 0.43$  mV. Subsequently, the cytotoxic effect of AuNP-PEG-AptHER2, trastuzumab (TTZ), and 5-fluorouracil (5-FU) was evaluated using the MTT assay in the cell lines HCC-1954 (HER2+) and Vero CCL-81 (non-tumor cells). Treatments with 5-FU and TTZ showed a dose- and time-dependent cytotoxic effect, with greater efficiency after 72 h of exposure. The IC<sub>50</sub> of 5-FU was 1,334  $\mu\text{g/mL}$  and 416  $\mu\text{g/mL}$  in HCC-1954 and Vero CCL-81, respectively. TTZ treatment showed an IC<sub>50</sub> of 3,856  $\mu\text{g/mL}$  and 4,457  $\mu\text{g/mL}$  in HCC-1954 and Vero CCL-81, respectively. AuNP-PEG-AptHER2 caused a moderate decrease in viability in both cell lines after 72 h, showing a greater effect at low concentrations in HCC-1954. The combination of AuNP-PEG-AptHER2 with 5-FU showed an antagonistic effect in both cell lines; however, the combination with TTZ exhibited an additive effect in HCC-1954 and a synergistic effect in Vero CCL-81. The combination of AuNP-PEG-AptHER2 with 5-FU and TTZ did not produce a significant reduction in HER2+ breast cancer cells; however, the results suggest the need to further explore different concentrations and drugs to develop a new therapeutic strategy



---

Celia Nohemí Sánchez Domínguez, Ph D

Thesis director

# 1. Introducción

## 1.1 Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento y la replicación sin control de células transformadas, capaces de invadir tejidos adyacentes (Brown et al., 2023). El cáncer constituye uno de los principales problemas de salud pública y social, al ser responsable de una de cada seis muertes a nivel mundial. Datos del Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) reportaron 19.96 millones de casos nuevos en todo el mundo en 2022, siendo el cáncer de pulmón el de mayor prevalencia (12.4%), seguido del cáncer de mama (11.6%), cáncer colorrectal (9.6%) y cáncer de próstata (7.3%) (Bray et al., 2024).

La incidencia de cáncer está influenciada por diversos factores demográficos y socioeconómicos. Se estima que, de mantenerse las tendencias actuales, para el año 2070 la incidencia global de cáncer se duplicará en comparación con lo reportado en los últimos años. En particular, para el cáncer de mama y cáncer colorrectal, se proyecta una incidencia conjunta de 9.1 millones de casos para el 2070, representando un incremento del 131% (Soerjomataram & Bray, 2021). Por ello, es fundamental el seguimiento clínico, el diagnóstico temprano y la mejora continua de las estrategias terapéuticas para el cáncer de mama.

## 1.2 Cáncer de mama

### 1.2.1 Epidemiología del cáncer de mama

A nivel mundial, el cáncer de mama es el de mayor prevalencia en mujeres, representando el 36% de los pacientes oncológicos (Smolarz et al., 2022). En 2022, GLOBOCAN reportó un total de 2.3 millones de casos nuevos y 666,000 defunciones, posicionándolo como el cuarto tipo de cáncer con mayor mortalidad (Bray et al., 2024). La incidencia de esta patología es mayor en regiones industrializadas como Europa, Estados Unidos, Japón y Australia (Ferlay et al., 2024).

En México, el cáncer de mama es considerado un problema de salud pública debido al aumento de casos en mujeres menores de 40 años y su alta tasa de mortalidad. En 2018, se registró como el segundo tipo de cáncer más frecuente en la población por debajo del cáncer de próstata y el más común en mujeres, representando el 25% de los casos (Arceo-Martínez et al., 2021). Sin embargo, datos más recientes del GLOBOCAN 2022 lo colocan como el cáncer más común en población mexicana, con un total de 31,043 casos diagnosticados, superando las cifras del cáncer de próstata y cáncer colorrectal (Ferlay et al., 2024).

Ese mismo año, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó una incidencia nacional de 27.64 casos por cada 100 mil habitantes, siendo los estados de Colima, Durango y Jalisco los que presentaron las tasas más altas (Figura 1) (INEGI, 2023). Asimismo, las defunciones por cáncer de mama han mostrado un incremento en población de 20 años y más. En 2022 se reportaron 7,888 defunciones (tasa de mortalidad: 17.4 por cada 100 mil habitantes) y en el 2023 la cifra ascendió a 8,034 muertes (tasa de mortalidad: 17.9 por cada 100 mil habitantes) (INEGI, 2024).

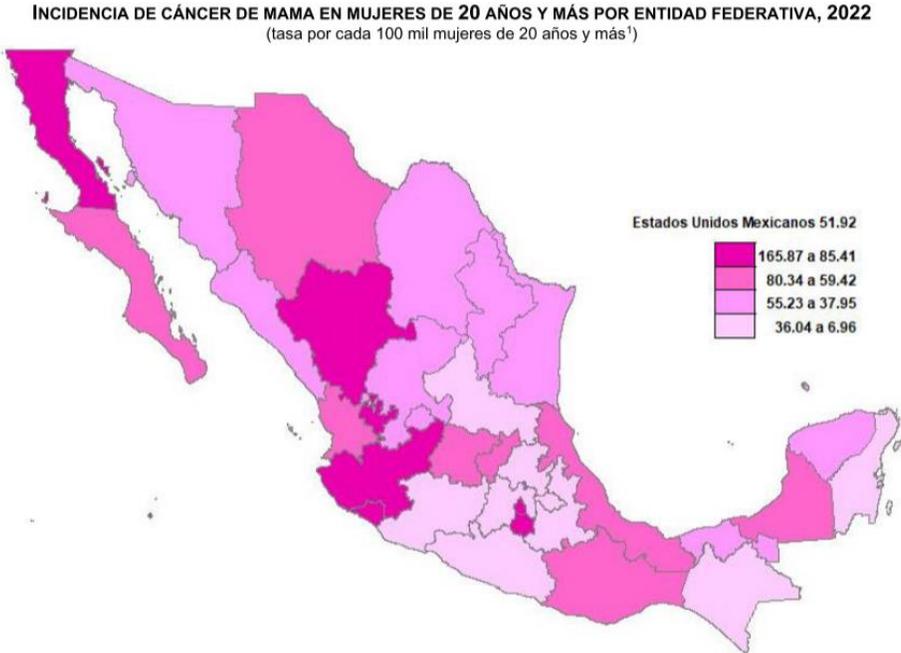


Figura 1. Incidencia de cáncer de mama en México por entidad federativa (INEGI,2023)

### 1.2.2 Factores de riesgo

El cáncer de mama es una enfermedad de origen multifactorial, cuyo desarrollo está influenciado por factores internos y externos. Diversos factores se han asociado con la tumorigénesis de este cáncer (Tabla 1); no obstante, los principales determinantes identificados corresponden a la predisposición genética, los factores hormonales y reproductivos, así como el estilo de vida (Łukasiewicz et al., 2021). Se estima que entre el 5 y 10% de los casos pueden atribuirse a mutaciones genéticas, mientras que un 20-30% se relacionan a factores modificables (Obeagu & Obeagu, 2024)

Tabla 1. Factores de riesgo involucrados en cáncer de mama

	<b>Factor de riesgo</b>	<b>Descripción</b>
Factores no modificables	Factores reproductivos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No embarazos</li> <li>• Primer embarazo a edad tardía</li> <li>• Edad temprana de la primera menstruación</li> <li>• Menopausia tardía</li> </ul>
	Factores Fisiológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad avanzada</li> <li>• Sexo femenino</li> <li>• Antecedentes familiares de cáncer</li> <li>• Mutaciones genéticas heredadas (BRCA1/BRCA2)</li> </ul>
Factores modificables	Factores Hormonales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uso de anticonceptivos orales</li> <li>• Uso de terapia de reemplazo hormonal</li> </ul>
	Factores relacionados al estilo de vida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dieta tipo occidental</li> <li>• Alto consumo de carnes rojas</li> <li>• Sobrepeso</li> <li>• Consumo de alcohol</li> <li>• Tabaquismo</li> <li>• Falta de actividad física</li> <li>• Exposición a radiación ionizante</li> </ul>

México atraviesa una transición demográfica, epidemiológica y nutricional que favorece la exposición a factores de riesgo de cáncer. Entre los principales factores se han identificado el historial familiar, los antecedentes reproductivos, mutaciones en los genes BRCA1/2 y los hábitos de vida (Romero-Cordoba et al., 2021). Un estudio realizado en la región fronteriza del norte estimó que aproximadamente el 10% de las mujeres hispanas con cáncer de mama presentaban antecedentes familiares (Salinas et al., 2019). Asimismo, se ha reportado que el 15% de las pacientes con este cáncer poseen mutaciones en los genes supresores de tumores BRCA1 y BRCA2 (Villarreal-Garza et al., 2015). En cuanto a la dieta, un análisis efectuado en el norte del país demostró que el exceso en el consumo de carbohidratos simples incrementa el riesgo a desarrollar tumores mamarios (Arceo-Martínez et al., 2021).

### **1.2.3 Subtipo molecular del cáncer de mama**

La clasificación correcta del cáncer de mama es fundamental para comprender el desarrollo de la enfermedad y predecir una respuesta al tratamiento. Esta patología se caracteriza por su marcada heterogeneidad, por consiguiente, suele categorizarse en distintos subtipos. El subtipo molecular se basa en la presencia o ausencia de receptores hormonales y se divide en 4 categorías: Luminal A, Luminal B, HER2 positivo y triple negativo. Los receptores analizados son el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) (Xiong et al., 2025).

El subtipo triple-negativo carece de expresión de ER, PR y HER2. Este subtipo representa el 20% de los casos de cáncer de mama y su prevalencia en mujeres menores de 40 años de edad ha ido en aumento. El subtipo triple negativo suele detectarse en etapas avanzadas incrementando su agresividad. En contraste, el subtipo Luminal A se caracteriza por la presencia de ER y PR, ausencia de HER2 y una baja expresión del marcador de proliferación celular Ki-67. Es el subtipo más común al representar el 50% de los casos y se asocia con un crecimiento lento y una tasa alta de supervivencia. El subtipo Luminal B presenta una expresión alta de

ER, baja o nula expresión de PR y una elevada expresión de Ki-67; estas características lo hacen más agresivo en comparación al Luminal A. Se presenta en el 15% de los casos y se ha observado un alto porcentaje de recurrencia. (Orrantia-Borunda et al., 2022).

Por último, el subtipo HER2 positivo (HER2+) constituye el 15% de los casos. Se caracteriza por presentar una sobreexpresión del receptor HER2 y ausencia de los receptores ER y PR. Esta sobreexpresión se ha asociado con un alto índice de recurrencia y metástasis (Orrantia-Borunda et al., 2022). Debido a estas características, el subtipo HER2+ fue el enfoque principal de esta investigación.

### **1.3 Características del cáncer de mama HER2+**

El cáncer de mama HER2+ presenta un fenotipo tumoral más agresivo en comparación con el subtipo luminal A y B. Este se caracteriza por una alta tasa proliferativa, un mayor riesgo de metástasis y una mayor probabilidad de recurrencia (Łukasiewicz et al., 2021). De acuerdo con la Breast Cancer Research Foundation, la tasa de supervivencia en este subtipo supera el 90% cuando el cáncer se diagnostica en etapas tempranas. No obstante, se ha registrado que alrededor del 20% de los pacientes presentan recurrencia en un periodo de 5 años, así como metástasis en cerebro (J. Yang et al., 2022).

#### **1.3.1 Epidemiología en México**

En México, la distribución de los subtipos moleculares de cáncer de mama refleja la heterogeneidad de la enfermedad. Un análisis multicéntrico reportó que el 65% de los casos corresponden a subtipos luminales, el 21% a HER2+ y el 16% a triple negativo (Arceo-Martínez et al., 2021).

En el Hospital General 72 del IMSS, en la Ciudad de México, un análisis de 1,380 pacientes realizado en 2015 reportó una prevalencia de 8.6% en casos de HER2+, 56% en luminal A, 19% en luminal B y 14% en triple negativo (Pérez-Rodríguez,

2015). Más recientemente, en Tabasco, un estudio retrospectivo realizado entre 2015 a 2023 registró una prevalencia de 8.6% HER2+, 56% en luminal A, 19% en luminal B y 16.4% en triple negativo (Cabrales-Santiago et al., 2025).

Un estudio desarrollado en el Centro Médico Nacional de Occidente del IMSS entre 2011 y 2014 demostró un incremento progresivo en los casos HER2+, pasando de 9% en 2011, 8.9% en 2012, 13.8% en 2013 y 15.9% en 2014 (Martínez-Silva et al., 2020), lo que resalta la importancia de mantener una vigilancia constante sobre este subtipo.

### **1.3.2 Biología del receptor HER2**

El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/*ErbB2*) es un oncogén ubicado en el cromosoma 17 y transcribe una glicoproteína transmembranal de 185 kDA. Este receptor está conformado por tres dominios principales: un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio tirosina quinasa (Mitri et al., 2012).

HER2 pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) compuesta por HER1/EGFR, HER2, HER3 y HER4. Esta familia de receptores se caracteriza por formar homodímeros o heterodímeros que inducen la fosforilación del dominio tirosina quinasa e iniciar diferentes cascadas de señalización celular (Orphanos & Kountourakis, 2012). A diferencia de otros receptores, HER 2 no tiene un ligando específico identificado. Sin embargo, se ha reportado que tiene una alta afinidad para formar heterodímeros con HER1, HER3 y HER4, debido a su lenta tasa de internalización y degradación. El complejo HER2/HER3 es considerado el heterodímero más común y potente para la activación de vías de señalización (Rubin & Yarden, 2001).

Los heterodímeros conformados con HER2 son esenciales para activar vías de proliferación y supervivencia celular. Las principales vías de señalización involucradas son PI3K/AKT, MAPK/ERK y PLC- $\gamma$  (Figura 2). La vía PI3K/AKT regula la síntesis proteica y regula la supervivencia celular, mientras MAPK/ERK y PLC- $\gamma$  están involucradas en la proliferación celular, migración y adhesión celular (Pan et al., 2024).

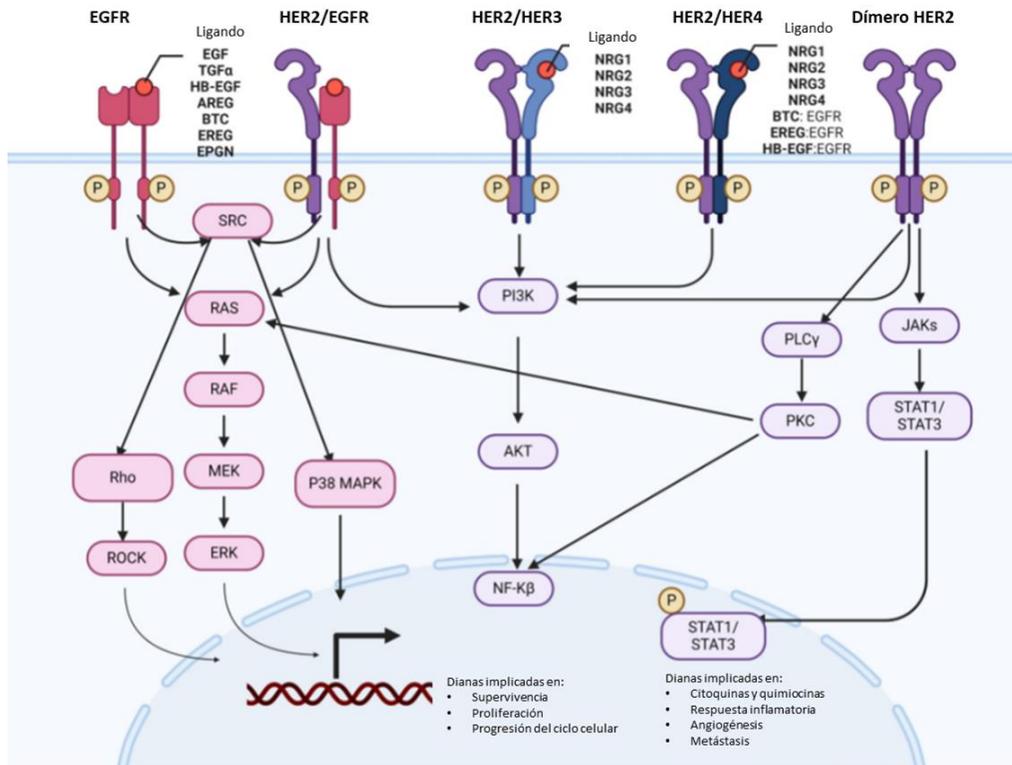


Figura 2. Señalización mediada por HER2. Esquema de la familia de receptores HER/EGFR, sus ligandos específicos, la formación de heterodímeros con HER2 y las cascadas de señalización activadas (Imagen obtenida y modificada de Cheng, 2024).

### 1.3.3. Señalización de HER2 en la progresión del cáncer

En condiciones fisiológicas, el receptor HER2 se encuentra en equilibrio, regulando un crecimiento celular normal. En un entorno tumoral, HER2 se encuentra amplificado y fosforilado de manera constante, lo que genera una regulación al alza y provoca hiperactivación de múltiples vías de señalización (Carvalho et al., 2025).

La sobreactivación de la vía PI3K/AKT/mTOR es mediada principalmente por la formación excesiva del heterodímero HER2/HER3. Esta vía se ha asociado con proliferación descontrolada, ya que la proteína quinasa B (AKT) regula a más de 100 sustratos intracelulares. Un ejemplo relevante es la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), sustrato crítico de AKT. En condiciones normales, GSK3 regula proteínas del ciclo celular; sin embargo, en un ambiente tumoral es fosforilada e inactivada por AKT, esto promueve la estabilidad y acumulación de la ciclina D1, favoreciendo la progresión del ciclo celular (Miricescu et al., 2020).

Asimismo, la vía PI3K/AKT contribuye a la evasión de apoptosis; AKT fosforila a los factores de transcripción FOXO, inhibiendo la expresión de genes de la familia BCL-2. Por otra parte, esta vía también incrementa la expresión del factor de crecimiento vascular (VEGF) a través de HIF-1 $\alpha$ , promoviendo la angiogénesis tumoral (Peng et al., 2022).

Otra vía fundamental asociada a HER2 es MAP/ERK, que se relaciona con la supervivencia y progresión de los pacientes con cáncer de mama. La sobreexpresión de HER2 promueve el reclutamiento de la proteína adaptadora GRB2, lo que conduce a la activación de RAS y al inicio de la cascada de señalización RAS-RAF-MEK-ERK. Esta ruta culmina en la activación de factores de transcripción como JUN, ELK-1 y ETS1/2, reguladores de genes relacionados a proliferación (Carvalho et al., 2025). Asimismo, la hiperactivación de esta vía se ha identificado como un factor determinante en la sensibilidad y resistencia a diferentes fármacos (Rocca et al., 2022).

HER2 también tiene la capacidad de formar homodímeros, los cuales promueven la activación de la vía PLC- $\gamma$ /PKC. La activación de PLC- $\gamma$  desencadena la hidrólisis de PIP2 en IP3 y activa a la familia de las proteínas quinasas C (PKC), la isoforma PKC $\alpha$  ha mostrado relevancia en cáncer de mama HER2+. La vía PLC- $\gamma$ -PKC $\alpha$ -NF- $\kappa$ B se ha asociado a un fenotipo tumoral más agresivo, PKC $\alpha$  promueve la

degradación del inhibidor de I $\kappa$ B, lo que permite a NF- $\kappa$ B translocar al núcleo y activar genes como ciclinas y proteínas antiapoptóticas (Chandran et al., 2015)

Finalmente, la vía JAK/STAT es activada por los dímeros EGFR/HER2 o por los homodímeros de HER2. Aunque su papel ha sido motivo de debate, diferentes estudios han mostrado que STAT3 está asociado con metástasis y la transición epitelial-mesenquimal (EMT). Por su cuenta, STAT5 participa en la diferenciación de glándulas mamarias; sin embargo, su activación anómala se ha vinculado con el inicio de la tumorigénesis en cáncer de mama (Temple & Walker, 2025).

## **1.4 Terapias contra cáncer de mama HER2+**

### **1.4.1 Tratamientos convencionales para cáncer de mama**

El tratamiento para el cáncer de mama se compone principalmente de terapias locales (cirugía y radioterapia) y terapias sistémicas (quimioterapia, terapia hormonal e inmunoterapia). La elección del abordaje más seguro y eficiente para el paciente debe basarse en el grado de diferenciación tumoral, la etapa clínica y la clasificación molecular (Burguin et al., 2021).

En la Tabla 2 se presenta un resumen del abordaje terapéutico en cáncer de mama. La cirugía, radioterapia y quimioterapia se utilizan de forma rutinaria en todos los subtipos, mientras que las terapias dirigidas se aplican de acuerdo con los receptores sobreexpresados en la membrana celular. En los subtipos luminal A y B, la terapia endocrina emplea moduladores del receptor de estrógeno e inhibidores de aromatasa. En el caso del cáncer de mama HER2+, el tratamiento se basa en terapias dirigidas mediante anticuerpos monoclonales específicos contra este receptor (Palmero Picazo et al., 2021).

Tabla 2. Tratamientos comunes para cáncer de mama y sus efectos adversos

<b>Categoría</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Efectos adversos comunes</b>
Cirugía	Mastectomía	Extracción total del tejido mamario	- Complementación con radioterapia - Hematomas - Infección postoperatoria - Dolor crónico
	Lumpectomía	Extracción del tumor con márgenes sanos	
Radioterapia	Radiación localizada	Daño al ADN y promueve apoptosis	- Cardiotoxicidad - Fibrosis del tejido - Alteraciones pulmonares
Quimioterapia	<b>Antraciclinas</b> Doxorrubicina Epirubicina	Intercalación en el ADN, inhibición de topoisomerasa II y generación de especies reactivas de oxígeno	- Cardiotoxicidad - Alopecia - Náusea y vómitos - Mielosupresión
	<b>Agentes alquilantes</b> Carboplatino Ciclofosfamida	Alquilación del ADN e inhibición de la replicación	- Supresión de la medula ósea - Náusea y vómitos - Cistitis hemorrágica
	<b>Taxanos</b> Paclitaxel Docetaxel	Estabilización de microtúbulos e inhibición de mitosis	- Alopecia - Mielosupresión - Neuropatía periférica
	<b>Antimetabolitos</b> 5-fluorouracilo Capecitabina	Inhibe la síntesis del ADN y ARN	- Toxicidad general - Mielosupresión - Síndrome mano-pie
Terapia endocrina	<b>Moduladores del ER</b> Tamoxifeno	Bloqueo de señalización de estrógeno	- Síntomas menopaúsicos - Riesgo de trombosis - Riesgo a cáncer de útero
	<b>Inhibidores de aromataasa</b> Anastrozol Exemestano Letrozol	Bloqueo de síntesis de estrógeno	- Osteoporosis - Mialgias - Sofocos
Terapia dirigida a HER2	<b>Anticuerpos</b> Pertuzumab Trastuzumab	Bloqueo de la señalización de HER2	- Cardiotoxicidad - Náusea y vómitos - Alopecia

Referencias: (Burguin et al., 2021; Traves & Cokenakes, 2021; Waks & Winer, 2019)

#### **1.4.1.1 5-fluorouracilo como agente de interés**

A pesar de contar con más de 50 años en el mercado, el 5-Fluorouracilo (5-FU) continúa siendo un fármaco esencial en el tratamiento del cáncer colorrectal y cáncer de mama. Debido a su relevancia clínica y a su relación con los objetivos de esta investigación, a continuación se describen sus mecanismos de acción.

El 5-FU es un antimetabolito análogo del uracilo, que tras su administración es metabolizado por la enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), presente en hígado, mucosa intestinal y otros tejidos. La acción de DPD genera tres metabolitos activos principales: Fluorodesoxiuridina-monofosfato (FdUMP), Fluorouridina-trifosfato (FUTP) y fluorodesoxiuridina-trifosfato (FdUTP) (Figura 3). El FUTP puede incorporarse al ARN; interfiere en el proceso de transcripción, reduce la síntesis de proteínas y causa toxicidad celular. Mientras el metabolito FdUTP se inserta en el ADN, lo cual ocasiona inestabilidad genética y errores de replicación (Roskoski, 2024).

El metabolito más relevante es FdUMP, este funciona como un inhibidor de la enzima timidilato sintasa (TS). Esta enzima es encargada de la conversión de desoxiuridina monofosfato (dUMP) en timidina monofosfato (dTMP), dicha inhibición genera una deficiencia de nucleótidos de timidina. Este efecto genera un desequilibrio en el conjunto de los desoxirribonucleótidos, interrumpe la replicación del ADN, provoca daños en la secuencia genética y eventualmente conduce a la muerte celular (Longley et al., 2003).

Una de las principales limitaciones de 5-FU es la amplia variedad de efectos adversos asociados a su inespecificidad. Entre los más frecuentes se incluyen náuseas, vómitos, mielosupresión y el síndrome mano-pie. Diversos estudios han reportado cardiotoxicidad, con manifestaciones como arritmias, dolor torácico y alteraciones en el electrocardiograma (ECG) (Jurczyk et al., 2021).

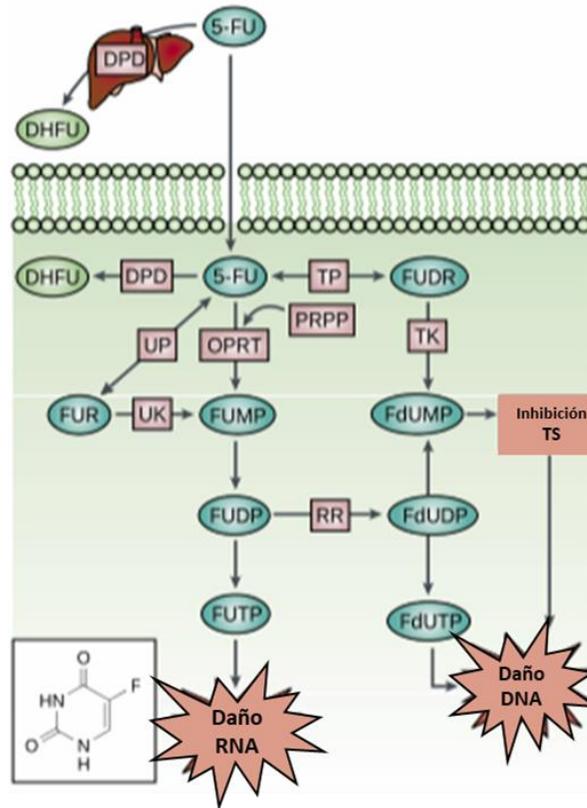


Figura 3. Metabolismo y mecanismo de acción completo del 5-fluorouracilo al ser administrado (Imagen obtenida y modificada de Longley et al., 2003).

Además, pacientes tratados con 5-FU, especialmente sobrevivientes de cáncer de mama, han reportado síntomas neurológicos a largo plazo; este efecto se conoce como “Chemo brain”. Los síntomas reportados incluyen confusión, pérdida de memoria, desorientación y dificultad para concentrarse; los cuales impactan significativamente en la calidad de vida de los pacientes (Raffa & Tallarida, 2019). Aunque la persistencia de estos síntomas varía entre meses y años después de finalizar el tratamiento, es imperativo buscar nuevas alternativas que disminuyan los efectos adversos.

#### 1.4.2 Terapias dirigidas a cáncer de mama HER2+

Como se ha mencionado anteriormente la sobreexpresión de HER2 provoca la hiperactivación de múltiples vías de señalización. La terapia dirigida a este receptor se centra en bloquear dicha activación, con el objetivo de frenar la progresión tumoral.

El desarrollo de tratamientos específicos contra HER2 ha mejorado de manera significativa el pronóstico de los pacientes que padecen este subtipo de cáncer. Entre las principales estrategias terapéuticas se encuentran: los anticuerpos monoclonales, los inhibidores del dominio tirosina quinasa y los anticuerpos monoclonales conjugados con fármacos citotóxicos (Tabla 3).

Tabla 3. Tratamientos dirigidos al receptor HER2 en cáncer de mama

Categoría	Tratamiento	Mecanismo de acción	Efectos adversos comunes
Anticuerpos monoclonales	Trastuzumab	Unión al dominio IV de HER2: inhibe dimerización y activa citotoxicidad dependiente de anticuerpos	- Cardiotoxicidad - Reacción alérgica
	Pertuzumab	Unión al dominio II de HER2: inhibe la heterodimerización HER2/HER3	- Diarrea - Neutropenia - Cardiotoxicidad
	Margetuximab	Unión al dominio IV de HER2: mejora de respuesta inmune	- Cardiotoxicidad - Dolores musculares
Inhibidores de tirosina quinasa	Lapatinib	Inhibidor del dominio tirosina quinasa de EGFR y HER2	- Diarrea - Náusea y vómito - Erupción cutánea
	Neratinib	Inhibidor irreversible del dominio tirosina quinasa de EGFR, HER2 y HER4.	- Diarrea grado 3 - Náusea y vómito
	Tucatinib	Inhibidor del dominio tirosina quinasa de HER2	- Diarrea - Náusea y vómito - Fatiga
	Pyrotinib	Inhibidor irreversible de tirosina quinasa de receptor HER2, EGFR y HER4	- Anemia - Diarrea - Vómito
Anticuerpos conjugados	T-DM1	Anticuerpo HER2 + inhibidor de microtúbulos emtansina: provoca arresto celular	- Hepatotoxicidad - Trombocitopenia - Fatiga
	T-Dxd	Trastuzumab + deruxtecan Inhibición de topoisomerasa I	- Toxicidad pulmonar - Mielosupresión

Referencias:(Cheng, 2024; Mercogliano et al., 2023; Stanowicka-Grada & Senkus, 2023; Swain et al., 2023)

### 1.4.2.1 Trastuzumab como agente de interés

Trastuzumab (TTZ) fue aprobado en 1998 como el primer terapéutico dirigido a cáncer de mama HER2. A continuación, se describe su mecanismo de acción debido a su relevancia en los objetivos de esta investigación.

TTZ es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 que se une de manera específica al dominio IV extracelular del receptor HER2. Esta unión tiene como finalidad bloquear la activación de las vías de señalización río abajo como PI3K/AKT y MAPK /ERK. Sin embargo, se ha demostrado que su mecanismo de acción es multifactorial; en la Figura 4 se representan los diferentes mecanismos propuestos para explicar la actividad antitumoral del fármaco.

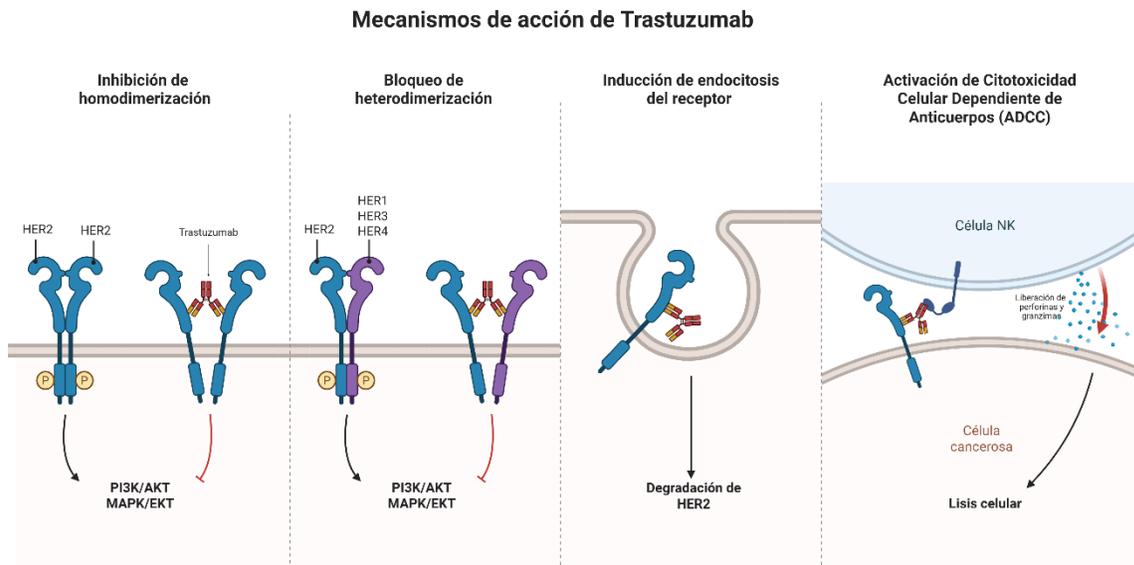


Figura 4. Mecanismos de acción del anticuerpo Trastuzumab. Imagen creada en: <https://BioRender.com>

Entre sus mecanismos principales, TTZ impide la dimerización de HER2 con otros miembros de su familia; en particular la formación del heterodímero HER2/HER3, considerado el más oncogénico. Asimismo, inhibe la formación de homodímeros de HER2 y favorece la endocitosis mediada por receptor y posteriormente la degradación del receptor (Orphanos & Kountourakis, 2012).

Además de sus efectos directos sobre la señalización, trastuzumab estimula la respuesta inmunitaria contra las células tumorales mediante la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Burguin et al., 2021). En este mecanismo, las células efectoras inmunes, principalmente linfocitos NK, reconocen a las células recubiertas por TTZ a través de la fracción FC del anticuerpo y liberan perforinas y granzimas. Las perforinas generan poros en la membrana plasmática, permitiendo la entrada de granzimas, lo que activa la cascada de apoptosis mediada por caspasas (Swain et al., 2023)

Diversos estudios clínicos han demostrado que la combinación de trastuzumab con quimioterapias mejora significativamente las tasas de supervivencia, lo que consolidó a TTZ como la primera línea de tratamiento para pacientes con cáncer de mama HER2+. No obstante, se ha reportado que aproximadamente dos tercios de pacientes no responden inicialmente al tratamiento y pacientes con una respuesta favorable desarrollan resistencia con el tiempo. Entre los mecanismos de resistencia adquirida se encuentran la activación de vías de señalización alternas, como la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-IR) y mutaciones somáticas en las moléculas involucradas en las vías de señalización, por ejemplo, en la subunidad p110 $\alpha$  de PI3K (Maadi et al., 2021).

Por otra parte, TTZ puede ocasionar diversos efectos adversos como reacciones alérgicas y cardiotoxicidad. Estudios clínicos han demostrado que la cardiotoxicidad no depende de la dosis administrada y su incidencia aumenta de manera considerable cuando se administra en combinación con antraciclinas (Lin et al., 2021).

### **1.5 Nanomedicina en cáncer**

Las terapias convencionales contra el cáncer han contribuido de manera significativa a mejorar la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, presentan limitaciones como resistencia al tratamiento, accesibilidad desigual, toxicidad

sistémica y presencia de efectos adversos severos. Estos retos han impulsado la búsqueda de alternativas terapéuticas más eficaces y seguras.

La nanotecnología ha atraído atención debido a las propiedades únicas de los nanomateriales. Su amplio potencial en aplicaciones biomédicas ha dado origen al subcampo conocido como nanomedicina (Abbasi Kajani et al., 2021). La nanomedicina se define como la aplicación médica de materiales a escala nanométrica (1-100 nm) aplicada en sistemas biológicos (Sahu & Casciano, 2014). Este campo abarca el desarrollo de biosensores, plataformas de diagnóstico, técnicas de bioimagen, sistemas de liberación de fármacos y plataformas teranósticas.

Las terapias basadas en nanopartículas para cáncer ofrecen múltiples ventajas: permiten acarrear fármacos quimioterapéuticos, aumentar su estabilidad, dirigirlos al sitio tumoral y, en consecuencia, mejorar su eficiencia y reducir la toxicidad sistémica (Rasool et al., 2022). Además, este tipo de terapia puede contribuir a combatir la resistencia a los tratamientos convencionales. Actualmente se reporta que existen 15 nanofármacos aprobados a nivel mundial, entre ellos destacan liposomas cargados con doxorubicina (Doxil) y nanopartículas de albúmina con paclitaxel (Abraxane) (Fan et al., 2023).

En cáncer de mama se han investigado diversos sistemas de liberación de fármacos, entre ellos liposomas, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono, micelas, dendrímeros y nanopartículas poliméricas. Estos acarreadores tienen como objetivo principal transportar los fármacos a través de las barreras biológicas y permitir su liberación selectiva en el sitio tumoral. Hasta el momento únicamente Doxil, Lipodoxil y Myocet, liposomas cargados con doxorubicina, han sido aprobados para su uso en el tratamiento del cáncer de mama. Por otro lado, dendrímeros y micelas cargadas con paclitaxel se encuentran actualmente en fase II de sus ensayos clínicos, mostrando resultados prometedores para su futura aplicación (Tagde et al., 2022).

Entre estos sistemas, las nanopartículas metálicas han recibido especial atención debido a sus propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas únicas, las cuales han abierto camino a aplicaciones avanzadas como detección molecular, la imagenología por contraste y la terapia fototérmica. Dentro de este grupo, las nanopartículas de oro (AuNPs) sobresalen entre las demás por su estabilidad y versatilidad.

### **1.5.1 Nanopartículas de oro en cáncer**

Las nanopartículas de oro (AuNPs) han emergido como uno de los nanomateriales más relevantes en investigación biomédica debido a su amplia gama de propiedades y aplicaciones. Una de sus principales ventajas es la facilidad de síntesis, esta puede lograrse mediante métodos químicos convencionales (reducción de sales de oro) o a través de síntesis verde (uso de extractos vegetales y agentes biológicos) (Singh et al., 2018).

Las AuNPs pueden obtenerse en diferentes tamaños y morfologías, como esferas, estrellas, jaulas, dependiendo de las condiciones de síntesis. Estas características definen propiedades fundamentales como el color, el punto de fusión, la conductividad eléctrica y la absorbancia óptica. Asimismo, la naturaleza inerte del oro le confiere una alta biocompatibilidad con sistemas biológicos, lo que refuerza su potencial para uso oncológico (Y. Yang et al., 2022).

En cuestión del tratamiento del cáncer, controlar la forma y el tamaño de las AuNPs es esencial, ya que estos parámetros determinan la superficie disponible para funcionalización. Las AuNPs puede interactuar y conjugarse con una amplia variedad de moléculas, como fármacos, ácidos nucleicos, péptidos o proteínas (Singh et al., 2018); estas interacciones permiten la construcción de nanosistemas multifuncionales que combinan una molécula de direccionamiento con un agente terapéutico.

Otra propiedad de gran relevancia de AuNPs, es el denominado efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR). Dado a que los tejidos tumorales suelen presentar vasculatura anormal y permeable, las nanopartículas pueden atravesar fácilmente las barreras y acumularse en la zona tumoral.

Finalmente, las AuNPs presentan una fuerte absorción en el rango del infrarrojo cercano (NIR), lo que las convierte en candidatas ideales para la terapia fototérmica. Las nanopartículas de oro son capaces de convertir la energía lumínica en calor, generando un incremento localizado de temperatura que induce la muerte celular selectiva en el tejido tumoral. Para esta aplicación, diversos estudios han reportado que el uso de nanobarras de oro es ideal, ya que su morfología optimiza la absorción en el rango NIR (Gao et al., 2021).

## 2. Antecedentes

### 2.1 Terapias con nanosistemas dirigidos a HER2

Diversos estudios han explorado el uso de sistema funcionalizados como tratamiento dirigido a cáncer HER2+. Se han desarrollado nanosistemas conformados por nanopartículas de sílice conjugadas con trastuzumab y doxorubicina (TTZ-SLN/DOX). En ensayos *in vitro* con la línea celular MCF-7, se observó una disminución de la viabilidad celular en un rango de 20 a 60% dependiente de la concentración. Resultados similares se observaron en modelo murino, donde el nanosistema redujo el tamaño del tumor en comparación a la administración de trastuzumab y doxorubicina, lo que sugiere un efecto sinérgico entre las nanopartículas de sílice y los fármacos (Meng et al., 2018).

Otro tipo de nanosistemas prometedores son las nanopartículas anticuerpo-fármaco (ADNs), un ejemplo son los nanorods de paclitaxel conjugadas con trastuzumab. Al emplear este nanosistema en células HER2+ (BT-474 y SK-BR-3) se observó una menor concentración inhibitoria media (IC50) en comparación a la monoterapia, así como una citotoxicidad específica en comparación con las células no cancerosas (MCF-10A). Los datos también confirmaron un efecto de sinergia entre el paclitaxel y trastuzumab en las líneas celulares HER2+ (Abedin et al., 2021).

Este tipo de terapias no solo se limita al cáncer de mama, se han reportado sobreexpresión del receptor HER2 en diversos tipos de cáncer como cáncer gástrico, cáncer de ovario y cáncer de pulmón de células pequeñas (Yan et al., 2015). Kubota y colaboradores desarrollaron un nanosistema con nanopartículas de oro y Trastuzumab (TTZ-AuNPs) el cual fue evaluado en líneas celulares de cáncer gástrico resistente a trastuzumab (MKN7) y sensible al medicamento (NCI-N87). El nanosistema mostró una mayor citotoxicidad y una IC50 menor en ambas líneas celulares en comparación al trastuzumab libre; demostrando un posible mecanismo de acción alternativo (Kubota et al., 2018).

En otro estudio, Źelechowska-Matysiak y colaboradores desarrollaron un nanosistema conformado por doxorubicina y trastuzumab conjugados en nanopartículas de oro (DOX-AuNps-TTZ). Se realizaron ensayos *in vitro* en células de cáncer de ovario SKOV-3 (HER2+) y cáncer de mama MB-231 (HER2 negativo). Se reportó una disminución en la actividad metabólica, correlacionada con la concentración de doxorubicina. El nanosistema redujo la viabilidad celular en comparación con los controles (AuNPs-DOX y AuNPs-TTZ) en células SKOV-3 y en estudios complementarios se observó arresto del ciclo celular, indicando su potencial como terapia dirigida a tumores HER2+ (Źelechowska-Matysiak et al., 2023).

El mismo grupo de trabajo también desarrollo un sistema que integra radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia usando nanopartículas de oro irradiadas, trastuzumab y doxorubicina (DOX-<sup>198</sup>AuNPs-TTZ). Ensayos *in vitro* en las mismas líneas celulares reportaron una mayor citotoxicidad en células HER2+ vinculada a la radiación; indicando un efecto sinérgico entre la quimioterapia y radioterapia (Źelechowska-Matysiak, Salvanou, et al., 2023).

Otra aplicación a explorar de las AuNPs es la terapia fototérmica. Dong y colaboradores diseñaron un nanosistema con nanoesferas realizadas con ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y oro conjugado con un anticuerpo específico anti-HER2 (HER2-GPH-NPs). El ensayo *in vitro* se realizó en células de cáncer de mama SKBR-3 y MDA-MB-231, observando que el nanosistema de manera individual no disminuyó la viabilidad celular más de un 20%. Sin embargo, tras irradiar el nanosistema con un láser NIR durante 10 minutos, la viabilidad celular disminuyo aproximadamente un 60%, concluyendo la importancia de explorar todas las propiedades del oro (Dong et al., 2019).

## 2.2 Antecedentes directos

El grupo de trabajo del laboratorio de Nanomedicina, perteneciente al departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, se ha enfocado en el desarrollo e investigación de nanopartículas de oro dirigidas al tratamiento de cáncer de mama y cáncer de próstata.

En el caso de cáncer de próstata, se desarrollaron diferentes nanosistemas conformados por nanopartículas de oro conjugadas con péptidos dirigidos a Myc y Max (*pMax:AuNPs*, *pMyc:AuNPs*, *pMyc:pMax:AuNPs*). Estos nanosistemas demostraron hemocompatibilidad superior en comparación a las AuNPs sin funcionalizar. Asimismo, se observó un efecto citotóxico significativo en diversas líneas celulares de cáncer de próstata a concentraciones bajas (0.05 – 5 ng/μL) (Longoria-García et al., 2023).

Respecto al cáncer de mama, se diseñó y construyó un nanosistema conformado por AuNPs recubiertas con polietilenglicol (AuNPs-PEG) y un aptámero específico para HER2 (AuNP-PEG-AptHer2) (Figura 5). Este nanosistema presentó un diámetro hidrodinámico de 65.3 nm, una carga superficial de -17.4 mV y la prueba de hemólisis lo clasificó como no hemolítico.

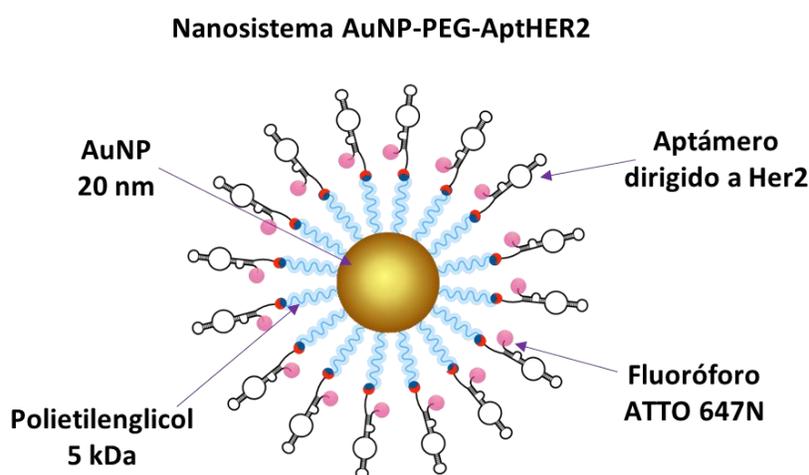


Figura 5. Esquema de los diferentes componentes del nanosistema AuNP-PEG-AptHer2

Estudios *in vitro* de fluorescencia realizados en líneas celulares HER2 positivas (HCC-1954 y ZR-75-30) mostraron una alta intensidad de señal fluorescente en comparación al control, lo que confirmó la capacidad del nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 para unirse al receptor HER2. De igual forma, los ensayos de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT evidenciaron una reducción significativa en la viabilidad celular de las líneas HCC-1954 y ZR-75-30 en relación con una línea celular no cancerosa, exhibiendo la especificidad del nanosistema (Carrión-García et al., 2023). En conjunto, estos resultados sugieren un potencial teranóstico para AuNP-PEG-AptHER2.

Estudios recientes coinciden que la combinación de terapias convencionales con nanopartículas puede generar efectos sinérgicos, incrementar la eficiencia de los tratamientos contra el cáncer y reducir costos (Shrestha et al., 2019). Por ello, la evaluación de una terapia combinada utilizando el nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 representa el siguiente paso en esta línea de investigación.

### 3. Justificación

En México, el cáncer de mama representa un problema de salud pública por el incremento en su incidencia en los últimos años. A pesar de los avances significativos en el tratamiento, las terapias contra el cáncer de mama HER2+ representan un desafío clínico debido a su baja eficiencia terapéutica, la citotoxicidad sistémica y resistencia adquirida a los medicamentos convencionales.

Las terapias basadas en nanopartículas han surgido como una alternativa prometedora para superar algunas de estas limitaciones. Diversos estudios han demostrado que nanosistemas funcionalizados mejoran la especificidad hacia células tumorales y potencian el efecto antineoplásico. Las nanopartículas de oro han destacado como nanomaterial líder debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas y biocompatibilidad. Sin embargo, es necesario seguir investigando su eficacia en combinación con tratamientos para cáncer de mama HER2+.

En este contexto, la presente investigación evaluó el efecto de la combinación del nanosistema AuNP-PEG-AptHER2, trastuzumab y 5-fluorouracilo en células de cáncer de mama HER2+, con el propósito de determinar si existe un efecto sinérgico, aditivo o antagónico, para evaluar si la combinación permite reducir las concentraciones de los fármacos convencionales, disminuyendo la toxicidad sistémica y en un futuro mejorar la eficacia terapéutica para el cáncer de mama HER2+.

## **4. Hipótesis**

La combinación del nanosistema compuesto por nanopartículas de oro y un aptámero dirigido a HER2 (AuNP-PEG-AptHER2) con terapia farmacológica presenta un efecto sinérgico en la reducción de la viabilidad celular en células de cáncer de mama HER2+.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto de un nanosistema compuesto por nanopartículas de oro y un aptámero dirigido al receptor HER2 (AuNP-PEG-AptHER2) en combinación con terapia farmacológica en células de cáncer de mama que sobreexpresan HER2.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Construir y caracterizar un nanosistema compuesto por nanopartículas de oro recubiertas con polietilenglicol (PEG) y un aptámero dirigido al receptor HER2 (AuNP-PEG-AptHER2)
2. Determinar la concentración inhibitoria media (IC50) del nanosistema AuNP-PEG-AptHER2, 5-Fluorouracilo y Trastuzumab en líneas celulares.
3. Evaluar el efecto antagonista o sinérgico de la combinación del nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 con 5-Fluorouracilo y Trastuzumab en líneas celulares.

## 6. Metodología

### 6.1 Esquema general de trabajo

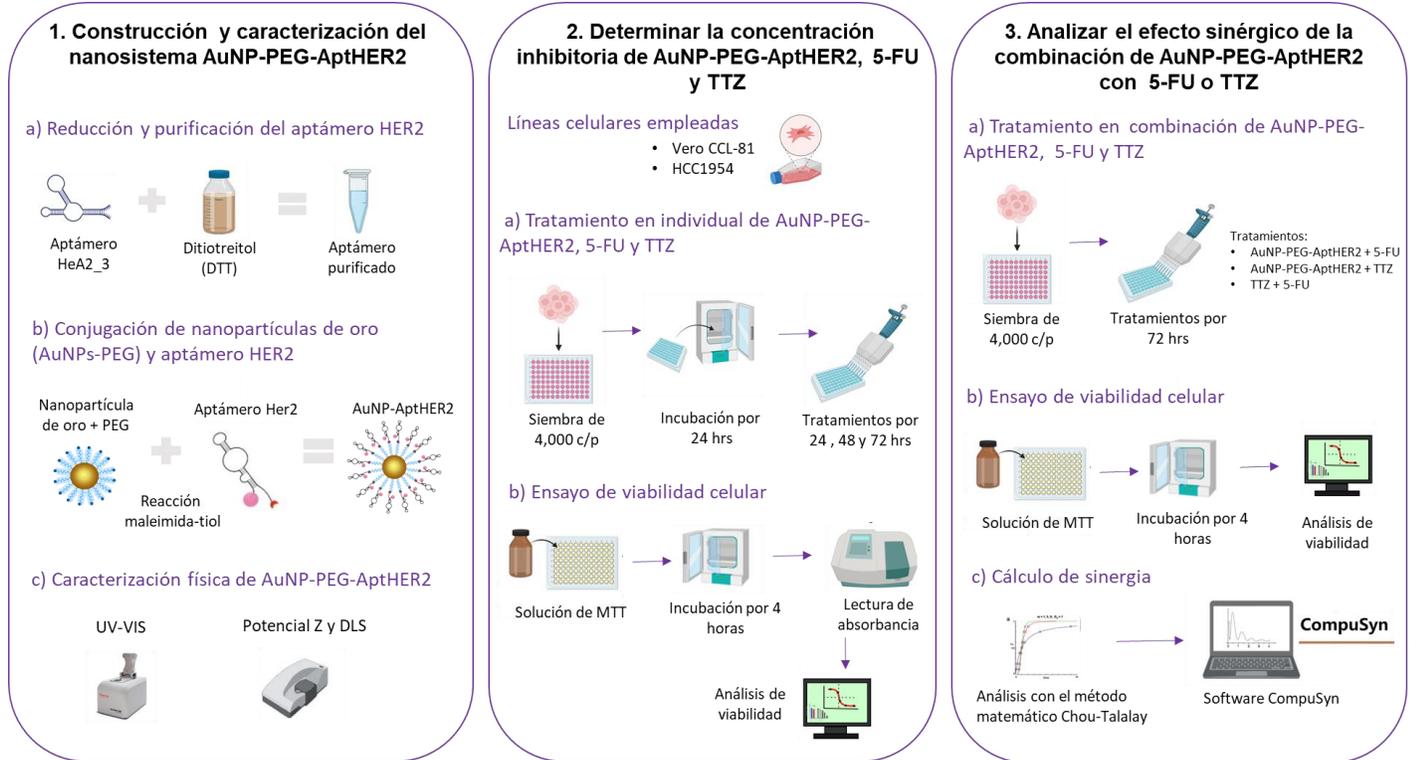


Figura 6. Estrategia general de trabajo correspondiente a los objetivos específicos.

### 6.2 Materiales

#### 6.2.1 Material Biológico

- Línea celular de cáncer de mama HCC-1954 (ATCC)
- Línea celular de tejido epitelial de riñón de mono verde: Vero CCL-81 (ATCC)

#### 6.2.2 Terapias farmacológicas

- Acoflut 5-Fluorouracilo 250 mg (Accord Pharma)
- Herceptin Trastuzumab 440 mg (Roche)

### 6.2.3 Equipos

- Campana de flujo laminar clase II UN425-400 (Nuaire)
- Espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific)
- Incubadora 2310 (VWR International)
- Lector de microplacas Cytation3 Imaging Reader (BioTek)
- Microcentrífuga 5415 C (Eppendorf)
- Microcentrífuga 5430 (Eppendorf)
- Micropipetas de 10, 200 y 1000  $\mu$ L (Eppendorf)
- Microscopio óptico Olympus CKX41SF (Olympus Life Science)
- Thermomixer AG 5350 (Eppendorf)
- Ultracongelador Vip Series (Panasonic)
- Vortex M37615 (Thermolyne)
- Zetasizer Nano ZS590 (Malvern Instruments)

### 6.2.4 Reactivos

- Agua destilada ultrapura (Invitrogen)
- Alcohol etílico Absoluto (CTR Scientific)
- Alcohol isopropílico HPLC (Sigma-Aldrich)
- Anfotericina B (Gibco)
- Aptámero AptHer2 (Integrated DNA Technologies)
- Azul de tripano 0.4 % (Invitrogen)
- Buffer PBS 10 X (Invitrogen)
- Buffer Tris-EDTA (Sigma-Aldrich)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich)
- Etanol grado biología molecular (Sigma-Aldrich)
- Kit de conjugación de nanopartículas de oro 20 nm OligoReady (Cytodiagnostics)
- Kit de proliferación celular I (MTT) (Roche)
- Medio de cultivo Dulbecco's modified eagle (DMEM) (Gibco)
- Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco)

- Penicilina-Estreptomicina PenStrep (Gibco)
- Suero fetal bovino (Corning)
- Tripsina-EDTA 0.05 % (1X) (Gibco)

### **6.2.5 Materiales**

- Botellas para cultivo celular 25 cm (Corning Incorporated)
- Cámara de Neubauer bright-line (Hausser Scientific)
- Columnas Spin-X UF 500 10k (Corning Incorporated)
- Micropipetas de 10, 200 y 1000  $\mu$ L (BioPette Labnet)
- Microplacas para cultivo celular de 96 pocillos (Corning Incorporated)
- Microtubos de 0.6, 1.5 y 2 mL (Heathrow Scientific)
- Pañuelos desechables Kimwipes (Kimtech)
- Pipetas serológicas con filtro COSTAR de 2, 5 y 10 ml (Corning Incorporated)
- Puntillas para micropipetas de 10, 200 y 1000  $\mu$ L con filtro (Axygen Scientific)
- Tubos cónicos de 15 y 50 mL (Corning Incorporated)
- Viales criogénicos 2 mL (Corning Incorporated)

## **6.3 Métodos**

### **6.3.1 Diseño de nanosistema**

El nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 estuvo conformado por nanopartículas de oro comerciales de 20 nm de diámetro recubiertas con polietilenglicol (PEG) de 5 kDa (AuNPs-PEG), y el aptámero HER2 fluorescente (AptHER2) sintetizado por Integrated DNA Technologies con la secuencia 5'- /5ThioMC6-D/TCT AAA AGG ATT CTT CCC AAG GGG ATC CAA TTC AAA CAG/3Cy5Sp/-3' reportada previamente por Gijs y colaboradores (Gijs et al., 2016).

### **6.3.2 Reducción y purificación de aptámero**

El aptámero se ajustó a una concentración de 100  $\mu$ M en buffer TE 1X. Se trasladaron 100  $\mu$ L del aptámero a un microtubo de 1.5 mL y se agregaron 2  $\mu$ L de ditioneitol (DTT) a 0.5 M. Se realizó una incubación a temperatura ambiente y en

obscuridad por dos horas. Posterior a la incubación, el aptámero se colocó en la columna Spin-X UF 500 y se centrifugó por 2 minutos a 735 x g. La pureza del aptámero se confirmó por espectroscopia UV-VIS utilizando el Nanodrop ND-1000 y fue almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **6.3.3 Conjugación de nanopartículas de oro**

La construcción del nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 se realizó siguiendo las instrucciones del kit de conjugación de nanopartículas de oro 20nm OligoREADY™ de Cytodiagnosics. Este kit lleva a cabo la formación de un enlace covalente entre el grupo tiol en el extremo 5' del aptámero y el grupo maleimida del polietilenglicol que recubre las nanopartículas de oro.

A continuación, se describe brevemente el protocolo: en un microtubo se añadieron 60  $\mu\text{L}$  del buffer de conjugación y 48  $\mu\text{L}$  del aptámero AptHER2 a 100  $\mu\text{M}$ . Posteriormente se transfirió 90  $\mu\text{L}$  de la solución de conjugación a un vial con las nanopartículas de oro liofilizadas y se incubó a temperatura ambiente y en obscuridad por 1 hora. Una vez terminada la incubación, se agregó 10  $\mu\text{L}$  de la solución de extinción y se dejó incubando por 15 minutos. La reacción completa se transfirió a un microtubo y se centrifugó durante 30 minutos a 5,500 g. El sobrenadante fue desechado y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de buffer TE 1x pH 7.6 para resuspender el nanosistema (Carrión-García et al., 2023). Se efectuó una lectura en el equipo Nanodrop ND-1000 y, tras realizar los cálculos correspondientes, se obtuvo una concentración final de 537.37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Posteriormente, el nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 fue almacenado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **6.3.4 Caracterización física**

La caracterización del nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 fue necesaria para determinar una correcta conjugación y asegurar la calidad del producto. Se realizó una lectura del espectro de absorbancia del nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 mediante espectroscopía UV-Vis con el equipo Nanodrop ND-1000. Las mediciones se realizaron en un barrido de 200 a 800 nm de longitud de onda, donde se

obtuvieron los espectros de absorción y se registraron las absorbancias a 520 y 646 nm, que corresponden a la longitud de onda de máxima absorción de las nanopartículas de oro (AuNPs-PEG) y del fluoróforo Cy5 presente en el aptámero.

El nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 se ajustó a 2 µg/mL en buffer TE para la evaluación del diámetro hidrodinámico y su carga superficial. El diámetro hidrodinámico se midió por medio de la dispersión dinámica de la luz (DLS), mientras que la carga superficial del nanosistema se determinó mediante el potencial Z. Ambas propiedades fueron obtenidas en el equipo Zetasizer Nano ZS90 de Malvern Instruments en una cubeta de cuarzo con trayecto óptico de 1 cm. (Longoria-García et al., 2023b)

### **6.3.5 Líneas celulares**

En los ensayos *in vitro* se empleó la línea celular HCC-1954 (ATCC) proveniente de carcinoma de mama ductal HER2 positivo. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de una solución antibiótica-antimicótica (estreptomycin, penicilina y anfotericina B). La línea celular Vero CCL-81 (ATCC), derivada de riñón de mono verde africano se utilizó como control negativo no canceroso. Esta línea celular fue cultivada en medio DMEM, igualmente suplementado con 10% de suero fetal bovino (Corning) y 1% de la misma solución antibiótica-antimicótica (Gibco). Las condiciones de cultivo de ambas líneas celulares se mantuvieron a 37 °C y una concentración de CO<sub>2</sub> del 5%.

### **6.3.6 Estandarización del número de células para experimentos**

Previo a iniciar los ensayos *in vitro*, se llevó a cabo una curva de crecimiento de las líneas celulares HCC-1954 y Vero CCL-81 con el objetivo de determinar la densidad celular óptima para los experimentos posteriores. La siembra se realizó en placas de 96 pozos y se evaluaron cantidades iniciales de 2,000, 4,000, 6,000, 8,000 y 10,000 células por pozo. La viabilidad celular se determinó a intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas mediante el ensayo colorimétrico MTT.

### 6.3.7 Evaluación de la citotoxicidad de los tratamientos individuales

Para evaluar los tratamientos, las líneas celulares se cultivaron hasta alcanzar un 70% de confluencia en sus respectivos frascos de cultivo. Posteriormente, se sembraron 4,000 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ L de medio completo en microplacas de 96 pozos. Las placas se incubaron durante 24 horas en condiciones óptimas (37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>) para permitir un periodo de adaptación celular. Transcurrido el periodo de incubación, se retiró el medio y se aplicaron 100  $\mu$ L de cada tratamiento. Los tratamientos fueron preparados en condiciones de esterilidad en medio RPMI-1640 o medio DMEM según la línea celular evaluada. Los tratamientos y concentraciones evaluadas se especifican en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones a evaluar de manera individual en ambas líneas celulares

Tratamiento a evaluar	Concentración ( $\mu$ g/mL)
5-fluorouracilo	0.02, 0.2, 2, 20, 200, 2,000, 20,000
Trastuzumab	0.01 0.1, 1, 10, 100, 1,000, 10,000
AuNP-PEG-AptHER2	2, 4, 8, 16

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, incluyendo un control negativo (células no tratadas) y un control positivo (tratamiento con DMSO al 10%). La viabilidad celular se determinó en periodos de 24, 48 y 72 horas después de la administración de los tratamientos.

Para el ensayo de MTT, se preparó una solución de trabajo en una proporción de 10  $\mu$ L de MTT por cada 100  $\mu$ L de medio; se retiró el medio con el tratamiento de las placas para evitar interferencias y se añadieron 100  $\mu$ L de la solución de trabajo. Las placas se incubaron por un periodo de 4 horas a 37 °C, tras lo cual los cristales de formazán se disolvieron agregando 100  $\mu$ L de isopropanol acidificado a pH 3. Finalmente, la absorbancia se midió a 570 nm y 651 nm en el lector de microplacas BioTek Cytation 3 Imaging Reader.

Los porcentajes de viabilidad celular se obtuvieron con la siguiente formula:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{(\text{Abs problema} - \text{Abs blanco})}{(\text{Abs control} - \text{Abs blanco})} * 100$$

Una vez determinado el porcentaje de viabilidad celular de cada concentración y tratamiento, los datos fueron ingresados al software de GraphPad PRISM para realizar el análisis estadístico, generar una curva dosis-respuesta a partir del modelo de regresión no lineal y obtener la concentración inhibitoria media (IC50).

### 6.3.8 Evaluación de citotoxicidad de los tratamientos en combinación

La metodología para determinar el efecto en la viabilidad celular se realizó de forma semejante al tratamiento en individual. Las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos y fueron incubadas en sus condiciones óptimas. Considerando los resultados previos, se decidió evaluar en combinación una única concentración de AuNPs-PEG-AptHER2 (2 µg/mL) y dos concentraciones distintas de los fármacos, seleccionadas en función de cada línea celular. Las concentraciones utilizadas para los tratamientos en combinación se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones a evaluar en combinación por cada línea celular.

Tratamiento a evaluar	Concentración en Vero CCL-81 (µg/mL)	Concentración en HCC-1954 (µg/mL)
AuNP-PEG-AptHER2 + 5-fluorouracilo	2 µg/mL + 2 y 200 µg/mL	2 µg/mL + 4 y 400 µg/mL
AuNP-PEG-AptHER2 + Trastuzumab	2 µg/mL + 100 y 2,000 µg/mL	2 µg/mL + 100 y 1,500 µg/mL
5- fluorouracilo + Trastuzumab	2 y 200 µg/mL + 100 y 2,000 µg/mL	4 y 400 µg/mL + 100 y 1,500 µg/mL

Las células fueron expuestas al tratamiento en combinación durante 72 horas. Después de la administración, se agregó el reactivo de MTT y se siguió la metodología mencionada en la sección anterior.

### **6.3.9 Determinación de Sinergia**

El modelo matemático Chou-Talalay fue utilizado para determinar si existe un efecto de sinergia o antagonismo entre los tratamientos utilizados. El método proporciona un Índice de combinación (CI), un valor cuantitativo que describe la interacción farmacodinámica entre tratamientos (Duarte & Vale, 2022). Los cálculos se realizaron en el software CompuSyn, donde se ingresaron los datos de los tratamientos de manera individual y los resultados del tratamiento en combinación.

Con base en el modelo matemático: un  $CI < 1$  indica sinergia, es decir, la combinación de fármacos produce un mayor efecto a la suma de los efectos individuales. Un  $CI = 1$  corresponde a un efecto aditivo, donde la combinación de fármacos produce un efecto equivalente a la suma de los efectos por separado. Un  $CI > 1$  señala antagonismo, lo que implica que la combinación es menos efectiva que los fármacos de manera individual (Chou, 2010).

### **6.3.10 Análisis estadístico**

El análisis estadístico y la elaboración de gráficas se realizaron en el software GraphPad Prism. Los resultados de viabilidad celular se analizaron mediante una prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba post hoc Bonferroni, donde se compararon los grupos con tratamiento frente al grupo control sin tratamiento.

## 7. Resultados

### 7.1 Caracterización física de AuNP-PEG-AptHER2

#### 7.1.1 Espectroscopia UV-VIS

En la Figura 7, se muestran los espectros de absorción correspondientes a los componentes individuales y al nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 después del proceso de conjugación. El espectro de absorción del aptámero presentó dos picos de absorción esperados a 260 nm y 646 nm (Figura 7a), el primero correspondiente a la secuencia de ácidos nucleicos y el segundo correspondiente al fluoróforo presente. No se detectaron lecturas adicionales que indiquen residuos del proceso de reducción previo. El espectro de las nanopartículas de oro recubiertas con PEG (Figura 7b) mostró un pico de absorbancia definido a 520 nm, esto concuerda con lo reportado en el kit de conjugación de Cytodiagnosics. Finalmente, el espectro de absorción de nuestro nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 (Figura 7c) presentó tres picos de absorbancia correspondientes a cada uno de sus componentes, confirmando una correcta conjugación.

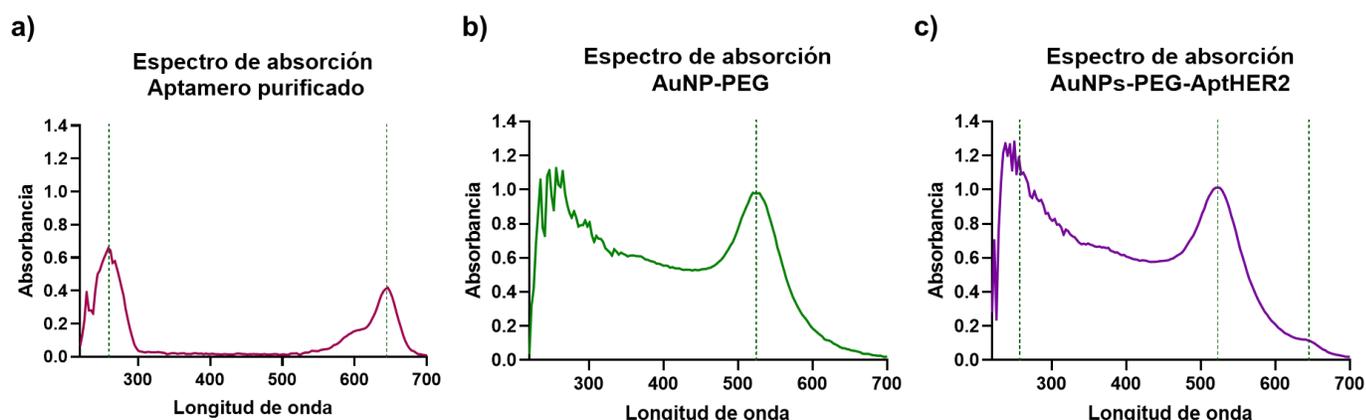


Figura 7. Espectro de absorción UV-VIS de los componentes del nanosistema. a) Espectro del aptámero reducido y purificado b) Espectro de las nanopartículas de oro recubiertas de polietilenglicol (AuNPs-PEG) c) Espectro de absorción del nanosistema AuNP-PEG-AptHER2

### 7.1.2 Diámetro hidrodinámico

En la Figura 8, se observa la distribución del tamaño hidrodinámico de las nanopartículas conjugadas presentes en la muestra. El análisis por dispersión dinámica de la luz reveló que el diámetro hidrodinámico promedio del nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 es  $65.30 \pm 1.1$  nm.

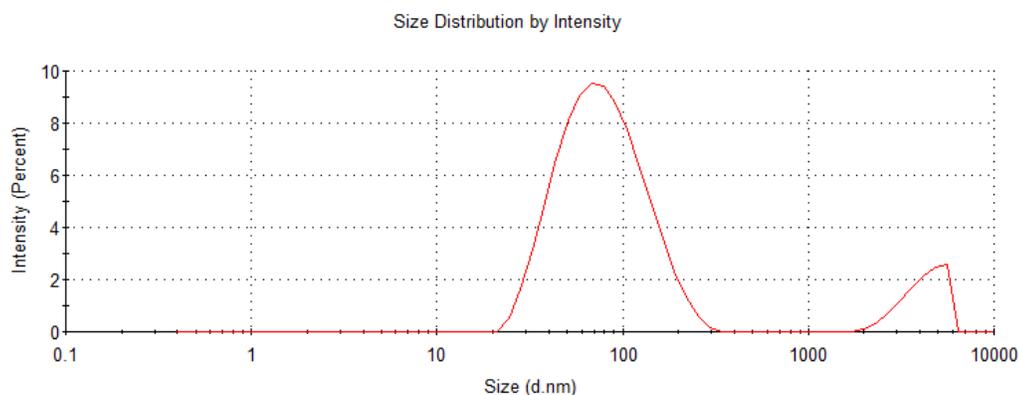


Figura 8. Grafica representativa del diámetro hidrodinámico de AuNP-PEG-AptHER2

### 7.1.3 Potencial Z

Para finalizar la caracterización del nanosistema, se evaluó la carga eléctrica superficial del nanosistema mediante el potencial Z. En la Figura 9 se observa la gráfica del potencial Z indicando que el nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 registró una carga superficial de  $-8.4 \pm 0.43$  mV.

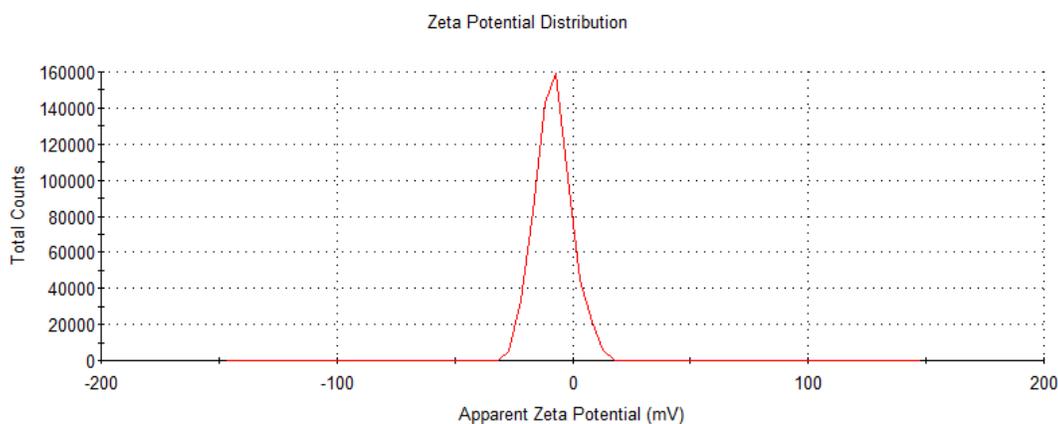


Figura 9. Grafica representativa del potencial Z de AuNP-PEG-AptHER2

## 7.2 Evaluación de la viabilidad celular de los tratamientos individuales

### 7.2.1 Estandarización del número de células para ensayos experimentales

En ambas graficas de la Figura 10, se observa un aumento en la absorbancia en relación al tiempo de incubación. En la Figura 10a, las densidades celulares más altas de la línea celular HCC-1954 (6,000-10,000 células) mostraron una absorbancia similar a las 72 horas. Mientras que la densidad de 4,000 células tuvo una cinética intermedia y la densidad más baja de 2,000 células no mostró una tendencia clara de crecimiento.

En la gráfica representativa de la línea celular Vero CCL-81 (Figura 10b) se observa que todas las densidades celulares presentaron un aumento en la absorbancia excepto la cantidad de 2,000 células. Las densidades mayores (6,000-10,000 células) alcanzaron un pico de absorbancia máximo a las 48 horas mientras que a las 72 horas se observa un descenso en la absorbancia. La densidad celular de 4,000 células registró un crecimiento exponencial y no se reportó una disminución a las 72 horas. Debido a estos resultados, se determinó que el número óptimo para nuestros experimentos fuera de 4,000 células por pocillo en ambas líneas, debido a que presentó menor variabilidad en las lecturas de absorbancia.

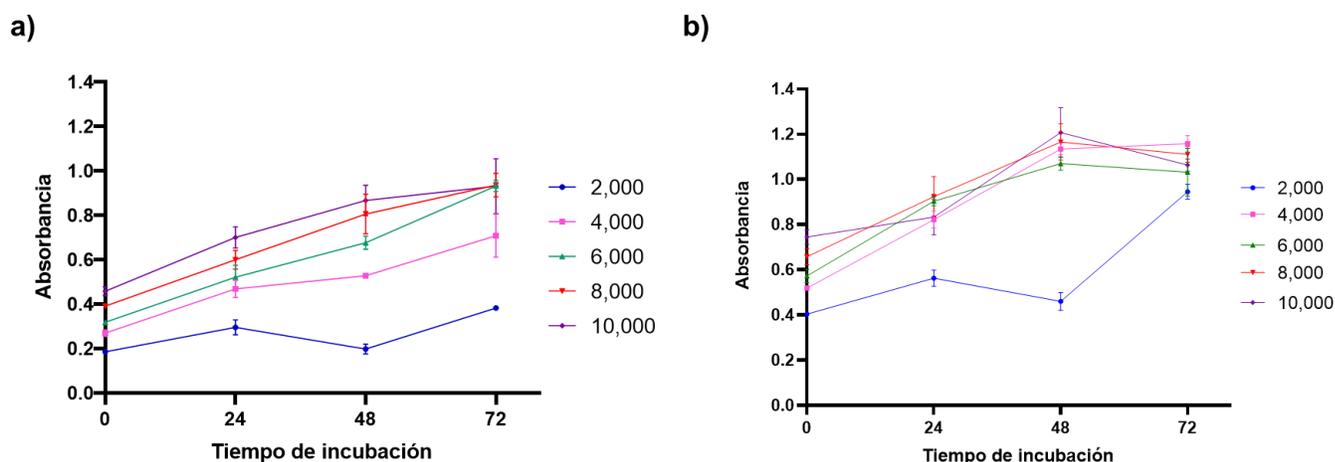


Figura 10. Curvas de crecimiento tras siembra con distintas densidades celulares. a) Viabilidad celular en la línea HCC-1954 b) Viabilidad celular en la línea Vero CCL-81

## 7.2.2 Tratamiento de 5-Fluorouracilo a diferentes tiempos

La evaluación de la viabilidad celular se inició con diferentes concentraciones del medicamento 5-fluorouracilo (0.2, 2, 20, 200, 2,000, 20,000  $\mu\text{g/mL}$ ) en la línea celular HCC-1954 durante 24, 48 y 42 horas. En la Figura 11 se presenta el efecto en función del tiempo y la concentración en la línea celular HCC-1954. Los tratamientos a 48 y 72 horas mostraron una disminución dependiente de la concentración en comparación al tratamiento a 24 horas. Dentro de los tiempos evaluados, la concentración de 20,000  $\mu\text{g/mL}$  presentó la mayor citotoxicidad con un rango de viabilidad entre 21-28% en los tres tiempos de incubación

Durante el tratamiento a 24 horas (Figura 11a), el rango de concentraciones de 0.02 – 20  $\mu\text{g/mL}$  registraron una viabilidad celular igual o superior al 77%. Únicamente la concentración de 20,000  $\mu\text{g/mL}$  registró la mayor reducción de viabilidad significativa a  $28.1 \pm 3.6\%$ . Una tendencia similar se observó a las 48 horas donde el rango de 0.02 – 200  $\mu\text{g/mL}$  obtuvieron valores de viabilidad mayores al 80%. Únicamente las concentraciones de 2,000 ( $73.63 \pm 6.6\%$ ) y 20,000  $\mu\text{g/mL}$  ( $23.67 \pm 1.29\%$ ) mostraron una disminución significativa en comparación al control (Figura 11b).

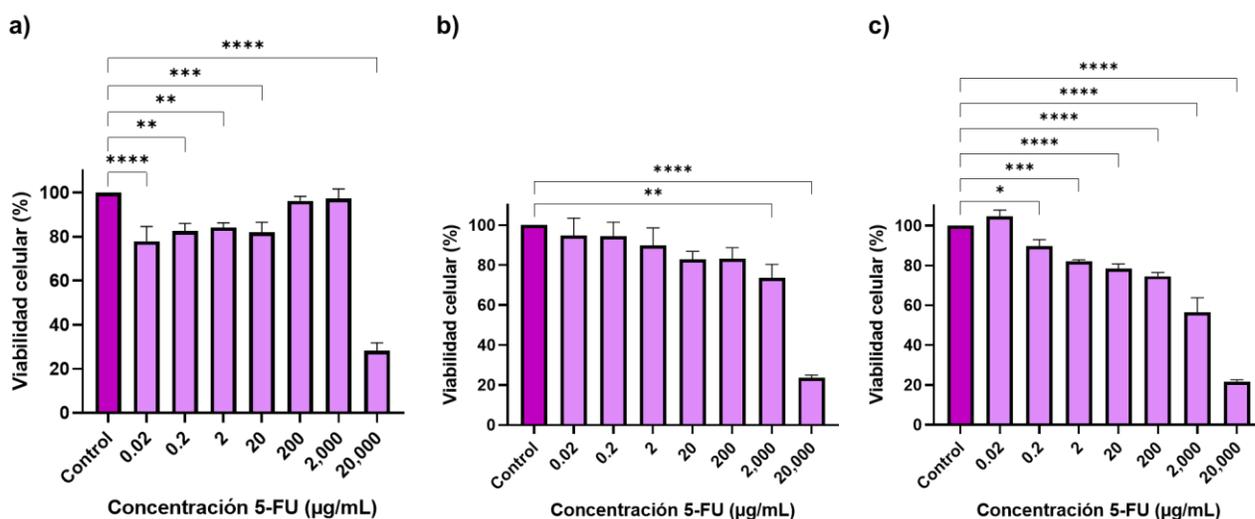


Figura 11. Viabilidad celular con tratamiento de 5-FU en la línea celular HCC-1954 a diferentes tiempos. a) Tratamiento por 24 horas b) Tratamiento por 48 horas c) Tratamiento por 72 horas. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significativa vs. Control. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . \*\*\*  $p < 0.0050$  \*\*  $p < 0.0020$  \*  $p < 0.020$

En la Figura 11C que corresponde al periodo de 72 horas, mostró que el rango de concentraciones bajas continuó manteniendo la viabilidad en un rango mayor al 80%. Los mayores efectos en la viabilidad se observaron en el rango de 2,000-20,000  $\mu\text{g/mL}$ .

Con el objetivo de graficar una curva dosis-efecto y calcular la concentración inhibitoria media (IC50), se realizó un segundo ensayo empleando un nuevo rango de concentraciones de 5-FU (1,000, 2,000, 3,000, 5,000, 10,000, 15,000, 20,000  $\mu\text{g/mL}$ ). Este segundo ensayo se realizó únicamente en periodos de 48 y 72 horas, debido a que el tratamiento a 24 horas no obtuvo un efecto dependiente de dosis.

En los resultados a 48 horas presentados en la Figura 12a, se muestra una disminución progresiva de la viabilidad conforme a la concentración del 5-FU. Las concentraciones más altas mostraron una reducción mayor al 50%, mientras que las concentraciones de 1,000 a 3,000  $\mu\text{g/mL}$  mantuvieron la viabilidad por encima del 60%. En el periodo de 72 horas el efecto citotóxico fue más notorio, destacando la reducción de la viabilidad de las concentraciones más altas: 20,000  $\mu\text{g/mL}$  a un  $14.18 \pm 2.2 \%$ , 10,000  $\mu\text{g/mL}$  a  $15.78 \pm 1.02 \%$  y 5,000  $\mu\text{g/mL}$  a  $28.96 \pm 2.06 \%$ .

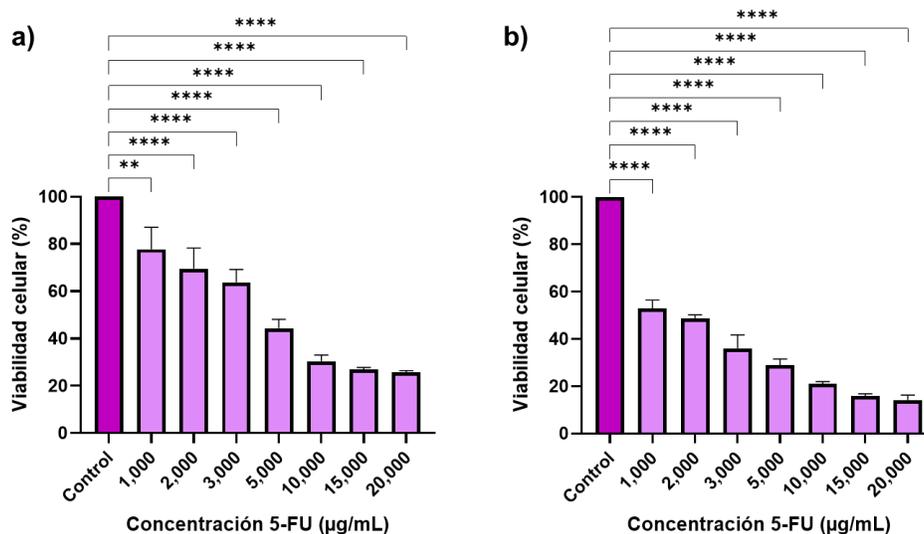


Figura 12. Segundo rango de tratamiento con 5-FU en la línea celular HCC-1954 a 24 y 48 horas. a) Tratamiento por 48 horas b) Tratamiento por 72 horas. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significada vs. Control. \*\*\*\* p < 0.0001. \*\*\* p < 0.0050 \*\* p < 0.0020 \* p < 0.020

Con los resultados se obtuvo un rango de viabilidad intermedia, especialmente a las 72 horas. Se utilizó el modelo de regresión lineal para calcular la IC50 a 72 horas de 5-FU en la línea celular HCC-1954 (Figura 13), obteniendo una IC50 de 1,334  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

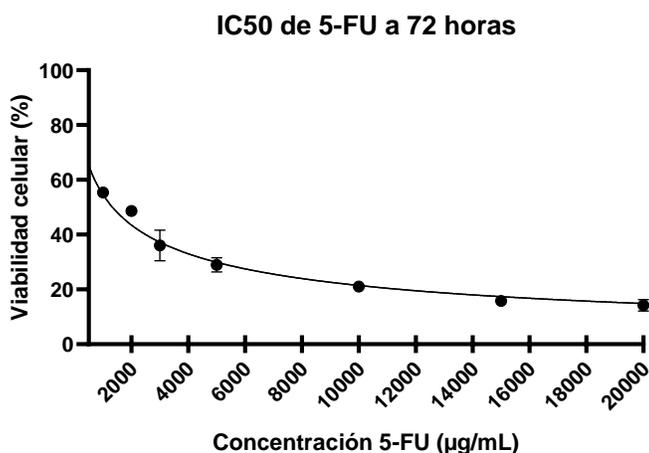


Figura 13. Curva dosis-efecto para concentración media inhibitoria de 5-fluorouracilo en HCC-1954

Se analizó el efecto de 5-FU en la línea no cancerosa Vero CCL-81 con las mismas concentraciones iniciales que HCC-1954 (rango de 0.02, - 20,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y en los mismos tiempos de exposición (Figura 14). Durante el tratamiento a 24 horas en la Figura 14a, se mantuvo la viabilidad por encima del 75% excepto por la concentración 20,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $68.15 \pm 2.7\%$ ). Las concentraciones más bajas (0.02 y 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtuvieron porcentajes cercanos al control ( $94.7 \pm 1.9\%$  y  $98.11 \pm 3.7\%$ ).

A 48 horas, las concentraciones entre 0.02 – 2,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mantuvieron una viabilidad por encima del 80% y se evidenció una diferencia significativa solo en las concentraciones mayores. La viabilidad celular disminuyó a  $47.53 \pm 4.3\%$  con 20,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y a  $65.7 \pm 2.84\%$  con 2,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 14b). Por último, a 72 horas el efecto citotóxico fue más pronunciado en todas las concentraciones (Figura 14c). La concentración mayor presentó una viabilidad de  $41.8 \pm 1.9\%$ , mientras que la concentración menor de 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  registró un  $85.89 \pm 1.1\%$

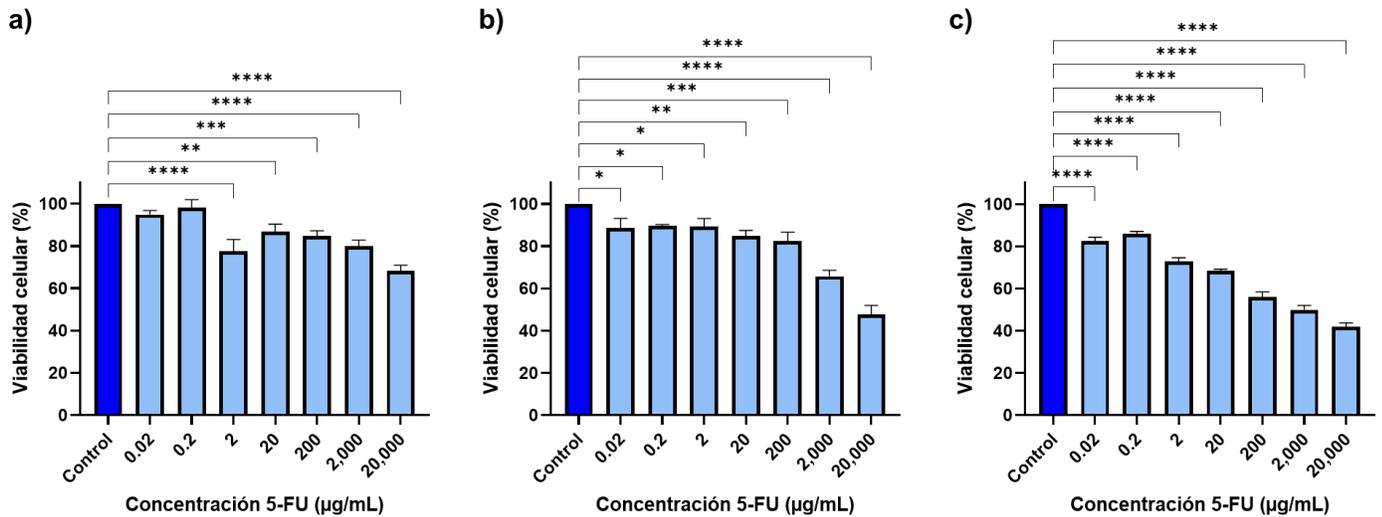


Figura 14. Viabilidad celular con tratamiento de 5-FU en la línea celular Vero CCL-81 a diferentes tiempos. a) Tratamiento por 24 horas b) Tratamiento por 48 horas c) Tratamiento por 72 horas. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significada vs. Control. \*\*\*\* p <0.0001. \*\*\*p <0.0050 \*\* p <0.0020 \*p <0.020

De igual manera que en HCC-1954 se evaluó un segundo rango (1,000 - 20,000 µg/mL) de 5-FU con tiempos de exposición de 48 y 72 horas. En la Figura 15a se muestran los resultados a 48 horas donde el rango de concentraciones presentó una viabilidad moderada en un rango de 45 – 63%. A las 72 horas se observó una disminución mayor a comparación del control, manteniendo la viabilidad celular en un rango de 30-42% (Figura 15b).

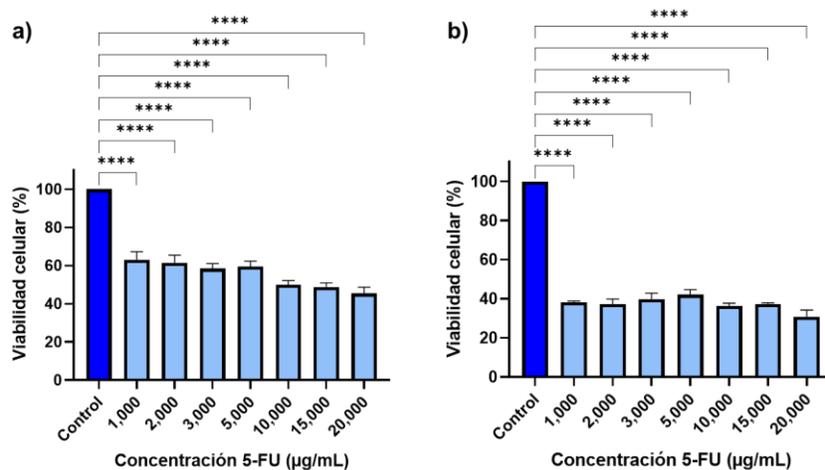


Figura 15. Segundo rango de tratamiento con 5-FU en la línea celular Vero CCL-81 a 24 y 48 horas. a) Tratamiento por 48 horas b) Tratamiento por 72 horas. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significada vs. Control. \*\*\*\* p <0.0001. \*\*\*p <0.0050 \*\* p <0.0020 \*p <0.020.

Partiendo de los datos obtenidos a las 72 horas se realizó el modelo de regresión lineal mostrado en la Figura 16 donde se obtuvo una IC50 de 416  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 72 horas en Vero CCL-81.

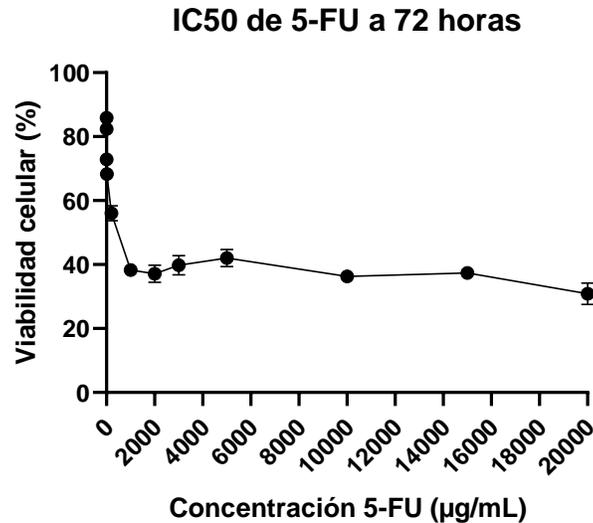


Figura 16. Curva dosis-efecto para concentración media inhibitoria de 5-fluorouracilo en Vero CCL-81

### 7.2.3 Tratamiento de TTZ a diferentes tiempos

Una vez obtenidos los resultados con el fármaco 5-FU se realizaron los ensayos con el anticuerpo Trastuzumab (TTZ) en un rango de 1 – 10,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en ambas líneas celulares por los periodos de incubación de 24, 48 y 72 horas.

En la Figura 17 se presentan los primeros resultados del tratamiento con TTZ. En los tres tiempos de exposición se logró observar una disminución de manera significativa solo en la concentración mayor de 10,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dicha concentración incrementó su efecto con el tiempo de exposición, siendo más evidente a las 72 horas (24 horas =  $43.8 \pm 5.7\%$ , 48 horas =  $25.3 \pm 4.0\%$ , 72 horas =  $18.2 \pm 3.3\%$ ). El rango de concentraciones de 1 – 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no mostró un efecto citotóxico en los diferentes tiempos de exposición.

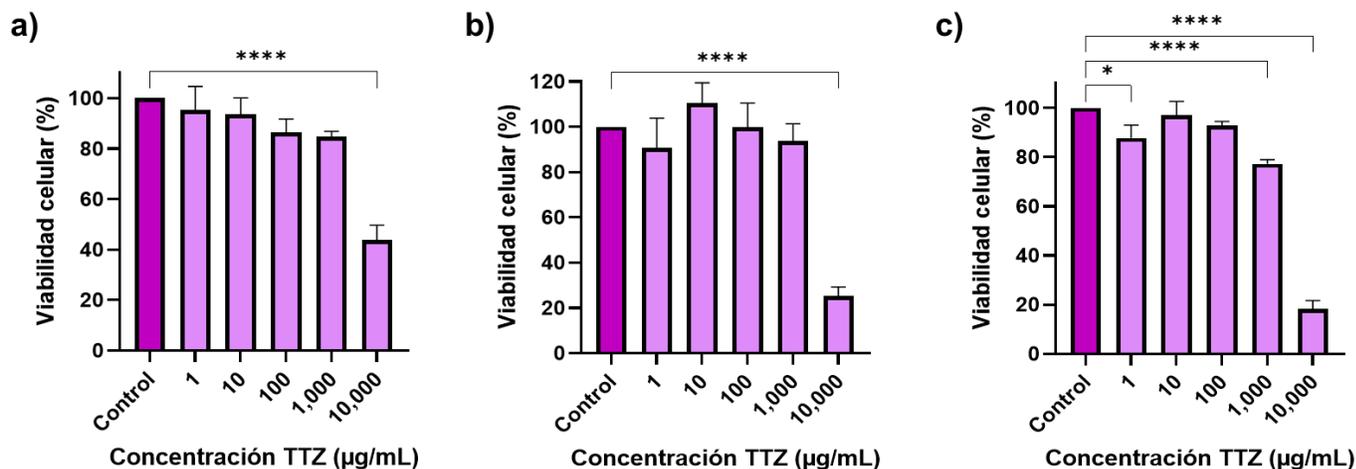


Figura 17. Viabilidad celular con tratamiento de TTZ en la línea celular HCC-1954 a diferentes tiempos a) Tratamiento a 24 horas b) Tratamiento a 48 horas c) Tratamiento a 72 horas. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significativa vs. Control. \*\*\*\* p <0.0001. \*\*\*p <0.0050 \*\* p <0.0020 \*p <0.020

Similar al tratamiento con 5-FU, se realizó un segundo ensayo utilizando concentraciones intermedias de TTZ (2,000 – 10,000 µg/mL) con tiempos de 48 y 72 horas con el objetivo de un rango más preciso para el cálculo de la IC50 (Figura 18). En el tratamiento a 48 horas se observó una disminución progresiva de viabilidad celular conforme aumentaba la concentración del anticuerpo. Las concentraciones de 10,000, 8,000 y 6,000 µg/mL mostraron valores similares ( $20.19 \pm 1.6\%$ ,  $22.58 \pm 2.3\%$  y  $27.61 \pm 1.4\%$ , respectivamente), mientras que la concentración baja de 2,000 µg/mL presentó una viabilidad elevada ( $92.3 \pm 4.7\%$ ).

A las 72 horas se siguió observando una disminución con el aumento de la concentración (Figura 18b). Las concentraciones altas registraron un rango de viabilidad de 16%-22%, mientras que las concentraciones bajas de 4,000 y 2,000 µg/mL presentaron viabilidades de  $48.36 \pm 0.4\%$  y  $82.50 \pm 4.08\%$ , estos resultados confirman un efecto dependiente de dosis y efecto.

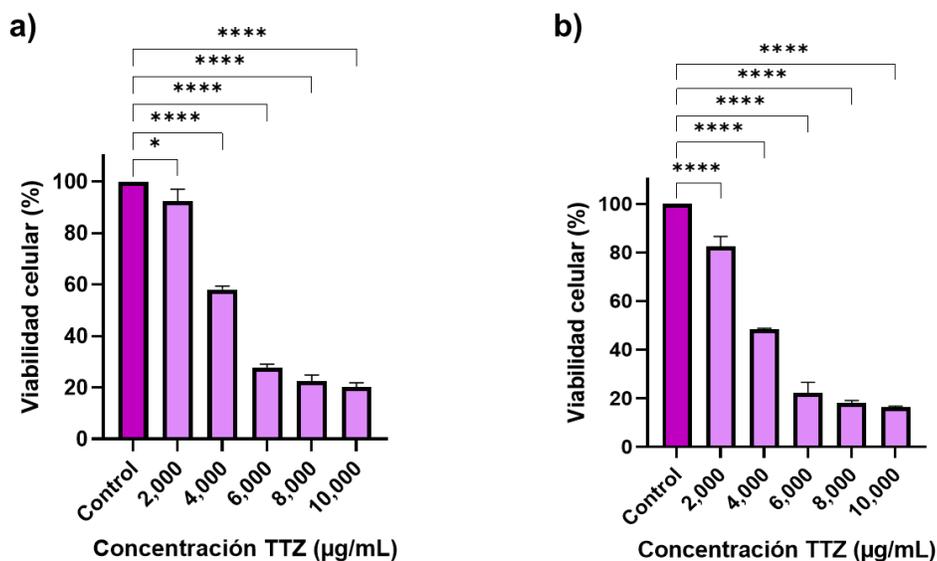


Figura 18. Segundo rango de tratamiento con TTZ en la línea celular HCC-1954 a 24 y 48 horas. a) Tratamiento a 48 horas b) Tratamiento a 72 horas. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significativa vs. Control. \*\*\*\* p < 0.0001. \*\*\*p < 0.0050 \*\* p < 0.0020 \*p < 0.020

Con base en los resultados obtenidos se determinó que el rango de 2,000 – 10,000 µg/mL a 72 horas es el adecuado para determinar la IC50 de TTZ. La IC50 a 72 horas de exposición con trastuzumab es de 3,856 µg/mL (Figura 19).

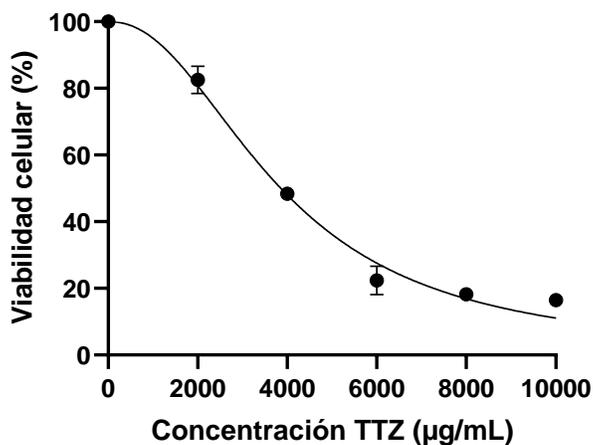


Figura 19. Curva dosis-efecto para concentración media inhibitoria de trastuzumab en HCC-1954.

Se realizó la evaluación del tratamiento con TTZ en la línea celular no cancerosa Vero CCL-81 con el rango de concentraciones de 1 – 10,000 µg/mL por los periodos de incubación de 24, 48 y 72 horas (Figura 20).

Similar a lo observado en HCC-1954, se observó una disminución de manera significativa en la concentración mayor de 10,000  $\mu\text{g/mL}$  a las 72 horas (24 horas =  $48.5 \pm 3.1\%$ , 48 horas =  $58.1 \pm 4.3\%$ , 72 horas =  $25.7 \pm 2.05\%$ ). En la Figura 20b referente al tratamiento a las 48 horas, se observa un comportamiento anormal debido al aumento en la viabilidad celular en comparación a lo observado a las 24 horas. El tratamiento a 72 horas registró un efecto dependiente de tiempo solo en la concentración de 10,000  $\mu\text{g/mL}$ .

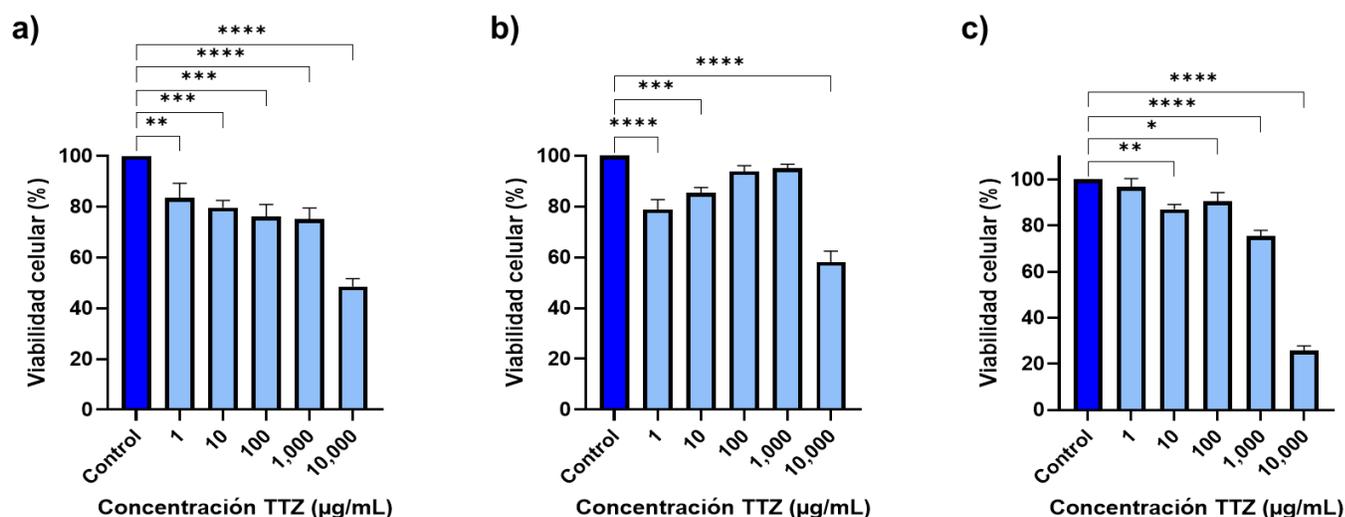


Figura 20. Viabilidad celular con tratamiento de TTZ en la línea celular Vero CCL-81 a diferentes tiempos a) Tratamiento a 24 horas b) Tratamiento a 48 horas c) Tratamiento a 72 horas. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significada vs. Control. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . \*\*\*  $p < 0.0050$  \*\*  $p < 0.0020$  \*  $p < 0.020$

Para asegurar una correcta caracterización del efecto de trastuzumab, se evaluó un segundo rango de concentraciones (2,000 – 10,000  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 48 y 72 horas. A 48 horas (Figura 21a) se observó una reducción moderada de la viabilidad celular con un rango de 30-77%. Mientras que en el tratamiento a 72 horas se observó un patrón dependiente de la concentración, el tratamiento a 10,000  $\mu\text{g/mL}$  presentó valores de  $27.07 \pm 1.6\%$  de viabilidad mientras que la concentración de 2,000  $\mu\text{g/mL}$  obtuvo un porcentaje de viabilidad de  $74.60 \pm 5.2\%$ . La  $\text{IC}_{50}$  de trastuzumab a 72 horas fue de 4,457  $\mu\text{g/mL}$ , valor superior al obtenido en la línea celular HCC-1954 (Figura 22).

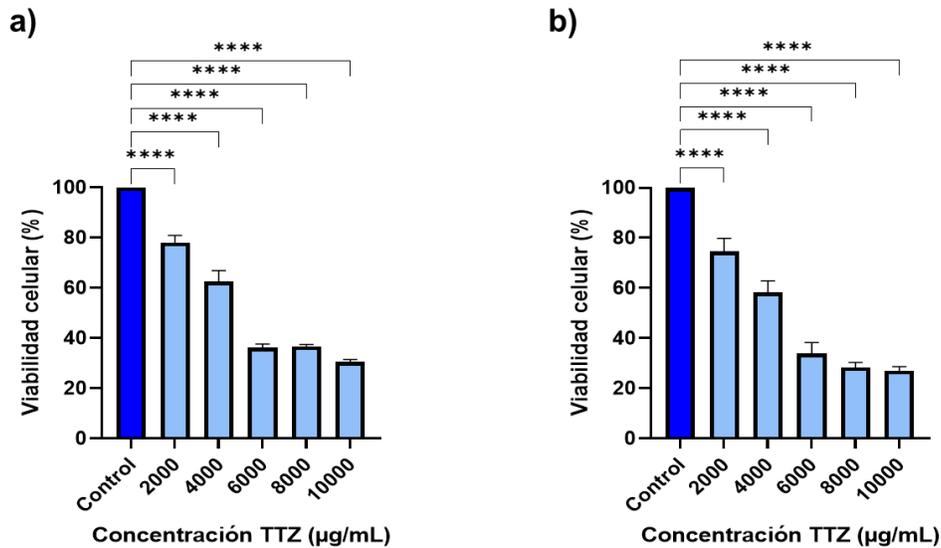


Figura 21. Segundo rango de tratamiento con TTZ en la línea celular Vero CCL-81 a 24 y 48 horas a) Tratamiento a las 48 horas b) Tratamiento a las 72 horas. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significada vs. Control. \*\*\*\* p <0.0001. \*\*\*p <0.0050 \*\* p <0.0020 \*p <0.020

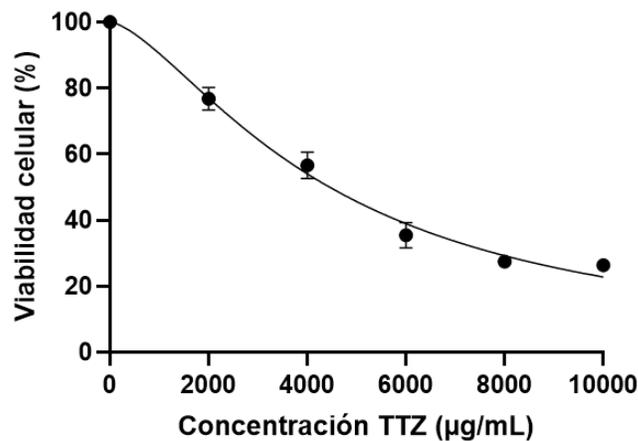


Figura 22. Curva dosis-efecto para concentración media inhibitoria de trastuzumab en Vero CCL-81

#### 7.2.4 Tratamiento de AuNP-PEG-AptHER2

Una vez realizados los análisis de ambos fármacos se procedió con las pruebas de citotoxicidad del nanosistema AuNP-PEG-AptHER2. Debido a que ambos fármacos presentaron un efecto mayor a 72 horas, los ensayos con el nanosistema se realizaron en dicho tiempo de exposición.

En la Figura 23 podemos observar los resultados para ambas líneas celulares. En las células de cáncer de mama, la concentración más baja (2  $\mu\text{g/mL}$ ) registró una viabilidad de  $78.43 \pm 3.9\%$ , con un incremento progresivo en la viabilidad celular en las concentraciones mayores:  $80.42 \pm 3.56\%$  para 4  $\mu\text{g/mL}$ , de  $84.43 \pm 5.2\%$  para 8  $\mu\text{g/mL}$  y  $90.29 \pm 5.4\%$  para 16  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 23a). Sin embargo, al análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas.

El tratamiento en células no cancerosas Vero CCL-81 mostró baja citotoxicidad, con valores de viabilidad superiores al 72%, y un ligero efecto dependiente de la dosis en comparación a las células HCC-1954 (Figura 23b). La concentración más alta (16  $\mu\text{g/mL}$ ) registró una viabilidad de  $72.54 \pm 2.73 \%$ , mientras que la concentración más baja (2  $\mu\text{g/mL}$ ) presentó la viabilidad más elevada con  $82.77 \pm 2.68\%$ . Cabe destacar que el resultado de la concentración más baja usada en HCC-1954 fue comparable con el resultado obtenido en la concentración más alta de Vero CCL-81.

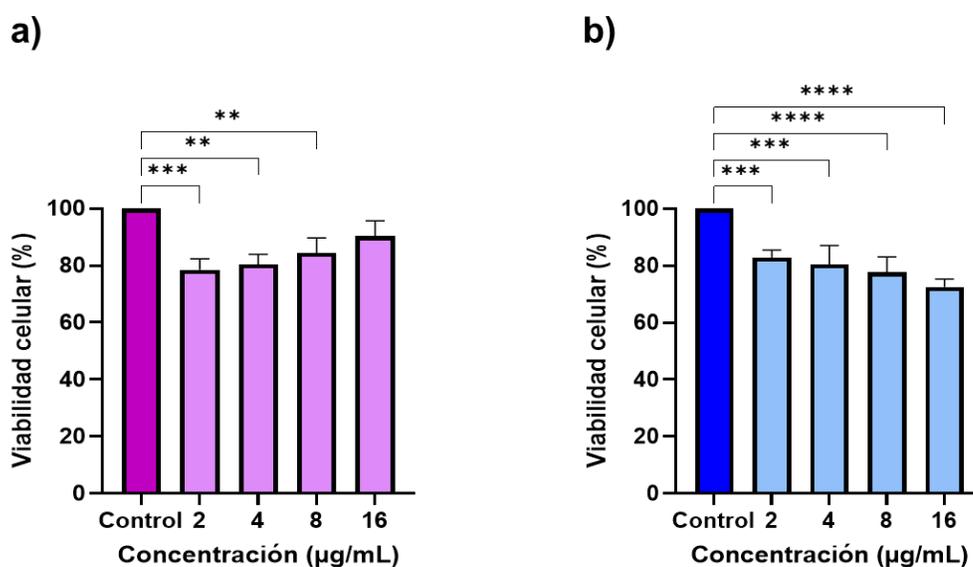


Figura 23. Viabilidad celular con tratamiento de AuNP-PEG-AptHER2 en ambas líneas celulares a) Tratamiento en línea celular HCC-1954 a 72 horas b) Tratamiento en línea celular Vero CCL-81 a 72 horas. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significativa vs. Control. \*\*\*\* p < 0.0001. \*\*\*p < 0.0050 \*\* p < 0.0020 \*p < 0.020

### **7.3 Tratamiento en combinación**

Para evaluar el efecto citotóxico del tratamiento combinado se seleccionó la concentración fija de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AuNP-PEG-AptHER2, debido a que en resultados previos no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones analizadas y 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mostró la mayor disminución en la viabilidad celular de la línea de cáncer. Con base en ello, se evaluó el efecto citotóxico de la combinación de AuNP-PEG-AptHer2 (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con dos concentraciones distintas de 5-FU y dos concentraciones distintas de TTZ tras 72 horas de exposición. Las concentraciones de los fármacos fueron definidas a partir de una matriz de efecto esperado elaborada con los datos obtenido en experimentos preliminares.

#### **7.3.1 Tratamiento en combinación con 5-FU**

En la Figura 24a, se muestran los resultados obtenidos para la línea celular HCC-1954, tanto para los tratamientos individuales como en combinación. La combinación de AuNP-PEG-AptHER2 + 5-FU en las dos concentraciones analizadas registró un aumento en la viabilidad y no evidenció un efecto potenciador que disminuya la viabilidad. La combinación de AuNP-PEG-AptHER2 + 5-FU 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  registró una viabilidad celular de  $44.14 \pm 3.8\%$ , mientras que la combinación de AuNP-PEG-AptHER2 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 5-FU 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  presentó una viabilidad de  $61.13 \pm 2.5\%$ .

En comparación, los tratamientos individuales de 5-FU mostraron valores de viabilidad de  $37.5 \pm 5.4\%$  para 5-FU 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y  $63.5 \pm 3.6\%$  para 5-FU 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que AuNP-PEG-AptHER2 registró  $76 \pm 5.2\%$ . El análisis estadístico reveló diferencias significativas únicamente entre AuNP-PEG-AptHER2 y las combinaciones. El análisis de sinergia, realizado mediante el modelo matemático Chou-Talalay, arrojó un índice de combinación (CI) mayor a 2.0 para ambas combinaciones; estos resultados demuestran un efecto antagonista entre AuNP-PEG-AptHER2 y 5-FU (Tabla 6).

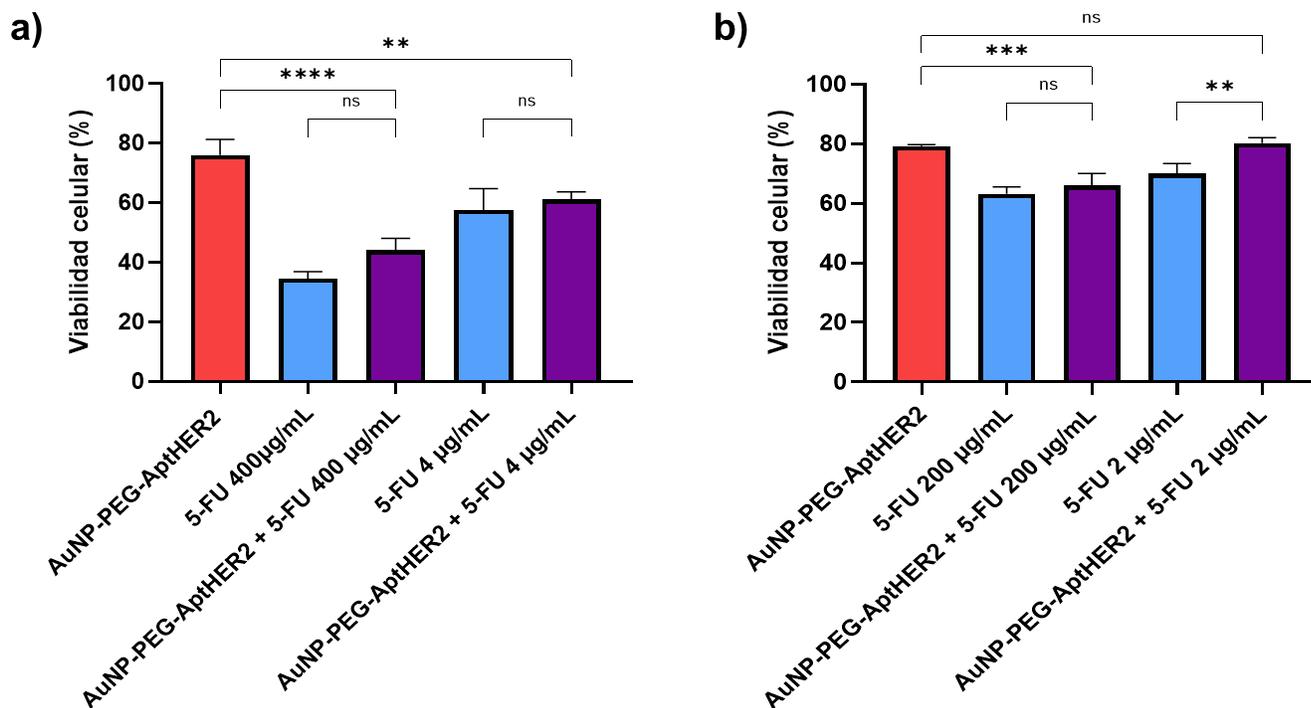


Figura 24. Viabilidad celular en el tratamiento combinado de AuNP-PEG-AptHER2 (2 µg/mL) y 5-FU a) Tratamiento en combinación en HCC-1954 b) Tratamiento en combinación en Vero CCL-81. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significada vs. Control. \*\*\*\* p <0.0001. \*\*\*p <0.0050 \*\* p <0.0020 \*p <0.020

En la línea celular Vero CCL-81, se evaluó la misma concentración fija de AuNP-PEG-AptHER2 (2 µg/mL) en combinación con 2 µg/mL y 200 µg/mL de 5-FU. La combinación con 200 µg/mL de 5-FU registró una viabilidad celular de  $65.99 \pm 4.4\%$ , mientras que la segunda combinación con 2 µg/mL reportó  $80.2 \pm 1.8\%$  (Figura 24b). De manera similar a lo observado en HCC-1954, los tratamientos combinados no mostraron una disminución en la viabilidad celular en comparación al tratamiento individual, si no un incremento (5-FU 200 µg/mL =  $63.1 \pm 2.4\%$ , 5-FU 2 µg/mL =  $70 \pm 3.3\%$ , AuNP-PEG-AptHER2 =  $80 \pm 0.5\%$ ). El análisis estadístico indicó que la combinación AuNP-PEG-AptHER2 + 5-FU 200 µg/mL presentó diferencias significativas en relación al nanosistema, en contraste, la combinación con 2 µg/mL mostró diferencias significativas únicamente en comparación con el tratamiento individual con 5-FU. Finalmente, el resultado de sinergia confirmó el efecto antagonista para ambas combinaciones (Tabla 6)

Tabla 6. Índice de combinación obtenido para el tratamiento de AuNP-PEG-AptHER2 y 5-FU

Línea Celular	Combinación	Índice de combinación (CI)	Efecto observado
HCC-1954	AuNP-PEG-AptHER2 + 5-FU 400 µg/mL	>2	Antagonista
	AuNP-PEG-AptHER2 + 5-FU 4 µg/mL	>2	Antagonista
Vero CCL-81	AuNP-PEG-AptHER2 + 5-FU 200 µg/mL	>2	Antagonista
	AuNP-PEG-AptHER2 + 5-FU 2 µg/mL	>2	Antagonista

### 7.3.2 Tratamiento en combinación con TTZ

Se procedió a evaluar el efecto citotóxico de la combinación del nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 (2 µg/mL) con dos concentraciones del anticuerpo trastuzumab (1400 y 100 µg/mL) en la línea celular HCC-1954. La combinación AuNP-PEG-AptHER2 + TTZ 1,400 µg/mL registró una viabilidad de  $74.7 \pm 6.0\%$ ; valor ligeramente inferior al obtenido con los tratamientos individuales (TTZ µg/mL 1400  $85.7 \pm 3.3\%$  y AUNP-PEG-AptHER2  $85.9 \pm 5.5\%$ ). En contraste, la segunda combinación con TTZ 100 µg/mL mostró una viabilidad de  $87.9 \pm 4.2\%$ , similar al tratamiento individual (TTZ 100 µg/mL  $89.3 \pm 6.0\%$ ) (Figura 25a).

En los resultados se observa claramente el efecto combinado entre tratamientos, pero no representó un efecto potenciador. El análisis matemático de sinergia indicó un CI de 1.4 para la concentración alta de TTZ y de 1.1 para la concentración baja (Tabla 7), indicando un efecto ligeramente antagonista y un efecto levemente aditivo, respectivamente. No obstante, no se encontró diferencia significativa entre las combinaciones y el tratamiento individual.

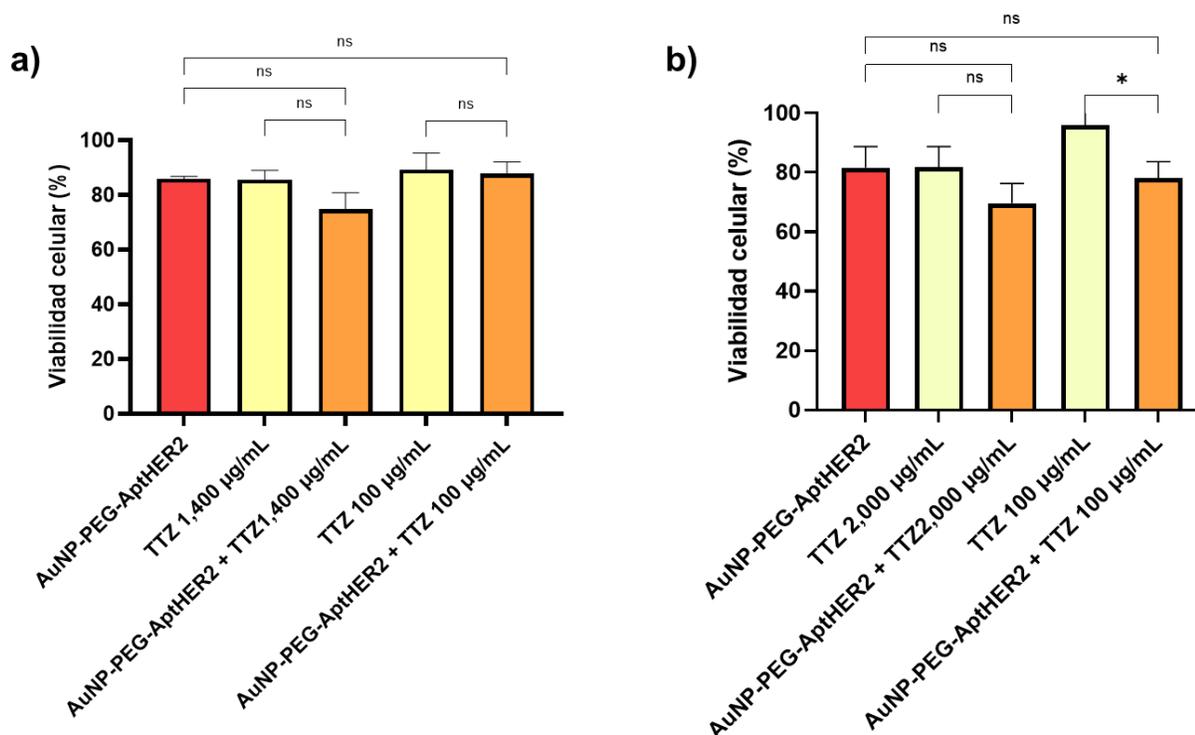


Figura 25. Viabilidad celular en el tratamiento combinado de AuNP-PEG-AptHER2 (2 µg/mL) y TTZ. a) Tratamiento en combinación en HCC-1954 b) Tratamiento en combinación en Vero CCL-81. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significativa vs. Control. \*\*\*\* p <0.0001. \*\*\*p <0.0050 \*\* p <0.0020 \*p <0.020

En la línea Vero CCL-81 se observó una reducción en la viabilidad celular al combinar AuNP-PEG-AptHER2 y TTZ en comparación con cada tratamiento en individual, aunque no fue estadísticamente significativa (Figura 25b). La combinación AuNP-PEG-AptHER2 + TTZ 2,000 µg/mL presentó una viabilidad de  $69.6 \pm 6.4\%$  y la segunda combinación AuNP-PEG-AptHER2 + 100 TTZ µg/mL registró una viabilidad de  $78.1 \pm 5.4\%$  (TTZ 2,000 µg/mL =  $81.6 \pm 7.0$ , TTZ 100 µg/mL =  $95.9 \pm 5.0\%$ , AuNP-PEG-AptHER2 =  $81.6 \pm 7.0$ ) (Figura 25b).

El análisis de sinergia mostró un índice de combinación de 1.2 para concentración alta de TTZ y 1.0 para la concentración baja, lo que indica un efecto aditivo. Los resultados sugieren una combinación más efectiva en concentraciones bajas de TTZ (Tabla 7).

Tabla 7. Índice de combinación obtenido para el tratamiento de AuNP-PEG-AptHER2 y TTZ

Línea Celular	Combinación	Índice de combinación (CI)	Efecto observado
HCC-1954	AuNP-PEG-AptHER2 + TTZ 1,400 µg/mL	1.4	Antagonismo moderado
	AuNP-PEG-AptHER2 + TTZ 100 µg/mL	1.1	Casi aditivo
Vero CCL-81	AuNP-PEG-AptHER2 + TTZ 2,000 µg/mL	1.2	Ligeramente aditivo
	AuNP-PEG-AptHER2 + TTZ 100 µg/mL	1.0	Aditivo

### 7.3.3 Tratamiento en combinación de 5-FU y TTZ

Como ultimo tratamiento, se evaluaron combinaciones entre las concentraciones previamente utilizadas de 5-fluorouracilo y trastuzumab.

En la Figura 26a se presentan los resultados obtenidos en la línea celular HCC-1954, los cuales mostraron resultados variables dependiendo del tratamiento. Primero se realizaron las combinaciones con el tratamiento de TTZ a 1,400 µg/mL (Viabilidad individual de  $80.7 \pm 6.8$  %). La combinación de TZZ 1,400 µg/mL y 5-FU 400 µg/mL obtuvo una viabilidad de  $37.52 \pm 1.95$ %, valor comparable al tratamiento de 5-FU individual ( $38.76 \pm 3.07$ %). Por otro lado, la combinación de TTZ 1,400 µg/mL + 5-FU 4 µg/mL presentó un ligero aumento en la viabilidad ( $62.02 \pm 2.5$ %) en comparación al tratamiento de 5-FU en individual ( $58.8 \pm 1.2$ %). En conjunto, no se evidencio un efecto potenciador que redujera la viabilidad celular y el análisis de sinergia confirmó un efecto antagonista (Tabla 8).

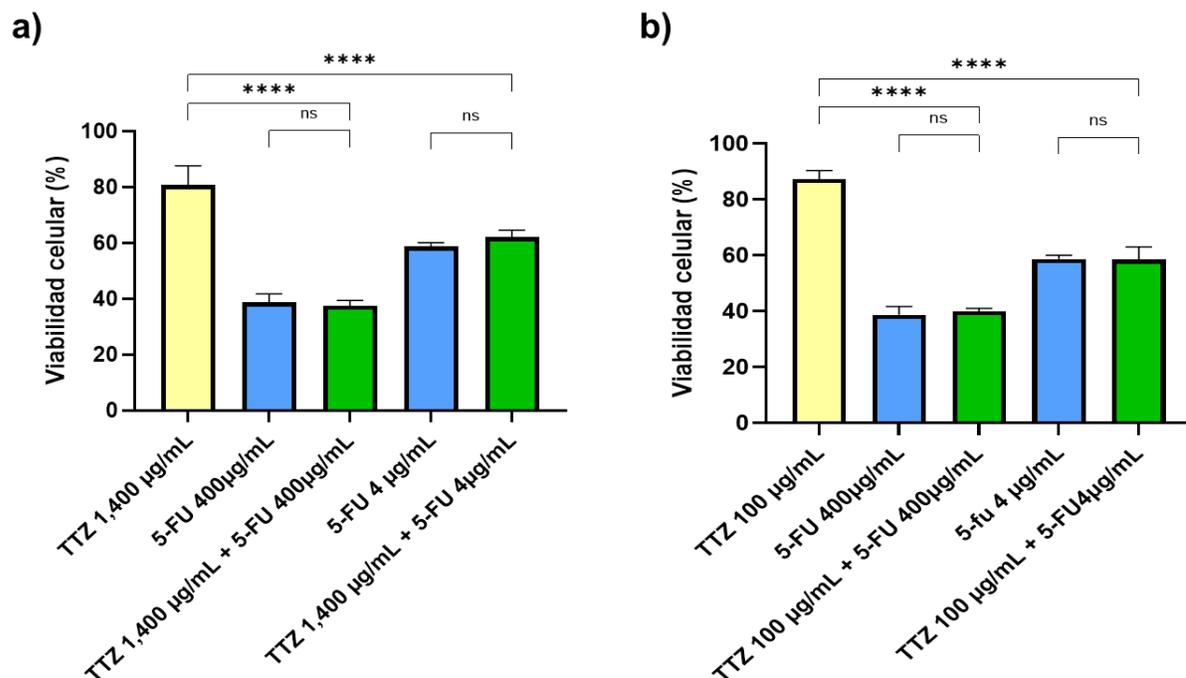


Figura 26. Viabilidad celular en el tratamiento combinado de 5-FU y TTZ en HCC-1954.

a) Tratamiento combinado de 5-FU + 1,400 µg/mL de TTZ. b) Tratamiento combinado de 5-FU + 100 µg/mL de TTZ. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significada vs. Control. \*\*\*\* p <0.0001. \*\*\*p <0.0050 \*\* p <0.0020 \*p <0.020

Asimismo, los tratamientos de TTZ 100 µg/mL en combinación de 5-FU (4 y 400 µg/mL) no mostraron diferencias significativas en respecto a los tratamientos individuales con 5-FU, a excepción del tratamiento de TTZ individual. Las combinaciones de TTZ 100 µg/mL + 5-FU 400 µg/mL y TTZ 100 µg/mL + 5-FU 4 µg/mL presentaron valores de viabilidad de  $40 \pm 1.0\%$  y  $58.5 \pm 4.5\%$ , respectivamente (Figura 26b). Los tratamientos individuales de TTZ 100 µg/mL, 5-FU 400 µg/mL y + 5-FU 4 µg/mL presentaron valores de  $87.3 \pm 3.0$ ,  $38.7 \pm 3.0$  y  $58.8 \pm 1.2$ , respectivamente.

El análisis de sinergia reveló índices de combinación superiores a 1, lo que indica un efecto antagonista a concentraciones mayores de TTZ y un efecto aditivo a concentraciones menores en células de cáncer de mama HER2+ (Tabla 8).

Tabla 8. Índice de combinación obtenido para el tratamiento de TTZ y 5-FU en HCC-1954

Línea celular	Combinación	Índice de combinación (CI)	Efecto observado
HCC-1954	TTZ 1400µg/mL + 5-FU 400 µg/mL	1.7	Antagonista
	TTZ 1400µg/mL + 5-FU 4 µg/mL	2.0	Antagonista
	TTZ 100µg/mL + 5-FU 400 µg/mL	1.2	Ligeramente aditivo
	TTZ 100µg/mL + 5-FU 4 µg/mL	1.1	Casi aditivo

En la línea celular Vero CCL-81, los tratamientos combinados con 5-FU y TTZ mostraron una ligera disminución en la viabilidad celular en comparación con los tratamientos individuales. Primero se evaluó la concentración de 2,000 µg/mL de TTZ con dos concentraciones de 5-FU (200 µg/mL y 2 µg/mL). La combinación de TTZ + 5-FU 200 µg/mL presentó una viabilidad de  $55.6 \pm 3.4\%$ , mientras que la combinación con 5-FU a 2 µg/mL reportó  $67.5 \pm 2.3\%$  (Figura 27a). Estos resultados fueron ligeramente menores a los obtenidos con los tratamientos individuales (TTZ 100 µg/mL =  $81.6 \pm 7.0\%$ , 5-FU 200 µg/mL =  $59.9 \pm 3.1\%$ , 5-FU 2 µg/mL =  $79.3 \pm 1.1\%$ ), aunque únicamente se observó diferencia significativa entre TTZ y las combinaciones. Finalmente, el análisis de sinergia calculó un CI de 1.0 para ambas combinaciones, lo cual indica un efecto aditivo (Tabla 9).

En comparación, la combinación de TTZ 100 µg/mL + 5-FU 200 µg/mL presentó una viabilidad de  $58.9 \pm 4.4\%$ , valor similar al obtenido con el tratamiento en individual de 5-FU ( $59.8 \pm 3.11\%$ ). Por otra parte, la combinación con TTZ 100 µg/mL + 5-FU 2 µg/mL reportó una viabilidad de  $60.8 \pm 0.64\%$  (Figura 27b). En esta última combinación se observó claramente una reducción en la viabilidad celular en comparación con los resultados en individual (TTZ 100 µg/mL =  $95.9 \pm 5.0\%$ , 5-FU µg/mL 2 =  $79.3 \pm 1.1\%$ ). Para la primera combinación se obtuvo un CI de 0.9 que corresponde a un efecto levemente sinérgico, mientras que la segunda concentración obtuvo un valor de 0.5, confirmando un efecto de sinergia (Tabla 9).

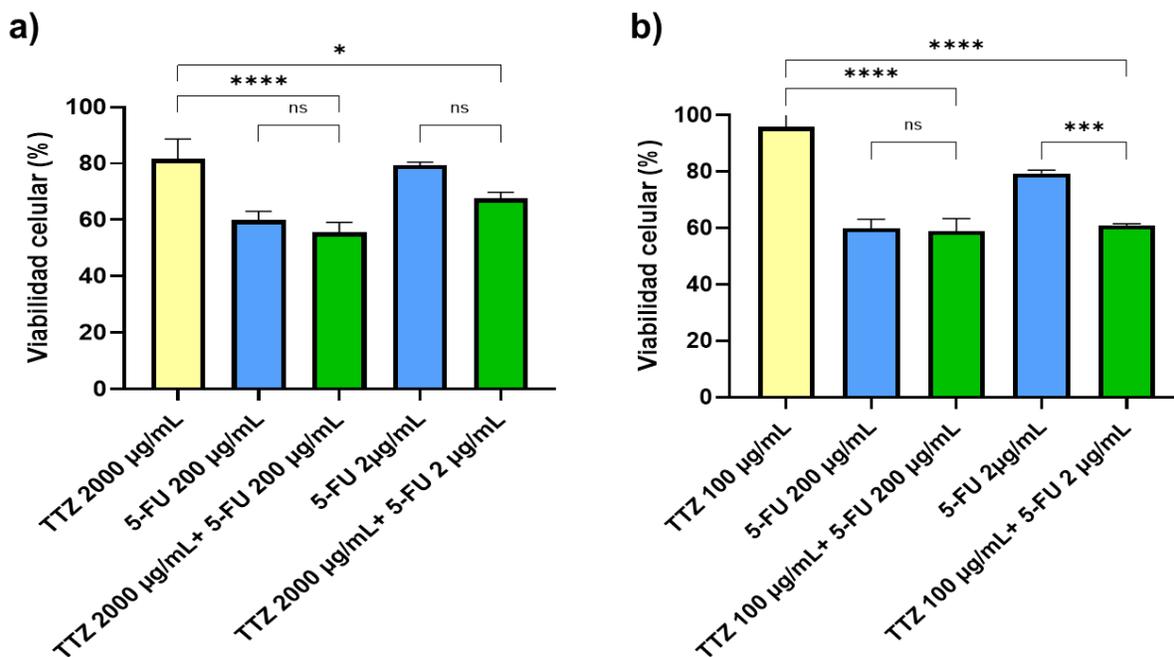


Figura 27. Viabilidad celular en el tratamiento combinado de 5-FU y TTZ en Vero CCL-81 a) Tratamiento combinado de 5-FU con concentración de 2,000 µg/mL de TTZ b) Tratamiento combinado de 5-FU con concentración de 100 µg/mL de TTZ. ANOVA de una vía, post hoc Bonferroni. Dos repeticiones por triplicado (n=6). Diferencia significativa vs. Control. \*\*\*\* p <0.0001. \*\*\*p <0.0050 \*\* p <0.0020 \*p <0.020

Tabla 9. Índice de combinación obtenido para el tratamiento de TTZ y 5-FU en Vero CCL-81.

Línea celular	Combinación	Índice de combinación (CI)	Efecto observado
Vero CCL-81	TTZ 2000µg/mL + 5-FU 200 µg/mL	1.0	Aditivo
	TTZ 2000µg/mL + 5-FU 2 µg/mL	1.1	Aditivo
	TTZ 100 µg/mL + 5-FU 200 µg/mL	0.9	Ligeramente sinérgico
	TTZ 100 µg/mL + 5-FU 2 µg/mL	0.5	Sinergia

## 8. Discusión

Los resultados obtenidos en los espectros de absorción confirmaron la conjugación correcta del nanosistema, mientras que los análisis de carga superficial y diámetro hidrodinámico son similares con la construcción previa del nanosistema (Carrión-García et al., 2023). Por lo tanto, podemos concluir que se logró replicar de manera exitosa la construcción de AuNP-PEG-AptHER2.

Los estudios *in vitro* confirman que la respuesta a los tratamientos depende del contexto celular y de la interacción de las vías de señalización. El tratamiento con 5-FU mostró un efecto citotóxico dependiente de dosis y del tiempo de exposición. En HCC-1954 se obtuvo una IC50 de 1,334 µg/mL a 72 horas, mientras que en Vero CCL-81 fue de 416 µg/mL tras 72 horas de exposición, evidenciando una mayor sensibilidad en células no tumorales.

La diferencia de IC50 entre líneas celulares sugiere una posible resistencia a 5-FU en HCC-1954. El 5-FU ejerce su acción por diversos mecanismos como inhibición de proliferación mediante el bloqueo de la vía RAS/ERK, reducción del riesgo de metástasis por medio de la disminución de la expresión de Rho-A y limitación de la movilidad celular al reducir los niveles de Rac1 (Malik et al., 2022). También 5-FU induce apoptosis a través de la activación de p53 y la caspasa-1 (Balahura et al., 2021). Estudios en líneas celulares de cáncer de colon han demostrado que la eficiencia de 5-FU se ve potenciada cuando P53 se encuentra funcional, pero se reduce en presencia de mutaciones o un estado inactivo, contribuyendo a la quimiorresistencia (Zheng et al., 2000).

En cáncer de mama, TP53 presenta mutaciones en aproximadamente el 35% de los casos y específicamente en tumores HER2+, la frecuencia puede ser del 53% (Marvalim et al., 2023). Según el repositorio ClinVAR, la línea celular HCC-1954 presenta un cambio de tirosina a cisteína (pTry163Cys) en TP53, dicha mutación ocasiona una pérdida de función. En concordancia, Tanihara y colaboradores

reportaron que las líneas células de cáncer de mama con mutaciones en p53 (MDA-MB-231 y MDA-MB-468) presentaron valores de IC50 de 5-FU elevados en comparación a la línea MCF-7, la cual posee un p53 funcional. Estos hallazgos destacan la importancia del estado mutacional de p53 en la respuesta terapéutica al 5-FU en cáncer de mama (Tanihara et al., 2025). Por lo tanto, se puede inferir que el efecto citotóxico observado a concentraciones elevadas de 5-FU en la línea HCC-1954 está relacionado con un mecanismo de resistencia asociado a la mutación p53.

En el caso de trastuzumab, se observó un efecto dosis-dependiente con mayor eficacia a 72 horas. Las IC50 calculadas fueron elevadas en ambas líneas celulares (HCC-1954: 3,856 µg/mL y Vero CCL-81: 4,457 µg/mL). En HCC-1954, este comportamiento era esperado, ya que la línea celular está reconocida como resistente al fármaco. Esta resistencia se atribuye a la mutación H1047R en PIK3CA, la cual confiere una activación constitutiva de la vía PI3K/AKT, permitiendo la proliferación celular aun cuando existe un bloqueo de HER2 (Chakrabarty et al., 2013). Estudios clínicos en pacientes que se han sometido a tratamiento con TTZ mostraron una correlación entre la resistencia a trastuzumab y desregularización en la vía PI3K/AKT (Vivekanandhan & Knutson, 2022).

La línea celular Vero CCL-81 presenta una expresión basal del receptor HER2, lo que limita la cantidad de moléculas de TTZ que pueden unirse de manera específica. Esto se evidencio en nuestros resultados, donde se observó una inhibición mínima de la proliferación incluso a concentraciones elevadas del fármaco. Tabeté y colaboradores reportaron que el tratamiento con TTZ redujo de manera significativa el crecimiento de células de cáncer hepatocelular sin afectar el crecimiento de hepatocitos normales (Tatebe et al., 2008). La respuesta mínima de Vero CCL-81 hacia TTZ resalta la importancia del nivel de expresión de HER2 para determinar la eficacia terapéutica.

Por su parte el nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 presentó una citotoxicidad distinta según la línea celular evaluada. En HCC-1954 se presentó un efecto dosis-respuesta invertido, donde la menor concentración redujo de forma más evidente la viabilidad celular; mientras que en Vero CCL-81 se registró un ligero efecto dosis-dependiente. Estos resultados en HCC-1954 no concuerdan con parte de la literatura reportada, donde la mayoría de los nanosistemas dirigidos contra HER2 presentan un efecto dosis-dependiente en la reducción de viabilidad.

Un ejemplo es el nanosistema descrito por Lee y colaboradores, conformado por nanostars de oro funcionalizadas con un aptámero anti-HER2. Este nanosistema mostró una disminución de la viabilidad celular en un efecto dependiente tanto del tiempo como de la dosis (Lee et al., 2015). Sin embargo, este estudio presenta dos diferencias relevantes con respecto a nuestro trabajo: la línea celular utilizada y el diseño estructural. En primer lugar, esta investigación empleó la línea celular SK-BR-3, la cual no presenta mutaciones en vías de señalización capaces de generar resistencia al tratamiento. En segundo lugar, el diseño se basó en nanostars, mientras que nuestro nanosistema emplea nanoesferas. Este aspecto es importante, ya que se ha reportado que la morfología de las nanopartículas influye en sus efectos biológicos, siendo las nanostars más citotóxicas que las nanoesferas (Y. J. Lee et al., 2019).

Existen diferentes factores que podrían explicar el perfil atípico de la respuesta dosis-dependiente observado. Nuestros resultados sugieren la posible presencia de un efecto hormético, este fenómeno se ha descrito previamente en diferentes nanomateriales, incluidas las nanopartículas de plata (Jiao et al., 2014; Lavicoli et al., 2018). La hormesis se define como una relación dosis-respuesta no lineal en la que dosis bajas y altas de un mismo agente generan efectos en direcciones opuestas (Bell et al., 2014). Bajo esta definición, se esperaría que concentraciones menores de AuNP-PEG-AptHER2 a las evaluadas presentaran una mayor citotoxicidad, mientras que concentraciones más elevadas no tendrían un efecto significativo.

Otro fenómeno relevante asociado a las nanopartículas es la formación de corona proteica. Este efecto ocurre cuando las nanopartículas son introducidas en un medio biológico y las proteínas presentes se adsorben a su superficie, generando una capa de biomoléculas. La presencia de esta corona puede impedir que el aptámero presente en AuNP-PEG-AptHER2 interactúe adecuadamente con el receptor (Pinals et al., 2020). Asimismo, se ha reportado que la formación de corona puede afectar la estabilidad coloidal y favorecer la aglomeración de las nanopartículas (Rampado et al., 2020). Para confirmar si este fenómeno está ocurriendo en nuestro sistema, sería necesario realizar mediciones adicionales de DLS y potencial Z en el medio de cultivo suplementado con suero y a las distintas concentraciones evaluadas, con el fin de evidenciar la posible presencia de corona proteína o agregación de nanopartículas.

Otra posible explicación a este resultado es la activación de vías alternas de señalización, un mecanismo de resistencia frecuente en células que sobreexpresan HER2. Se ha reportado que células tumorales HER2+ tratadas con trastuzumab y lapatinib que desarrollaron resistencia presentan una sobreexpresión del receptor Integrina- $\beta$ 1 (CD29), la cual participa en señalización asociada en migración celular, evasión de apoptosis y proliferación celular (Huang et al., 2011). En concordancia, un estudio en la línea celular HCC-1954 ha demostrado que la exposición a TTZ induce un incremento en la expresión de Integrina- $\beta$ 1. Asimismo, se observó que HCC-1954 tratada con TTZ presentó un incremento de migración celular durante ensayos de cicatrización (de Abreu Pereira et al., 2022). Considerando estos antecedentes, un mecanismo similar podría estar ocurriendo en el tratamiento de AuNP-PEG-AptHER2, lo que explicaría la viabilidad mayor registrada en concentraciones más altas. Por lo tanto, resulta relevante implementar ensayos de migración y apoptosis en la caracterización de nanosistemas, ya que pueden aportar información valiosa para comprender los procesos celulares implicados.

La combinación AuNP-PEG-AptHER2 + 5-FU resultó en un efecto antagonista ( $CI > 2$ ) en ambas líneas celulares. Este efecto sugiere que los mecanismos de acción de ambos tratamientos interfieren entre sí en lugar de complementarse. Kim y colaboradores reportaron que, en líneas celulares de cáncer gástrico, la combinación de trastuzumab y 5-FU produjo un efecto aditivo. Los autores atribuyen los resultados a que trastuzumab induce arresto celular en la fase G1, mientras que 5-FU requiere que las células se encuentren en fase S del ciclo para ejercer su efecto (Kim et al., 2008). De manera similar, en líneas celulares de cáncer de mama (SK-BR-3, BT-474, MDA-MB-361 y MDA-MB-361) se ha descrito un efecto aditivo entre trastuzumab y doxorubicina, un fármaco con mecanismos de acción semejante a 5-FU (Pegram et al., 2004). Si bien estos hallazgos corresponden a TTZ con otros fármacos utilizados en cáncer de mama, resulta esencial evaluar el efecto de AuNP-PEG-AptHER2 sobre el ciclo celular.

Fujimoto-Ouchi y colaboradores evaluaron la combinación de trastuzumab con capecitabina (pródroga de 5-FU) y metabolitos derivados de 5-FU. Se emplearon las líneas celulares KPL-4 y BT474, tanto en estudios *in vitro* como en un modelo *in vivo* de xenoinjerto en ratón. En los experimentos *in vitro* se observó un efecto antagonista entre trastuzumab y los metabolitos, mientras que en el modelo *in vivo* se reportó un efecto aditivo (Fujimoto-Ouchi et al., 2002). Estos ensayos indican que es posible que la combinación de AuNP-PEG-AptHER2 y 5-FU presenten un efecto sinérgico en modelos de cultivo 3D o estudios *in vivo*.

La combinación de AuNP-PEG-AptHER2 + TTZ produjo un efecto ligeramente antagonista en la línea HCC-1954 y un efecto aditivo en la línea Vero CCL-81. Se han descrito múltiples estudios en los que TTZ y aptámeros han sido conjugados individualmente a nanopartículas o a fármacos para dirigir tratamientos (H. Lee et al., 2015; Meng et al., 2018; Żelechowska-Matysiak, Wawrowicz, et al., 2023), sin embargo, no se han reportado combinaciones de ambos enfoques. Nuestros resultados sugieren que el efecto ligeramente antagonista podría indicar que los tratamientos interfieren entre sí, debido a que están dirigidos al mismo blanco. Tanto

TTZ como el aptámero utilizado en el nanosistema han demostrado inducir la internalización del receptor (Gijs et al., 2016; Maadi et al., 2021). No obstante, el mecanismo de internalización exacto de AuNP-PEG-AptHER2 no se encuentra completamente elucidado.

Un aspecto interesante de los resultados obtenidos es que AuNP-PEG-AptHER2 con trastuzumab mostró un efecto antagonista a altas concentraciones de trastuzumab mientras que a bajas dosis se observó un efecto ligeramente aditivo en HCC-1954. Este efecto de aumento en el cálculo de sinergia también se observó en células Vero CCL-81, obteniendo un CI de 1.2 a altas concentraciones de TTZ y un 0.9 cuando se usó menor concentración. Este comportamiento puede explicarse por una saturación del receptor por parte de TTZ, lo que limitaría la unión del aptámero presente en el nanosistema y el mecanismo de acción de este. Este fenómeno se ha observado con diferentes anticuerpos, conocido como “binding site barrier/barrera de sitios de unión”, donde los anticuerpos crean una barrera alrededor tumores e impiden la interacción de otros agentes terapéuticos.

En la línea Vero CCL-81, la combinación de TTZ + 5-FU presentó un efecto sinérgico más significativo a bajas concentraciones. Estos resultados evidencian el impacto de la concentración de TTZ en la interacción y destacan la importancia de evaluar un rango amplio de dosis en combinación. Se ha descrito que la sinergia puede manifestarse en determinadas regiones de la curva dosis-efecto en lugar de mantenerse en un solo rango (Staffa et al., 2021) Estos resultados sugieren que la exploración de combinaciones con concentraciones menores de TTZ podría favorecer la aparición de un efecto sinérgico.

La combinación de 5-FU + TTZ mostró un efecto antagonista en la línea HCC-1954 y un efecto aditivo en Vero CCL-81. Los resultados en la línea HCC-1954 son consistentes con lo reportado para combinaciones de 5-FU con otros tratamientos dirigidos a HER2, donde se ha descrito una posible interferencia entre los mecanismos de estos fármacos (Kim et al., 2008). Al comparar estos resultados con

los obtenidos para la combinación de 5-FU con AuNP-PEG-AptHER2, es posible inferir que el nanosistema podría compartir mecanismo de acción similar al TTZ, lo que explica las similitudes observadas.

De acuerdo con la literatura, las terapias dirigidas a receptores pueden sensibilizar a las células tumorales frente a la quimioterapia. Li y colaboradores reportaron que la administración secuencial de trastuzumab seguida de 5-FU produjo un efecto sinérgico en líneas celulares de cáncer gástrico. En contraste con nuestros experimentos, dicho estudio utilizó esquemas de tratamientos secuenciales, mientras que en nuestros experimentos la aplicación fue simultánea. Estos hallazgos abren la posibilidad de que, aunque el AuNP-PEG-AptHER2 no haya mostrado sinergia en células tumorales, pueda actuar como agente de sensibilización cuando se emplee como tratamiento previo (Li et al., 2010).

Finalmente, no se observó sinergia en las combinaciones que incluyeron el nanosistema en células de cáncer de mama HER2+. Una de las limitaciones de esta investigación fue la disponibilidad de volumen de nanosistema, por lo que solo se analizó una concentración fija de AuNP-PEG-AptHER2. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de un efecto sinérgico en otras concentraciones. Asimismo, resulta fundamental considerar el método empleado para el análisis de la sinergia. El modelo Chou-Talalay es uno de los modelos más reportados en la literatura (Abedin et al., 2021; Karuppaiah et al., 2020) sin embargo, aún no existe un consenso respecto al método más adecuado para evaluar interacciones sinérgicas entre nanopartículas.

Es relevante señalar que, si bien hemos revisado estudios similares, no existen antecedentes que utilicen las dos líneas celulares empleadas en esta investigación. Esta ausencia de información resalta la influencia del perfil molecular de cada línea y sugiere interpretar con cautela los hallazgos de estudios realizados en modelos diferentes. Por ello, futuras investigaciones deberán contemplar tanto la exploración

de un rango más amplio de concentraciones como de métodos alternativos para una interpretación más robusta de la sinergia en nanosistemas.

Nuestros resultados sugieren la necesidad de estudios más profundos que permitan esclarecer los mecanismos involucrados y orientar nuevas estrategias. En nuestro caso, por ejemplo, una línea futura de combinación sería incorporar una fase de sensibilización previa con el nanosistema o un fármaco, en lugar de aplicarlos de manera simultánea.

## 9. Conclusiones

En este trabajo se evaluó la actividad citotóxica y las interacciones farmacológicas del nanosistema AuNP-PEG-AptHer2 de forma individual y en combinación con 5-fluorouracilo y trastuzumab en líneas celulares HCC-1954 (HER2+) y Vero CCL-81 (no tumoral). La caracterización fisicoquímica confirmó la correcta conjugación y estabilidad del nanosistema, evidenciada por el espectro de absorción, el diámetro hidrodinámico y la carga superficial.

Los ensayos de viabilidad celular mostraron que la respuesta a los tratamientos depende de la línea celular y sus características moleculares. La IC<sub>50</sub> de 5-FU en HCC-1954 fue de 1,334 µg/mL mientras que en la línea celular Vero CCL-81 fue de 416 µg/mL a 72 horas. Tras 72 horas de exposición, la IC<sub>50</sub> de trastuzumab fue de 3,856 µg/mL en células HCC-1954 y 4,422 µg/mL en células Vero CCL-81.

En HCC-1954, las altas concentraciones de 5-FU y TTZ requeridas para la reducción de la viabilidad podrían explicarse por la presencia de mutaciones en TP53 y PI3K, sugiriendo una resistencia intrínseca a estos fármacos. El nanosistema AuNP-PEG-AptHER2 presentó efecto dosis-dependiente inverso, un comportamiento que podría indicar entre otras cosas una posible activación de vías alternas de señalización en células que sobreexpresan HER2.

En combinaciones, AuNP-PEG-AptHER2 + 5-FU mostró un efecto antagonista en ambas líneas celulares, posiblemente por la interferencia de sus mecanismos de acción. La combinación de AuNP-PEG-AptHER2 + TTZ presentó un efecto antagonista en la línea HCC-1954 y un efecto aditivo en Vero CCL-81, lo que sugiere un fenómeno de saturación del receptor.

Aunque la hipótesis proponía un efecto sinérgico de la combinación de AuNP-PEG-AptHER2 con terapia farmacológica en células de cáncer de mama HER2+, los resultados mostraron efectos antagonistas y aditivos principalmente. Los resultados demuestran que la capacidad para generar sinergia depende de factores críticos como dosis empleada, tipo de fármaco en combinación y el perfil genético de las

células. Por lo tanto, esta investigación resalta la importancia de evaluar diferentes concentraciones de los tratamientos en distintas líneas celulares, así como de considerar el perfil genético de cada modelo al diseñar estrategias terapéuticas basadas en nanomateriales.

## 10. Referencias

- Abbasi Kajani, A., Haghjooy Javanmard, S., Asadnia, M., & Razmjou, A. (2021). Recent Advances in Nanomaterials Development for Nanomedicine and Cancer. *ACS Applied Bio Materials*, 4(8), 5908–5925. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00591>
- Abedin, M. R., Powers, K., Aiardo, R., Barua, D., & Barua, S. (2021). Antibody–drug nanoparticle induces synergistic treatment efficacies in HER2 positive breast cancer cells. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86762-6>
- Arceo-Martínez, M. T., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A., & Palomera-Sanchez, Z. (2021). Estado actual del cáncer de mama en México: principales tipos y factores de riesgo. *Gaceta Mexicana de Oncologica*, 20(3), 101–110. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.21000134>
- Balahura, L. R., Dinescu, S., Balaş, M., Cernencu, A., Lungu, A., Vlăsceanu, G. M., Iovu, H., & Costache, M. (2021). Cellulose nanofiber-based hydrogels embedding 5-FU promote pyroptosis activation in breast cancer cells and support human adipose-derived stem cell proliferation, opening new perspectives for breast tissue engineering. *Pharmaceutics*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081189>
- Bell, I. R., Ives, J. A., & Jonas, W. B. (2014). Nonlinear effects of nanoparticles: Biological variability from hormetic doses, small particle sizes, and dynamic adaptive interactions. *Dose-Response*, 12(2), 202–232. <https://doi.org/10.2203/dose-response.13-025.Bell>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. (2023). Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research*, 21(11), 1142–1147. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>
- Burguin, A., Diorio, C., & Durocher, F. (2021). Breast cancer treatments: Updates and new challenges. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/jpm11080808>
- Cabrales-Santiago, H. E., Moreno-Miceli, H. M., Gonzalez-Sanchez, G. C., Vazquez-Perez, E., & Barrios-Perez, A. (2025). Prevalencia de cáncer de

mama en pacientes con seguridad social en Tabasco, México. *Horizonte Sanitario*, 3(23).

- Carrión-García, P. Y., Sánchez-Domínguez, C. N., Gallardo-Blanco, H. L., Garza-Treviño, E. N., Delgado-Balderas, J. R., Roacho-Pérez, J. A., & Sánchez-Domínguez, M. (2023). *Aptamer-Conjugated Gold Nanoparticles Targeting Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) for Cancer Theranostic*, *In Vitro Assays*, 25. <https://doi.org/10.3390/iocn2023-14502>
- Carvalho, E., Canberk, S., Schmitt, F., & Vale, N. (2025). Molecular Subtypes and Mechanisms of Breast Cancer: Precision Medicine Approaches for Targeted Therapies. *Cancers*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/cancers17071102>
- Chakrabarty, A., Bhola, N. E., Sutton, C., Ghosh, R., Kuba, M. G., Dave, B., Chang, J. C., & Arteaga, C. L. (2013). Trastuzumab-resistant cells rely on a HER2-PI3K-FoxO-survivin axis and are sensitive to PI3K inhibitors. *Cancer Research*, 73(3), 1190–1200. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2440>
- Chandran, V. I., Eppenberger-Castori, S., Venkatesh, T., Lea Vine, K., & Ranson, M. (2015). HER2 and uPAR cooperativity contribute to metastatic phenotype of HER2-positive breast cancer. *Oncoscience*, 2(3). [www.impactjournals.com/oncoscience](http://www.impactjournals.com/oncoscience)
- Cheng, X. (2024). A Comprehensive Review of HER2 in Cancer Biology and Therapeutics. *Genes*, 15(7). <https://doi.org/10.3390/genes15070903>
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. In *Cancer Research* (Vol. 70, Issue 2, pp. 440–446). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
- de Abreu Pereira, D., Sandim, V., Fernandes, T. F. B., Almeida, V. H., Rocha, M. R., do Amaral, R. J. F. C., Rossi, M. I. D., Kalume, D. E., & Zingali, R. B. (2022). Proteomic Analysis of HCC-1954 and MCF-7 Cell Lines Highlights Crosstalk between  $\alpha v$  and  $\beta 1$  Integrins, E-Cadherin and HER-2. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17). <https://doi.org/10.3390/ijms231710194>
- Dong, Q., Yang, H., Wan, C., Zheng, D., Zhou, Z., Xie, S., Xu, L., Du, J., & Li, F. (2019). Her2-Functionalized Gold-Nanoshelled Magnetic Hybrid Nanoparticles: a Theranostic Agent for Dual-Modal Imaging and Photothermal Therapy of Breast Cancer. *Nanoscale Research Letters*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3053-4>
- Duarte, D., & Vale, N. (2022). Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology. In *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery* (Vol. 3). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2022.100110>

- Fan, D., Cao, Y., Cao, M., Wang, Y., Cao, Y., & Gong, T. (2023). Nanomedicine in cancer therapy. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 8, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01536-y>
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Colombet, M., Mery, L., Piñero, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2024). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2024). *Global Cancer Observatory: Cancer Today Mexico*.
- Fujimoto-Ouchi, K., Sekiguchi, F., & Tanaka, Y. (2002). Antitumor activity of combinations of anti-HER-2 antibody trastuzumab and oral fluoropyrimidines capecitabine/5'-dFUrd in human breast cancer models. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 49(3), 211–216. <https://doi.org/10.1007/s00280-001-0401-7>
- Gao, Q., Zhang, J., Gao, J., Zhang, Z., Zhu, H., & Wang, D. (2021). Gold Nanoparticles in Cancer Theranostics. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.647905>
- Gijs, M., Penner, G., Blackler, G. B., Impens, N. R. E. N., Baatout, S., Luxen, A., & Aerts, A. M. (2016). Improved aptamers for the diagnosis and potential treatment of HER2-positive cancer. *Pharmaceuticals*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/ph9020029>
- Huang, C., Park, C. C., Hilsenbeck, S. G., Ward, R., Rimawi, M. F., Wang, Y. chao, Shou, J., Bissell, M. J., Osborne, C. K., & Schiff, R. (2011). B1 integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Research*, 13(4). <https://doi.org/10.1186/bcr2936>
- INEGI. (2024). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA INTERNACIONAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA*. [https://www.cdc.gov/breast-cancer/es/about/?CDC\\_AAref\\_Val=https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic\\_info/what-is-breast-cancer.htm](https://www.cdc.gov/breast-cancer/es/about/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm)
- INEGI, S. de salud. (2023). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA INTERNACIONAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA*. <https://www.breastcancer.org/es/pruebas-deteccion/mamografias/beneficios-riesgos>
- Jiao, Z. H., Li, M., Feng, Y. X., Shi, J. C., Zhang, J., & Shao, B. (2014). Hormesis effects of silver nanoparticles at non-cytotoxic doses to human hepatoma cells. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102564>

- Jurczyk, M., Król, M., Midro, A., Kurnik-lucka, M., Poniowski, A., & Gil, K. (2021). Cardiotoxicity of fluoropyrimidines: Epidemiology, mechanisms, diagnosis, and management. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 10, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcm10194426>
- Karuppaiah, A., Siram, K., Selvaraj, D., Ramasamy, M., Babu, D., & Sankar, V. (2020). Synergistic and enhanced anticancer effect of a facile surface modified non-cytotoxic silver nanoparticle conjugated with gemcitabine in metastatic breast cancer cells. *Materials Today Communications*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.100884>
- Kim, S. Y., Kim, H. P., Kim, Y. J., Oh, D. Y., & Im, S.-A. (2008). Trastuzumab inhibits the growth of human gastric cancer cell lines with HER2 amplification synergistically with cisplatin. *International Journal of Oncology*, 32, 89–95.
- Kubota, T., Kuroda, S., Kanaya, N., Morihiro, T., Aoyama, K., Kakiuchi, Y., Kikuchi, S., Nishizaki, M., Kagawa, S., Tazawa, H., & Fujiwara, T. (2018). HER2-targeted gold nanoparticles potentially overcome resistance to trastuzumab in gastric cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 14(6), 1919–1929. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.05.019>
- Lavicoli, I., Leso, V., Fontana, L., & Calabrese, E. J. (2018). Nanoparticle exposure and hormetic dose–responses: An update. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19030805>
- Lee, H., Dam, D. H. M., Ha, J. W., Yue, J., & Odom, T. W. (2015). Enhanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Degradation in Breast Cancer Cells by Lysosome-Targeting Gold Nanoconstructs. *ACS Nano*, 9(10), 9859–9867. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b05138>
- Lee, Y. J., Ahn, E. Y., & Park, Y. (2019). Shape-dependent cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles synthesized using green tea extract. *Nanoscale Research Letters*, 14. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-2967-1>
- Li, X. L., Yi, S. Q., Xu, J. M., Zhang, Y., Yingying-Feng, Chen, W., & Song, S. T. (2010). The sequence-dependent cytotoxic effect of trastuzumab in combination with 5-fluorouracil or cisplatin on gastric cancer cell lines. *Cancer Investigation*, 28(10), 1038–1047. <https://doi.org/10.3109/07357907.2010.483512>
- Lin, M., Xiong, W., Wang, S., Li, Y., Hou, C., Li, C., & Li, G. (2021). The Research Progress of Trastuzumab-Induced Cardiotoxicity in HER-2-Positive Breast Cancer Treatment. In *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (Vol. 8). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.821663>

- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 3, Issue 5, pp. 330–338). <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Longoria-García, S., Sánchez-Domínguez, C. N., Sánchez-Domínguez, M., Delgado-Balderas, J. R., Islas-Cisneros, J. F., Vidal-Gutiérrez, O., & Gallardo-Blanco, H. L. (2023a). Design and Characterization of pMyc/pMax Peptide-Coupled Gold Nanosystems for Targeting Myc in Prostate Cancer Cell Lines. *Nanomaterials*, *13*(20). <https://doi.org/10.3390/nano13202802>
- Longoria-García, S., Sánchez-Domínguez, C. N., Sánchez-Domínguez, M., Delgado-Balderas, J. R., Islas-Cisneros, J. F., Vidal-Gutiérrez, O., & Gallardo-Blanco, H. L. (2023b). Design and Characterization of pMyc/pMax Peptide-Coupled Gold Nanosystems for Targeting Myc in Prostate Cancer Cell Lines. *Nanomaterials*, *13*(20). <https://doi.org/10.3390/nano13202802>
- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—An updated review. *Cancers*, *13*(17). <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>
- Maadi, H., Soheilifar, M. H., Choi, W. S., Moshtaghian, A., & Wang, Z. (2021). Trastuzumab mechanism of action; 20 years of research to unravel a dilemma. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 14). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers13143540>
- Malik, J. A., Ahmed, S., Jan, B., Bender, O., Al Hagbani, T., Alqarni, A., & Anwar, S. (2022). Drugs repurposed: An advanced step towards the treatment of breast cancer and associated challenges. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 145). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112375>
- Martínez-Silva, M. G., García-Chagollán, M., Aguilar-Lemarroy, A., Hernández-Gutiérrez, R., Leal-Herrera, Y. A., Ruiz-Tachiquín, M.-E., González-López, S., & Jave-Suárez, L. F. (2020). Molecular subtypes and clinicopathological features of breast cancer in Mexican women. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, *58*(Supl 1), S21–S31. <https://doi.org/10.24875/RMIMSS.M20000112>
- Marvalim, C., Datta, A., & Lee, S. C. (2023). Role of p53 in breast cancer progression: An insight into p53 targeted therapy. In *Theranostics* (Vol. 13, Issue 4, pp. 1421–1442). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/thno.81847>
- Meng, L. xin, Ren, Q., Meng, Q., Zheng, Y. xiu, He, M. lei, Sun, S. yan, Ding, Z. jun, Li, B. cheng, & Wang, H. yun. (2018). Trastuzumab modified silica nanoparticles loaded with doxorubicin for targeted and synergic therapy of

- breast cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup3), S556–S563. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1501380>
- Mercogliano, M. F., Bruni, S., Mauro, F. L., & Schillaci, R. (2023). Emerging Targeted Therapies for HER2-Positive Breast Cancer. In *Cancers* (Vol. 15, Issue 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cancers15071987>
- Miricescu, D., Totan, A., Stanescu-Spinu, I.-I., Constantin Badoiu, S., Stefani, C., & Greabu, M. (2020). *Molecular Sciences PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects*. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Mitri, Z., Constantine, T., & O'Regan, R. (2012). The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemotherapy Research and Practice*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/743193>
- Obeagu, E. I., & Obeagu, G. U. (2024). Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine (United States)*, 103(3), E36905. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000036905>
- Orphanos, G., & Kountourakis, P. (2012). Targeting the HER2 receptor in metastatic breast cancer. In *Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy* (Vol. 5, Issue 3, pp. 127–137). King Faisal Specialist Hospital and Research Centre. <https://doi.org/10.5144/1658-3876.2012.127>
- Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gomez-Valles, F. O., & Ramirez-Valdespino, C. (2022). Subtypes of Breast Cancer. In H. Mayrovits (Ed.), *Breast Cancer* (Vol. 1, pp. 31–42).
- Palmero Picazo, J., Lassard Rosenthal, J., Juárez Aguilar, L. A., & Medina Núñez, C. A. (2021). Cáncer de mama: una visión general. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 19(3), 354–360. <https://doi.org/10.35366/101727>
- Pan, L., Li, J., Xu, Q., Gao, Z., Yang, M., Wu, X., & Li, X. (2024). HER2/PI3K/AKT pathway in HER2-positive breast cancer A review. In *Medicine (United States)* (Vol. 103, Issue 24, p. e38508). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000038508>
- Pegram, M. D., Konecny, G. E., O'Callaghan, C., Beryt, M., Pietras, R., & Slamon, D. J. (2004). Rational combinations of Trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(10), 739–749. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh131>
- Peng, Y., Wang, Y., Zhou, C., Mei, W., & Zeng, C. (2022). PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? In

*Frontiers in Oncology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.819128>

Pérez-Rodríguez, G. (2015). Prevalencia de subtipos por inmunohistoquímica del cáncer de mama en pacientes del Hospital General Regional 72, Instituto Mexicano del Seguro Social. *Cirugía y Cirujanos*, 83(3), 193–198.  
<https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.05.003>

Pinals, R. L., Chio, L., Ledesma, F., & Landry, M. P. (2020). Engineering at the nano-bio interface: Harnessing the protein corona towards nanoparticle design and function. In *Analyst* (Vol. 145, Issue 15, pp. 5090–5112). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0an00633e>

Raffa, R., & Tallarida, R. (2019). *Chemo Fog: Cancer Chemotherapy-Related Cognitive Impairment*. Scholars Portal.

Rampado, R., Crotti, S., Caliceti, P., Pucciarelli, S., & Agostini, M. (2020). Recent Advances in Understanding the Protein Corona of Nanoparticles and in the Formulation of “Stealthy” Nanomaterials. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00166>

Rasool, M., Malik, A., Waquar, S., Arooj, M., Zahid, S., Asif, M., Shaheen, S., Hussain, A., Ullah, H., & Gan, S. H. (2022). New challenges in the use of nanomedicine in cancer therapy. *Bioengineered*, 13(1), 759–773.  
<https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2012907>

Rocca, A., Braga, L., Volpe, M. C., Maiocchi, S., & Generali, D. (2022). The Predictive and Prognostic Role of RAS–RAF–MEK–ERK Pathway Alterations in Breast Cancer: Revision of the Literature and Comparison with the Analysis of Cancer Genomic Datasets. *Cancers*, 14(21).  
<https://doi.org/10.3390/cancers14215306>

Romero-Cordoba, S. L., Salido-Guadarrama, I., Rebollar-Vega, R., Bautista-Piña, V., Dominguez-Reyes, C., Tenorio-Torres, A., Villegas-Carlos, F., Fernández-López, J. C., Uribe-Figueroa, L., Alfaro-Ruiz, L., & Hidalgo-Miranda, A. (2021). Comprehensive omic characterization of breast cancer in Mexican-Hispanic women. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22478-5>

Roskoski, R. (2024). Targeted and cytotoxic inhibitors used in the treatment of breast cancer. In *Pharmacological Research* (Vol. 210). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107534>

Rubin, I., & Yarden, Y. (2001). The basic biology of HER2. In *Annals of Oncology* (Vol. 12). <http://annonc.oxfordjournals.org/>

- Sahu, S., & Casciano, D. (2014). *Handbook of Nanotoxicology, Nanomedicine and Stem Cell Use in Toxicology*. Wiley.
- Salinas, J. J., Roy, R., Dwivedi, A. K., & Shokar, N. K. (2019). Hereditary Breast Cancer Risk Analysis in Uninsured Mexican-Origin Women Living in the U.S.–Mexico Border Region. *Hispanic Health Care International*, 17(3), 118–124. <https://doi.org/10.1177/1540415319837850>
- Shrestha, B., Tang, L., & Romero, G. (2019). Nanoparticles-Mediated Combination Therapies for Cancer Treatment. *Advanced Therapeutics*, 2(11). <https://doi.org/10.1002/adtp.201900076>
- Singh, P., Pandit, S., Mokkalpati, V. R. S. S., Garg, A., Ravikumar, V., & Mijakovic, I. (2018). Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>
- Smolarz, B., Zadrożna Nowak, A., & Romanowicz, H. (2022). Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/cancers14102569>
- Soerjomataram, I., & Bray, F. (2021). Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(10), 663–672. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00514-z>
- Staffa, S. J., Kohane, D. S., & Zurakowski, D. (2021). Synergy in Nanomedicine: What It Is Not, and What It Might Be. In *Nano Letters* (Vol. 21, Issue 13, pp. 5457–5460). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c01894>
- Stanowicka-Grada, M., & Senkus, E. (2023). Anti-HER2 Drugs for the Treatment of Advanced HER2 Positive Breast Cancer. In *Current Treatment Options in Oncology* (Vol. 24, Issue 11, pp. 1633–1650). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11864-023-01137-5>
- Swain, S. M., Shastry, M., & Hamilton, E. (2023). Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 22, Issue 2, pp. 101–126). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00579-0>
- Tagde, P., Najda, A., Nagpal, K., Kulkarni, G. T., Shah, M., Ullah, O., Balant, S., & Rahman, M. H. (2022). Nanomedicine-Based Delivery Strategies for Breast Cancer Treatment and Management. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052856>
- Tanihara, T., Yoshida, Y., Ogino, T., Terada, Y., Tsurusaki, F., Hamasaki, K., Otsuki, K., Fukuoka, K., Oyama, K., Tsuruta, A., Hamamura, K., Mayanagi, K., Koyanagi, S., Murakami, Y., Ono, M., Kuwano, M., Ohdo, S., & Matsunaga, N.

- (2025). Microcurrent stimulation induces cell death in p53-mutant and 5-FU-resistant breast cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 301(8).  
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.110414>
- Tatebe, H., Shimizu, M., Shirakami, Y., Tsurumi, H., & Moriwaki, H. (2008). Synergistic growth inhibition by 9-cis-retinoic acid plus trastuzumab in human hepatocellular carcinoma cells. *Clinical Cancer Research*, 14(9), 2806–2812.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4708>
- Temple, A. E., & Walker, S. R. (2025). The Roles of STAT3 and STAT5 in Breast Cancer. In *Cancers* (Vol. 17, Issue 11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cancers17111781>
- Trayes, K., & Cokenakes, S. (2021). Breast cancer treatment. *American Academy of Family Physicians*, 104(2).
- Villarreal-Garza, C., Alvarez-Gómez, R. M., Pérez-Plasencia, C., Herrera, L. A., Herzog, J., Castillo, D., Mohar, A., Castro, C., Gallardo, L. N., Gallardo, D., Santibáñez, M., Blazer, K. R., & Weitzel, J. N. (2015). Significant clinical impact of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexico. *Cancer*, 121(3), 372–378. <https://doi.org/10.1002/cncr.29058>
- Vivekanandhan, S., & Knutson, K. L. (2022). Resistance to Trastuzumab. In *Cancers* (Vol. 14, Issue 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers14205115>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 321, Issue 3, pp. 288–300). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Xiong, X., Zheng, L. W., Ding, Y., Chen, Y. F., Cai, Y. W., Wang, L. P., Huang, L., Liu, C. C., Shao, Z. M., & Yu, K. Da. (2025). Breast cancer: pathogenesis and treatments. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 10, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02108-4>
- Yan, M., Schwaederle, M., Arguello, D., Millis, S. Z., Gatalica, Z., & Kurzrock, R. (2015). HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. *Cancer and Metastasis Reviews*, 34(1), 157–164.  
<https://doi.org/10.1007/s10555-015-9552-6>
- Yang, J., Ju, J., Guo, L., Ji, B., Shi, S., Yang, Z., Gao, S., Yuan, X., Tian, G., Liang, Y., & Yuan, P. (2022). Prediction of HER2-positive breast cancer recurrence and metastasis risk from histopathological images and clinical information via multimodal deep learning. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.12.028>
- Yang, Y., Zheng, X., Chen, L., Gong, X., Yang, H., Duan, X., & Zhu, Y. (2022). Multifunctional Gold Nanoparticles in Cancer Diagnosis and Treatment. In

*International Journal of Nanomedicine* (Vol. 17, pp. 2041–2067). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S355142>

Żelechowska-Matysiak, K., Salvanou, E. A., Bouziotis, P., Budlewski, T., Bilewicz, A., & Majkowska-Pilip, A. (2023). Improvement of the Effectiveness of HER2+ Cancer Therapy by Use of Doxorubicin and Trastuzumab Modified Radioactive Gold Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 20(9), 4676–4686. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00414>

Żelechowska-Matysiak, K., Wawrowicz, K., Wierzbicki, M., Budlewski, T., Bilewicz, A., & Majkowska-Pilip, A. (2023). Doxorubicin- and Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles as Potential Multimodal Agents for Targeted Therapy of HER2+ Cancers. *Molecules*, 28(6). <https://doi.org/10.3390/molecules28062451>

Zheng, M., Wang, H., Zhang, H., Ou, Q., Shen, B., Li, N., & Yu, B. (2000). *The influence of the p53 gene on the in vitro chemosensitivity of colorectal cancer cells.*