

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ACTIVIDAD ANTITUMORAL E INMUNOMODULADORA DE  
NANOPARTÍCULAS DE PLATA / B-D-GLUCOSA SOBRE EL  
MICROAMBIENTE TUMORAL EN UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA**

**POR**

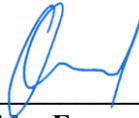
**M.C. PEDRO FÉLIX PIÑA**

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

**2026**

ACTIVIDAD ANTITUMORAL E INMUNOMODULADORA DE NANOPARTÍCULAS  
DE PLATA/B-D-GLUCOSA SOBRE EL MICROAMBIENTE TUMORAL EN UN  
MODELO DE CÁNCER DE MAMA

**Comité de Tesis**



---

**Dr. Moisés Armides Franco Molina**  
Presidente



---

**Dr. Santiago Saavedra Alonso**  
Secretario



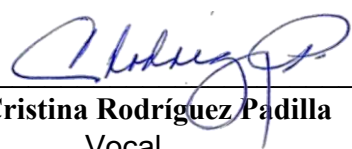
---

**Dr. Pablo Zapata Benavides**  
Vocal



---

**Dra. Diana Ginette Zarate Triviño**  
Vocal



---

**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**  
Vocal

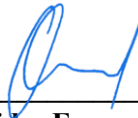


---

**Dra. Katiushka Arévalo Pardo**  
Subdirector de Posgrado

ACTIVIDAD ANTITUMORAL E INMUNOMODULADORA DE NANOPARTÍCULAS  
DE PLATA/B-D-GLUCOSA SOBRE EL MICROAMBIENTE TUMORAL EN UN  
MODELO DE CÁNCER DE MAMA

Dirección de Tesis



---

**Dr. Moisés Armides Franco Molina**  
Director

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

## AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que con su inestimable apoyo han colaborado en la realización de este proyecto de investigación.

En primer lugar, quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por abrirme sus puertas y permitirme trabajar en conjunto con todos ustedes. Sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) por la ayuda económica brindada. Gracias por depositar su confianza en mí.

A mi director de tesis, el Dr. Moisés Armides Franco Molina, que, con su gran calidad científica y humana, me acogió en su equipo de trabajo. Le agradezco sinceramente su confianza y todo el apoyo que me brindo. Logro guiarme durante todo este camino con sus consejos y por eso siempre le estaré agradecido.

A la Dra. Diana G. Zarate Triviño por haberme orientado en todos los momentos que necesite de su ayuda. Gracias doctora por todo el interés mostrado en mí y su gran colaboración en cada paso de este proyecto.

Agradezco profundamente al Dr. Pablo Zapata, quien me brindó su apoyo incondicional a lo largo de este proceso. Sus consejos, su guía y sus palabras de ánimo fueron un pilar fundamental en los momentos más desafiantes de mi formación doctoral.

Me gustaría agradecer a mis compañeros de doctorado por haberme acompañado en este proceso con su amistad, consejos e interés por mi trabajo. Especialmente a Juan, mi amigo, por su compañía incondicional, por las risas en los días difíciles y por recordarme siempre el valor de la amistad verdadera.

A ti Anna, que compartiste conmigo parte de este camino, por tu apoyo, comprensión y compañía en momentos decisivos. Agradezco sinceramente tu presencia y el impulso que significó en esta etapa de mi vida.

A mi perrita Mía, que, sin pedir nada a cambio, me enseñó el valor de la paciencia, la lealtad y el amor desinteresado. Este reconocimiento es para ella, un pequeño homenaje a quien hizo que este camino fuera no solo posible, sino también más cálido y lleno de alegría.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que de una manera u otra me ayudaron en la realización de este trabajo. Tal vez su nombre no aparezca, pero tienen mi más sincera gratitud.

A todos, gracias.

**A Dios**  
Tuyo es el reino, el poder y la gloria por siempre señor.  
—Mateo 6:13

# INDICE

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Cáncer: aspectos generales</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2 Cáncer de mama</b> .....	<b>4</b>
2.2.1 Anatomía y origen de las lesiones.....	4
2.2.2 Clasificación.....	5
2.2.2.1 Clasificación histológica .....	5
2.2.2.2 Clasificación por estadios.....	5
2.2.2.3 Clasificación por subtipos moleculares.....	6
2.2.3 Epidemiología .....	6
2.2.4 Tratamiento .....	6
2.2.4.1 Cirugía.....	7
2.2.4.2 Radioterapia .....	7
2.2.4.3 Quimioterapia.....	7
2.2.4.4 Inmunoterapia.....	8
2.2.5 Limitaciones en el tratamiento del cáncer de mama .....	8
<b>2.3 Muerte inmunogénica</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4 Nanotecnología</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4.1 Aplicación de la nanotecnología en la terapia contra el cáncer</b> .....	<b>11</b>
2.4.2 Nanopartículas metálicas.....	12
2.4.3. Nanopartículas de plata .....	13
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>4. HIPOTESIS</b> .....	<b>17</b>

<b>5. OBJETIVO DEL TRABAJO .....</b>	<b>18</b>
<b>6. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>19</b>
6.1 Reactivos y anticuerpos .....	19
6.2 Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	19
6.3 Síntesis de nanopartículas de plata utilizando $\beta$ -D-glucosa (AgNPs-G) .....	19
6.4 Caracterización de AgNPs-G.....	20
6.5 Aislamiento de células mononucleares de sangre y sangre periférica (PBMC) .....	20
6.6 Ensayo de citotoxicidad .....	20
6.7 Análisis del ciclo celular.....	21
6.8 Determinación de calreticulina .....	21
6.9 Ensayo de liberación de ATP.....	21
6.10 Ensayo de liberación de HMGB1 .....	22
6.11 Análisis de Western Blot .....	22
6.12 Animales .....	22
6.13 Vacunación antitumoral in vivo.....	23
6.14 Modelo de airbag, implantación de tumores y administración del tratamiento.....	23
6.14 Inmunohistoquímica .....	24
6.15 Determinación de citocinas.....	24
6.16 Aislamiento de leucocitos.....	25
6.17 Inmunofenotipificación de leucocitos.....	25
6.18 Análisis de sangre y suero .....	25
6.19 Tinción con hematoxilina-eosina.....	26
6.20 Análisis estadístico .....	26
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
7.1 Caracterización AgNPs-G.....	27

7.2 Efecto de AgNPs-G sobre la viabilidad y el ciclo celular de las células BC.....	29
7.3 El tratamiento con AgNPs-G induce la exposición y liberación de DAMP en células CM .....	31
7.4 La vacunación con células tratadas con AgNPs-G no impidió el establecimiento de tumores.....	35
7.5 El tratamiento con AgNPs-G disminuyó el volumen tumoral y prolongó la supervivencia de ratones portadores del tumor 4T1. ....	36
7.6 El tratamiento con AgNPs-G disminuyó la expresión de PCNA, IDO y Gal-3 y aumentó la de caspasa-3 .....	37
7.7 El tratamiento con AgNPs-G aumentó el porcentaje de células T citotóxicas, células de memoria y células efectoras innatas en el tejido tumoral. ....	38
7.8 El tratamiento con AgNPs-G aumentó los niveles de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-6 en el tejido tumoral. ....	39
7.9 El tratamiento con AgNPs-G aumentó los niveles séricos de TNF- $\alpha$ .....	40
7.10 El tratamiento con AgNPs-G no causó cambios significativos en los parámetros hematológicos. ....	41
7.12 El tratamiento con AgNPs-G generó cambios histomorfológicos en el hígado, riñón, pulmón, corazón o cerebro.....	43
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>45</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>52</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>53</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los cánceres de mama .....	6
Tabla 2. Nanopartículas metálicas y sus aplicaciones en la terapia contra el cáncer .....	12
Tabla 3. Efectos moleculares de las AgNPs tras la exposición en métodos in vitro .....	15
Tabla 4. Parámetros hematológicos de ratones BALB/c portadores de tumores 4T1 .....	41
Tabla 5. Parámetros bioquímicos de ratones portadores de tumores .....	42

# INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Pagina</b>
Figura 1. Sellos distintivos del cáncer.....	3
Figura 2. Esquema del proceso de muerte celular inmunogénica y la activación de la respuesta inmune adaptativa.....	10
Figura 3. Mecanismos de acción de las AgNP en células tumorales.....	13
Figura 4. Espectros UV-Vis y DLS de AgNPs -G..	28
Figura 5. Características morfológicas y espectrales de AgNPs - G.....	29
Figura 6. El tratamiento con AgNPs -G disminuye la viabilidad celular e interfiere con el ciclo celular.....	30
Figura 7. El tratamiento con AgNPs -G induce la liberación de HMGB1 y ATP.....	32
Figura 8. Expresión y liberación de las proteínas HSP70 y HSP90 en respuesta al tratamiento con AgNPs -G.....	33
Figura 9. El tratamiento con AgNPs -G indujo la exposición a calreticulina en líneas celulares de cáncer de mama..	34
Figura 10 . La vacunación con células tratadas con AgNPs -G CC50 y CC100 no impidió el establecimiento del tumor.....	35
Figura 11. Actividad antitumoral de AgNPs-G in vivo.....	35
Figura 12. Tinción inmunohistoquímica y porcentaje de expresión de PCNA, CTLA-4, caspasa-3, IDO y Gal-3 en tejido tumoral .....	35
Figura 13. Subpoblaciones de leucocitos en tejido tumoral. ....	35
Figura 14. El tratamiento con AgNPs-G aumentó los niveles de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-6 en el tejido tumoral.....	35
Figura 15. El tratamiento con AgNPs-G aumentó los niveles séricos de TNF- $\alpha$ .....	35
Figura 16. Micrografías de hígado, riñón, pulmón, corazón y cerebro. ....	35

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ATP	Adenosin trifosfato
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CD91	Grupo de diferenciación 91
CPA	Célula presentadora de antígeno
CRT	Calreticulina
DAMPs	Patrón molecular asociado a daño
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HMG	Proteína de alta movilidad
HMGB1	Proteína de alta movilidad del grupo caja-1
HSP70	Proteína del shock térmico 70
HSP90	Proteína del shock térmico 90
IFN	Interferón
LPS	Lipopolisacárido
MCP	Muerte celular programada
ml	Mililitro
mM	Milimolar
OXP	Oxaliplatino
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer fosfato salino
PE	Ficoeritrina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
TBS	Tris-buffer salino
U	Unidad
UFC-GM	Unidades formadoras de colonias- granulocitos-monocitos
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
μl	Microlitro
μM	Micromolar

## RESUMEN

La muerte celular inmunogénica (ICD) es un tipo de muerte celular capaz de estimular la inmunidad contra el cáncer a través de señales de peligro que conducen a una respuesta inmune adaptativa. Se ha demostrado que las nanopartículas de plata (AgNP) tienen un efecto citotóxico sobre las células cancerosas; sin embargo, su mecanismo de acción no se comprende completamente. El presente estudio sintetizó, caracterizó y evaluó el efecto citotóxico de AgNP reducidas con beta-D-glucosa (AgNP-G) contra células de cáncer de mama (CM) *in vitro*; y la inmunogenicidad de la muerte celular *in vitro* e *in vivo*. Además, se determinó el efecto antitumoral de las AgNP-G en un modelo murino de cáncer de mama triple negativo (CMTN) y su efecto sobre el microambiente tumoral. Los resultados mostraron que las AgNPs-G inducen la muerte celular de forma dosis-dependiente en líneas celulares de CM. Además, las AgNP-G mostraron efectos antiproliferativos al interferir con el ciclo celular. En cuanto a la detección de patrones moleculares asociados al daño (DAMP), se encontró que el tratamiento con AgNPs-G induce la exposición de calreticulina y la liberación de HSP70, HSP90, HMGB1 y ATP. *In vivo*, la vacunación profiláctica no impidió el establecimiento del tumor; sin embargo, el peso del tumor fue significativamente menor en los ratones vacunados con AgNPs-G, mientras que la tasa de supervivencia aumentó. En el modelo de bolsa de aire con implantación de células tumorales 4T1, la administración de AgNPs-G mostró actividad antitumoral. Mediante inmunohistoquímica se demostró que el tratamiento con AgNPs-G disminuyó la expresión de PCNA, IDO y GAL-3, y aumentó la expresión de Caspasa-3. En el microambiente tumoral, el tratamiento incrementó el porcentaje de linfocitos T de memoria y células efectoras innatas, y disminuyó el de linfocitos CD4+ y linfocitos T reguladores. También se observó un aumento en los niveles de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6, mientras que el TNF- $\alpha$  se incrementó en suero. En conclusión, hemos desarrollado un nuevo método para la síntesis de AgNPs-G, con actividad citotóxica antitumoral *in vitro* e *in vivo* sobre células BC, acompañada de la liberación de DAMPs y el remodelamiento del microambiente tumoral.

**Palabras clave:** nanotecnología;  $\beta$ -D-glucosa; nanopartículas de plata; cáncer; muerte celular inmunogénica.

## ABSTRACT

Immunogenic cell death (ICD) is a type of cell death capable of stimulating immunity against cancer through danger signals that lead to an adaptive immune response. Silver nanoparticles (AgNPs) have been shown to have a cytotoxic effect on cancer cells; however, their mechanism of action is not fully understood. This study synthesized, characterized, and evaluated the cytotoxic effect of beta-D-glucose-reduced AgNPs (AgNP-G) against breast cancer (BC) cells in vitro, and the immunogenicity of cell death in vitro and in vivo. Furthermore, the antitumor effect of AgNP-G was determined in a murine model of triple-negative breast cancer (TNBC) and its effect on the tumor microenvironment. The results showed that AgNP-G induces cell death in a dose-dependent manner in BC cell lines. In addition, AgNP-G showed antiproliferative effects by interfering with the cell cycle. Regarding the detection of damage-associated molecular patterns (DAMPs), treatment with AgNPs-G was found to induce calreticulin exposure and the release of HSP70, HSP90, HMGB1, and ATP. In vivo, prophylactic vaccination did not prevent tumor establishment; however, tumor weight was significantly lower in mice vaccinated with AgNPs-G, while the survival rate increased. In the 4T1 tumor cell implantation air bag model, administration of AgNPs-G showed antitumor activity. Immunohistochemistry demonstrated that treatment with AgNPs-G decreased the expression of PCNA, IDO, and GAL-3, and increased the expression of Caspase-3. In the tumor microenvironment, the treatment increased the percentage of memory T cells and innate effector cells, and decreased the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells and regulatory T cells. An increase in TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-6 levels was also observed, with serum TNF- $\alpha$  levels increasing. In conclusion, we have developed a novel method for the synthesis of AgNPs-G, exhibiting antitumor cytotoxic activity in vitro and in vivo against BC cells, accompanied by the release of DAMPs and remodeling of the tumor microenvironment.

**Keywords:** nanotechnology;  $\beta$ -D-glucose; silver nanoparticles; cancer; immunogenic cell death.

# 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente a nivel mundial y constituye una de las principales causas de mortalidad. Tan solo en los últimos años, esta enfermedad ha producido cambios llamativos en cuanto a datos epidemiológicos, diagnóstico, pronóstico y tratamiento; un hecho particularmente favorecido por el aumento de la esperanza de vida en la población. Se estima que, para el año 2030 se logre alcanzar la cifra de 11 millones de defunciones anuales en el mundo, representando un nuevo desafío para la economía global y protección financiera del sistema de salud (Mireles et al. 2018).

Para contrarrestar esta problemática surge un nuevo campo de interés científico, la inmunooncología, que aprovecha el propio sistema inmunitario del organismo para atacar a las células tumorales, suponiendo así, una nueva era en el tratamiento del cáncer. Con un enfoque distinto pero innovador, la inmunooncología pretende a la vez generar una memoria específica del tumor que logre evitar la recidiva del cáncer (Serrano et al. 2019). Para ello, la muerte celular inmunogénica se prefiere a cualquier otro tipo de muerte celular, ya que se caracteriza por la activación del sistema inmune innato y adaptativo a través de la liberación de DAMPs (del inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*, o patrones moleculares asociados a daño). No obstante, en la actualidad, pocos tratamientos quimioterapéuticos consiguen cumplir este cometido. De manera que, se hace necesaria la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos con la capacidad de inducir muerte inmunogénica (Asadzadeh et al. 2020).

En este contexto, las nanopartículas de plata han mostrado la capacidad de inducir apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama a través de la activación de caspasa-3, muerte asociada con la liberación de DAMPs y, por ende, característica de muerte celular inmunogénica (Liu et al. 2017). Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de nanopartículas de plata sintetizadas con  $\beta$ -D-glucosa *in vivo* en un modelo murino de cáncer de mama 4T1 sobre la capacidad de inducir muerte celular inmunogénica, así como su efecto como nanorregulador microambiental *in situ*.

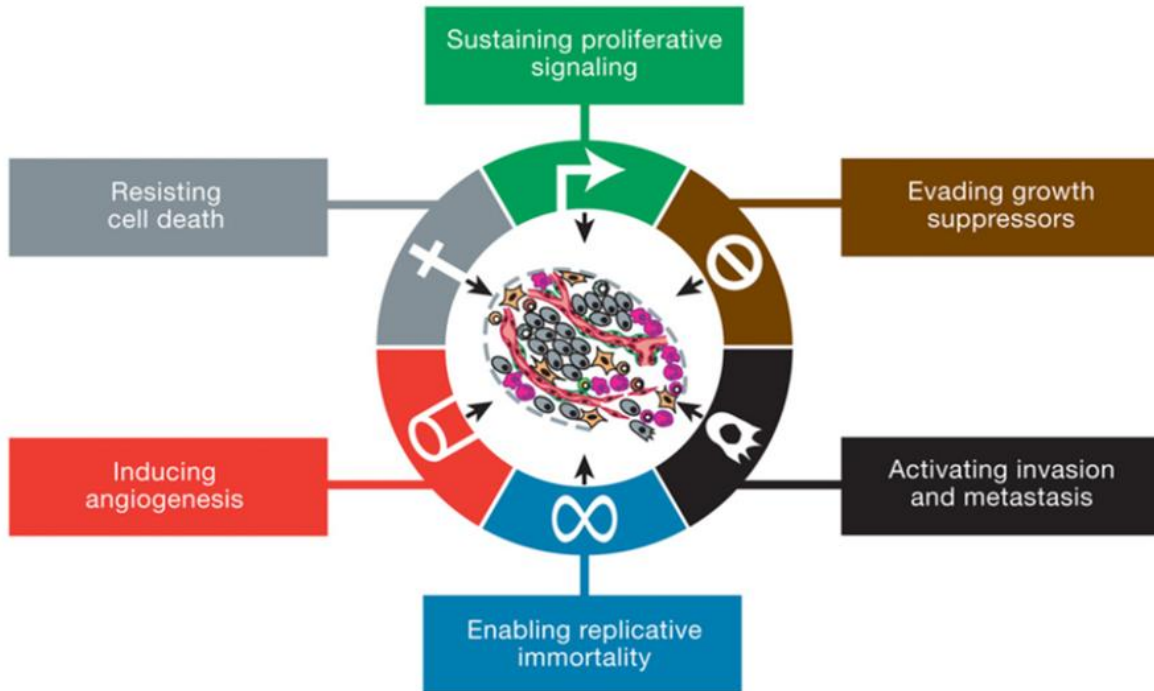
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cáncer: aspectos generales

El término “cáncer” es un nombre genérico asignado a un grupo amplio de enfermedades cuya característica principal es el crecimiento descontrolado de células anormales. Su origen deriva de la palabra griega “Karkinos” (relativo al cangrejo), utilizada por primera vez por el médico Hipócrates (400 a.C.) haciendo referencia a la similitud entre la aparición de tumores y lesiones endurecidas con las patas de los cangrejos. Tiempo después, karkinos se convertiría en “carcinomas” y finalmente en la palabra latina cáncer (Hondermarck 2019).

Han pasado 24 siglos desde Hipócrates y nuestro conocimiento se ha expandido epidemiológica, clínica, celular y molecularmente, sin embargo, nuestra comprensión del cáncer sigue siendo limitada. Como consecuencia de esto, se estima que 9.6 millones de personas mueren anualmente por cáncer, posicionándose como la segunda causa de muerte a nivel mundial (OMS 2018).

Naturalmente, las células del organismo crecen, se dividen para formar nuevas células y mueren ordenadamente. Sin embargo, en el cáncer, este proceso ordenado se descontrola. Las células cancerosas continúan creciendo, proliferando y evadiendo la muerte celular. Racionalizar la complejidad que rodea al cáncer podría ser complicado, no obstante, en el año 2011, Hanagan y Weinberg publicaron los “sellos distintivos del cáncer”, un principio organizador que permite comprender las capacidades distintivas y complementarias del crecimiento tumoral. Entre estos sellos se encuentran la evasión de supresores de crecimiento, evasión de la respuesta inmunológica, adquisición de inmortalidad replicativa, inflamación promovida por el tumor, activación de invasión y metástasis, inducción de angiogénesis, mutación e inestabilidad genómica, evasión de apoptosis y desregulación energética celular. Si bien la mayoría de los cánceres poseen estos sellos distintivos, su adquisición puede aparecer en distintas fases (véase figura 1).



**Figura 1. Sellos distintivos del cáncer.** Principales características y capacidades adquiridas por las células tumorales durante la progresión del cáncer. (Hanahan y Weinberg 2011)

En las células cancerosas, las vías de señalización de proliferación presentan alteraciones que les da una ventaja de supervivencia. Macroscópicamente, esto se ve reflejado en el aumento del volumen de los tejidos, formando una masa denominada “tumor” (Fouad y Aanei 2017). Los tumores pueden ser benignos o malignos. Los tumores malignos se definen molecularmente como un crecimiento celular descontrolado mediado por una serie de mutaciones adquiridas que afectan la progenie clonal de una célula, desencadenando una proliferación excesiva e independiente de señales de crecimiento (Kumar et al. 2008, 2014). Las neoplasias pueden surgir de cualquier célula del organismo, motivo por el cual, actualmente se han reportado más de 100 tipos diferentes de cáncer (Siegel y Jemal 2019).

El crecimiento exacerbado de las células tumorales provoca la compresión de los tejidos anexos, invadiendo zonas adyacentes y, eventualmente, diseminándose a órganos distantes, proceso denominado como metástasis (Herrera 2013). En esencia, la metástasis es el desarrollo de una masa secundaria sin conexión directa con el tumor de origen, la cual implica un complejo número de interacciones extrínsecas e intrínsecas entre la célula tumoral y

múltiples microambientes (Welch y Hurst 2019).

El microambiente del tumor es la región específica donde células tumorales, estromales no cancerosas e inmunológicas del huésped, interactúan de forma activa. Se sabe que, el microambiente tumoral brinda las condiciones necesarias a las células cancerosas para mantener la proliferación replicativa y escapar a los mecanismos de muerte celular programada (Nagarsheth y Zou 2017). Por su parte, las células tumorales influyen directamente en la estructura y función del estroma mediante la secreción de moléculas de señalización al medio extracelular (Thakkar et al. 2020).

## **2.2 Cáncer de mama**

### **2.2.1 Anatomía y origen de las lesiones**

La mama o también llamado seno, es una estructura glandular con función exocrina formada principalmente por dos tejidos, tejido adiposo y tejido glandular. En las mujeres, los senos suelen tener más tejido glandular, aunque esto depende mucho del ciclo hormonal y estado fisiológico. En el embarazo, el tejido glandular predomina ampliamente, mientras que, tras la menopausia el tejido glandular se atrofia y su volumen recae directamente en el tejido adiposo. Por su parte, los hombres también cuentan con senos, pero la cantidad de tejido glandular es muy baja. Anatómicamente, la mama se extiende de la segunda hasta la sexta costilla; medial al esternón y lateralmente a la línea media axilar. Además, esta se encuentra anclada a la fascia del músculo pectoral mayor por medio de los ligamentos de Cooper y se extiende oblicuamente hacia la axila (Gastouniotti et al. 2018).

El tejido adiposo de la mama se encuentra irrigado por una compleja red de vasos sanguíneos, nervios, vasos y ganglios linfáticos, además, está compuesto de tejido conectivo fibroso y ligamentos. El tejido glandular, a su vez, se compone principalmente por acinos glandulares y ductos. Los acinos glandulares son estructuras compactas esferoidales donde se encuentran las células secretoras, también denominadas lactocitos. Los ductos son estructuras tubulares ramificadas cuya luz confluye directamente en canalillos que desembocan en los galactóforos. Una glándula mamaria consta de 15 a 25 lóbulos, dentro de los cuales, a su vez, existen entre 50 a 75 lobulillos. Como se mencionó anteriormente, la glándula mamaria está expuesta a los cambios hormonales, y esto es debido a que tanto las células acinares (en los lóbulos) como las células luminales (en los ductos) expresan

receptores de estrógeno y progesterona constitutivamente. Además, las células luminales están rodeadas de células mioepiteliales, células de soporte que, pese a no expresar receptores hormonales nucleares, sí que expresan receptores de crecimiento epidermal. La exposición inusual a factores hormonales, fisicoquímicos y/o biológicos, predisponen la iniciación, promoción y progresión del cáncer de mama (Nahid et al. 2017).

### **2.2.2 Clasificación**

El cáncer de mama es el resultado de una gran variedad de lesiones celulares heterogéneas y morfológicamente diversas que han dificultado la clasificación de este. Sin embargo, actualmente puede ser clasificado con base en su histología, estadio y subtipos moleculares (Paruch et al. 2019).

#### **2.2.2.1 Clasificación histológica**

Una clasificación patológica convencional divide las lesiones con base a su histología en: (1) lesiones *in situ* y (2) lesiones invasivas. Entre las lesiones *in situ* podemos encontrar las de tipo ductal (carcinoma ductal *in situ*) y las lobulares (carcinoma lobular *in situ*). Por su parte, las lesiones invasivas constan de una gran variedad de subtipos histológicos, los cuales se pueden clasificar en base a su porcentaje de aparición; un ejemplo de esto podría ser el carcinoma ductal infiltrante, cuyo porcentaje de aparición se estima en un 76%, muy por encima de otros tipos de lesiones invasivas como lo son el carcinoma lobular invasivo (8%) o el carcinoma ducto-lobular (7%).

#### **2.2.2.2 Clasificación por estadios**

Este sistema de clasificación permite agrupar dentro de cuatro estadios al cáncer de mama. Cada estadio es dado en base a un sistema de clasificación denominado TNM, referente a: tamaño de tumor (T), extensión a ganglios linfáticos regionales (N) y metástasis distante (M).

El estadio I (*in situ*) es considerado como un estado temprano de la enfermedad donde las células tumorales están confinadas al tejido del cual se originaron. El estadio II (local) es designado al cáncer invasivo que este confinado en la mama que, al igual que el estadio I, se considera una etapa temprana. El estadio III (regional) se considera una etapa avanzada, en la cual el cáncer se ha esparcido a los ganglios linfáticos regionales sin signos de metástasis. Finalmente, el estadio IV (distante) presenta metástasis a órganos distantes, siendo la etapa más avanzada de la enfermedad y de peor pronóstico.

### 2.2.2.3 Clasificación por subtipos moleculares

Esta clasificación se da en función de las características genéticas que expresan las células tumorales, como lo son: el receptor de estrógeno (ER, por sus siglas en inglés *estrogen receptor*), el receptor de progesterona (PR, por sus siglas en inglés *progesterone receptor*) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2). (véase tabla 1) (Mehanna et al. 2019).

**Tabla 1.** Clasificación de los cánceres de mama

CLASIFICACIÓN	BIOMARCADORES TUMORALES
LUMINAL A	ER+ PR± HER-
LUMINAL B	ER+ PR± HER+
HER2+	ER- PR- HER+
TNBC (TIPO BASAL)	ER- PR- HER-

TNBC: cáncer de mama triple negativo; RE: receptor de estrógenos; PR: receptor de progesterona. (Adaptado de Garmpis et al. 2017).

### 2.2.3 Epidemiología

En México, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente entre sus habitantes, siendo las mujeres las más propensas a padecerlo con una tasa de incidencia de 39.5 por 100,000 habitantes (Globocan 2018). Se estima que, 1 de cada 8 mujeres podría desarrollar cáncer de mama a lo largo de su vida, cifra contrastante al género masculino, cuya probabilidad es de 1 en 1000 (OMS 2018).

La tasa de mortalidad por cáncer de mama en México muestra un aumento notable. A principios de la década de 1960, la mortalidad registrada era de solo 2 muertes por cada 100,000 casos. Entre los años de 1990 y 1999, esta cifra aumento a 9 por 100,000 casos (Herrera 2013). Actualmente, la tasa de mortalidad por cáncer de mama en México es de 9.9 por 100,000 casos (Globocan 2018). Según estadísticas de Globocan, se estima que para el año 2030, 24,386 mujeres serán diagnosticadas con cáncer de mama en México y 9,778 morirán por ello.

### 2.2.4 Tratamiento

El principal objetivo del tratamiento contra el cáncer de mama es preservar la calidad y

prolongar la esperanza de vida del paciente. Actualmente, son la cirugía, radioterapia, quimioterapia y tratamientos hormonales, los tratamientos de elección. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado distintas alternativas, tales como el uso de inmunoterapia, trasplantes de células madre, terapia dirigida y medicina de precisión. Las estrategias por emplear en la terapia contra el cáncer dependerán de diversos factores, tales como el origen, diseminación y la condición física del paciente (Akram et al. 2017).

#### **2.2.4.1 Cirugía**

Es considerada la principal opción de tratamiento en pacientes donde el cáncer se encuentra localizado y delimitado. Los tipos de cirugía varían de acuerdo con la cantidad de tejido que será extirpado y las características del cáncer. Dentro de las cirugías más comunes se encuentra la lumpectomía o tumorectomía parcial, técnica que consiste en la extirpación de parte de la glándula mamaria que contiene el tumor maligno. Por lo general, en este tipo de cirugía se suele retirar un poco de tejido sano (margen del tumor) y ganglios linfáticos circundantes, manteniendo la integridad de la mama (Vaz et al. 2016). La mastectomía es un método eficaz en casos de cáncer mamario difuso, ya que, en estos casos una tumorectomía no es suficiente (Tuttle et al. 2007). Otro método quirúrgico es la ablación ovárica, puesto que, se emplea como adyuvante para el tratamiento contra el cáncer de mama. Puede ser inducida por radiación, extirpación quirúrgica de los ovarios y la utilización de análogos de la hormona luteinizante (Davidson 2001).

#### **2.2.4.2 Radioterapia**

Esta alternativa es posible en etapas tempranas de la enfermedad. Normalmente, su empleo se lleva a cabo en combinación con la tumorectomía para evitar realizar una mastectomía completa. Un estudio realizado en la India determinó que el 97% de mujeres sometidas a radioterapia, no tuvieron recurrencia local después del tratamiento (Nandi et al. 2014). De la misma manera, Zhou et al. (2012) mostraron que la radioterapia es más efectiva en etapas iniciales, los rayos de alta energía terminan con las células cancerígenas, la terapia puede ser empleada después de una tumorectomía o mastectomía para acabar con las células restantes en la mama.

#### **2.2.4.3 Quimioterapia**

Al hecho de destruir células cancerígenas por medio de ciertos fármacos se denomina quimioterapia. Los medicamentos generalmente brindan un alivio temporal a los síntomas,

aunque se han reportado algunos casos de éxito donde curan la enfermedad. Actualmente se han sintetizado una gran variedad fármacos de clase quimioterapéutica contra el cáncer, cuya actividad se basa en la capacidad de alquilación biológica, no obstante, la dosis eficaz de estos agentes alquilantes es similar a la dosis tóxica. Algunos estudios reportan el uso efectivo de antineoplásicos combinados contra cáncer altamente metastásico, tal es el caso del uso de Pemetrexed y Lobaplatin sobre pacientes con fase metastásica que no respondían a la terapia con antraciclinas o taxanos (Deng et al. 2013).

Los medicamentos que se emplean en la quimioterapia según la Sociedad Estadounidense del Cáncer son Capecitabina (Xeloda), Carboplatino (Paraplatino), Ciclofosfamida (Cytosan), Docetaxel, Doxorubicina liposomal (Doxil), Paclitaxel, Platino (cisplatino, carboplatino), Vinorelbina (Navelbina), entre otros (Benson et al. 2004). No obstante, estos fármacos presentan diversos efectos secundarios que van desde náuseas, vómitos, pérdida de cabello, problemas de fertilidad, entre otros (Shapiro y Recht 2001).

#### **2.2.4.4 Inmunoterapia**

La inmunoterapia del cáncer tiene como objetivo estimular al sistema inmune para el rechazo del tumor de una manera específica, con una respuesta de larga duración y memoria inmunológica. La inmunoterapia suele utilizarse en etapas de remisión del cáncer o cuando el tumor es resistente a tratamientos, puede administrarse de forma individual o combinada con terapias convencionales o con otros tipos de inmunoterapia. Entre estas estrategias, la terapia celular adoptiva consiste en extraer sangre del paciente para obtener y generar linfocitos específicos contra el tumor *in vitro*, los cuales son posteriormente reinfundidos en el paciente para atacar y destruir las células tumorales. También se utilizan anticuerpos monoclonales como terapia dirigida para bloquear alguna proteína en específico de las células tumorales; en la inmunoterapia no específica, se busca estimular al sistema inmune utilizando terapias con interferones, interleucinas y factores estimulantes de colonias; en la inmunoterapia activa se estimula al sistema inmune responsable de la respuesta antitumoral con la administración de vacunas (Chiang C et al. 2015; Arango y González, 2002).

#### **2.2.5 Limitaciones en el tratamiento del cáncer de mama**

Los tratamientos empleados más frecuentemente en casos de cáncer de mama son cirugía, radioterapia y quimioterapia, los cuales han mejorado pronósticos desalentadores para

muchos pacientes. A pesar de las ventajas que brindan estas terapias, poseen múltiples desventajas como la falta de especificidad, limitada biodisponibilidad, alta toxicidad y efectos secundarios en los pacientes tratados (Moo et al. 2018).

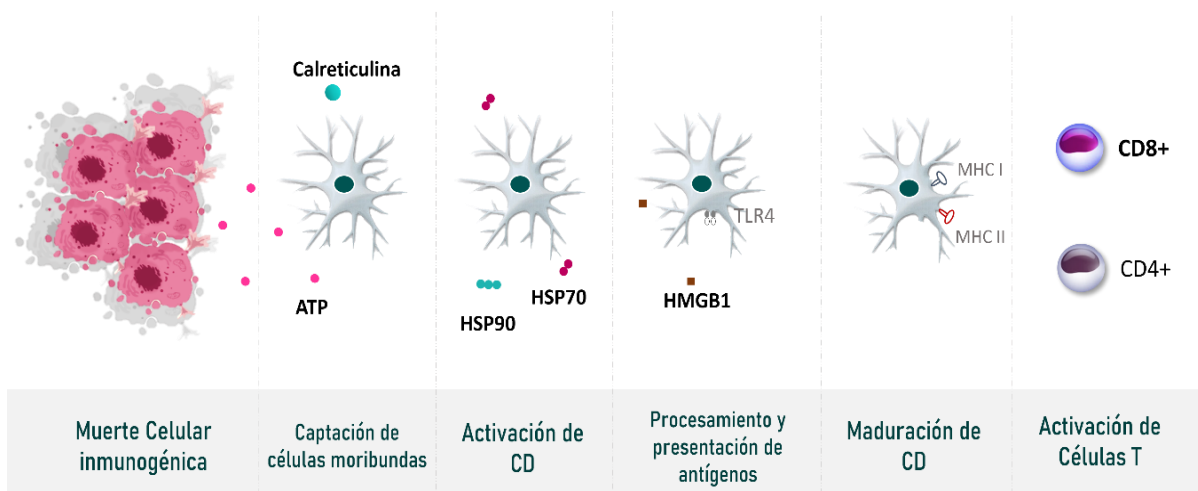
La mayoría de los agentes quimioterapéuticos actúan sobre células en proceso de división, ya que la principal característica de las células del cáncer es su elevada tasa de proliferación. Los quimioterapéuticos carecen de especificidad, no solo dañan células cancerosas, sino que también afectan células sanas, ya que estas también tienen una rápida división celular, tal es el caso de las células de la medula ósea, folículos de cabello, gónadas y mucosa gastrointestinal. Los efectos secundarios se suelen presentar rápidamente al aplicar los agentes terapéuticos, pudiendo ser náuseas, vómito, mielosupresión, pérdida de cabello y fertilidad (Bodai y Tusó 2015). Padegimas et al. (2019) reportaron una alta incidencia de enfermedades cardiovasculares en pacientes con cáncer de mama que estuvieron en tratamiento de quimioterapia, al parecer se genera una disfunción cardíaca progresiva que puede ser causa de una interrupción en la quimioterapia, lo cual complica y afecta el pronóstico del paciente (Bird y Swain 2008).

Otra limitación a la cual se enfrentan los agentes quimioterapéuticos es al desarrollo de resistencia múltiple a fármacos (por sus siglas en inglés MDR), lo cual dificulta aún más el tratamiento de esta enfermedad (Si et al. 2019), se han implementado estrategias como el uso de combinaciones racionales de terapias utilizando diversos compuestos que permitan obtener el beneficio terapéutico y minorice la probabilidad de MDR (Fisusi y Akala 2019).

### **2.3 Muerte inmunogénica**

La muerte celular inmunogénica (ICD) es un tipo de muerte celular regulada capaz de activar una respuesta inmune adaptativa en huéspedes singénicos inmunocompetentes. Se caracteriza por una secuencia temporal de eventos que incluyen la liberación o exposición coordinada de moléculas inmunogénicas denominadas patrones moleculares asociados al daño (DAMP). Si bien, todas las células contienen DAMP a concentraciones adecuadas para estimular al sistema inmunitario, la cinética y la intensidad de su liberación son factores claves para impulsar la ICD. Dentro de los principales DAMP y eventos relacionados con la ICD se encuentran la translocación temprana de calreticulina (CRT) a la superficie celular,

la exposición y liberación de proteínas de choque térmico 70 y 90 (HSP70 y HSP9, respectivamente) y la liberación de ATP y la caja 1 del grupo de alta movilidad de la proteína cromatina no histona (HMGB1). De manera colectiva, estos DAMP actúan en la captación, procesamiento y presentación de antígenos, lo que resulta en la activación de linfocitos T (véase figura 2). Sin embargo, la adyuvancia generada por la liberación de DAMP no es suficiente para determinar si una molécula tiene la capacidad de inducir ICD, por lo cual, los ensayos de vacunación in vivo siguen siendo el estándar de oro para la detección de inductores de ICD (Ahmed, 2020; Kroemer, 2022; Galluzi, 2020).



**Figura 2. Esquema del proceso de muerte celular inmunogénica y la activación de la respuesta inmune adaptativa.** Se muestran las etapas de muerte celular inmunogénica. (Kroemer, 2022)

## 2.4 Nanotecnología

La nanotecnología es la ciencia que se encarga de manipular y controlar la materia a escala atómica. Su origen se atribuye al físico estadounidense R. Feynman, quien en el año de 1959 realizaría un discurso para la Asociación Americana de Física (APS, por sus siglas en inglés American Physical Society) titulado “There is plenty of room at the bottom: an invitation to enter a new field of Physics” donde se mencionaría por primera vez la posibilidad de crear objetos nanodimensionales utilizando únicamente átomos como material de construcción (Feynman, 1960; Drexler 2004). Desde entonces, esta idea se ha desarrollado creando nanomateriales a partir de elementos conocidos por medio de reacciones fisicoquímicas.

### **2.4.1 Aplicación de la nanotecnología en la terapia contra el cáncer**

La aplicación de la nanotecnología a la ciencia médica a generado un gran interés entre los investigadores, brindando la oportunidad de estudiar y manipular materiales a escalas nanométricas. En general, los fenómenos biológicos, incluidos aquellos que conducen al cáncer, ocurren a nanoescala. Por ello, actualmente cada día se incrementa el interés por desarrollar agentes nanoterapéuticos que logren hacer frente a esta enfermedad (Auría et al. 2019). Desde la primera nanomedicina liposomal aprobada para la terapia contra el cáncer por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos, muchos grupos de investigación han estudiado el potencial de distintas plataformas de administración mediadas por nanopartículas (Grodzinski et al. 2019). A pesar de esto, los avances siguen siendo limitados debido al desafío que suponen las barreras biológicas, inmunológicas y traslacionales.

En general, el éxito de las nanopartículas como terapia anticancerígena se ve influenciado por diferentes factores como: (1) su estabilidad y tiempo de circulación, (2) la capacidad para atravesar barreras fisiológicas y acceder a sitios afectados, (3) su biodisponibilidad y (4) su perfil de seguridad. Teniendo en cuenta esto, el uso de nanopartículas metálicas supone una ventaja, ya que estas pueden ser personalizadas mediante la modulación de sus propiedades, incluyendo tamaño, forma y carga (Evans et al. 2017).

Como se mencionó anteriormente, diferentes factores afectan la eficacia de las terapias existentes contra el cáncer, sin embargo, se acepta que el principal obstáculo es la escasa penetración tumoral. En el cáncer, a medida que la masa tumoral crece, los vasos sanguíneos también lo hacen, expandiéndose rápidamente para cubrir las necesidades de oxígeno y nutrientes. Este crecimiento acelerado provoca poros en los vasos sanguíneos de entre 40 nm a 1  $\mu\text{m}$ , permitiendo que nanopartículas se extravasen en la masa tumoral y se acumulen. Este suceso denominado Efecto de Retención y Permeabilidad (EPR, por sus siglas en inglés *Enhanced Permeability and Retention*) es muy bien aprovechado por las nanopartículas de entre 8 a 100 nm (Grodzinski et al. 2019). La mayoría de las nanopartículas actuales aplicadas al cáncer buscan garantizar una alta acumulación y con ello, optimizar la eficacia del tratamiento.

## 2.4.2 Nanopartículas metálicas

En los últimos años, las nanopartículas metálicas han capturado el interés de muchos científicos alrededor del mundo, esto debido a sus propiedades físicas, químicas y mecánicas, distintas a las de tamaño macroscópico (Torres 2008). Sus primeros usos podrían ubicarse miles de años atrás en la cultura egipcia, la cual utilizaba nanopartículas de oro como coloides medicinales para preservar la salud y mantener la juventud. Otro ejemplo podría ser la cultura china que además de utilizar nanopartículas metálicas con fines medicinales, las empleaba como colorantes inorgánicos en la fabricación de porcelana (Wing 2006). Actualmente, las nanopartículas metálicas se emplean mayoritariamente como dispositivos para la administración de medicamentos y agentes para bioimágenes, tales como: fármacos quimioterapéuticos, proteínas, vacunas, fármacos biotecnológicos, etc. En la tabla 2 se resumen algunas de las nanopartículas metálicas mayormente empleadas en la terapia contra el cáncer.

**Tabla 2.** Nanopartículas metálicas y sus aplicaciones en la terapia contra el cáncer

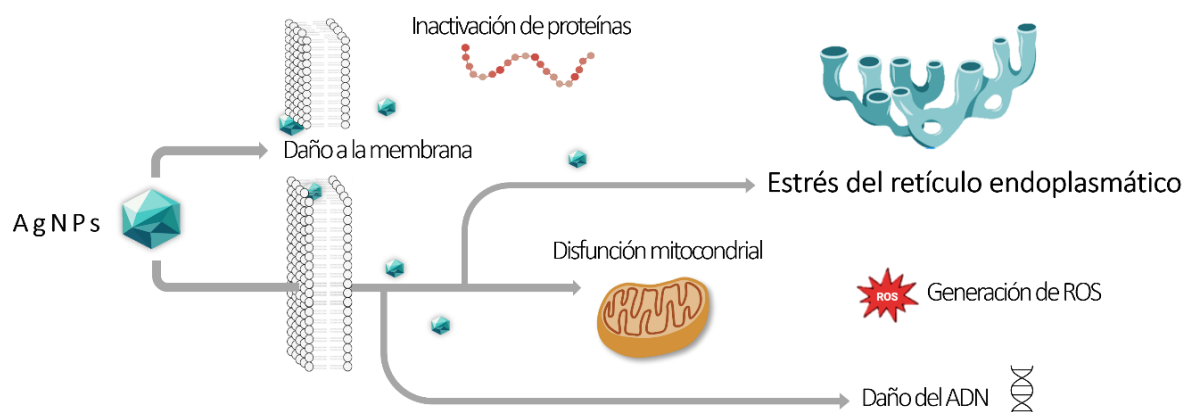
Nanopartícula metálica	Uso	Mecanismo	Resultado
Oxido de aluminio	Auxiliar	Mejora los efectos anticancerígenos de las vacunas de células tumorales	Se observaron tamaños más pequeños en CTL cuando se coadministra con vacunas de células tumorales
Oxido de cobalto	Entrega de antígeno	Inducir la activación de macrófagos	Aumento de CTL específicos de antígeno <i>in vivo</i>
Plata	Reducir las citocinas promotoras de tumores	Disminución de la señalización de IL-1 $\beta$ en el microambiente tumoral	Inhibición del crecimiento tumoral de fibrosarcoma <i>in vivo</i>
Oro	Entrega de antígeno / adyuvante; Terapia fototermal	Aumento de las respuestas de CTL; la ablación tumoral libera antígenos tumorales	Reducción del crecimiento tumoral <i>in vivo</i> ; impidió el crecimiento tumoral <i>in vivo</i>
Óxido de hierro	Polarización de macrófagos M1; Entrega de proteínas; Terapia fototermal	Aumento de la proliferación de macrófagos proinflamatorios; Antígenos acompañados de IONP-HSP para APC; ablación térmica de tumores	Crecimiento tumoral inhibido; IONP-HSP70 condujo a respuestas CTL específicas de tumor; la ablación condujo a la inmunidad protectora

CTL: linfocito T citotóxico . IONP: nanopartícula de óxido de hierro . HSP: proteína de choque térmico . IL-1  $\beta$ : interleucina 1 beta. ROS: especies reactivas de oxígeno . DC: célula dendrítica. APC: célula presentadora de antígeno. (Adaptado de Evans et al. 2017).

### 2.4.3. Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNP) se encuentran como uno de los nanomateriales (NM) emergentes de mayor interés, distribución y disponibilidad en las últimas décadas. De hecho, su uso se ha difundido ampliamente en la industria textil, cosméticos, enlatados, productos de limpieza, sistemas de purificación, etc. Si bien, su acción como agente antimicrobiano está ampliamente descrita en la literatura, parece que en la actualidad sus propiedades físicas (tamaño, carga superficial, solvatación, etc.) lo han conducido a distintos campos dentro de la nanomedicina (Panzarini et al. 2017). Hoy en día, las AgNPs son dirigidas como posibles agentes quimioterapéuticos, además de actuar como agentes de diagnóstico contra el cáncer mediante el direccionamiento, la detección y la formación de imágenes.

Una de las características mejor estudiadas de las AgNPs ha sido su toxicidad (citotoxicidad y genotoxicidad). Esta toxicidad celular procede a través de una vía apoptótica desencadenada por la producción de ROS y la disfunción mitocondrial (véase figura 3).



**Figura 3. Mecanismos de acción de las nanopartículas de plata (AgNP) en células tumorales.** Las AgNP pueden interactuar con la membrana celular, el ADN, las mitocondrias y el retículo endoplásmico, provocando daño oxidativo, estrés del retículo, disfunción mitocondrial y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que conduce a la muerte celular. (Adaptado de Coutinho et al. 2018)

Además, la naturaleza citotóxica y genotóxica de los AgNPs hacia las células cancerosas combinadas en nanoportadores, junto con la biocompatibilidad y la administración dirigida, potencia el uso de los AgNPs como terapias antitumorales. En la tabla 3 se resumen algunos estudios *in vitro* realizados con AgNPs en líneas de cáncer (Ong et al. 2013).

**Tabla 3.** Efectos moleculares de las AgNPs tras la exposición en métodos *in vitro*.

Año	Células cancerosas	Tamaño (NM)	Concentración	Resultados mecanobiológicos
2009	Células de hepatoma humano (HepG2)	7-20	Hasta 250 mg / ml	Aumento del nivel de glutatión (GSH); aumento de la apoptosis (tinción AO-EB) y actividad de caspasa 3
2009	A431HT-1080	7-20	1,56 a 500 µg / ml	Apoptosis inducida en líneas celulares A431 y HT-1080
2009	Adenocarcinoma de pulmón humano (células A549)	30-50	Hasta 15 mg / ml	Generación de ROS: formación de aductos de ADN. Citotoxicidad; ROS; estrés oxidativo
2013	Carcinoma de pulmón humano (células A549)	<100	0, 25, 50, 100 o 200 µg / ml	Niveles de ROS intracelulares; ciclo celular; nivel de expresión de la proteína del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA)
2011	Células de cáncer de colon humano (HT29)	172,6 ± 27,1	12 a 48 µg / ml	Generación ROS; apoptosis inducida (tinción AO-EB y tinción con anexina V); aumento de la fragmentación del ADN y la expresión de caspasa 3; despolarización de la membrana mitocondrial
2009	Células de hepatoma humano (HepG2)	5-10	Hasta 2 mg / ml	Generación de ROS y cambio de la expresión génica relacionada con el estrés oxidativo (catalasa, GPx1, MT1b y SOD1) Detección de fosforilación de g-H2AX; fuga de lactato deshidrogenasa (LDH)
2015	Células de cáncer de mama humano (MDA-MB-231)	300 y 600	5–25 µg / ml	Dirigido a p53; Bcl-2; p-p53; ROS; efectos anticancerígenos
2009	Células de hepatoma humano (HepG2)	7-10	1 mg / ml	Mayor formación de micronúcleos
2009	Células PC12	200	2,5–25 µg / ml	Expresión genética de Gss; Gpx; Txnrd

2008	Fibroblasto de ratón (NIH3T3) y células de cáncer de colon humano (HCT116)	1–100	Hasta 100 mg / ml	Generación ROS; aumento de la apoptosis (tinción con anexina V); expresión de p53 y activación de quinasas N-terminales c-Jun (JNK). Liberación del citocromo c inducida por NIH3T3 en el citosol y translocación del gen Bax a las mitocondrias y disminución de la expresión de Bcl-2
2011	Línea celular de hepatocitos humanos (LO2)	37,8, 6,7	Hasta 100 mg / ml	Aumento de la formación de MDA y reducción del nivel de GSH y la actividad de SOD; rotura inducida del ADN (ensayo cometa)
2010	Células de hepatoma humano (HepG2)	5,9–3,3,23,8–6,7,47,5–22,1	Hasta 50 mg / ml	Generación ROS; apoptosis inducida (tinción con anexina V y tinción Hoechst 33342) Nivel de GSH aumentado y disminuido; actividad reducida de SOD; detención del ciclo celular en la fase S
2012	Células SK-OV3	7,5 ± 2,5	1, 5 o 10 µg / ml	Células de caída de Nrf2; Daño al ADN y apoptosis
2019	Adenocarcinoma de mama humano (células MCF-7)	5, 75	212 µM	Marcadores de estrés en retículo endoplasmático; Niveles de calcio del retículo endoplasmático.
2018	Adenocarcinoma de pulmón humano (células A549)	633	10, 40 µg / ml	Bcl-2; Bax; caspasa-3, 7 expresión

(Adaptada de Raja et al. 2020)

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial que afecta a un alto porcentaje de la población mundial. En el caso específico del cáncer de mama, el desafío es aún mayor, pues a nivel global se estima la detección anual de aproximadamente 1.38 millones de nuevos casos y cerca de 571,000 decesos.

Actualmente, solo un número limitado de tratamientos quimioterapéuticos es capaz de inducir muerte celular inmunogénica (ICD), un tipo de muerte celular que se caracteriza por activar las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, generando memoria inmunológica que contribuye a prevenir la recidiva del cáncer. Por ello, resulta fundamental la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos con la capacidad de inducir este tipo de muerte.

En este contexto, las nanopartículas de plata (AgNPs) han mostrado la capacidad de inducir apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama mediante la activación de la caspasa-3, un proceso de muerte asociado con la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y, por ende, característico de la muerte celular inmunogénica (Liu et al., 2017). Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de AgNPs-G en un modelo murino de cáncer de mama 4T1 sobre su capacidad de inducir muerte celular inmunogénica, así como su potencial función como nanorregulador del microambiente tumoral *in situ*.

## **4. HIPOTESIS**

El tratamiento con AgNPs-G tiene la capacidad de inducir muerte celular inmunogénica y modular el microambiente tumoral en un modelo murino de cáncer de mama 4T1.

## 5. OBJETIVO DEL TRABAJO

### 5.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de AgNPs-G en la inducción de muerte celular inmunogénica y su actividad como inmunomodulador del microambiente tumoral.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto citotóxico de AgNPs-G en un modelo *in vitro* de cáncer de mama.
2. Determinar el efecto de AgNPs-G sobre la inducción de DAMP (Calreticulina, HSP90, HSP70, HMGB1, ATP) en un modelo *in vitro* de cáncer de mama.
3. Determinar el efecto sobre la expresión de los marcadores de memoria CD62L y CD44 en linfocitos T tras el co-cultivo con células dendríticas expuestas a células 4T1 tratadas previamente con AgNPs-G.
4. Evaluar el efecto de la administración subcutánea del extracto de células 4T1 tratadas con AgNPs-G en la prevención del cáncer de mama.
5. Determinar el efecto de AgNPs-G sobre el microambiente tumoral en un modelo murino de cáncer de mama 4T1.

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Reactivos y anticuerpos

El nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). La  $\beta$ -D-glucosa se obtuvo de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, EE. UU.), anticuerpos monoclonales de calreticulina conjugados con ficoeritrina (PE) (Cat. No. ADI-SPA-601PE-F) y control de isotipo IgG1 (Cat. No. ADI-SAB-600PE-D) se obtuvo de Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, EE. UU.). Los anticuerpos monoclonales de ratón contra HSP70 (n.º de cat. sc-24),  $\beta$ -actina (n.º de cat. sc-69879) y el anticuerpo policlonal de conejo HSP90 (n.º de cat. sc-7947) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EE. UU.). El kit BioAssay™ ELISA de proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) (ratón) se adquirió de US Biological Life Science (Salem, MA, EE. UU.).

### 6.2 Líneas celulares y condiciones de cultivo

La línea celular epitelial no tumorigénica MCF-10A (ATCC® CRL-10317™), líneas celulares de carcinoma mamario humano MCF-7 (ATCC® HTB-22™), MDA-MB-231 (ATCC® HTB -26), SK-BR3 (ATCC® HTB -30) y 4T1 murino (ATCC® CRL -2539) se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.). Las células MCF-10A se cultivaron en medio de crecimiento de células epiteliales mamarias (MEGM) y el resto en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO®, Thermo Scientific, Waltham, MA · EE. UU.), ambos suplementados con suero bovino fetal al 10% (FBS) (GIBCO®, México), y antibiótico-antimicótico al 1% (penicilina, estreptomina y anfotericina B) (Sigma, St. Louis MO, EE. UU.). Todas las líneas celulares se mantuvieron en condiciones específicas a una temperatura de 37 °C, una humedad relativa de  $\approx$ 85% y una atmósfera de 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$ .

### 6.3 Síntesis de nanopartículas de plata utilizando $\beta$ -D-glucosa (AgNPs-G)

La síntesis de AgNPs -G se realizó siguiendo la metodología descrita por Panzarini E. et al. (2017) con algunas modificaciones que se detallan a continuación. Se colocaron 10 ml de una solución acuosa 0,3 M de  $\beta$ -D-glucosa en un vaso de precipitados a 120 °C durante 5 min. Posteriormente se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{AgNO}_3$  2.5 mM y 10  $\mu\text{L}$  de solución

de NaOH 0.1 M hasta observar un cambio de color amarillo, indicativo de la formación de AgNPs -G.

#### **6.4 Caracterización de AgNPs-G**

Las características morfológicas y espectrales se determinaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (FEI Titan G2, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), microscopía de fuerza atómica (AFM) (NT-MDT, Moscú, Rusia), espectroscopia fotoelectrónica de rayos X. (XPS) (ULTRA DLD, Shimadzu Ltd., Kyoto, Japón) y análisis ultravioleta-visible (espectrómetro UV-Vis Agilent 8453, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). El tamaño de las partículas y los valores de polidispersidad se midieron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) y la dispersión de la luz por análisis de fase (PALS) para el potencial zeta se obtuvo mediante el Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido).

#### **6.5 Aislamiento de células mononucleares de sangre y sangre periférica (PBMC)**

La sangre se obtuvo de donantes sanos mediante venopunción y se recogió en tubos heparinizados. El aislamiento de PBMC se realizó mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll- Histopaque 1077 (Sigma, St Louis, MO, EE. UU.). La viabilidad de las PBMC se determinó mediante el método de exclusión de azul tripano (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.).

#### **6.6 Ensayo de citotoxicidad**

Además, se sembraron  $5 \times 10^3$  células por pocillo en una microplaca de 96 pocillos, una placa para cada línea celular, y se incubaron durante la noche a 37 °C en una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células se trataron con concentraciones de AgNPs-G que oscilan entre 250 y 3.9 μM durante 24 h. Luego, los pocillos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Luego de eso, se agregaron 100 μL de azul Alamar (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 20% *v / v*, y se incubó durante 4 h en las condiciones previamente descritas. Las lecturas de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofotómetro Synergy HT™ ( Biotek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.) a una

longitud de onda de excitación de 535 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. El porcentaje de citotoxicidad se definió mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Citotoxicidad} = 100 - [(A/B) \times 100]$$

Donde A corresponde a la absorbancia promedio de las células con tratamiento y B a la absorbancia promedio de las células que no recibieron tratamiento.

### **6.7 Análisis del ciclo celular**

Además, se sembraron  $1 \times 10^6$  células por pocillo en placas de 6 pocillos, se trataron con AgNP-G a una concentración citotóxica de 50 (CC50) y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, las células se recogieron, se lavaron, se fijaron en etanol al 70% v / v y se almacenaron a 4 °C. Para el análisis del ciclo celular, las células se lavaron y se incubaron en Triton X-100 0,5% v / v, solución de 7-amino actinomicina D (7-AAD) (10 µg/mL) durante 20 minutos en condiciones de oscuridad para su evaluación mediante citometría de flujo. (Citómetro de flujo BD FACSCanto II, San José, CA, EE. UU.). Para cada análisis, se recopilaron y analizaron 20 000 eventos utilizando el software FlowJo ( Becton Dickinson , Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.).

### **6.8 Determinación de calreticulina**

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células por pocillo en placas de 6 pocillos y se trataron con AgNPs-G a CC50. (para cada línea celular) y se incubaron durante 2 h. Posteriormente, las células se recogieron, se lavaron y se incubaron durante 1 h en la oscuridad con un anticuerpo monoclonal de calreticulina conjugado con ficoeritrina (1:100) y se evaluaron mediante citometría de flujo ( BD Accuri <sup>TM</sup> Citómetro de flujo C6, San José, CA, EE. UU.).

### **6.9 Ensayo de liberación de ATP**

Se trataron  $5 \times 10^5$  células con AgNPs-G (CC50 y CC100 para cada línea celular). Los niveles de ATP extracelular se evaluaron en los sobrenadantes utilizando el kit de detección de quimioluminiscencia cuantitativa (ENLITEN <sup>®</sup> ATP Assay System Bioluminescent Inspection Kit for ATP Measurement, PROMEGA) siguiendo las instrucciones del

fabricante. La bioluminiscencia se determinó utilizando un espectrofotómetro Synergy HT™ ( Biotek instrument, Winooski, VT, EE. UU.) a 560 nm.

#### **6.10 Ensayo de liberación de HMGB1**

Se trataron  $5 \times 10^5$  células con AgNPs-G (CC50 y CC100 para cada línea celular) durante 24 h. Los niveles de HMGB1 se evaluaron en los sobrenadantes de células tratadas y no tratadas utilizando el kit ELISA HMGB1 BioAssay (humano) para células MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR3 (Biological Life Science, Salem, MA, EE. UU.), y el kit HMGB1 BioAssay ELISA (ratón) para células 4T1 (Biological Life Science, Salem, MA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de la microplaca se realizó en un espectrofotómetro (Biotek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.) a 460 nm.

#### **6.11 Análisis de Western Blot**

Se sembraron líneas celulares de cáncer de mama a una densidad de  $5 \times 10^5$  células y se trataron con AgNPs-G (CC50 y CC100 para cada línea celular) durante 24 h. Las células y el sobrenadante se recogieron por separado. Las células se lavaron con PBS y se homogeneizaron utilizando el tampón de lisis SET 2X suplementado con un cóctel inhibidor de proteasa (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La cuantificación de proteínas se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Para la electroforesis, se colocaron 50 µg de proteína por carril en un gel de poliacrilamida al 12%. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia y se incubaron con los anticuerpos primarios para HSP70 y HSP90 durante 24 h, a 4 °C. Los anticuerpos primarios se detectaron utilizando un anticuerpo secundario específico marcado con peroxidasa de rábano picante. Finalmente, revelado por el sistema de sustrato de quimioluminiscencia enzimática (Thermo Scientific™, Waltham, MA, EE. UU.).

#### **6.12 Animales**

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de seis a ocho semanas de edad, que se mantuvieron en condiciones de instalación para animales (temperatura de 25 °C, humedad relativa de ≈55% y fotoperiodo de 12 h de luz / 12 h de oscuridad). Todos los ratones recibieron comida

y agua ad libitum . Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (San Nicolás de los Garza, NL, México).

### **6.13 Vacunación antitumoral in vivo**

Se trataron  $5 \times 10^5$  células 4T1 con AgNPs -G (CC50 y CC100) y AgNO<sub>3</sub> (2,5 mM) *in vitro*. Posteriormente, las células se recogieron, se lavaron y se centrifugaron a 800 x g durante 15 min. Las células se resuspendieron en 200 µl de PBS y se inocularon por vía subcutánea en el flanco izquierdo de los ratones. Siete días después, se inocularon células 4T1 viables por vía subcutánea en el flanco derecho. El volumen del tumor se midió diariamente hasta el sacrificio y se definió mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen del tumor: } 4/3 \times \pi \times L/2 \times W/2 \times h/2$$

Donde L corresponde al lado más largo, W al lado más corto y h a la altura del tumor.

### **6.14 Modelo de airbag, implantación de tumores y administración del tratamiento**

Seis días antes de la inoculación de las células tumorales, se rasuró el lomo del ratón y se inyectaron 5 ml de aire estéril por vía subcutánea. Tres días después, se inyectaron otros 3 ml de aire estéril. Se inyectaron células 4T1 viables ( $0,5 \times 10^6$ ) en la cavidad de aire. Nueve días después, al alcanzar un tamaño tumoral de aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos experimentales (n = 6): (1) grupo control, sin tratamiento; (2) grupo doxorrubicina, dosis única de doxorrubicina (Doxolem®, Teva Pharmaceuticals, México) (10 mg/kg, vía peritumoral); y (3) grupo AgNPs-G, dosis diaria durante 7 días de AgNPs-G (1,08 mg/kg, vía peritumoral). El volumen del tumor se midió diariamente usando un calibrador vernier hasta el día del sacrificio (30 días después de la inoculación de células 4T1) y se definió usando la siguiente ecuación (Sapi et al. 2015):

$$\text{Volumen del tumor: } 4/3 \times \pi \times L/2 \times W/2 \times h/2$$

Donde L corresponde al lado más largo, W al lado más corto y h a la altura del tumor.

Los tumores, una vez extirpados (postmortem), se pesaron con una balanza analítica de laboratorio TE241S (Sartorius, Göttingen, Alemania). Para el ensayo de supervivencia

animal, se mantuvieron cinco ratones adicionales por grupo durante 60 días tras la inoculación con células 4T1. Los ratones se sacrificaron si el volumen tumoral alcanzaba los 2000 mm<sup>3</sup>.

#### **6.14 Inmunohistoquímica**

Los tumores se disecaron y fijaron en formalina neutra al 10 % (pH 7,2) durante 24 h para su posterior inclusión en parafina. Se obtuvieron secciones tumorales de 3 a 5 µm, se desparafinaron y se hidrataron en xileno-alcohol. Posteriormente, las muestras se incubaron con tampón de citrato de sodio (citrato de sodio 10 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH 6,0) durante 30 min a 60 °C. Finalmente, se bloquearon con suero de caballo normal (Vector Laboratories, Newark, CA, EE. UU.). Las muestras se incubaron por separado con los anticuerpos primarios: anti-CTLA-4 sc-376016 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EE. UU.), anti-IDO sc-137012 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.), anti-Gal-3 sc-32790 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.), anti-Caspasa-3 ab214430 (Abcam Inc., Waltham, MA, EE. UU.) y anti-PCNA sc-528093 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EE. UU.). Todos los anticuerpos se incubaron a 4 °C durante 24 h (dilución 1:1000). Se utilizó un anticuerpo universal pan-específico biotilado (Vector Laboratories, Newark, CA, EE. UU.) como anticuerpo secundario. Las muestras se contratiñeron con hematoxilina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y se deshidrataron en un gradiente de xileno-alcohol para su inclusión en un medio de montaje (Entellan<sup>®</sup>, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). Las micrografías se obtuvieron con un microscopio Zeiss Imager Z1 (Zeiss, Alemania) acoplado a una cámara Ve-LX1000 (VELAB, Tlalpan, Ciudad de México, México). Las imágenes se procesaron con el software Velabview versión 2.0 (VELAB, Tlalpan, Ciudad de México, México). La tinción positiva para DAB se evidenció por la presencia de células marrones y se cuantificó con el software de procesamiento de imágenes Fiji (ImageJ versión 2.0).

#### **6.15 Determinación de citocinas**

Se analizaron los niveles de citocinas en suero y tejido tumoral obtenidos 30 días después de la inoculación de las células tumorales. Para la obtención de suero, se centrifugó sangre periférica a 3600 rpm durante 10 min a 4 °C. Por otro lado, los tumores se seccionaron e

incubaron a 4 °C con tampón de lisis (150 mM de cloruro de sodio, 1 % de Triton X-100, 50 mM de Tris, cóctel inhibidor de proteasas Halt™ y pH 8,0) durante 30 min con agitación suave. Posteriormente, las secciones de tumor lisadas se centrifugaron a 12 000 rpm durante 20 min a 4 °C y se recogieron los sobrenadantes para su posterior análisis. Los niveles de citocinas se cuantificaron mediante el kit BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit (BD Horizon, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La adquisición de datos se realizó con un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Horizon, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). Finalmente, los datos obtenidos se analizaron con el software CFlow plus versión 1.0.264.15 (BD Biosciences, Milpitas, CA, EE. UU.).

### **6.16 Aislamiento de leucocitos**

Los tumores se cortaron y se incubaron con agitación suave con 0,1 mg/mL de solución Liberase™ TL (Roche, Mannheim, Alemania) durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, los leucocitos se obtuvieron mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.17 Inmunofenotipificación de leucocitos**

Los leucocitos se marcaron con anticuerpos anti-ratón: anti-CD3 FITC 555274, anti-CD8 PE 553033, anti-CD4 APC 553051, anti-CD44 PE 51-9007324, anti-CD62 L APC 5-9007326, anti-CD16/CD32 APC 558636, anti-CD25 PE 12-0251-81 y anti-FOXP3 PE-Cy5 15-5773-80A; todos fabricados por BD Biosciences, CA, EE. UU. Solo para el marcaje de FOXP3, las células se prefijaron con formaldehído (4% v / v en PBS) durante 1 min, se permeabilizaron con metanol al 90% durante 30 min en un baño de agua con hielo, se lavaron y se resuspendieron en PBS. Todas las muestras con sus respectivos anticuerpos se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con albúmina (0,5 % p / v en PBS) y se resuspendieron en PBS para su posterior análisis. La adquisición de datos se realizó mediante un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Horizon, Franklin Lakes, CA, EE. UU.).

### **6.18 Análisis de sangre y suero**

Se recolectó sangre el día 30 posterior a la inoculación de las células tumorales en tubos de

microtitulación con EDTA-K2 (sangre), heparina de litio y gel (suero) para cada grupo experimental. Los parámetros hematológicos se analizaron con un analizador hematológico BC2800 (Mindray, Shenzhen, China), mientras que los parámetros bioquímicos se analizaron con un analizador químico automatizado Skyla VB1 (Skyla, Hsinchu, Taiwán).

### **6.19 Tinción con hematoxilina-eosina**

El cerebro, los pulmones, el corazón, el hígado y los riñones se extrajeron post mortem de los ratones de cada grupo experimental y se fijaron en formalina (10 % en PBS, pH 7,2) durante 24 h para su posterior inclusión en parafina. Los tumores se seccionaron en cortes de 3 a 5  $\mu\text{m}$ , se desparafinaron y se hidrataron en una gradiente de xileno-alcohol. A continuación, los tejidos se tiñeron con hematoxilina de Mayer durante 3 min y se contratiñeron con eosina-floxina B durante 30 s. Finalmente, las muestras se deshidrataron en una gradiente de xileno-alcohol para su inclusión en un medio de montaje (Entellan® · Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

### **6.20 Análisis estadístico**

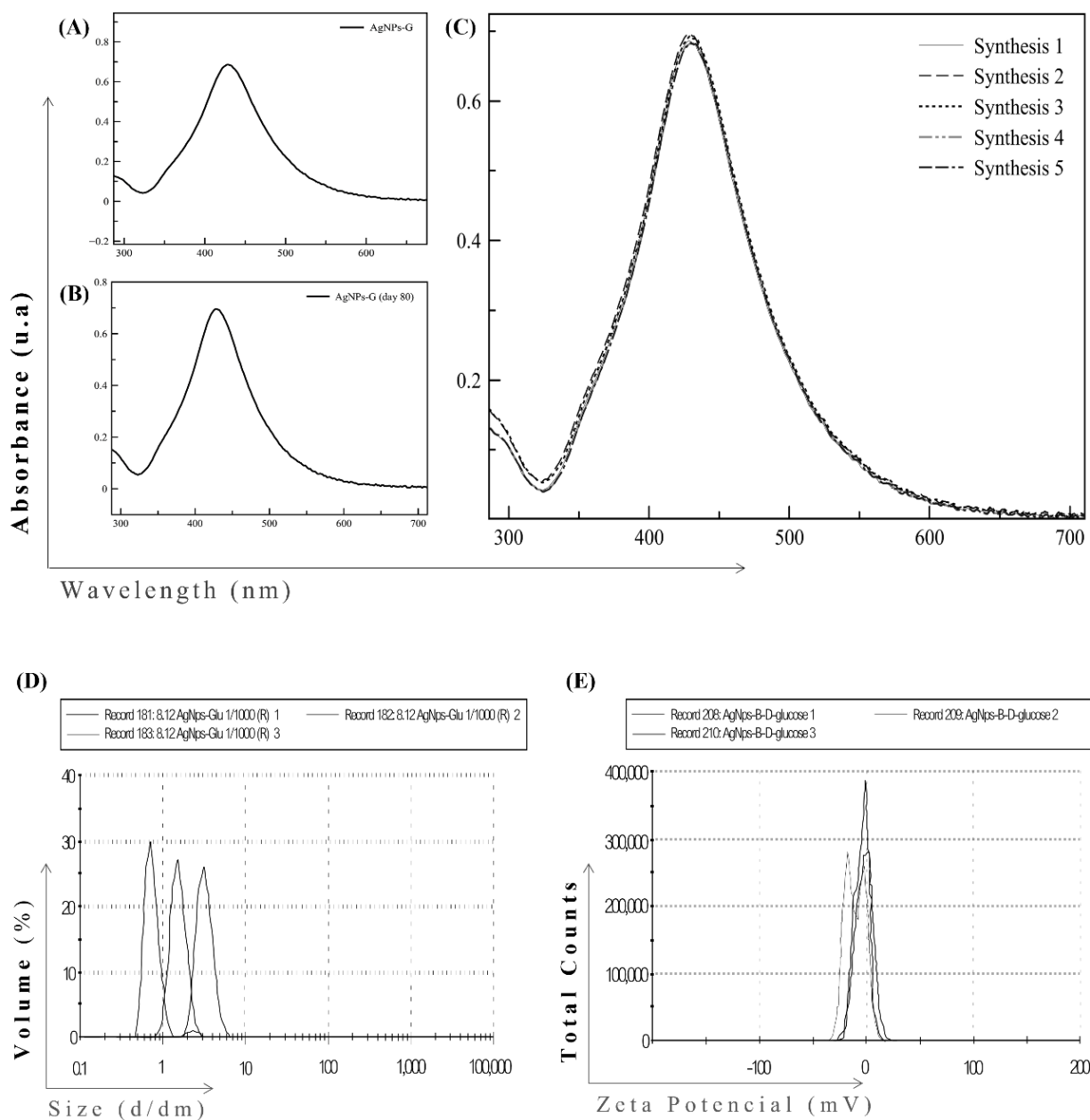
Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado con un estudio experimental de tipo análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Tukey utilizando el software GraphPad Prism (San Diego CA, EE. UU.). Los valores *de p* se consideraron significativos de la siguiente manera:  $p < 0,033$  (\*),  $p < 0,002$ (\*\*),  $p < 0,0002$ (\*\*\*) y  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). Las letras (a, b, c, d, e y f) muestran una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos.

## 7. RESULTADOS

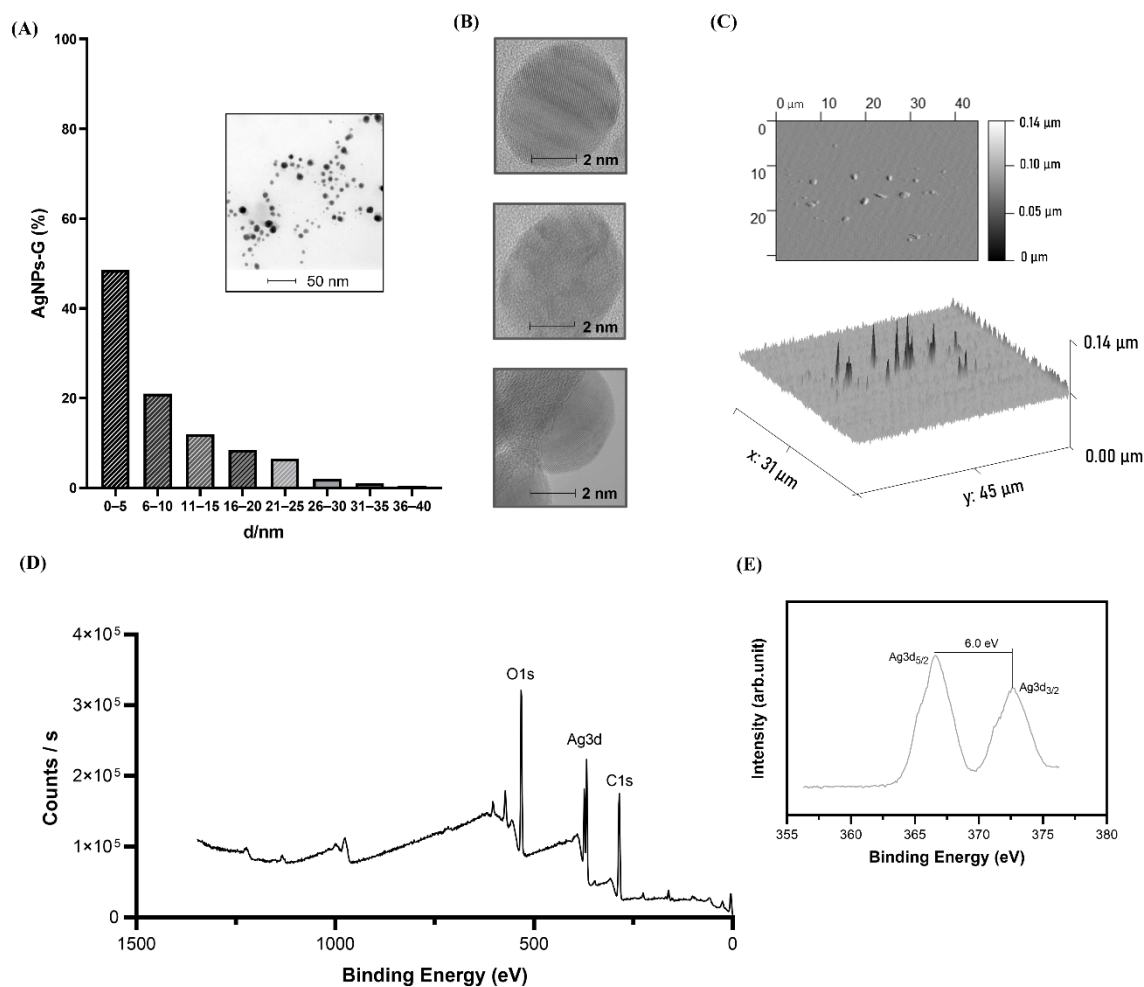
### 7.1 Caracterización AgNPs-G

El primer paso fue desarrollar un método simple de síntesis de flujo ascendente para la formación de AgNPs-G estables. La generación de AgNPs-G estuvo acompañada por un cambio de color en la solución de incoloro a amarillo pálido, que fue confirmado por espectroscopia UV-visible. Los espectros de absorbancia UV-visible de AgNPs-G el día 0 (Figura 1a) mostraron una fuerte banda de excitación con un máximo  $\lambda$  a 423 nm, característica de las nanopartículas de plata. Para confirmar la estabilidad espectral de AgNPs-G en solución, todas las preparaciones se mantuvieron a temperatura ambiente y se protegieron de la luz solar directa. Las mediciones de los espectros de absorbancia UV-visible se realizaron hasta 80 días después de la síntesis (Figura 1b) sin la presencia de un cambio evidente en el espectro de absorbancia, lo que confirma una estabilidad en la solución. La Figura 1c muestra los espectros de absorbancia de una misma síntesis realizada 5 veces, donde se observa un pico simétrico que se superpone entre sí, confirmando la estandarización del proceso de síntesis con un mínimo grado de variabilidad. En un paso posterior, el análisis de dispersión dinámica confirmó la dispersidad de las partículas y determinó el valor del potencial zeta. La Figura 4 (d) mostró la distribución de tamaño de AgNPs-G DLS. Se observa una distribución de tamaño que oscila entre 0,1 y 10 nm con un tamaño promedio de 5,991 nm y una polidispersidad de 0,228. El potencial zeta de AgNPs-G se muestra como un pico agudo a  $-7,48$  mV (Figura 4e). La morfología y el tamaño fueron corroborados por TEM y AFM. Las micrografías TEM sugieren tamaños entre 0,1 y 35 nm con promedios entre 0,1 y 5 nm (Figura 5a). El tamaño promedio medido por análisis TEM muestra correlación con el análisis DLS. Las nanopartículas mostraron una morfología casi esférica (Figura 5b). Las imágenes de AFM muestran la existencia de AgNPs-G dispersos individualmente y en agregados de varios cientos de nm (Figura 5c). A diferencia de las micrografías TEM, las imágenes AFM revelan detalles topográficos de la superficie de la nanopartícula, corroborando así una forma casi esférica. La composición elemental de AgNPs-G se determinó mediante XPS. El estudio XPS (Figura 5d) mostró la presencia de Ag, O y C. Los espectros XPS de alta resolución en el nivel del núcleo de electrones de Ag (3d) (Figura 2e) mostraron dos picos simétricos a 366,8 y 372,78 eV consistentes con Ag

(3d5/2) y Ag(3d3/2), respectivamente. La separación entre los picos de la región Ag(3d) fue de 6,0 eV.



**Figura 4. Espectros UV-Vis y DLS de AgNPs -G.** (A) Espectro de absorción UV-visible de AgNP -G el día 0, (B) día 80 y (C) sintetizados cinco veces de forma independiente. Todos los espectros se informan como absorbancia en unidades arbitrarias (au, eje Y) versus longitud de onda (nm, eje X). (D) Distribución de tamaño de AgNP -G y (E) potencial zeta por DLS y PALS, respectivamente.

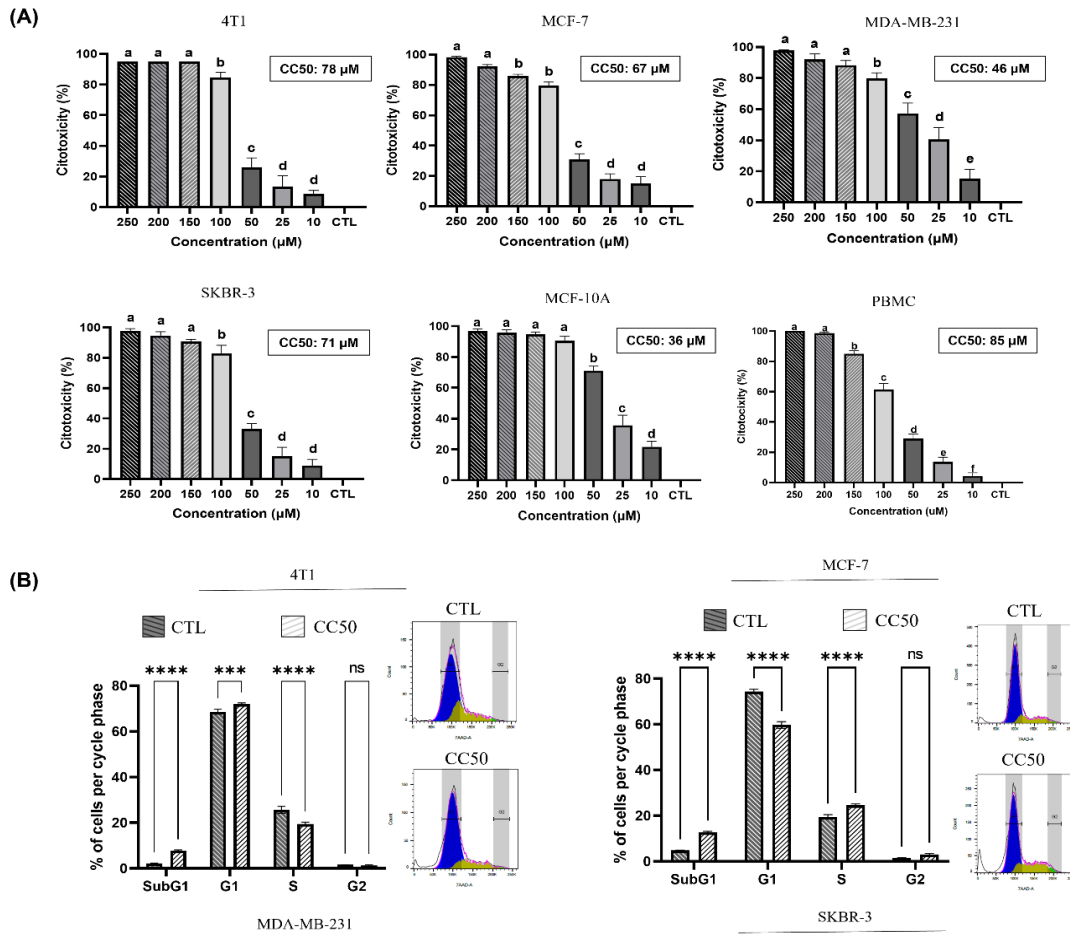


**Figura 5. Características morfológicas y espectrales de AgNPs - G.** (A) Histograma de tamaño de AgNPs-G, el recuadro muestra una imagen TEM típica; (B) Imágenes TEM de AgNP - G; (C) Imágenes AFM de AgNP-G; (D) Espectro de escaneo XPS de AgNP-G; y (E) espectro de escaneo XPS de alta resolución en Ag3d.

## 7.2 Efecto de AgNPs-G sobre la viabilidad y el ciclo celular de las células BC

Primero, evaluamos el efecto de diferentes concentraciones de AgNPs-G en líneas celulares BC y PBMC. Como se muestra en la Figura 6 (a), el tratamiento con AgNPs-G indujo una disminución dependiente de la dosis en la viabilidad celular de todas las líneas celulares analizadas en comparación con el control. Los valores de CC50 para cada línea celular fueron 78  $\mu$ M para 4T1, 67  $\mu$ M para MCF-7, 46  $\mu$ M para MDA-MB-231, 71  $\mu$ M para SKBR-3 y 85  $\mu$ M para PMBC. Posteriormente, investigamos si la disminución de la viabilidad celular inducida por el tratamiento con AgNPs-G estaba relacionada con la detención del ciclo

celular. Como se puede ver en la Figura 6 (b), la progresión del ciclo celular dependía de la línea celular. El tratamiento con AgNPs-G incrementó el porcentaje de células en fase SubG1 en las líneas 4T1 (5,8%), MCF-7 (7,6%) y SKBR-3 (18,2%) respecto al grupo no tratado. La fase G1 disminuyó en las líneas celulares MCF-7 (12,6%), MDA-MB-231 (1,97%) y SKBR-3 (2,8%) tratadas con AgNPs-G. La fase de síntesis disminuyó en las líneas 4T1 (7,2%) y SKBR-3 (21,1%) después del tratamiento con AgNPs-G.



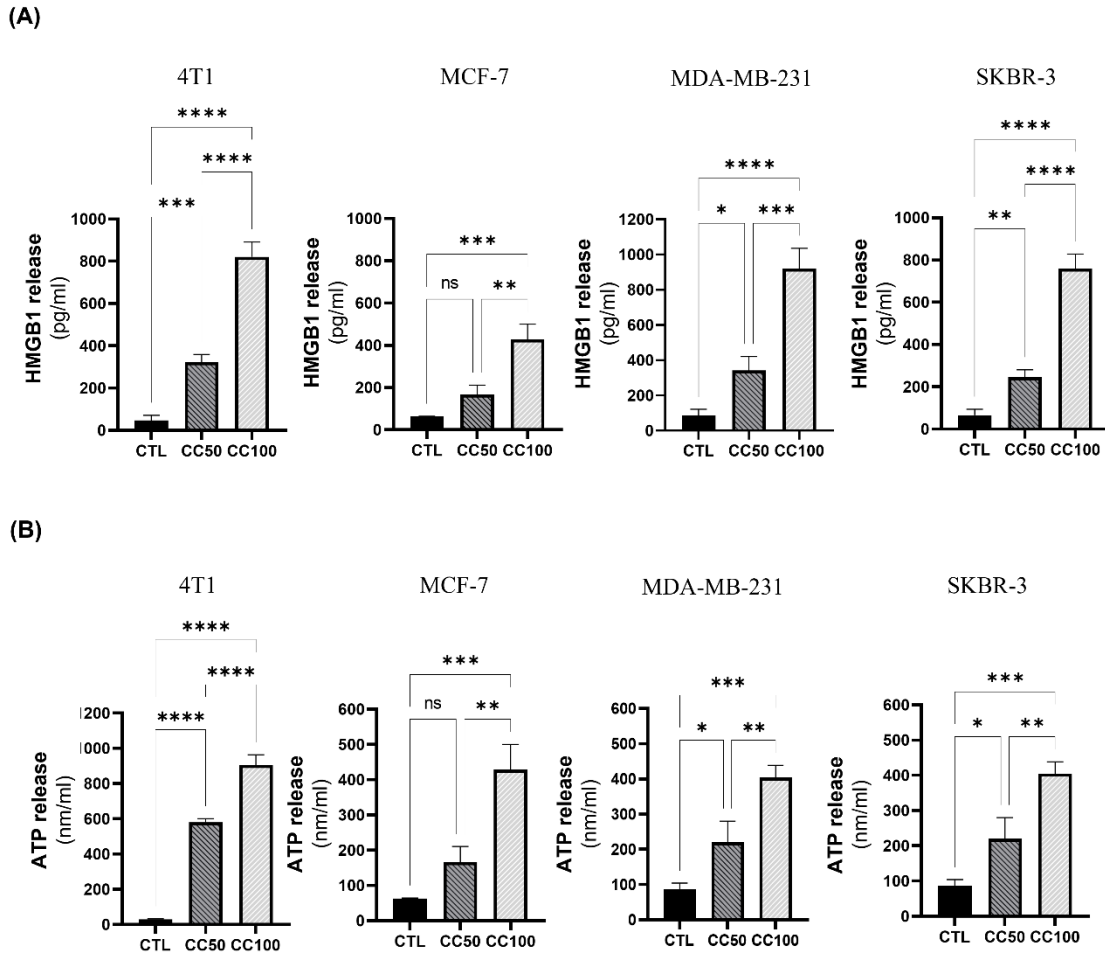
**Figura 6. El tratamiento con AgNPs -G disminuye la viabilidad celular e interfiere con el ciclo celular.** (A) La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo colorimétrico azul de Alamar en líneas celulares de cáncer de mama, MCF-10A y PBMC. Se informaron datos cuantitativos (media y desviación estándar). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA utilizando la prueba de Tukey. Las letras (a, b, c, d, e y f) muestran una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos. (B) Análisis de citometría de flujo para el ciclo celular de líneas celulares de cáncer de mama tratadas a una concentración citotóxica 50 (CC50) y no tratadas (CTL). Se informaron datos cuantitativos (media  $\pm$  desviación estándar). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA utilizando la prueba de Tukey  $p < 0,033$  (\*\*\*) ,  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) y ns (no significativo  $p < 0,12$ ).

### **7.3 El tratamiento con AgNPs-G induce la exposición y liberación de DAMP en células CM**

Una vez determinado el potencial citotóxico de AgNPs-G contra líneas CM, evaluamos la exposición y liberación de DAMP. La liberación de HMGB1 varió según la línea celular y la concentración de AgNPs-G. En CC50, la liberación de HMGB1 aumentó significativamente en todas las líneas celulares excepto en la línea celular MCF-7. Por otro lado, la liberación de HMGB1 en CC100 aumentó considerablemente en todas las líneas celulares con respecto al control (Figura 7a).

La liberación de ATP aumentó en casi todas las líneas celulares después de la administración de los tratamientos con ambas concentraciones, solo en la línea celular MCF-7 en la concentración CC50 el aumento no fue significativo en comparación con el control (Figura 7b). La expresión de HSP70 y HSP90 disminuyó en los lisados celulares de las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y SKBR-3 tratados con AgNPs-G CC50 (Figura 8a). Por el contrario, la expresión de estas proteínas aumentó en los sobrenadantes de las células tratadas con AgNPs-G CC50 en comparación con las células no tratadas (Figura 8b).

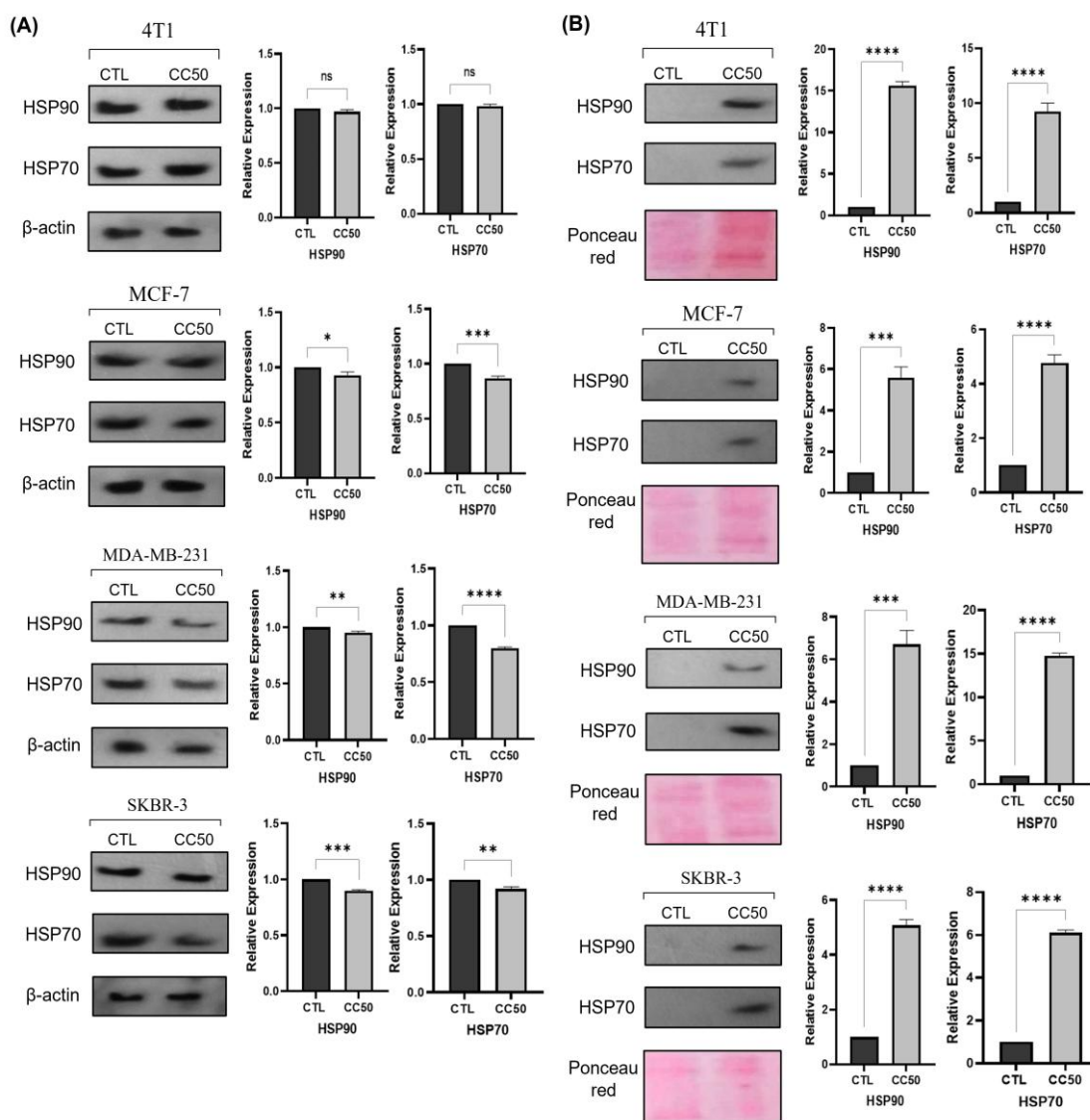
Finalmente, los tratamientos con AgNPs-G CC50 presentaron un aumento significativo en la exposición a calreticulina en todas las líneas celulares analizadas por citometría de flujo, como se puede observar en la Figura 9.



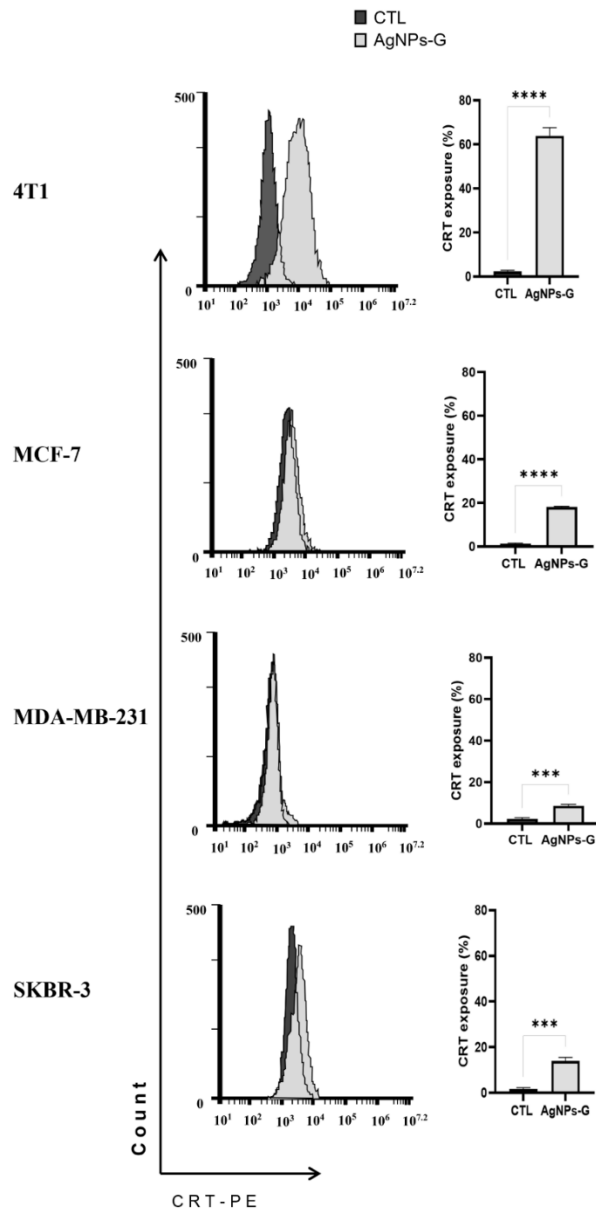
**Figura 7. El tratamiento con AgNPs -G induce la liberación de HMGB1 y ATP.** ( A ) Las células se trataron con las concentraciones de CC50 y CC100 correspondientes para cada línea celular. Posteriormente se tomaron 100  $\mu$ L de los sobrenadantes para mediciones de HMGB1 mediante un kit ELISA, según las instrucciones del fabricante. ( B ) Las células se trataron con las concentraciones de CC50 y CC100 correspondientes para cada línea celular. Posteriormente se tomaron 100  $\mu$ L de los sobrenadantes para realizar mediciones de ATP mediante un kit de bioluminiscencia, según las instrucciones del fabricante. Se informaron datos cuantitativos (media  $\pm$  desviación estándar). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA utilizando la prueba de Tukey  $p < 0,033$ (\*),  $p < 0,002$ (\*\*),  $p < 0,0002$ (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) y ns (no significativo  $p < 0,12$ ).

## CELL LYSATES PROTEINS

## SUPERNATANS PROTEINS



**Figura 8. Expresión y liberación de las proteínas HSP70 y HSP90 en respuesta al tratamiento con AgNPs -G.** La transferencia Western se realizó con ( A ) lisados celulares y ( B ) sobrenadantes de la línea celular correspondiente. Se utilizó  $\beta$ -actina como control endógeno. El análisis semicuantitativo de la señal de inmunotransferencia se realizó utilizando el software de análisis de imágenes Image J para proporcionar datos de densitometría para cada transferencia. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA utilizando la prueba de Tukey  $p < 0,033$  (\*),  $p < 0,002$  (\*\*),  $p < 0,0002$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*), y ns (no significativo  $p < 0,12$ ).



**Figura 9.** El tratamiento con AgNPs -G indujo la exposición a calreticulina en líneas celulares de cáncer de **mama**. Las células tratadas se tiñeron utilizando un anticuerpo monoclonal anti-ratón conjugado con ficoeritrina contra la calreticulina para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA utilizando la prueba de Tukey  $p < 0,0002$  (\*\*\*) , y  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

## 7.4 La vacunación con células tratadas con AgNPs-G no impidió el establecimiento de tumores

Una vez determinado el efecto de las AgNPs-G sobre la viabilidad celular y la expresión y liberación de DAMP in vitro, el siguiente paso fue realizar una vacunación profiláctica, Gold Standard para la detección de ICD. Los resultados mostraron que la vacunación con células tratadas con AgNPs-G CC50 (V-AgNPs-CC50) y CC100 (V-AgNPs-CC100) no impidió el establecimiento del tumor (Figura 10a). Sin embargo, como se puede observar en la figura 10(b), el peso del tumor fue significativamente menor en los ratones vacunados en comparación con el control. Además, la tasa de supervivencia (Figura 10c) aumentó en ratones vacunados con V-AgNPs-CC50 (18 días) y V-AgNPs-CC100 (16 días).

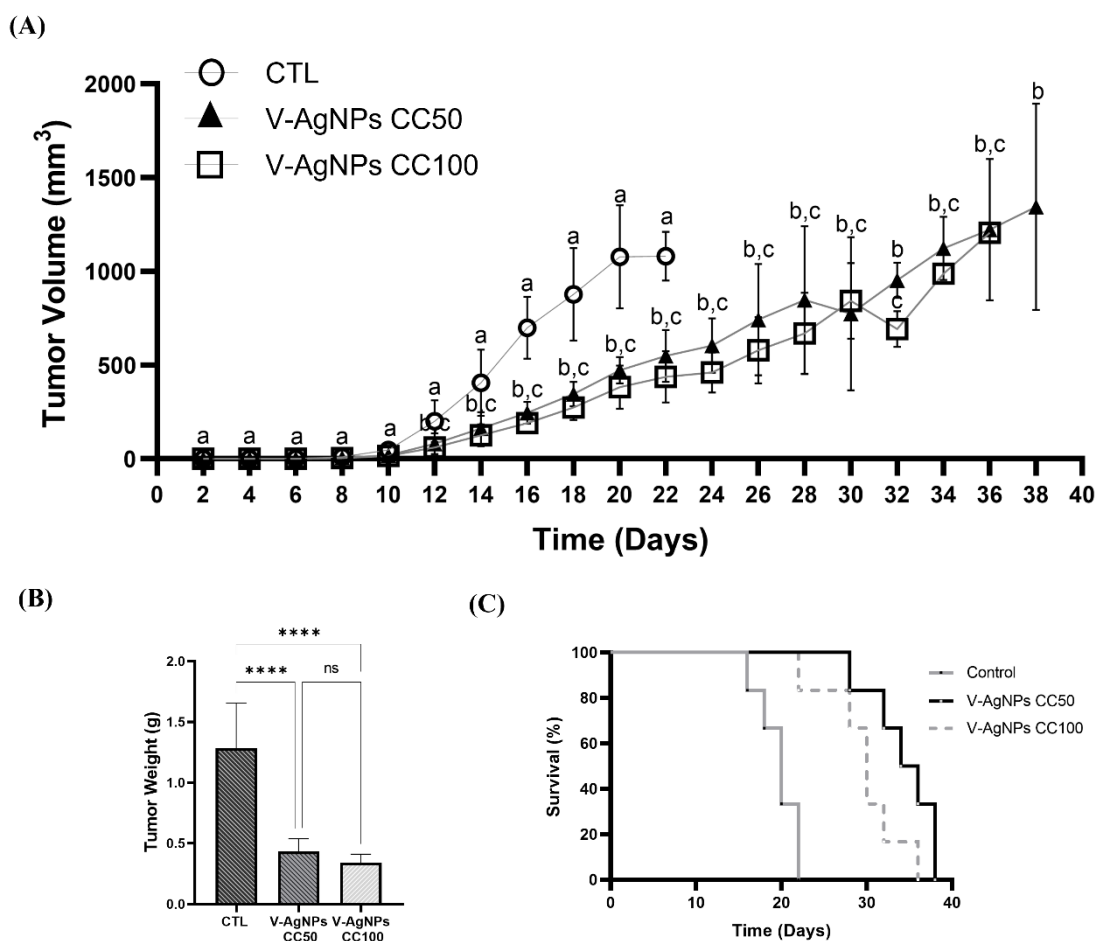
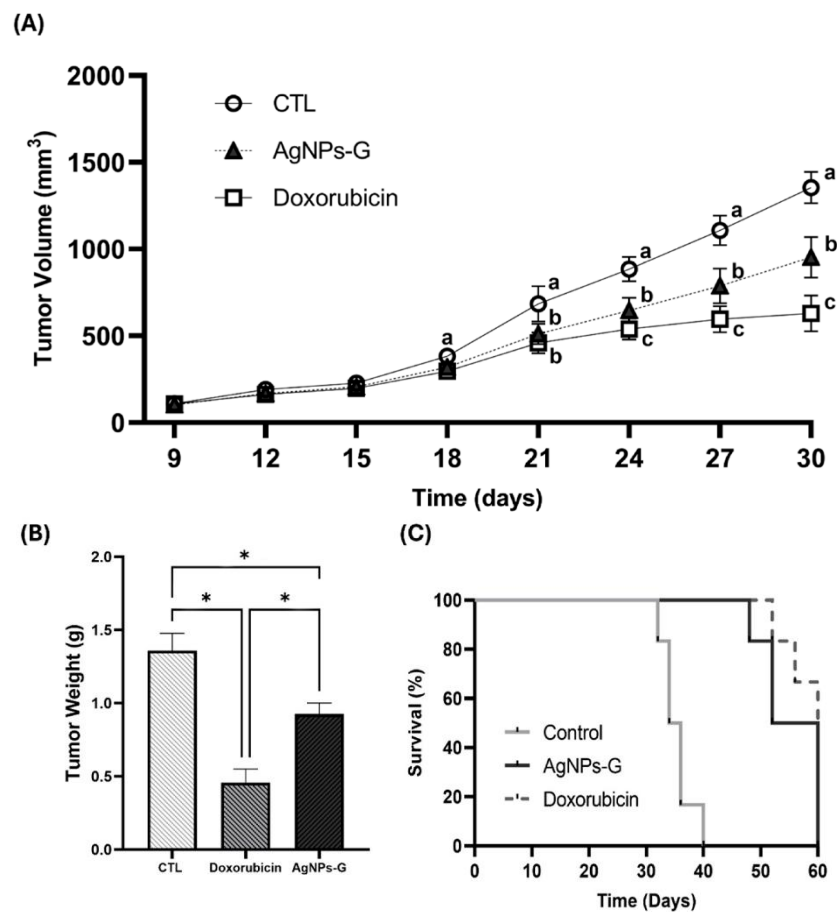


Figura 10 . La vacunación con células tratadas con AgNPs-G CC50 y CC100 no impidió el establecimiento del tumor. ( A ) El gráfico indica el crecimiento tumoral en ratones no vacunados (CTL) y vacunados con 2 ×

10<sup>6</sup> células 4T1 tratadas con AgNP-G CC50 y CC100. Las letras (a, byc) muestran una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos. ( B ) Peso del tumor. ( C ) Supervivencia de ratones representada por el gráfico de Kaplan-Meier. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA utilizando la prueba *p de Tukey*.  $< 0,0001$  (\*\*\*\*), y *ns* (no significativo  $p < 0,12$ ).

### 7.5 El tratamiento con AgNPs-G disminuyó el volumen tumoral y prolongó la supervivencia de ratones portadores del tumor 4T1.

Se evaluó la actividad antitumoral mediante un modelo de bolsa de aire con implantación de células tumorales BC 4T1. Como se observa en la Figura 11 A y B, el volumen y el peso del tumor fueron significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ) en los grupos tratados con AgNPs-G y doxorubicina que en el grupo control. Asimismo, ambos grupos mostraron un mayor tiempo de supervivencia de los ratones portadores del tumor en comparación con el grupo control (Figura 11).

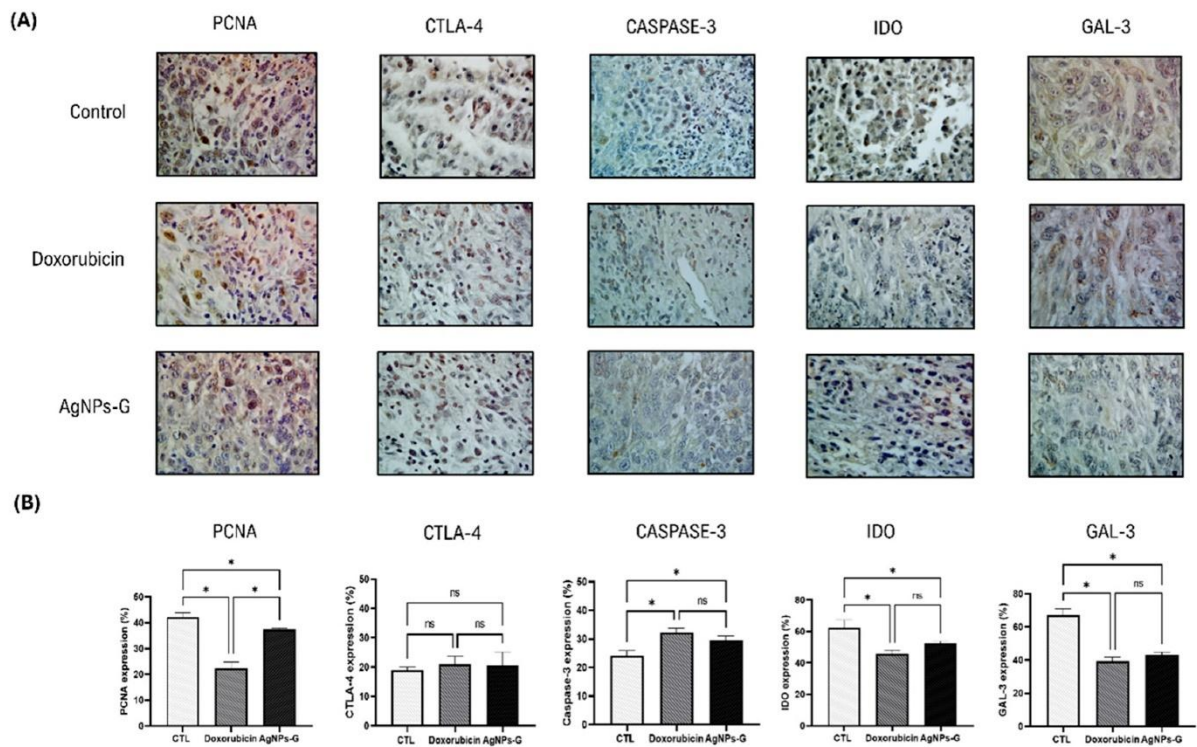


**Figura 11. Actividad antitumoral de AgNPs-G in vivo.** ( A ) El volumen tumoral (mm<sup>3</sup>) se midió diariamente desde la inoculación hasta el día del sacrificio (día 30). ( B ) Los tumores extirpados (post mortem) se pesaron.

( C ) Para el ensayo de supervivencia animal, se mantuvieron cinco ratones adicionales por grupo durante 60 días posteriores a la inoculación. La supervivencia de los ratones se representó mediante la curva de Kaplan-Meier. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA con la prueba de Tukey. Las letras (a-c) indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) (\*) entre los tratamientos.

## 7.6 El tratamiento con AgNPs-G disminuyó la expresión de PCNA, IDO y Gal-3 y aumentó la de caspasa-3

El tratamiento con AgNPs-G disminuyó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) la expresión de los marcadores antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (37,4 %), indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) (53,8 %) y galectina-3 (GAL-3) (41,9 %) en comparación con el grupo control (Figura 12). Por otro lado, AgNPs-G aumentó la expresión de caspasa-3 (28,9 %).

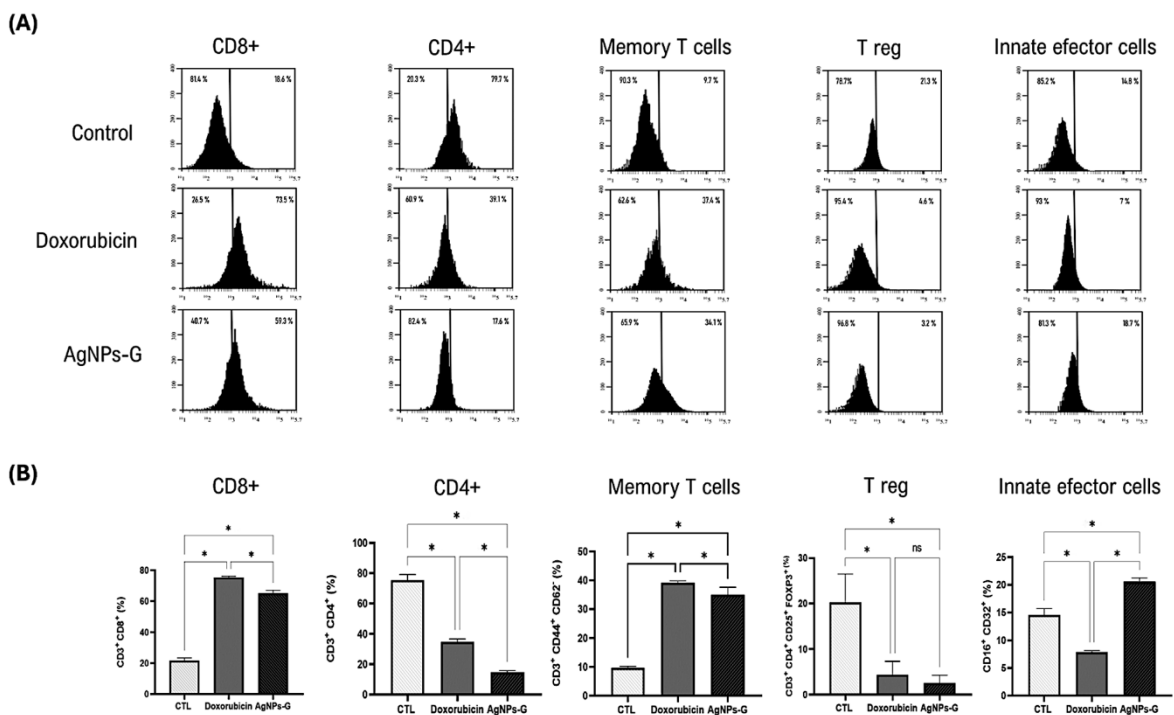


**Figura 12. Tinción inmunohistoquímica y porcentaje de expresión de PCNA, CTLA-4, caspasa-3, IDO y Gal-3 en tejido tumoral.** Treinta días después de la inoculación con células BC 4T1 viables, se extrajeron tumores (post mortem) de ratones no tratados (control) y se trataron con: AgNPs-G o doxorubicina. Los tumores se fijaron, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 3 a 5  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, se realizó la tinción inmunohistoquímica. ( A ) Micrografías representativas de inmunohistoquímica (aumento 20×). ( B )

Los gráficos de barras representan el porcentaje medio de expresión obtenido mediante análisis de deconvolución de color. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA con la prueba post hoc de Tukey;  $p \leq 0,05$  (\*) y ns (no significativo).

### 7.7 El tratamiento con AgNPs-G aumentó el porcentaje de células T citotóxicas, células de memoria y células efectoras innatas en el tejido tumoral.

Una vez determinado el efecto antitumoral de las AgNPs-G, decidimos evaluar las poblaciones de leucocitos presentes en el microambiente tumoral. Como se observa en la Figura 13, el tratamiento con AgNPs-G aumentó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) el porcentaje de células CD8+ (59,3%) en comparación con el grupo control (18,6%). A su vez, las AgNPs-G aumentaron el porcentaje de linfocitos T de memoria (34,1 %) y de células efectoras innatas (18,7 %) en comparación con el grupo control (9,7 % y 14,8 %, respectivamente). El tratamiento con AgNPs-G también disminuyó el porcentaje de linfocitos CD4+ (17,6 %) y de linfocitos T reguladores (3,2 %) en comparación con el grupo control (79,7 % y 21,3 %, respectivamente).

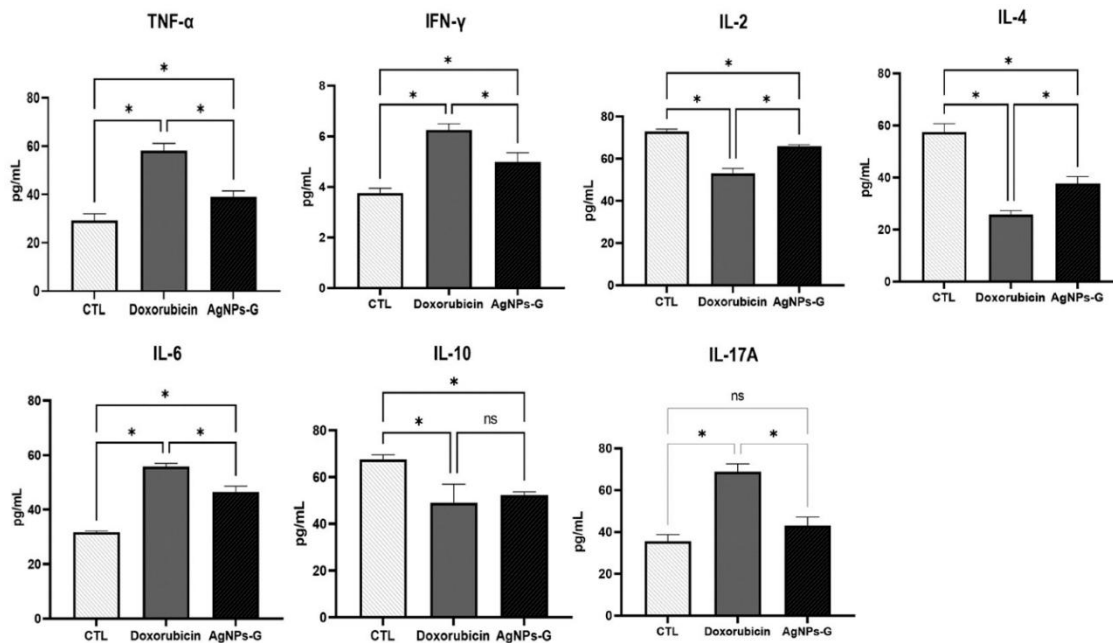


**Figura 13. Subpoblaciones de leucocitos en tejido tumoral.** Treinta días después de la inoculación con células BC 4T1 viables, se extrajeron los tumores (post mortem) de ratones no tratados (control) o tratados con AgNPs-

G o doxorubicina. Los tumores se cortaron y se incubaron en solución Liberase™ TL, y los leucocitos se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Histopaque. (A) Histogramas representativos de las subpoblaciones de leucocitos CD8+, CD4+, células T de memoria, células T reguladoras y células efectoras innatas, determinadas por citometría de flujo; el eje Y representa el recuento celular. (B) Los gráficos de barras representan el porcentaje promedio de la población celular. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA con la prueba post hoc de Tukey;  $p \leq 0,05$  (\*) y ns (no significativo).

### 7.8 El tratamiento con AgNPs-G aumentó los niveles de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-6 en el tejido tumoral.

A nivel del microambiente tumoral, los tratamientos con AgNPs-G y doxorubicina aumentaron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) los niveles de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 en comparación con el grupo de control (Figura 14). Por otro lado, ambos tratamientos disminuyeron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) los niveles de IL-2, IL-4 e IL-10 en comparación con el grupo control. En el caso de la IL-17A, solo el tratamiento con doxorubicina aumentó sus niveles significativamente ( $p \leq 0,05$ ).



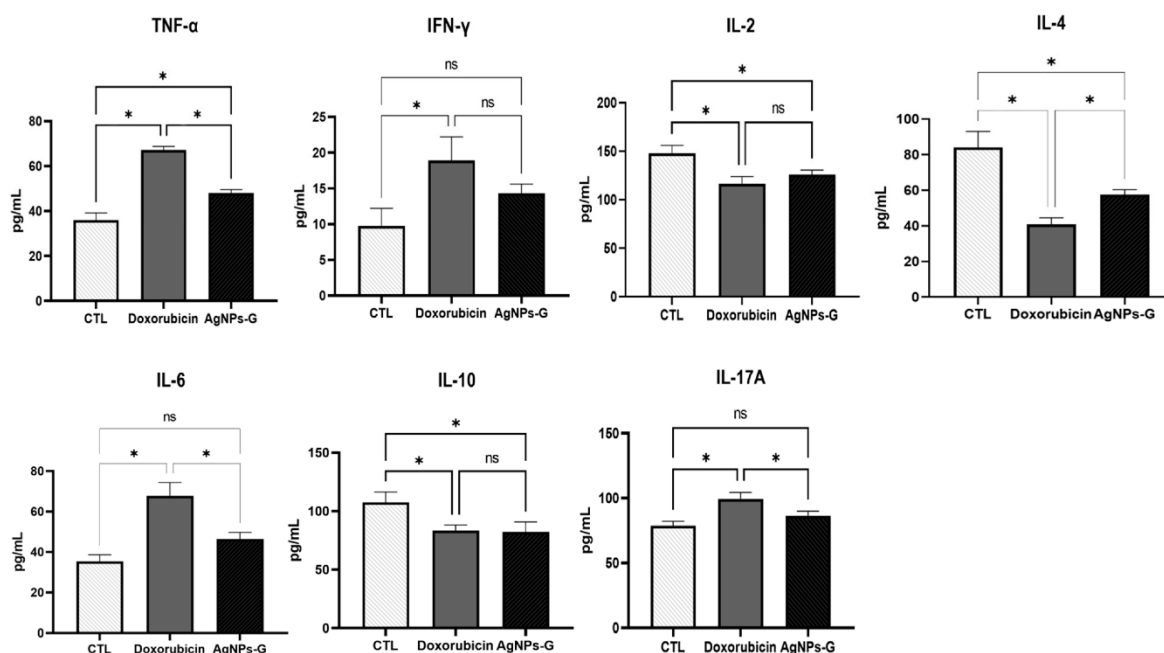
**Figura 14. El tratamiento con AgNPs-G aumentó los niveles de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 en el tejido tumoral.**

Treinta días después de la inoculación con células BC 4T1 viables, se extrajeron los tumores (post mortem) de ratones no tratados (control) y de ratones tratados con AgNPs-G o doxorubicina. Los tumores se cortaron y se incubaron en tampón de lisis durante 30 min con agitación suave. Posteriormente, las secciones de tumor lisadas se centrifugaron y se recogieron los sobrenadantes para su posterior análisis. Los gráficos de barras representan

los niveles de citocinas determinados mediante citometría de flujo con el kit BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA con la prueba post hoc de Tukey;  $p \leq 0,05$  (\*) y ns (no significativo).

### 7.9 El tratamiento con AgNPs-G aumentó los niveles séricos de TNF- $\alpha$

Una vez determinados los niveles de citocinas en el tejido tumoral, decidimos cuantificar los niveles séricos. Como se observa en la Figura 15, el tratamiento con AgNPs-G solo aumentó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) los niveles de TNF- $\alpha$  en comparación con el grupo control. Por otro lado, el tratamiento con AgNPs-G disminuyó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) los niveles séricos de IL-2, IL-4 e IL-10.



**Figura 15. El tratamiento con AgNPs-G aumentó los niveles séricos de TNF- $\alpha$ .** Treinta días después de la inoculación con células BC 4T1 viables, se recolectó suero de ratones no tratados (control) y de ratones tratados con AgNPs-G o doxorubicina. Los gráficos de barras representan los niveles de citocinas determinados mediante análisis de citometría de flujo con el kit BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA con la prueba post hoc de Tukey;  $p \leq 0,05$  (\*) y ns (no significativo).

### 7.10 El tratamiento con AgNPs-G no causó cambios significativos en los parámetros hematológicos.

Como se observa en la Tabla 4, los ratones no tratados (control) y los tratados con AgNPs-G no mostraron diferencias significativas en los parámetros hematológicos. Sin embargo, ambos grupos presentaron un recuento bajo de glóbulos rojos, y los porcentajes de hematocrito y hemoglobina se encontraban por debajo del rango normal estandarizado.

**Tabla 4.** Parámetros hematológicos de ratones BALB/c portadores de tumores 4T1.

	Control	doxorrubicina	AgNPs-G	Rango normal
Neutrófilos (%)	41,62 ± 9,04	49,10 ± 14,23	44,2 ± 10,28	35.0–75.0
Linfocitos (%)	46,72 ± 6,22	42,5 ± 5,19	41,87 ± 4,61	25.0–50.0
Monocitos (%)	6,78 ± 1,23	6,23 ± 0,75	6,54 ± 2,01	2.0–10.0
Eosinófilos (%)	3,12 ± 0,68	4,12 ± 1,08	3,56 ± 0,75	1.0–4.0
Recuento total de glóbulos blancos (10 <sup>9</sup> /L)	5,21 ± 1,26 a	6,98 ± 0,48 b	5,68 ± 0,72 a	4.0–10.0
Glóbulos rojos (10 <sup>12</sup> /L)	7,57 ± 0,52 a	6,89 ± 0,23 b	7,11 ± 0,09 a	8.0–15.0
Hematocrito (%)	39,32 ± 4,12	38,77 ± 3,12	37,54 ± 3,31	40.0–54.0
Hemoglobina (g/dL)	13,19 ± 0,82	13,32 ± 1,02	12,44 ± 0,87	14.0–17.5

Treinta días después de la inoculación con células BC 4T1 viables, se extrajo sangre de ratones no tratados (control) y de ratones tratados con AgNPs-G o doxorrubicina. Los parámetros hematológicos se analizaron con el analizador hematológico Sysmex XS 1000™. Los valores se presentan como media ± DE ( $p \leq 0,05$ ). La significación estadística se determinó mediante ANOVA con la prueba post hoc de Tukey. Las letras (a y b) indican una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos.

### 7.11 El tratamiento con AgNPs-G aumentó los niveles de enzimas hepáticas en ratones portadores del tumor 4T1.

Como se puede observar en la Tabla 5, el tratamiento con AgNPs-G aumentó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) ( $58,3 \pm 6,33$  UI/L), alanina aminotransferasa (ALT) ( $49,21 \pm 8,2$  U/L) y fosfatasa alcalina (ALP) ( $147,23 \pm 33,02$  U/L) en comparación con el grupo de control ( $26,23 \pm 8,23$  UI/L,  $32,47 \pm 6,78$  U/L).

y  $82,08 \pm 12,76$  U/L, respectivamente). Por otro lado, se observó una disminución de la proteína total ( $5,3 \pm 1,04$  g/dL) en el grupo tratado con AgNPs-G en comparación con el grupo de control ( $6,5 \pm 0,42$  g/dL).

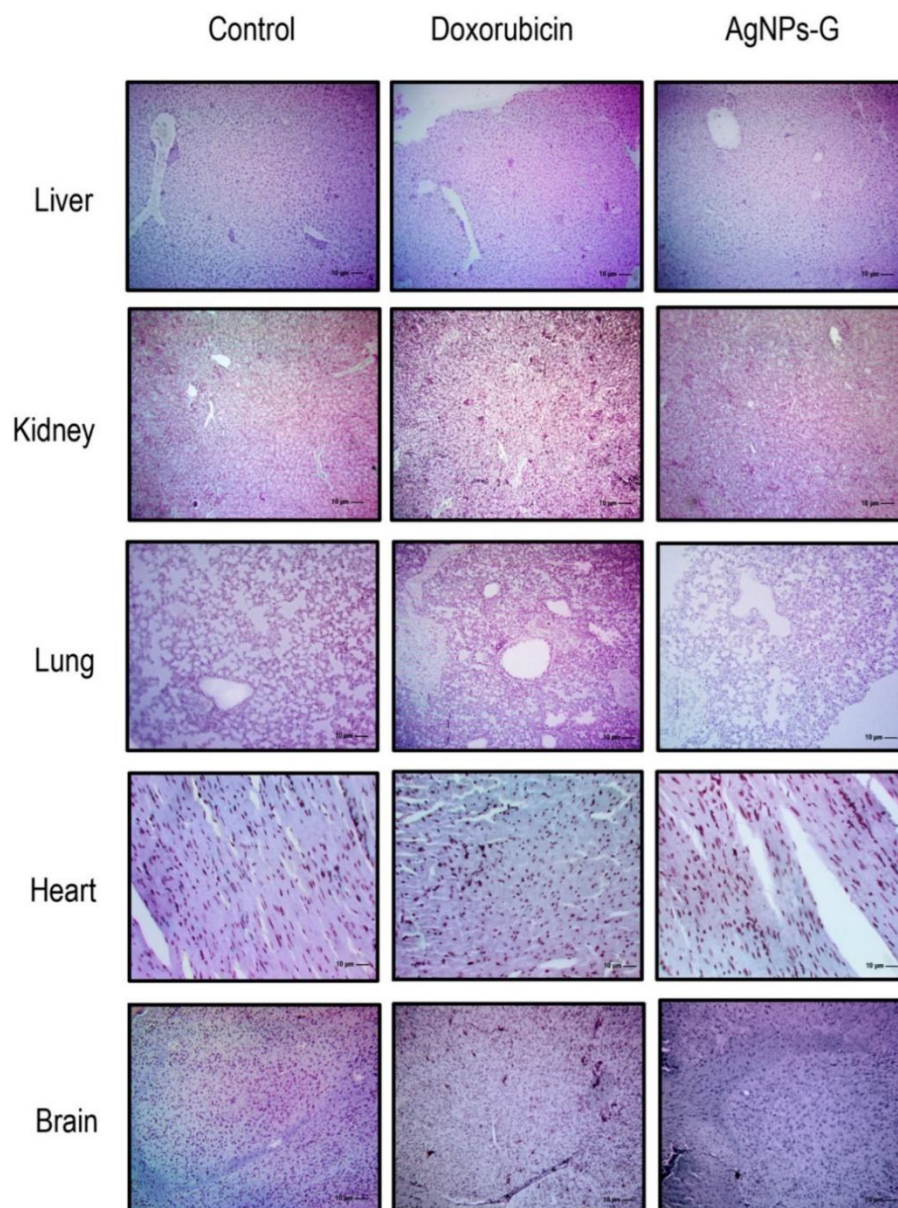
**Tabla 5.** Parámetros bioquímicos de ratones portadores de tumores.

	Control	doxorrubicina	AgNPs-G	Rango normal
bilirrubina total (mg/dL)	$0,22 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,05$	$0,32 \pm 0,08$	0.0–1.40
bilirrubina directa (mg/dL)	$0,07 \pm 0,008$	$0,08 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,03$	0,0–0,50
bilirrubina indirecta (mg/dL)	$0,04 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$	0,0–0,90
Proteínas totales (g/dL)	$6,5 \pm 0,42$ a	$5,58 \pm 1,23$ b	$5,3 \pm 1,04$ b	6.0–8.10
Albúmina	$3,72 \pm 0,52$	$3,12 \pm 0,61$	$3,4 \pm 0,41$	3.0–5.20
Globulina	$2,88 \pm 0,58$	$2,38 \pm 0,43$	$2,23 \pm 0,38$	1.5–3.30
Aspartato aminotransferasa (UI/L)	$26,23 \pm 8,23$ a	$43,2 \pm 12,1$ b	$58,3 \pm 6,33$ c	4.0–37.0
Alanina aminotransferasa (U/L)	$32,47 \pm 6,78$ a	$57,25 \pm 6,5$ b	$49,21 \pm 8,21$ b	4.0–41.0
Fosfatasa alcalina (U/L)	$82,08 \pm 12,76$ a	$135,8 \pm 18,01$ b	$147,23 \pm 33,02$ b	40.0–129.0

Treinta días después de la inoculación con células BC 4T1 viables, se extrajo sangre de ratones no tratados (control) y de ratones tratados con AgNPs-G o doxorrubicina. Los parámetros bioquímicos se analizaron mediante el analizador químico Skyla VP1™. Los valores se presentan como media  $\pm$  DE ( $p \leq 0,05$ ) ( $n = 6$ ). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA con la prueba post hoc de Tukey. Las letras (a–c) indican una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos.

### 7.12 El tratamiento con AgNPs-G generó cambios histomorfológicos en el hígado, riñón, pulmón, corazón o cerebro.

El análisis histológico descartó la presencia de lesiones perceptibles, áreas necróticas o signos de erosión en los órganos principales (hígado, riñón, pulmón, corazón y cerebro) en todos los grupos experimentales (Figura 16). Asimismo, se descartó la presencia de infiltrados linfocíticos o signos de malignidad.



**Figura 16. Micrografías de hígado, riñón, pulmón, corazón y cerebro.** Treinta días después de la inoculación con células BC 4T1 viables, se extrajeron los órganos de ratones no tratados (control) y de ratones tratados con

AgNPs-G o doxorubicina (post mortem) (n = 6). Todos los órganos se fijaron en formalina durante 24 h antes de su inclusión en parafina. Secciones de tejido de 3 a 5  $\mu\text{m}$  se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las micrografías se obtuvieron con un microscopio Zeiss Imager Z1 acoplado a una cámara Ve-LX1000

## 8. DISCUSIÓN

Primero, obtuvimos nanopartículas de plata reducidas con  $\beta$ -D-glucosa con una resonancia de plasmón superficial distintiva de la plata en un tamaño nanométrico en un rango de 400 a 480 nm (Elkomy et al. 2020; Rani et al. 2020; Abed et al. 2019). Las nanopartículas mostraron un tamaño promedio de 5.991 nm con morfología cuasi esférica, probablemente debido al uso de glucosa como agente reductor (Yaqoob et al. 2020), estos resultados se correlacionan con Panzarini et al. 2017 quienes informaron la obtención de NP esféricas recubiertas con  $\beta$ -D-glucosa con tamaños entre 20 y 40 nm. Además, obtuvimos un valor de potencial zeta de  $-7,48$  mV con estabilidad durante 80 días, similar a las AgNPs preparadas mediante irradiación con microondas en un estudio de Singh et al. 2014, que demostraron la estabilidad de las nanopartículas con un potencial zeta de  $-5,11$  mV y un aumento de la estabilidad cuando el potencial zeta aumenta a  $-15,3$  mV.

Podríamos determinar que la solución de plata se exhibe en estado Ag 0 (metálico) con base en análisis XPS, como los encontrados por Figueiredo et al. 2022 y Du et al. 2022. Las regiones detalladas del análisis XPS muestran un doblete simple en el espectro de Ag3d con una separación de energía de 6,0 eV, donde también pudimos observar el componente Ag3d 5/2 centrado en 366,8 eV. Con base en los datos anteriores y considerando los valores de dispersión informados en la literatura, se correlaciona con la síntesis de AgNPs metálicos (Du et al. 2020; Auría et al. 2020).

Según lo informado por Panzarini et al. 2017, también se demostró el efecto citotóxico de AgNPs -G en líneas celulares de cáncer de mama. Sin embargo, no es completamente posible establecer un efecto comparativo con autores anteriores con nuestros resultados con respecto a la actividad citotóxica debido a las diferentes líneas celulares cancerosas utilizadas y la variabilidad en la forma y tamaño de las nanopartículas obtenidas. Principalmente, el efecto de las nanopartículas depende de factores que involucran características fisicoquímicas, como el tamaño, la forma, el recubrimiento y la presencia de contaminantes derivados de su síntesis (Auría et al. 2020). El efecto citotóxico de las AgNPs se mantiene a pesar de las diferencias en los agentes reductores utilizados para su síntesis, la plata mantiene su efecto

citotóxico. Se obtuvieron resultados similares con el tratamiento de células MCF-7 y HEP-2 con AgNPs que presentan forma esférica con un tamaño en el rango de 5 a 40 nm pero reducidas con extracto medicinal natural de *Piper nigrum* (Venugopal et al. 2017).

Nuestro estudio es consistente con otros, al demostrar la sensibilidad de las células de cáncer de mama al tratamiento con AgNP (Vergallo et al. 2016; Gurunathan et al. 2013), especialmente en células de cáncer de mama triple negativo. Esta predisposición puede deberse al enriquecimiento de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga característico de este tipo de cáncer, que es propenso a la peroxidación impulsada por AgNP (Rhode et al. 2021). Las AgNPs -G afectan el ciclo celular del cáncer de mama de forma dosis dependiente, interfiriendo con su crecimiento. Estos datos son importantes porque algunos medicamentos utilizados en el tratamiento del cáncer pueden afectar el ciclo celular (Matthews et al. 2022). Abriendo una nueva perspectiva en el estudio de las AgNPs -G sobre los reguladores del ciclo celular y de los puntos de control y sus interacciones con fármacos que afectan a este mecanismo de acción.

Por otro lado, hay reportes de AgNPs reducidas con glucosa y su capacidad para inducir alarminas relacionadas con el MCI, sin embargo, cuando se realiza el estándar de oro, el MCI no se genera (García et al. 2023). Este posible mecanismo de acción podría aparecer si la cantidad o calidad de las alarminas o neoantígenos tumorales se ve afectada por el tratamiento, como ocurre en las células B16F10. tratada con plata coloidal/AgNPs como vacuna profiláctica *in vivo* por Torres et al. 2020 y García et al. 2023, respectivamente (García et al. 2023; Torres-Cavazos et al. 2020), no previniendo la implantación tumoral en ratones de la cepa C57BL/6, a pesar de la presencia de alarminas. Sin embargo, en nuestro estudio, se desarrolla un cierto grado de inmunidad ya que retrasa el crecimiento del tumor, lo que indica que algunos mecanismos, como los que se mencionan más adelante, pueden estar implicados y deben aclararse. (A) El tratamiento afecta la calidad de los principales antígenos de las células 4T1 capaces de inducir una respuesta de células T específica capaz de atacar a las células 4T1. (B) Una gran cantidad de AgNPs -G está presente en el lisado de células 4T1 utilizado para la vacunación profiláctica, que no pudo eliminarse mediante centrifugación, lo que puede afectar la presentación óptima del antígeno de las células dendríticas, induciendo una respuesta específica parcial de las células T. (C) AgNP residuales

mencionadas anteriormente pueden afectar la capacidad de los linfocitos para producir y liberar granzimas evitando la muerte del tumor.

Nuestros resultados indican que el tratamiento con AgNPs-G retrasa el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia en ratones. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que han demostrado el potencial terapéutico *in vivo* de las AgNPs en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo (TNBC) (Swanner et al. 2019; Snyder et al. 2021). Estos mecanismos podrían haberse visto facilitados por la incorporación de  $\beta$ -D-glucosa en la síntesis de nuestras partículas, la cual podría estar presente en su superficie, potenciando así su interacción con las células cancerosas. Sin embargo, la ubicación exacta de la  $\beta$ -D-glucosa en nuestras partículas aún se desconoce.

El mecanismo de acción de la doxorrubicina se basa en el daño que provoca al ADN celular y su capacidad para generar radicales libres (Ir et al. 2001). Estos mecanismos moleculares también se observan en tratamientos basados en otras nanopartículas de plata (AgNPs) (Butler et al. 2015). Por ello, podemos hipotetizar que nuestras nanopartículas podrían tener un mecanismo de acción similar al de este agente quimioterapéutico utilizado como control. Sin embargo, es fundamental realizar ensayos clínicos que permitan determinar con certeza si nuestras AgNPs y la doxorrubicina comparten mecanismos de acción similares.

Por otro lado, nuestros resultados muestran una disminución en la expresión del marcador de proliferación PCNA y de las moléculas IDO y GAL-3 en el grupo tratado con AgNPs-G en comparación con el grupo control. La reducción en la expresión de PCNA se correlaciona con la reducción del volumen tumoral, lo que sugiere que el tratamiento con AgNPs-G tiene un efecto directo sobre la capacidad de división de las células tumorales. Este efecto también se ha descrito en estudios que utilizan una molécula pequeña (PCNA-IIS) capaz de unirse directamente a PCNA, estabilizar la estructura del trímero y reducir la PCNA asociada a la cromatina, inhibiendo así selectivamente el crecimiento de las células tumorales e induciendo la apoptosis (Dillehay et al. 2015).

Además, la disminución en la expresión de IDO y GAL-3 es relevante, ya que estas proteínas se asocian con la promoción de la tolerancia inmunosupresora y la progresión tumoral (Farhad et al. 2018; Santana-Krimskaya et al. 2020). Por otro lado, el aumento en la expresión

de caspasa-3 sugiere que las AgNPs-G podrían promover vías apoptóticas. Se reportaron datos similares en la línea celular de cáncer de vejiga 5637, en la cual las AgNPs indujeron la formación excesiva de ROS, la sobreexpresión de Bax/Bcl-2 y la activación de las caspasas 3 y 7 (Daei et al. 2022). Posteriormente, evaluamos la implicación del tratamiento con AgNPs-G en las poblaciones de leucocitos dentro del microambiente tumoral (TME). Nuestros resultados indican que el tratamiento con AgNPs-G aumenta el porcentaje de linfocitos T CD8+. Este hallazgo es importante debido al papel central de los linfocitos T CD8+ en la eliminación directa de células tumorales, lo que indica una mejora en la capacidad del sistema inmunitario para reconocer y atacar eficazmente las células cancerosas (Chen et al. 2024). Además, observamos un aumento en el porcentaje de células de memoria y células efectoras innatas, lo que podría estar relacionado con la liberación de DAMPs previamente descrita y la inducción de linfocitos T específicos capaces de infiltrar y eliminar el tumor (Jin H. et al. 2023). El tratamiento con AgNPs-G disminuyó el porcentaje de células CD4+ y linfocitos T reguladores en el tejido tumoral. Recientemente, un ensayo clínico con 5177 muestras de pacientes con cáncer de mama demostró que una baja abundancia de Treg se asoció con una respuesta patológica completa tras la quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo (Oshi M. et al. 2020). Es posible que un tratamiento concomitante con AgNPs sea útil para obtener una mejor respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer. Sin embargo, existen algunas limitaciones relacionadas con la aprobación ética, la vía de administración y las dosis en pacientes humanos.

Nuestros hallazgos revelan un aumento significativo en los niveles de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 en el tejido tumoral tras el tratamiento con AgNPs-G. Se sabe que estas citocinas proinflamatorias desempeñan un papel clave en la activación y regulación de las respuestas inmunitarias antitumorales. El TNF- $\alpha$  participa en la inflamación y tiene una doble función en el cáncer: como inductor de metástasis o en la eliminación tumoral (Ben-Baruch et al. 2022). Sin embargo, el TNF- $\alpha$  también interviene en la defensa del huésped, la regulación de la actividad citotóxica contra células y tumores, la activación de linfocitos T y células NK, la estimulación de monocitos para la producción de citocinas y la activación de la diferenciación del endotelio y los adipocitos (Mercogliano et al. 2020). En el caso del IFN- $\gamma$ , diversos estudios han demostrado que los inhibidores de CTLA-4 y PD-1, así como otras terapias de bloqueo de puntos de control inmunitario, aumentan la producción de IFN- $\gamma$ , lo

que posteriormente conlleva la eliminación de las células cancerosas. Recientemente se ha confirmado que la resistencia a la inmunoterapia se asocia con defectos en la señalización del IFN- $\gamma$ . Estos hallazgos sugieren que la eficacia de la inmunoterapia contra el cáncer se debe, al menos en parte, a un aumento en la expresión del IFN- $\gamma$  (Ni et al. 2018). Datos similares indican un aumento de IL-6 tras el tratamiento con nanopartículas de plata (AgNPs) de 20 o 200 nm en células MDA-MB-436 (Matysiak-Kucharek et al. 2020). La aplicación de IL-6 en células de cáncer de mama inhibe la proliferación en células positivas para el receptor de estrógeno, mientras que los altos niveles circulantes de IL-6 se correlacionan con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama, lo que indica discrepancias y las distintas funciones de esta citocina (Zhao et al. 2020).

Por otro lado, el tratamiento con AgNPs-G redujo significativamente los niveles de IL-2, IL-4 e IL-10 en el tejido tumoral en comparación con el grupo control. Estas citocinas se asocian con funciones inmunosupresoras y reguladoras, por lo que su disminución podría favorecer una mejor respuesta al tratamiento oncológico, especialmente la IL-10, dado su papel clave en la tumorigénesis y su correlación negativa con la supervivencia libre de enfermedad en ciertos tipos de cáncer (Martinez-Perez et al. 2021). Así pues, los resultados de nuestro estudio sugieren, en parte, que las citocinas inducidas por el tratamiento con AgNPs-G pueden participar en la modificación del microambiente tumoral e inducir una respuesta inmunitaria que reduzca la masa tumoral. Sin embargo, algunas limitaciones, como la falta de ratones mutantes específicos para cada citocina que permitan dilucidar su participación en el microambiente tumoral, restringen el alcance de nuestros resultados.

Los parámetros hematológicos podrían indicar efectos adversos de los compuestos sobre los componentes sanguíneos (Wm A. et al. 2021) El tratamiento con AgNPs-G aumentó los valores hematológicos relacionados con AST, ALT y ALP en los ratones tratados con AgNPs-G en comparación con el grupo control. El aumento de estas enzimas hepáticas indica daño en ciertos órganos, lo cual se correlaciona con los datos histológicos. Estudios previos reportaron una alta incidencia de anemia en pacientes con cáncer (Knight et al 2004) y una correlación con malos resultados terapéuticos y pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Chen B. et al. 2016; Dubsky P. et al 2008). Si bien los niveles de hematocrito, hemoglobina y glóbulos rojos se encontraban por debajo de los niveles de referencia, estos hallazgos

parecen ser independientes del tratamiento, ya que no se observaron diferencias significativas en hematocrito ni hemoglobina entre los grupos experimentales.

## 9. CONCLUSIONES

En conclusión, hemos desarrollado una nueva síntesis de AgNPs -G, con actividad antitumoral sobre líneas celulares de cáncer de mama que afectan su ciclo celular e inducen un mecanismo de muerte celular inmunogénica parcial demostrado al reducir el tamaño del tumor y prolongar la supervivencia en ratones con vacunación profiláctica. Además, el tratamiento con AgNPs-G tiene un efecto antitumoral que se ve potenciado por su capacidad para remodelar el microambiente tumoral en ratones con cáncer de mama triple negativo. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para comprender completamente los mecanismos de acción exactos de AgNPs-G, optimizar las estrategias de tratamiento y evaluar su seguridad a largo plazo en modelos preclínicos y, eventualmente, en ensayos clínicos.

## **10. PERSPECTIVAS**

Dilucidar la capacidad real de ICD al administrar AgNPs -G en un modelo tumoral in vivo para después de un tiempo de eliminación del tumor, desafiar a los ratones con células cancerosas 4T1 y evaluar si se alcanza un cierto grado de inmunidad para evitar reincidencia. Similar a Tao Huand et al., 2023 quienes demuestran con esta metodología que el ICD se puede restaurar a través de la actividad de la granzima B.

## 11. BIBLIOGRAFIA

Abed MS, Abed AS, Othman FM. 2019. Green synthesis of silver nanoparticles from natural compounds: glucose, eugenol, and thymol. *Journal of Advanced Research* 60:95–111.

Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M. y Khan, AU 2017. Sensibilización y conocimiento actual del cáncer de mama. *Investigación biológica*. 50 (1), 33.

Asadzadeh, Z., Safarzadeh, E., Safaei, S., Baradaran, A., Mohammadi, A., Hajiasgharzadeh, K., Derakhshani, A., Argentiero, A., Silvestris, N., y Baradaran, B. 2020. Enfoques actuales para la terapia combinada del cáncer: el papel de la muerte celular inmunogénica. *Cánceres*, 12 (4), 1047.

Au, CC, Furness, JB, Britt, K., Oshchepkova, S., Ladumor, H., Soo, KY, Callaghan, B., Gerard, C., Inghirami, G., Mittal, V., Wang, Y., Huang, XY, Spector, JA, Andreopoulou, E., Zumbo, P., Betel, D., Dow, L. y Brown, KA (2020). El crecimiento tridimensional de las células de cáncer de mama potencia los efectos antitumorales de la grelina no acilada y AZP-531. *eLife*, 9 , e56913.

Auria-Soro C, Nesma T, Juanes-Velasco P, Landeira-Viñuela A, Fidalgo-Gomez H, Acebes-Fernandez V, Gongora R, Almendral Parra MJ, Manzano-Roman R, Fuentes M. 2019. Interactions of nanoparticles and biosystems: microenvironment of nanoparticles and biomolecules in nanomedicine. *Nanomaterials* 9:1365.

Barton, M., Santucci-Pereira, J., Vaccaro, OG, Nguyen, T., Su, Y. y Russo, J. (2019). La sobreexpresión de BC200 contribuye a la patogénesis del cáncer de mama luminal y triple negativo. *Cáncer de BMC*, 19 (1), 994.

Ben-Baruch A. 2022. Tumor necrosis factor  $\alpha$ : taking a personalized road in cancer therapy. *Frontiers in Immunology* 13:903679.

Benson, A. B., 3rd, Schrag, D., Somerfield, M. R., Cohen, A. M., Figueredo, A. T., Flynn,

P. J., Krzyzanowska, M. K., Maroun, J., McAllister, P., Van Cutsem, E., Brouwers, M., Charette, M., & Haller, D. G. 2004. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(16), 3408–3419.

Bird, B. R., & Swain, S. M. 2008. Cardiac toxicity in breast cancer survivors: review of potential cardiac problems. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(1), 14–24.

Bodai, B. I., & Tusso, P. 2015. Breast cancer survivorship: a comprehensive review of long-term medical issues and lifestyle recommendations. *The Permanente journal*, 19(2), 48–79.

Butler KS, Peeler DJ, Casey BJ, Dair BJ, Elespuru RK. 2015. Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis* 30:577–591.

Chen B, Dai D, Tang H, Ai X, Chen X, Zhang X, Li Z, Xie X. 2016. Pretreatment hematocrit is superior to hemoglobin as a prognostic factor for triple negative breast cancer. *PLoS ONE* 11:e0165133.

Chen Y, Yu D, Qian H, Shi Y, Tao Z. 2024. CD8+ T cell-based cancer immunotherapy. *Journal of Translational Medicine* 22:394.

Daei S, Ziamajidi N, Abbasalipourkabir R, Aminzadeh Z, Vahabirad M. 2022. Silver nanoparticles exert apoptotic activity in bladder cancer 5637 cells through alteration of Bax/Bcl-2 genes expression. *Chonnam Medical Journal* 58:102–109.

Davidson N. E. 2001. Ovarian ablation as adjuvant therapy for breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, (30), 67–71.

Deng, Q. Q., Huang, X. E., Ye, L. H., Lu, Y. Y., Liang, Y., & Xiang, J. 2013. Phase II trial of Loubo® (Lobaplatin) and pemetrexed for patients with metastatic breast cancer not responding to anthracycline or taxanes. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 14(1), 413–417.

Dillehay KL, Seibel WL, Zhao D, Lu S, Dong Z. 2015. Target validation and structure-activity analysis of a series of novel PCNA inhibitors. *Pharmacology Research Perspectives* 3:e00115.

Drexler, K. E. (2004). Nanotechnology: from Feynman to funding. *Bulletin of Science, Technology & Society*, 24(1), 21-27.

Du P, Xu Y, Shi Y, Xu Q, Li S, Gao M. 2022. Preparation and shape change of silver nanoparticles (AgNPs) loaded on the dialdehyde cellulose by in-situ synthesis method. *Cellulose* 29:6831–6843.

Dubsky P, Sevela P, Jakesz R, Hausmaninger H, Samonigg H, Seifert M, Denison U, Mlineritsch B, Steger G, Kwasny W, et al. 2008. Anemia is a significant prognostic factor in local relapse-free survival of premenopausal primary breast cancer patients receiving adjuvant cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil chemotherapy. *Clinical Cancer Research* 14:2082–2087.

Elkomy RG. 2020. Antimicrobial screening of silver nanoparticles synthesized by marine cyanobacterium *Phormidium formosum*. *Iranian Journal of Microbiology* 12:242–248.

Elkomy RG. 2020. Antimicrobial screening of silver nanoparticles synthesized by marine cyanobacterium *Phormidium formosum*. *Iranian Journal of Microbiology* 12:242–248.

Evans, E. R., Bugga, P., Asthana, V., & Drezek, R. 2018. Metallic nanoparticles for cancer immunotherapy. *Materials Today*, 21(6), 673-685.

Farhad M, Rolig AS, Redmond WL. 2018. The role of galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. *OncoImmunology* 7:e1434467.

Feynman, R. (1960). Nanotechnology. *Caltech s Eng. Sci*, 22-36.

Figueiredo AS, Ferraria AM, Botelho do Rego AM, Monteiro S, Santos R, Minhalma M, Sánchez-Loredo MG, Tovar-Tovar RL, de Pinho MN. 2023. Bactericide activity of cellulose

acetate/silver nanoparticles asymmetric membranes: surfaces and porous structures role. *Membranes* 13:4.

Fisusi, F.A. & Akala, E.O. 2019. Combinaciones de fármacos en la terapia del cáncer de mama. *Nanotecnología farmacéutica*, 7 (1), 3–23.

Fouad, Y. A., & Aanei, C. 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, 7(5), 1016.

Garpis, N., Damaskos, C., Garpis, A., Kalampokas, E., Kalampokas, T., Spartalis, E., Daskalopoulou, A., Valsami, S., Kontos, M., Nonni, A., Kontzoglou, K., Perrea, D., Nikiteas, N. y Dimitroulis, D. (2017). Histonas desacetilasas como nuevos objetivos terapéuticos en el cáncer de mama triple negativo: avances y promesas. *Genómica y proteómica del cáncer*, 14 (5), 299–313.

Gastounioti, A., Hsieh, MK, Cohen, E., Pantalone, L., Conant, EF y Kontos, D. (2018). Incorporación de la anatomía mamaria en el fenotipado computacional de patrones parenquimatosos mamográficos para la estimación del riesgo de cáncer de mama. *Informes científicos*, 8 (1), 17489.

Goto S, Ihara Y, Urata Y, Izumi S, Abe K, Koji T, Kondo T. 2001. Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase  $\pi$ . *FASEB Journal* 15:2702–2714.

Grodzinski, P., Kircher, M., Goldberg, M., & Gabizon, A. 2019. *Integrating Nanotechnology into Cancer Care*. *ACS Nano*.

Gurunathan S, Han JW, Eppakayala V, Jeyaraj M, Kim JH. 2013. Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *BioMed Research International* 2013:535796.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

- Herrera Gómez, A. 2013. *Manual de oncología*. México: McGraw Hill. Ed 6, pp. 34-70.
- Hondermarck, H. 2019. Cancer Omics: Adding Understanding to Knowledge. *Proteomics*, 19(21–22), 1–2.
- Huang T, Sun X, Qi Y, Yang X, Fan L, Chen M, Yue Y, Ge H, Li Y, Nie G, et al. 2023. Immunogenic cell death effects induced by doxorubicin improved chemo-immunotherapy via restoration of granzyme B activity. *Nano Research* 1–9.
- Jin H, Liao S, Yao F, Li J, Xu Z, Zhao K, Xu X, Sun S. 2023. Insight into the crosstalk between photodynamic therapy and immunotherapy in breast cancer. *Cancers* 15:1532.
- Kakarala, M., & Wicha, M. S. 2008. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(17), 2813–2820.
- Knight K, Wade S, Balducci L. 2004. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *American Journal of Medicine* 116:11–26.
- Kumar, V., Fausto, N. & A., A., 2008. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier, Burlington, MA, ed. 7, pp. 324-361.*
- Liu, Y., Hardie, J., Zhang, X. y Rotello, VM 2017. Efectos de las nanopartículas artificiales sobre el sistema inmunológico innato. *Seminarios de inmunología*, 34, 25–32.
- Martínez-Pérez C, Kay C, Meehan J, Gray M, Dixon JM, Turnbull AK. 2021. The IL6-like cytokine family: role and biomarker potential in breast cancer. *Journal of Personalized Medicine* 11:1073.
- Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. 2022. Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23:74–88.
- Matysiak-Kucharek M, Czajka M, Jodłowska-Jędrych B, Sawicki K, Wojtyła-Buciora P, Kruszewski M, Kapka-Skrzypczak L. 2020. Two sides to the same coin—cytotoxicity vs.

potential metastatic activity of AgNPs relative to triple-negative human breast cancer MDA-MB-436 cells. *Molecules* 25:2375.

Mehanna, J., Haddad, FG, Eid, R., Lambertini, M. y Kourie, HR (2019). Cáncer de mama triple negativo: perspectiva actual sobre el panorama terapéutico en evolución. *Revista internacional de salud de la mujer*, 11, 431–437.

Mercogliano MF, Bruni S, Elizalde PV, Schillaci R. 2020. Tumor necrosis factor  $\alpha$  blockade: an opportunity to tackle breast cancer. *Frontiers in Oncology* 10:584.

Mireles-Aguilar, T., Tamez-Salazar, J., Muñoz-Lozano, JF, Lopez-Martinez, EA, Romero, C., Platas, A., y Villarreal-Garza, C. 2018. Alerta Rosa: Nuevo Programa de Alerta y Navegación para el Cáncer de Mama en Nuevo León, México, para la Reducción de Retrasos en los Intervalos del Sistema de Salud. *El oncólogo*, 23 (12), 1461–1466.

Moo, TA, Sanford, R., Dang, C. y Morrow, M. 2018. Descripción general de la terapia contra el cáncer de mama. *Clínicas de PET*, 13 (3), 339–354.

Nagarsheth, N., Wicha, MS y Zou, W. 2017. Quimiocinas en el microambiente del cáncer y su relevancia en la inmunoterapia del cáncer. *Nature Reviews Immunology*, 17 (9), 559.

Nahid, AA y Kong, Y. (2017). Implicación del aprendizaje automático para la clasificación de imágenes del cáncer de mama: una encuesta. *Métodos computacionales y matemáticos en medicina*, 2017, 3781951.

Ni L, Lu J. 2018. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Medicine* 7:4509–4516.

Ong, C., Lim, J. Z. Z., Ng, C. T., Li, J. J., Yung, L. Y., & Bay, B. H. (2013). Silver nanoparticles in cancer: therapeutic efficacy and toxicity. *Current medicinal chemistry*, 20(6), 772-781.

Osborne, C. K., Yochmowitz, M. G., Knight, W. A., 3rd, & McGuire, W. L. 1980. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer*, 46(12)

Suppl), 2884–2888.

Oshi M, Asaoka M, Tokumaru Y, Angarita FA, Yan L, Matsuyama R, Zsiros E, Ishikawa T, Endo I, Takabe K. 2020. Abundance of regulatory T cell (Treg) as a predictive biomarker for neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Cancers* 12:3038.

Panzarini E, Mariano S, Vergallo C, Carata E, Fimia GM, Mura F, Rossi M, Vergaro V, Ciccarella G, Corazzari M, et al. 2017. Glucose capped silver nanoparticles induce cell cycle arrest in HeLa cells. *Toxicology In Vitro* 41:64–74.

Paruch M. (2019). Modelado matemático de la destrucción de tumores mamarios mediante calentamiento rápido durante la ablación por radiofrecuencia. *Materiales (Basilea, Suiza)*, 13 (1), 136.

Raja, G., Jang, Y.-K., Suh, J.-S., Kim, H.-S., Ahn, S. H., & Kim, T.-J. 2020. *Microcellular Environmental Regulation of Silver Nanoparticles in Cancer Therapy: A Critical Review. Cancers*, 12(3).

Rani P, Trivedi L, Gaurav SS, Singh A, Shukla G. 2020. Green synthesis of silver nanoparticles by *Cassia filiformis* L. extract and its characterization. *Materials Today: Proceedings* 49:3510–3516.

Rohde MM, Snyder CM, Sloop J, Solst SR, Donati GL, Spitz DR, Furdui CM, Singh R. 2021. The mechanism of cell death induced by silver nanoparticles is distinct from silver cations. *Particle and Fibre Toxicology* 18:37.

Santana-Krímiskaya SE, Franco-Molina MA, Zárate-Triviño DG, Prado-García H, Zapata-Benavides P, Torres-del-Muro F, Rodríguez-Padilla C. 2020. IMMUNEPOTENT CRP plus doxorubicin/cyclophosphamide chemotherapy remodel the tumor microenvironment in an air pouch triple-negative breast cancer murine model. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 126:110062.

Sápi J, Kovács L, Drexler DA, Kocsis P, Gajári D, Sápi Z, Bertolini F. 2015. Tumor volume estimation and quasi-continuous administration for most effective bevacizumab therapy. *PLoS ONE* 10:e0142190.

Serrano-Del Valle, A., Anel, A., Naval, J. y marzo, I. 2019. Muerte celular inmunogénica e inmunoterapia del mieloma múltiple. *Fronteras en biología celular y del desarrollo*, 7, 50.

Shapiro, C. L., & Recht, A. 2001. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *The New England journal of medicine*, 344(26), 1997–2008.

Si, W., Shen, J., Zheng, H., & Fan, W. 2019. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical epigenetics*, 11(1), 25.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. 2019. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(1), 7-34.

Singh S, Bharti A, Meena VK. 2014. Structural, thermal, zeta potential and electrical properties of disaccharide reduced silver nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 25:3747–3752.

Snyder CM, Rohde MM, Fahrenholtz CD, Swanner J, Sloop J, Donati GL, Furdui CM, Singh R. 2021. Low doses of silver nanoparticles selectively induce lipid peroxidation and proteotoxic stress in mesenchymal subtypes of triple-negative breast cancer. *Cancers* 13:4217.

Swanner J, Fahrenholtz CD, Tenvooren I, Bernish BW, Sears JJ, Hooker A, Furdui CM, Alli E, Li W, Donati GL, et al. 2019. Silver nanoparticles selectively treat triple-negative breast cancer cells without affecting non-malignant breast epithelial cells in vitro and in vivo. *FASEB BioAdvances* 1:639–660.

Thakkar, S., Sharma, D., Kalia, K., & Tekade, R. K. 2020. Tumor microenvironment targeted nanotherapeutics for cancer therapy and diagnosis: A review. *Acta biomaterialia*, 101, 43-68.

Torres Castro, A., López Cuéllar, E. M., García Loera, A. F., Ortiz Méndez, U., & Yacamán, M. J. (2008). Elaboración de nanopartículas metálicas y bimetálicas mediante desbastado iónico. *Ingenierías*, 11(40), 34-40.

Torres-Cavazos Z, Franco-Molina MA, Santana-Krímskaya SE, Rodríguez-Padilla C, Kawas-Garza JR, Hernández-Vidal G, Moreno-Degollado G, Zamora-Ávila DE. 2020. In vivo evaluation of the antitumor and immunogenic properties of silver and sodium dichloroacetate combination against melanoma. *Journal of Nanomaterials* 2020:3741019.

Torres-Cavazos Z, Franco-Molina MA, Santana-Krímskaya SE, Rodríguez-Padilla C, Kawas-Garza JR, Hernández-Vidal G, Moreno-Degollado G, Zamora-Ávila DE. 2020. In vivo evaluation of the antitumor and immunogenic properties of silver and sodium dichloroacetate combination against melanoma. *Journal of Nanomaterials* 2020:3741019.

Tuttle, T. M., Habermann, E. B., Grund, E. H., Morris, T. J., & Virnig, B. A. 2007. Increasing use of contralateral prophylactic mastectomy for breast cancer patients: a trend toward more aggressive surgical treatment. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(33), 5203–5209.

Vaz-Luis, I., Hughes, M. E., Cronin, A., Rugo, H. S., Edge, S. B., Moy, B., Theriault, R. L., Hassett, M. J., Winer, E. P., & Lin, N. U. 2016. Trends in the use of mastectomy in women with small node-negative breast cancer treated at US academic centers. *Breast cancer research and treatment*, 155(3), 569–578.

Venugopal K, Rather HA, Rajagopal K, Shanthi MP, Sheriff K, Illiyas M, Rather RA, Manikandan E, Uvarajan S, Bhaskar M, et al. 2017. Synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) for anticancer activities (MCF7 breast and A549 lung cell lines) of the crude extract of *Syzygium aromaticum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 167:282–289.

Vergallo C, Panzarini E, Carata E, Ahmadi M, Mariano S, Tenuzzo BA, Dini L. 2016. Cytotoxicity of  $\beta$ -D-glucose/sucrose-coated silver nanoparticles depends on cell type,

nanoparticles concentration and time of incubation. *AIP Conference Proceedings* 1749:020012.

Vergallo C, Panzarini E, Izzo D, Carata E, Mariano S, Buccolieri A, Dini L. 2014. Cytotoxicity of  $\beta$ -D-glucose coated silver nanoparticles on human lymphocytes. *AIP Conference Proceedings* 1603:78–85.

Welch, D. R., & Hurst, D. R. 2019. Defining the hallmarks of metastasis. *Cancer Research*, 79(12), 3011-3027

Wing, C. E. G. (2006). Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial. *El Inin Hoy, Contacto Nuclear*, 24-29.

Wm A, Dw N. 2016. Hematological markers of in vivo toxicity. *Journal of Hematology and Thrombosis Disorders* 4:2.

Yaqoob AA, Umar K, Ibrahim MNM. 2020. Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications – a review. *Applied Nanoscience* 10:1369–1378.

Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, Li Y. 2021. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6:263.

### **Páginas Web**

Organización mundial de la salud. 2018. Cáncer. 06/10/2020, de Organización Mundial de la Salud, Sitio web: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>