



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

UNIDAD LEGARIA

**BIOCONJUGACIÓN DE NANOTRANSPORTADORES DE
NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON SBA PARA EL
TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN TECNOLOGÍA AVANZADA

PRESENTA

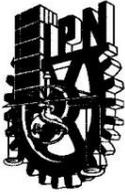
MARIA VIVIANA ROBLES BOTERO

DIRECTORES DE TESIS:

DR. EDUARDO SAN MARTÍN MARTÍNEZ

DRA. ROCIO GUADALUPE CASAÑAS PIMENTEL

JULIO 2015



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de MÉXICO D.F. siendo las 10.00 horas del día 09 del mes de Julio del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA LEGARIA para examinar la tesis titulada:

"Bioconjugación de nanotransportadores de nanopartículas de plata con SBA para el tratamiento de cáncer de mama"

Presentada por el alumno:

ROBLES

BOTERO

MARIA VIVIANA

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	1	3	0	7	6	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRIA EN TECNOLOGÍA AVANZADA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

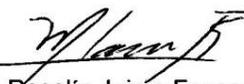
Directores de tesis


Dr. Eduardo San Martín Martínez


Dra. Rocio Guadalupe Casañas Pimentel

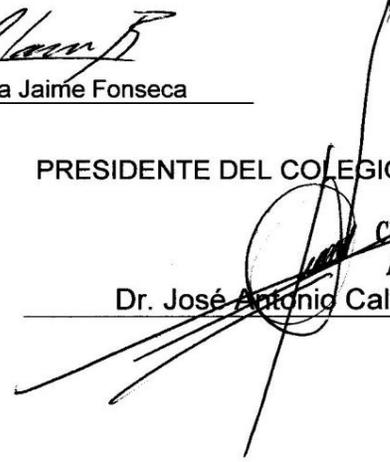

Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez

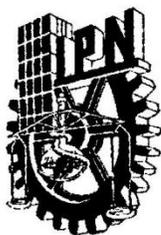

Dr. Fernando Trejo Zárraga


Dra. Mónica Rosalía Jaime Fonseca

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA


Dr. José Antonio Calderón Arenas
IPN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 13 del mes de Julio del año 2015, la que suscribe **Maria Viviana Robles Botero** alumna del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada, con número de registro **B-130761**, adscrita al Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada – Unidad Legaria, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Eduardo San Martín Martínez** y la **Dra. Rocío Guadalupe Casañas Pimentel** y cede los derechos del trabajo titulado **Bioconjugación de Nanotransportadores de Nanopartículas de Plata con SBA para el Tratamiento de Cáncer de Mama**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: **mavi_rb@hotmail.com**, **rg15cp@yahoo.com.mx**, **sanmartinedu@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Maria Viviana Robles Botero
Nombre y firma del alumno(a)

Resumen

La síntesis de nanopartículas de plata por el método del poliol es una reacción en donde la plata iónica se reduce a plata metálica. En este trabajo se reporta la presencia de grupos funcionales aldehído y carboxilo en la oxidación del polietilenglicol, al pasivar la plata.

Las nanopartículas de plata (1.48% m/m) fueron puestas en agua desionizada para la síntesis de nanotransportadores de nanopartículas de plata por autoensamble, se siguió la siguiente metodología: agitación en vortex durante 30 segundos, por tres veces; baño ultrasónico, 25 kHz, 10 minutos; se evaluó la influencia del factor pH, en un experimento de 24 corridas, con 2 niveles de variación: pH 9 ± 0.1 y sin ajuste de pH; posteriormente se dejaron madurar por 24, 48 y 72 horas para evaluar por dispersión de luz dinámica (DLS) la estabilidad de los nanotransportadores en almacenamiento, a los tiempos establecidos. De este estudio, se observó que los nanotransportadores sintetizados sin ajustar pH presentaron distribución del diámetro hidrodinámico menor al 90%, con múltiples modas. Por el contrario, al ajustar a 9, el pH de estos nanoacarreadores, se tiene que a mayor tiempo de maduración las nanoesferas poliméricas ven mejorada su estabilidad, ya que al analizarse por DLS se obtuvo una distribución monomodal del tamaño del nanotransportador y un diámetro hidrodinámico medio de $182,9 \pm 6,6$ nm. Una vez establecidas las condiciones favorables, se procedió a evaluar el potencial Z (en función del pH) de las muestras sintetizadas y maduras por 72 h. De esta manera se determinó que la carga del nanotransportador es negativa en todo el rango de pH estudiado (2 a 11) y que, además, a pH 9 la carga negativa del nanovehículo es muy alta, debiéndose reajustar al momento de ser bioconjugada.

A partir de semillas de soya (*Glycine max*), se extrajo la aglutinina de soya (SBA) que es una proteína que se ha reportado, en estudios realizados por otros autores, tener afinidad a células tumorales de cáncer de mama. La extracción se realizó por cromatografía de afinidad y se evaluó por electroforesis SDS-PAGE (10%). Se evaluó el potencial Z en función del pH (en un rango de 4 a 8), para ver el comportamiento de las cargas predominantes en la proteína y valorar la bioconjugación por atracción de cargas. También se realizó este estudio con SBA comercial (Sigma-Aldrich, USA).

Una vez extraída la proteína se procedió a realizar la bioconjugación con los nanotransportadores, al mismo tiempo que, para comparar la acción de nuestra proteína en estudios *In vitro*, se tomó SBA comercial para ser bioconjugada con los nanotransportadores. Las condiciones de bioconjugación fueron: 9°C, agitación a 150 rpm, por 8 h, pH 5.8. Se evaluó el efecto citotóxico de los bioconjugados en la línea celular de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231, demostrando disminución de la viabilidad celular a las 24 y 72 h de haber sido aplicado el tratamiento.

Abstract

The synthesis of silver nanoparticles by the polyol method is a reaction in which ionic silver is reduced to metallic silver. In this work, we report the presence of aldehyde functional groups and carboxyl on the oxidation of polyethylene glycol, to reduce silver.

Silver nanoparticles (1.48% m/m) were placed in deionized water to nanocarriers synthesis of silver nanoparticles by self-assembly, the methodology was the followed: vortexing for 30 seconds, three times; ultrasonic bath, 25 kHz, 10 minutes; a bull without adjusting pH and other pH adjusted to 9 ± 0.1 ; subsequently left to mature for 24, 48 and 72 hours to evaluate by dynamic light scattering (DLS) nanocarriers stability in storage at set times. From this study, it was found that nanocarriers synthesized without adjusted pH presented hydrodynamic diameter distribution of less than 90%, with multiple modes. Conversely, adjusting to 9, the pH of these nanocarriers, we have that longer mature time improves nanospheres stability since when analyzed by DLS was obtained a monomodal size distribution of nanocarriers and a hydrodynamic diameter means about 182.9 ± 6.6 nm. Once established favorable conditions, we proceeded to assess the Z-potential (depending on pH) of the synthesized samples and matured for 72 h.

Thus, it was determined that the nanocarrier charge is negative throughout the pH range studied (2 to 11) and also at pH 9 this negative charge is very high, so pH must be change for bioconjugation.

Soybean agglutinin (SBA) was removed from soybeans (*Glycine max*). SBA is a protein that, has been reported in studies by other authors, have affinity to tumor cells of breast cancer. Extraction was performed by affinity chromatography and evaluated by SDS-PAGE (10%). The zeta potential versus pH was evaluated (in a range of 4 to 8), to see the behavior of prevailing charges on the protein and evaluate bioconjugation by charge attraction. This study was also performed with commercial SBA (Sigma-Aldrich, USA).

After removing the protein, it was proceeded to make nanocarriers bioconjugation with our protein and, at the same time to compare the action of *In vitro* studies, commercial SBA was taken to be bioconjugada with nanocarriers. Bioconjugation conditions were: 9°C, shaking at 150 rpm for 8 h, pH 5.8. The cytotoxic effect of the bioconjugates in mammary adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 was evaluated, showing decreased cell viability after 24 and 72 h of treatment applied.

*Todo el esfuerzo y empeño invertido, en este trabajo de tesis, los dedico a: Arcil,
Nirma y Danielito.*

Agradecimientos

Primero a Dios, por todo.

A mi amada familia, por el apoyo incondicional que me han dado para poder hacer realidad este sueño.

A CICATA-Legaria por haberme recibido en su programa de maestría en tecnología avanzada y permitirme desarrollar en el ámbito de la investigación.

Al Dr. Eduardo San Martín y la Dra. Rocío Casañas, por haberme aceptado en su proyecto, por su paciencia, cooperación, consejo y por haberme enseñado tanto en estos dos años de maestría.

A los profesores: Dr. Fernando Trejo, Dra. Mónica Jaime, Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez por su valiosa guía en las actividades de la maestría, especialmente en las unidades de aprendizaje.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biomateriales, por el apoyo brindado de alguna manera a este trabajo, en especial a mi compañero Juan Maldonado en las pruebas de citotoxicidad, Pako y Eli por las labores del día a día. A mis amigos Saúl y Olivia, el trabajo en el laboratorio no es el mismo sin ustedes.

A mi amigo Romer Oyola, por su gran apoyo y amistad.

Al laboratorio de Biocatálisis, por su colaboración en el desarrollo de algunas pruebas de espectroscopía UV-Vis.

A Lety, Lau, Pablo y Andrés por su accesibilidad, cordial asesoramiento y ayuda en todo tiempo.

A CONACYT por el soporte económico otorgado durante el tiempo en el que se realizó este trabajo de maestría.

En general, Gracias México!!!

Contenido

1. Antecedentes	1
1.1 Cáncer	1
1.1.1 Características de los tejidos tumorales.....	1
1.1.2 El Microambiente tumoral	10
1.2 Cáncer de mama	11
1.2.1 Tipos de cáncer de mama.....	12
1.2.2 Tratamientos contra el Cáncer de Mama.....	14
1.3 Nanotecnología.....	17
1.3.1 Direccionamiento Pasivo vs Direccionamiento Activo	18
1.3.2 Nanotransportadores de Nanopartículas para terapia dirigida.....	19
1.3.3 Moléculas de direccionamiento para el desarrollo de nanopartículas dirigidas	20
1.3.4 Nano partículas de Plata para el tratamiento del cáncer.....	24
1.4 Síntesis de Nano partículas de Plata por el Método del Poliol.....	25
1.5 Bioconjugación para el direccionamiento de fármacos	26
1.5.1 Pre-requisitos para la conjugación de nanopartículas con proteínas, mientras se preserva su función biológica	26
1.5.2 Métodos de Bioconjugación.....	27
2. Justificación	31
3. Objetivo General	32
3.1 Objetivos Específicos	32
4. Metodología y Materiales	33
4.1 Síntesis y caracterización de Nanopartículas de Plata.....	33
4.1.1 Síntesis de Nanopartículas de Plata	33
4.1.2 Caracterización de Nanopartículas de Plata por Espectroscopía UV-Vis.....	33
4.1.3 Caracterización del producto de la reacción del PEG con Nanopartículas de Plata por Espectroscopía RAMAN	33
4.2 Síntesis y Caracterización de Nanotransportadores de Nanopartículas de Plata .	33
4.2.1 Caracterización de Nanotransportadores de AgNPs por DLS	35

4.3	Purificación y caracterización de la proteína de soya	35
4.3.1	Obtención del material vegetal.....	36
4.3.2	Molienda.....	36
4.3.3	Tamizado.	36
4.3.4	Desgrasado.	36
4.3.5	Extracción de Proteínas (Globulinas).	37
4.3.6	Precipitación de Proteínas por “Salting Out”.	37
4.3.7	Cuantificación de Proteínas Totales	38
4.3.8	Cromatografía de afinidad.....	38
4.3.9	Espectroscopía FTIR.....	40
4.3.10	Electroforesis	40
4.4	Bioconjugación.....	41
4.4.1	Caracterización de SBA y muestra purificada.....	41
4.4.2	Proceso de bioconjugación.....	41
4.5	Caracterización de los Nanotransportadores de AgNPs conjugados	42
4.5.1	Ensayos de Toxicidad.....	42
4.5.2	Preparación de las muestras	42
4.5.3	Ensayo de Viabilidad Celular (MTT).....	42
5.	Resultados y discusión	44
5.1	Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata	44
5.1.1	Caracterización de nanopartículas de plata por Espectrofotometría UV-Vis	44
5.1.2	Caracterización de Nanopartículas de Plata por Espectroscopía RAMAN	46
5.2	Síntesis de nanotransportadores.....	49
5.3	Estudio de estabilidad de los nanotransportadores.....	53
5.4	Purificación y caracterización de la proteína de soya	57
5.5	Bioconjugación.....	59
5.5.1	Estudios de Citotoxicidad	60
6	Conclusiones.....	64
7	Recomendaciones	65
8	Referencias.....	66

TABLAS

TABLA 1.- COMBINACIONES COMUNES DE FÁRMACOS PARA LA QUIMIOTERAPIA DE CÁNCER DE MAMA TEMPRANO. FUENTE: (GIRISH ET AL., 2014).....	15
TABLA 2.- FÁRMACOS PARA LA TERAPIA HORMONAL DE CÁNCER DE MAMA. FUENTE: (GIRISH ET AL., 2014).	16
TABLA 3.- MEDICAMENTOS MOLECULARMENTE DIRIGIDOS CONTRA EL CÁNCER DE MAMA EN EL USO CLÍNICO. ND = NO DISPONIBLE. FUENTE: (HUANG ET AL., 2014).	17
TABLA 4.- ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER. FDA = U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION; CD= GRUPO DE DIFERENCIACIÓN; VEGF= FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR; EGFR= RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO. FUENTE: (GERBER, 2008).	21
TABLA 5.- MÉTODOS AVANZADOS PARA LA CONJUGACIÓN DE PROTEÍNAS CON NANOPARTÍCULAS: VENTAJAS Y DESVENTAJAS. FUENTE:(AVVAKUMOVA ET AL., 2014)	30
TABLA 6.- EXPERIMENTO PARA LA SÍNTESIS DE NANOTRANSPORTADORES DE AgNPs, CON DIFERENTES TIEMPOS DE MADURACIÓN (24, 48, 72 H), CON AJUSTE (9 ± 0.1) DE PH Y SIN AJUSTE DE PH (SA).....	34
TABLA 7.- PROCEDIMIENTOS GENERALES PARA LA PURIFICACIÓN DE AGLUTININA DE SOYA (SBA).....	35
TABLA 8.- TAMAÑO DE ABERTURA DE LOS TAMICES UTILIZADOS.	36
TABLA 9.- MUESTRAS Y CONTROLES CARGADOS EN LOS CANALES ELECTROFORÉTICOS.	41
TABLA 10.- TRATAMIENTOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD EVALUADOS MEDIANTE MTT	43
TABLA 11.- RENDIMIENTO DE LA SÍNTESIS DE AgNPs A DIFERENTES TIEMPOS DE REACCIÓN.....	46
TABLA 12.- DIÁMETRO HIDRODINÁMICO DE LOS NANOTRANSPORTADORES DE AgNPs, A DIFERENTES TIEMPOS DE MADURACIÓN, SIN AJUSTAR PH.....	54
TABLA 13.- DIÁMETRO HIDRODINÁMICO DE LOS NANOTRANSPORTADORES DE AgNPs, A DIFERENTES TIEMPOS DE MADURACIÓN, CON AJUSTE DE PH.	55
TABLA 14.- POTENCIAL Z DE LOS NANOTRANSPORTADORES DE AgNPS, A 72 H DE MADURACIÓN, CON Y SIN AJUSTAE DE PH.	55
TABLA 15.- POTENCIAL Z DE LOS NANOTRANSPORTADORES DE AgNPS, A 72 H DE MADURACIÓN, CON AJUSTE DE PH.....	56
TABLA 16.- CONTENIDO DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE LOWRY, EN LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN.	57
TABLA 17.- POTENCIAL Z DE LA AGLUTININA DE SOYA (SBA) DISUELTA EN PBS (PH 7.4) A DIFERENTES CONDICIONES DE PH.....	59
TABLA 18.- POTENCIAL Z DE LA MUESTRA PURIFICADA (T2) DISUELTA EN PBS (PH 7.4) A DIFERENTES CONDICIONES DE PH.....	60

FIGURAS

FIGURA 1.- INTERACCIONES ENTRE CÉLULA-NANOPARTÍCULA. FUENTE: (ALBANESE ET AL., 2012).....	25
FIGURA 2.- PROCEDIMIENTOS PARA LA SÍNTESIS DE NANOTRANSPORTADORES DE AGNPs	34
FIGURA 3.- EQUIPO DE SOXHLET UTILIZADO PARA LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LA HARINA DE SOYA.	37
FIGURA 4.- DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS	38
FIGURA 5.- REACCIÓN DE ACTIVACIÓN DE MATRIZ DE AGAROSA CON 1,4-BUTANODIOL-DIGLICIDIL-ÉTER.....	39
FIGURA 6.- REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO DEL LIGANDO A LA DE MATRIZ DE AGAROSA.	39
FIGURA 7.- ESQUEMA DE LA BIOCONJUGACIÓN DE LOS NANOTRANSPORTADORES DE AGNPs.....	41
FIGURA 8.- ESPECTRO UV-VIS DE LAS AGNPs SINTETIZADAS A DIFERENTES TIEMPOS DE REACCIÓN (0, 30, 60, 90, 120 MINUTOS), Y DISUELTAS EN CLOROFORMO PARA SU CARACTERIZACIÓN.	44
FIGURA 9.- ESPECTRO UV-VIS DE LAS AGNPs SINTETIZADAS A DIFERENTES TIEMPOS DE REACCIÓN (0, 30, 60, 90, 120 MINUTOS), Y DISUELTAS EN CLORURO DE METILENO PARA SU CARACTERIZACIÓN.....	45
FIGURA 11.- ESPECTRO DE DISPERSIÓN RAMAN DE A) EL PEG OXIDADO POR LA SÍNTESIS DE AGNPs B) IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE OXIDACIÓN.....	48
FIGURA 12.- DIÁMETRO HIDRODINÁMICO DE LOS NANOTRANSPORTADORES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PEG-AGNPs, SIN AJUSTAR PH. %=PORCENTAJE DE ABUNDANCIA.....	49
FIGURA 13.-GRÁFICOS DE DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS POR INTENSIDAD DE LOS NANOTRANSPORTADORES SINTETIZADOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PEG-AGNPs, SIN AJUSTAR PH. A) 2.84%; B) 2,49%; C) 2.15% D) 1.80%; E) 1.48%; F) 0.79%; G) 0.45%; H) 0.10%;	50
FIGURA 14.- DIÁMETRO HIDRODINÁMICO DE LOS NANOTRANSPORTADORES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PEG-AGNPs, CON AJUSTE DE PH A $9,0\pm 0,2$; %=PORCENTAJE DE ABUNDANCIA.	51
FIGURA 16.- DIÁMETRO HIDRODINÁMICO DE LOS NANOTRANSPORTADORES DE AGNPs A DIFERENTES TIEMPOS DE MADURACIÓN, SIN AJUSTE DE PH; %=INTENSIDAD.	53
FIGURA 18.- GRÁFICO DEL POTENCIAL Z EN FUNCIÓN DEL PH, PARA LOS NANOTRANSPORTADORES DE AGNPs.....	56
FIGURA 19.- GEL DE ELECTROFORESIS. MW= MARCADOR DE PESO MOLECULAR; D1, D2, D3, D4, D5= MUESTRAS DE DIALIZADOS DESPUÉS DEL SALTING OUT; T1, T2= FRACCIONES 7 Y 3, RESPECTIVAMENTE, DE LA CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD; CTRL(+)= SBA PURA (SIGMA-ALDRICH); CTRL(-)= ALBÚMINA DE SUERO BOVINO. DA= DALTONS. A LA IZQUIERDA: CROMATOGRAMA DE LA ELUCIÓN DE LA SBA.	58
FIGURA 20.- GRÁFICO DEL POTENCIAL Z EN FUNCIÓN DEL PH, PARA LA AGLUTININA DE SOYA Y LA PROTEÍNA EXTRAÍDA.....	59
FIGURA 21.- VIABILIDAD CELULAR DETERMINADA POR MTT TRAS 24 H DE TRATAMIENTO.	61
FIGURA 22.- VIABILIDAD CELULAR DETERMINADA POR MTT TRAS 72 H DE TRATAMIENTO.	63

1. Antecedentes

1.1 Cáncer

Nuestro cuerpo está formado por trillones de células vivas. Las células normales crecen, se dividen para formar nuevas células y mueren de una forma ordenada. Durante los primeros años de vida del ser humano, las células normales se dividen más rápido para permitir el crecimiento de la persona. Cuando el individuo se convierte en adulto, la mayoría de las células se dividen sólo para reemplazar aquellas células que están desgastadas o las que están muriendo, y para reparar lesiones. El cáncer empieza cuando las células de una parte del cuerpo comienzan a crecer fuera de control("Cancer Basics," 2014).

Cáncer es un término genérico para un gran grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una de las características que define el cáncer es la generación acelerada de células anormales que crecen más allá de sus límites normales, y que pueden después invadir zonas adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos, este último proceso se conoce como metástasis("World Health Organization," 2015).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con aproximadamente 14 millones de casos nuevos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer en el año 2012. Las causas más comunes de muerte por cáncer son: el de pulmón, hígado, estómago, colon-rectal, mama y cáncer esofágico(Stewart, 2014).

El cáncer es un conjunto complejo de enfermedades genéticas distintas, unidas por características comunes(J. Luo *et al.*, 2009). A continuación, se describen estas características de los tejidos tumorales:

1.1.1 Características de los tejidos tumorales

Se han propuesto seis particularidades del cáncer que proveen un sólido fundamento para entender la biología del cáncer(Hanahan & Weinberg, 2000). Además, se han descrito otras características cruciales para la adquisición de estas seis capacidades distintivas (que permiten la supervivencia, proliferación y diseminación de las células cancerígenas); estos rasgos emergentes son: la inestabilidad del genoma y mutación, promotores tumorales de inflamación, reprogramación de energía metabólica y evasión del sistema inmune(Hanahan & Weinberg, 2011).

1.1.1.1 Rasgos del Cáncer

Mantenimiento de la Señalización Proliferativa

El rasgo más fundamental de las células del cáncer implica su capacidad para mantener la proliferación crónica. Los tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento que instruyen la entrada y progresión a través del ciclo de crecimiento y división celular, asegurando así una homeostasis del número de células y, por lo tanto, el mantenimiento de la arquitectura del tejido normal y su función. Las células cancerosas, mediante la desregulación de estas señales, se convierten en dueños de sus propios destinos. Las señales que permiten se transportan en gran parte por factores de crecimiento que se unen a receptores de la superficie celular, que contienen típicamente dominios intracelulares de tirosina quinasa. Este último procede a emitir señales a través de vías de señalización intracelular que regulan la progresión a través del ciclo celular, así como el crecimiento celular (es decir, los aumentos en el tamaño celular); a menudo estas señales influyen también otras propiedades biológicas de las células, tales como la supervivencia celular y el metabolismo energético (Hanahan & Weinberg, 2011).

Evación de los supresores de crecimiento

Las células cancerosas también deben eludir programas de gran alcance que regulan negativamente la proliferación celular; muchos de estos programas dependen de las acciones de los genes supresores de tumores. Decenas de supresores tumorales que operan en diversas formas para limitar el crecimiento celular y la proliferación se han descubierto a través de su inactivación característica en una u otra forma de cáncer humano o animal; muchos de estos genes se han validado como auténticos supresores tumorales a través de experimentos de ganancia o pérdida de función en los ratones. Los dos supresores tumorales prototípicos codifican las proteínas: RB (retinoblastoma asociada) y TP53; funcionan como nodos de control de centrales dentro de dos circuitos de regulación celular, complementarios clave que rigen las decisiones de las células para que proliferen o, alternativamente, activen la senescencia y los programas apoptóticos. La proteína RB integra señales de diversas fuentes extracelulares e intracelulares y, en respuesta, decide si o no una célula debe proceder a través de su ciclo de crecimiento y división (Burkhart & Sage, 2008).

Por lo tanto, las células con defectos en la función de la vía RB no responden a los puntos de control de la progresión del ciclo celular, cuya ausencia permite la proliferación celular persistente.

Resistencia a la muerte celular

Con el fin de eliminar las células redundantes, dañadas o infectadas, los organismos poseen un mecanismo de suicidio celular llamado apoptosis (Kerr, 1972).

Estudios han demostrado que la muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer y han revelado cómo la vía de señalización que regula el programa de apoptosis se activa en respuesta a diferentes tensiones fisiológicas que las células de cáncer experimentan durante el curso de la tumorigénesis o como resultado de terapias anticáncer (J. Adams & Cory, 2007; Hanahan & Weinberg, 2011).

Sin embargo, otras investigaciones han revelado cómo se atenúa la apoptosis en los tumores que tienen éxito en progresar a estados de alto grado de malignidad y la resistencia a la terapia (J. Adams & Cory, 2007; Lowe et al., 2004). La maquinaria apoptótica se compone de dos reguladores: los de cascada arriba y los componentes efectores cascada abajo (J. Adams & Cory, 2007).

Los reguladores, a su vez, se dividen en dos circuitos principales: uno de recepción y procesamiento de señales (que inducen la muerte extracelular), y el otro de detección e integración de una variedad de señales de origen intracelular (el programa intrínseco). Cada uno culmina en la activación de una proteasa normalmente latente (caspasas 8 y 9, respectivamente), que procede a iniciar una cascada de proteólisis que implica la participación de las caspasas efectoras responsables de la fase de ejecución de la apoptosis, en el que la célula se desmonta progresivamente y luego se consume (por sus vecinos y por las células fagocíticas profesionales). Actualmente, el programa de apoptosis intrínseca es más ampliamente implicado como una barrera para la patogénesis del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

El "gatillo apoptótico" que transmite señales entre los reguladores y efectores está controlado por el contrapeso de los miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 de proteínas reguladoras (J. Adams & Cory, 2007). Bcl-2 (junto con Bcl-x, Bcl-w, MCL-1, A1) son inhibidores de la apoptosis, actuando en gran parte mediante unión y de este modo suprimiendo dos proteínas de activación proapoptóticas (Bax y Bak); estas últimas están incrustadas en la membrana externa mitocondrial. Cuando se liberan de la inhibición por parte de sus parientes antiapoptóticas, Bax y Bak interrumpen la integridad de la membrana mitocondrial externa, causando la liberación de proteínas de señalización proapoptóticas, el más importante de los cuales es el citocromo c.

El citocromo c liberado activa, a su vez, una cascada de caspasas que actúan a través de sus actividades proteolíticas para inducir los múltiples cambios celulares asociados con el programa apoptótico. Bax y Bak comparten dominios de interacción proteína-proteína, denominados motivos BH3, con las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas que intervienen en sus diversas interacciones físicas. Las actividades de una subfamilia de proteínas relacionadas, cada uno de los cuales contiene un único motivo BH3 como tal, están acoplados a una variedad de sensores de anormalidad celular; estas proteínas "solo-BH3" actúan ya sea al interferir con proteínas antiapoptóticas Bcl-2 o por estimulación directa de los miembros proapoptóticos de esta familia (J. Adams & Cory, 2007; Willis & Adams, 2005).

Se han identificado varios sensores anormales que juegan un papel clave en el desarrollo de tumores, el más notable es un sensor dañado del DNA que funciona vía del supresor tumoral TP53. TP53 induce la apoptosis mediante la regulación positiva de la expresión de las proteínas BH3 Noxa y Puma, provocando esto en respuesta a niveles sustanciales de roturas en el ADN y otras anormalidades cromosómicas (Junttila & Evan, 2009).

Las células tumorales evolucionan diversas estrategias para limitar o evitar la apoptosis. La más común es la pérdida de la función del supresor tumoral TP53, que implica la eliminación de un sensor de daño crítico de la vía de inducción de apoptosis. Alternativamente, los tumores pueden lograr fines similares aumentando la expresión de los reguladores anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x) o de señales de supervivencia (Igf1/2), mediante la regulación negativa factores pro-apoptóticos (Bax, Bim, Puma), o poniendo en cortocircuito la vía de la muerte inducida por ligandos extrínsecos. La multiplicidad de mecanismos de evasión de apoptosis refleja la diversidad de señales que inducen apoptosis que las poblaciones celulares de cáncer enfrentan durante su evolución al estado maligno. La estructura de la maquinaria y el programa de apoptosis, y las estrategias utilizadas por las células cancerosas para evadir sus acciones, fueron ampliamente evaluados por el comienzo de la última década. Los avances conceptuales más notables desde entonces han incluido otras formas de muerte celular que amplían el alcance de la "muerte celular programada" como una barrera para el cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

Habilitación de la Inmortalidad Replicativa

Cuando las células se propagan en cultivos celulares, los repetidos ciclos de división celular conducen primero a la inducción de la senescencia y, a continuación, para aquellas células que tienen éxito en eludir esta barrera, a una fase de crisis, en la que la gran mayoría de la población de células muere. En raras ocasiones, las células surgen de una población en crisis y muestran potencial de replicación ilimitado.

Esta transición se ha denominado la inmortalización, un rasgo que la mayoría de las líneas celulares establecidas poseen en virtud de su capacidad para proliferar en cultivo celular sin evidencia de senescencia ni crisis. Múltiples líneas de evidencia indican que los telómeros, que protegen los extremos de los cromosomas, están centralmente involucrados en la capacidad de proliferación ilimitada (Blasco, 2005).

La telomerasa, la DNA-polimerasa especializada que agrega segmentos repetidos de los telómeros en los extremos de DNA telomérico, está casi ausente en las células no-inmortalizadas pero se expresa en niveles funcionalmente significativo en la gran mayoría (~90%) de las células inmortalizadas de forma espontánea, incluyendo las células de cáncer humano. Al ampliar el DNA telomérico, la telomerasa es capaz de contrarrestar la erosión progresiva de los telómeros que se hubiera producido en su ausencia. La presencia de actividad de la telomerasa está correlacionada con la resistencia a la inducción de las barreras de la senescencia y la crisis/apoptosis; en cambio la supresión de la actividad de la telomerasa conduce al acortamiento de los telómeros y a la activación de una u otra de estas barreras de la proliferación celular. Estas dos barreras son cruciales para la defensa de nuestro organismo en contra del cáncer. Sin embargo, existe la eventual inmortalización de variantes raras de células que proceden a formar tumores atribuyéndose a su capacidad para mantener el DNA telomérico en longitudes suficientes para evitar el desencadenamiento de la senescencia o apoptosis, alcanzando comúnmente la sobreexpresión de la telomerasa o, con menor frecuencia, a través del mantenimiento de los telómeros en base a un mecanismo de recombinación alternativa (Hanahan & Weinberg, 2011).

Inducción a la Angiogénesis

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como una capacidad para evacuar los desechos metabólicos y dióxido de carbono. La neovasculatura asociada al tumor, generada por el proceso de la angiogénesis, se dirige a suplir estas necesidades. Durante la embriogénesis, el desarrollo de la vasculatura implica el nacimiento de nuevas células endoteliales y su montaje en tubos (vasculogénesis) además de la germinación (angiogénesis) de nuevos vasos a partir de los ya existentes. Después de esta morfogénesis, la vasculatura normal se mantiene en reposo. En el adulto, como parte de procesos fisiológicos tales como la curación de heridas y el ciclo reproductivo femenino, la angiogénesis se activa, pero sólo transitoriamente. En contraste, durante la progresión tumoral, un "cambio angiogénico" es casi siempre activado y permanece encendido, causando vasculatura normalmente quiescente a brotar continuamente nuevos vasos que ayudan a mantener la expansión de crecimientos neoplásicos (Hanahan & Folkman, 1996).

Existe evidencia que indica que el interruptor angiogénico se gobierna por factores que inducen o se oponen a la angiogénesis. Algunos de estos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización que se unen a receptores estimuladores o inhibidores de la superficie celular manifestadas por las células endoteliales vasculares. Los prototipos conocidos de inductores e inhibidores de angiogénesis son: el factor de crecimiento vascular endotelial-A (VEGF-A) y trombospondina-1 (TSP-1)(Baeriswyl & Christofori, 2009).

La angiogénesis se induce sorprendentemente de manera precoz durante el desarrollo de múltiples etapas de los cánceres invasivos, tanto en modelos animales y en los seres humanos. Los análisis histológicos de las lesiones premalignas, no invasivas, incluyendo displasias y carcinomas in situ que surgen en una variedad de órganos, han revelado principios de la activación del interruptor angiogénico(Raica *et al.*, 2009).

Históricamente, la angiogénesis fue prevista para ser importante sólo cuando los tumores macroscópicos de rápido crecimiento se habían formado, pero los datos más recientes indican que la angiogénesis contribuye también a la fase premaligna microscópica de la progresión neoplásica, consolidando aún más su condición de característica integral del cáncer(Hanahan & Weinberg, 2011).

Invasión y metástasis

El proceso de múltiples etapas que representa a la invasión y la metástasis se ha esquematizado como una secuencia de pasos discretos, a menudo se denomina la cascada de invasión y metástasis(Talmadge & Fidler, 2010).

Esta representación prevé una sucesión de cambios en las células biológicas, a partir de la invasión local, siguiendo con la extravasación de las células cancerosas en los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, el tránsito de las células cancerosas a través de los sistemas linfáticos y hematógenos, seguido por el escape de las células cancerosas de la lumina de tales vasos en el parénquima de los tejidos distantes (extravasación), la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis), y finalmente el crecimiento de lesiones micrometastásicas en tumores macroscópicos, este último paso se denomina "colonización"(Hanahan & Weinberg, 2011).

Existe un programa de regulación del desarrollo, denominado "transición epitelio-mesenquimal" (EMT), que se ha convertido en un medio por el cual las células epiteliales transformadas pueden adquirir habilidades para invadir, resistir la apoptosis y diseminarse(Polyak & Weinberg, 2009).

Un conjunto de factores de transcripción activos pleiotrópicos, incluyendo Snail, Slug, Twist y Zeb1/2, dirigen la EMT y los procesos migratorios vinculados durante la embriogénesis; la mayoría fueron identificados por la genética del desarrollo. Estos reguladores de la transcripción se expresan en diversas combinaciones en diferentes tipos de tumores malignos y se ha demostrado en modelos experimentales de formación de carcinoma que son causalmente importantes para la invasión programada; se ha encontrado que algunos provocan metástasis cuando se da una sobreexpresión ectópica(Micalizzi *et al.*, 2010).

Los rasgos que provocan estos factores de transcripción son: la pérdida de las uniones adherentes y la conversión asociada de una morfología epitelial/poligonal a una fibroblástica/largo-delgado, la expresión de las enzimas que degradan la matriz, el aumento de la movilidad, y la alta resistencia a la apoptosis; todos estos rasgos están implicados en la invasión y metástasis. Varios de estos factores de transcripción pueden reprimir directamente la expresión del gen E-cadherina, privando así a las células epiteliales neoplásicas de este supresor de la motilidad e invasividad(Peinado *et al.*, 2004).

1.1.1.2 Rasgos Emergentes de los tejidos tumorales

Se han definido las características del cáncer como las capacidades funcionales adquiridas que permiten a las células cancerosas sobrevivir, proliferar y diseminarse; estas funciones se adquieren en diferentes tipos de tumores a través de mecanismos diferentes y en varios momentos durante el curso de varios pasos de la tumorigénesis. Su adquisición es posible gracias a dos características de activación. Una de las características, la más destacada, es el desarrollo de la inestabilidad genómica en las células de cáncer, que genera mutaciones aleatorias incluyendo reordenamientos cromosómicos; entre éstos están los extraños cambios genéticos que pueden orquestar las capacidades distintivas que se mencionaron anteriormente.

Una segunda característica de activación implica el estado inflamatorio de las lesiones premalignas y malignas, que es impulsado por las células del sistema inmunológico, algunos de los que sirven para promover la progresión del tumor a través de diversos medios.

Se han propuesto otros atributos distintivos de las células cancerosas, considerados funcionalmente importantes para el desarrollo del cáncer y que, por lo tanto, podrían ser añadidos a la lista de características básicas del cáncer(Colotta *et al.*, 2009; J. Luo *et al.*, 2009; Negrini *et al.*, 2010).

Dos de estos atributos son particularmente convincentes: El primero involucra la reprogramación del metabolismo energético celular con el fin de apoyar el crecimiento y la proliferación celular continua, reemplazando el programa metabólico que opera en los tejidos normales y aviva las operaciones fisiológicas de las células normales asociados; el segundo atributo consiste en la evasión activa de los ataques de las células inmunológicas y la eliminación de estas, esta capacidad destaca las funciones dicotómicas de un sistema inmunológico que tanto antagoniza como mejora el desarrollo y progresión tumoral.

Rasgo emergente: reprogramación del metabolismo energético.

La proliferación celular crónica y a menudo incontrolada que representa la esencia de las enfermedades neoplásicas implica no sólo el control desregulado de la proliferación celular sino también ajustes correspondientes al metabolismo energético con el fin de impulsar el crecimiento y la división celular.

Bajo condiciones aeróbicas, las células normales procesan a la glucosa, primero a piruvato a través de la glucólisis en el citosol y, posteriormente, a dióxido de carbono en la mitocondria; en condiciones anaeróbicas, relativamente poco piruvato es enviado a las mitocondrias que consumen oxígeno. Warburg *et al.* (1927) fueron los primeros en observar una característica anómala del metabolismo energético celular del cáncer(Koppenol *et al.*, 2011): incluso en la presencia de oxígeno, las células cancerosas pueden reprogramar su metabolismo de la glucosa, y por lo tanto su producción de energía, limitando su metabolismo energético en gran medida a la glucólisis, lo que lleva a un estado que se ha denominado “glucólisis aeróbica”. La existencia de este interruptor metabólico en las células del cáncer se ha fundamentado en las décadas siguientes.

De acuerdo a una hipótesis planteada y redefinida(Potter, 1958; Vander Heiden *et al.*, 2009), el aumento de la glicólisis permite el desvío de productos intermedios glicolíticos en diversas rutas biosintéticas, incluyendo aquellos que generan nucleósidos y aminoácidos; esto facilita, a su vez, la biosíntesis de las macromoléculas y orgánulos requeridos para el montaje de nuevas células. Además, el metabolismo propuesto por Warburg parece estar presente en muchos tejidos de embriones que se dividen rápidamente, una vez más lo que sugiere un papel en el apoyo a los programas de biosíntesis a gran escala que se requieren para la proliferación celular activa(Hanahan & Weinberg, 2011).

Curiosamente, se han encontrado algunos tumores que poseen dos subpoblaciones de células de cáncer que difieren en sus vías de generación de energía.

Una subpoblación consiste en células dependientes de glucosa (“efecto Warburg”) que secretan lactato, mientras que las células de la segunda subpoblación preferentemente importan y utilizan el lactato producido por sus vecinas como su principal fuente de energía, empleando parte del ciclo del ácido cítrico para hacerlo. Aunque este modo provocativo de simbiosis intratumoral aún no se ha generalizado, la cooperación entre las células de secreción de lactato y las células que utilizan ese lactato para impulsar el crecimiento del tumor no es, de hecho, una invención de los tumores, sino que nuevamente refleja cooptación de un mecanismo fisiológico normal, en este caso uno operativo en el músculo.(Feron, 2009; Kennedy & Dewhirst, 2010; Semenza, 2008).

Adicionalmente, se está haciendo evidente que la oxigenación, que va desde la normoxia a la hipoxia, no es necesariamente estática en los tumores pero fluctúa temporal y regionalmente (Hardee *et al.*, 2009), probablemente como resultado de la inestabilidad y organización caótica de la neovasculatura asociada al tumor.

Es así que el metabolismo energético alterado está demostrando ser tan generalizado en las células cancerosas como muchos de los otros rasgos asociados con el cáncer que han sido aceptados como características de identidad del cáncer.

Rasgo emergente: Evasión de destrucción inmune.

Otro rasgo aún no resuelto que comprende la formación del tumor involucra el papel que el sistema inmunológico juega en la resistencia o erradicación de la formación y progresión de neoplasias incipientes, tumores en etapa tardía y micrometástasis. Esta teoría de la vigilancia inmune propone que las células y los tejidos son monitoreados constantemente por un sistema inmune siempre alerta, y que dicha vigilancia inmune es responsable de reconocer y eliminar la gran mayoría de las células cancerosas y por lo tanto tumores nacientes incipientes. De acuerdo a esto, los tumores sólidos que aparecen tienen algún control para evadir la detección del sistema inmune o tienen la capacidad de limitar el alcance de la matanza inmunológica, evadiendo la erradicación(Hanahan & Weinberg, 2011).

El papel de la monitorización inmunológica defectuosa de tumores parece estar validado por los aumentos sorprendentes de ciertos tipos de cáncer en individuos inmunocomprometidos(Vajdic & van Leeuwen, 2009), sin embargo, la mayoría de estos son inducidos por virus lo que sugiere que la mayor parte del control de esta clase de cánceres normalmente depende de la reducción de la carga viral en individuos infectados, en parte a través de la eliminación de células infectadas por virus. Estas observaciones, por lo tanto, parecen arrojar poca luz sobre el posible papel del sistema inmune en la limitación de la formación del 80% de los tumores de etiología no viral.

En los últimos años, sin embargo, un creciente cuerpo de evidencia, tanto de ratones modificados genéticamente y de epidemiología clínica, sugiere que el sistema inmune funciona como una barrera significativa a la formación y progresión del tumor, al menos en algunas formas de cáncer no inducidas por virus. Cuando los ratones genéticamente modificados para ser deficientes en diversos componentes del sistema inmune, en particular deficiencias en el desarrollo o la función de las células CD8⁺ linfocitos T citotóxicos (CTLs), las células T auxiliares CD4⁺ T_h1, o las células asesinas naturales (NK), fueron evaluados para el desarrollo de tumores inducidos por carcinógenos, se observaron incrementos demostrables en la incidencia de tumores; por otra parte, los ratones con inmunodeficiencias en células T y células NK, juntas, eran incluso más susceptibles al desarrollo del cáncer. Los resultados indicaron que, al menos en ciertos modelos experimentales, el sistema inmunológico es capaz de contribuir de manera significativa en la vigilancia inmune y por lo tanto la erradicación del tumor (R. Kim *et al.*, 2007; Teng *et al.*, 2008).

La epidemiología clínica también apoya cada vez más la existencia de respuestas inmunitarias antitumorales en algunas formas de cáncer humano (Bindea *et al.*, 2010; Ferrone & Dranoff, 2010).

Por ejemplo, pacientes con tumores en el colon y en los ovarios que están infiltrados con células CTLs y NK, en gran medida, tienen un mejor pronóstico que los que carecen de abundantes linfocitos asesinos (Pages *et al.*, 2010), en el caso de otros tipos de cáncer es sugerente pero menos convincente y es objeto de investigación en curso.

Con estas consideraciones y afirmaciones de la inmunidad antitumoral como una barrera significativa a la formación y progresión de tumores en los seres humanos, se presenta la evasión inmune como rasgo emergente con la capacidad de ser establecido como una de las características principales del cáncer.

1.1.2 El Microambiente tumoral

Durante la última década, los tumores han sido reconocidos como órganos cuya complejidad se acerca y puede incluso superar a la de los tejidos sanos normales. Visto desde esta perspectiva, la biología de un tumor sólo puede entenderse mediante el estudio de los tipos de células especializadas individuales dentro de él, así como el “microambiente tumoral” que construyen durante el curso de la tumorigénesis.

Enumeramos aquí un conjunto de tipos de células que se sabe que contribuyen de manera importante a la biología de muchos tumores. La mayoría de estas observaciones se derivan del estudio de carcinomas, en los que las células epiteliales neoplásicas constituyen un compartimento (parénquima) que es claramente distinto al de las células mesenquimales que forman el estroma asociado al tumor(Hanahan & Weinberg, 2011).

Un conjunto de distintos tipos de células constituyen la mayoría de los tumores sólidos. Tanto el parénquima y estroma de los tumores contienen distintos tipos de células y subtipos que permiten colectivamente el crecimiento del tumor y la progresión. Cabe destacar que las células inflamatorias del sistema inmune presentes en los tumores pueden ser tanto promotoras de tumores, así como subclases de asesinos tumorales. Los múltiples tipos de células del estroma crean una sucesión de microambientes tumorales que cambian a medida que los tumores invaden el tejido normal y, posteriormente, se diseminan y colonizan tejidos distantes. La abundancia, la organización histológica, y las características fenotípicas de los tipos de células del estroma, así como de la matriz extracelular, evolucionan durante la progresión, permitiendo así el crecimiento primario, invasivo, y luego metastásico(Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el que más afecta a las mujeres de todo el mundo, tanto en los países desarrollados como en aquellos países en vías de desarrollo. Se estima que, a nivel mundial, 508000 mujeres murieron en el 2011 debido al cáncer de seno(WHO, 2013).

Las tasas de incidencia entre países desarrollados y en vías de desarrollo varían mucho. Las tasas más bajas de incidencia se encuentran en los países de África, pero van en aumento(Cancer, 2008).

El cáncer de seno (o cáncer de mama) es un tumor maligno que se origina en las células del seno. Esta enfermedad ocurre casi exclusivamente en las mujeres, pero los hombres también la pueden padecer. El cáncer de mama se inicia en el tejido mamario el cual está compuesto por lobulillos (glándulas encargadas de la producción de leche), conductos (tubos diminutos que llevan la leche desde los lobulillos al pezón) y estroma (el tejido adiposo y el tejido conectivo que rodean los conductos y los lobulillos, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos). La mayoría de los cánceres de seno comienza en las células que recubren los conductos (cánceres ductales).

Algunos cánceres de seno se originan en las células que recubren los lobulillos (cánceres lobulillares), mientras que un pequeño número se origina en otros tejidos(DeSantis *et al.*, 2013). De acuerdo al origen se establecen los diferentes tipos de cáncer.

1.2.1 Tipos de cáncer de mama

La mayoría de los cánceres de seno son carcinomas, un tipo de cáncer que comienza en las células (células epiteliales) que revisten los órganos y los tejidos como el seno; a menudo un tipo de carcinoma llamado adenocarcinoma, que es el carcinoma que comienza en el tejido glandular. Otros tipos de cáncer también pueden ocurrir en el seno, como los sarcomas, que empiezan en las células del músculo, grasa o tejido conectivo. El cáncer de seno también se puede clasificar en función de las proteínas que se encuentran sobre la superficie de las células cancerosas o dentro de ellas, en grupos como “receptor hormonal positivo” o “triple negativo”(Society, 2015).

1.2.1.1 Clasificación del cáncer de mama según los receptores hormonales y condición de HER2

Receptor hormonal positivo

Se denomina cáncer con receptores de hormonas positivos si las células cancerosas del seno contienen receptores de estrógeno (ER: estrogen receptor) o de progesterona (PR: progesterone receptor). Los cánceres de seno con receptores hormonales positivos se pueden tratar con medicamentos de terapia hormonal que reducen los niveles de estrógeno o bloquean los receptores de estrógeno. Esto incluye a los cánceres que son negativos para estrógeno, pero positivos para progesterona(Society, 2015).

Receptor hormonal negativo

Cuando las células cancerosas del tejido mamario no contienen receptores de estrógeno ni de progesterona, el cáncer se identifica como negativo para receptores hormonales (o con receptores de hormonas negativos). El tratamiento con los medicamentos de terapia hormonal no es útil para estos cánceres. Estos cánceres tienden a crecer más rápidamente que los cánceres con receptores hormonales positivos. Los cánceres con receptores hormonales negativos son más comunes en mujeres que aún no han pasado por la menopausia(Society, 2015).

HER2 positivo

A las células cancerosas que sobreexpresan la proteína HER2 o copias adicionales del gen HER2 se les llama HER2 positivos. Estos cánceres se pueden tratar con medicamentos que se dirigen a HER2(Society, 2015).

HER2 negativo

Los cánceres que no tienen exceso de HER2 se les llama HER2 negativos(Society, 2015).

Triple negativo

En el caso de que las células tumorales no contengan receptores de estrógeno ni de progesterona y no sobreexpresan HER2, se les llama triple negativos. El cáncer de seno triple negativo tiende a crecer y a propagarse más rápidamente que la mayoría de los otros tipos de cáncer de seno(Society, 2015).

Triple positivo

Este término se usa para describir cánceres que son ER positivos, PR positivos, y tienen exceso de HER2(Society, 2015).

1.2.1.2 Clasificación del cáncer de mama basándose en la expresión genética

Una clasificación reciente, basada en características moleculares, divide los cánceres de seno en cuatro grupos. Este tipo de categorización está basado en análisis genómicos experimentales y se realizan en casos de cáncer de mama de receptores de hormonas positivos en etapa temprana, ofrecen información sobre el riesgo de recurrencia de la enfermedad. El análisis PAM50 examina los niveles de actividad de 58 genes en casos de cáncer de mama de receptores de hormonas positivos en etapa temprana(BreastCancer.org, 2013).

Tipos luminal A y luminal B

Los tipos luminales son positivos para receptores de estrógeno. Los patrones de expresión genética de estos cánceres son similares a las células normales que recubren los conductos y las glándulas del seno (el interior de un conducto o glándula es llamado su lumen). Los cánceres luminal A son de bajo grado, suelen crecer con bastante lentitud, y tienen el mejor pronóstico. Los cánceres luminal B generalmente crecen con un poco más de rapidez que los luminal A, y el pronóstico no es tan favorable(Society, 2015).

Tipo HER2

Las células cancerosas de este tipo tienen copias adicionales del gen HER2 y algunas veces otros genes. Por lo general, estos cánceres tienen una apariencia de alto grado cuando son observados con el microscopio. Estos cánceres tienden a crecer más rápidamente y tienen un peor pronóstico, aunque a menudo pueden ser tratados exitosamente con terapias dirigidas a HER2, las cuales se administran usualmente con quimioterapia(Society, 2015).

Tipo basal

La mayoría de estos cánceres son de los llamados tipo triple negativo. Los patrones de expresión genética de estos cánceres son similares a las células en las capas basales más profundas de los conductos y las glándulas del seno. Este tipo es más común entre las mujeres con mutaciones genéticas BRCA1(Society, 2015).

Éstos son cánceres de alto grado que suelen crecer rápidamente y con pronóstico desfavorable. Actualmente se están conduciendo muchas investigaciones para conocer las mejores maneras de tratar estos cánceres, permitiendo a los médicos administrar mejores tratamientos a la medida de cada paciente.

1.2.2 Tratamientos contra el Cáncer de Mama

Existen diferentes tipos de tratamiento para los pacientes de cáncer de seno: la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la terapia hormonal y la terapia dirigida. Los tratamientos se pueden agrupar en base a cómo funcionan y en qué etapa de la enfermedad se pueden usar. Para ello se tiene la terapia local que trata el tumor en un sitio específico, sin afectar el resto del cuerpo (se tienen como ejemplos a la cirugía y la radioterapia). La terapia sistémica consiste en la administración por vía oral o intravenosa de medicamentos para llegar a las células cancerosas en cualquier parte del cuerpo (se consideran como terapias sistémicas a: la quimioterapia, la terapia hormonal y la terapia dirigida)(AmericanCancerSociety, 2014e).

1.2.2.1 Cirugía

Las opciones quirúrgicas son la cirugía conservadora del seno y la mastectomía. El seno se puede reconstruir al mismo tiempo que la cirugía o en una fecha posterior. La cirugía también se hace para verificar si el cáncer se propagó a los ganglios linfáticos que están debajo del brazo. Las opciones para esto incluyen una biopsia del ganglio linfático centinela y una disección de los ganglios linfáticos axilares(AmericanCancerSociety, 2014a).

1.2.2.2 Radioterapia

La radioterapia es un tratamiento con rayos o partículas de alta energía que destruyen las células cancerosas. La radiación al seno a menudo se administra después de la cirugía con conservación del seno para ayudar a reducir la probabilidad de que el cáncer regrese en el seno o en los ganglios linfáticos adyacentes. También se recomienda después de la mastectomía en pacientes donde el cáncer mide más de 5 cm o cuando los ganglios linfáticos son positivos al cáncer. La radiación también se usa para tratar el cáncer que se ha propagado a otras áreas, por ejemplo los huesos o el cerebro(AmericanCancerSociety, 2014b).

1.2.2.3 Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento con medicamentos contra el cáncer que se pueden administrar por vía intravenosa o por vía oral. Los medicamentos pasan a través del torrente sanguíneo para llegar a las células cancerosas en la mayoría de las partes del cuerpo. La quimioterapia se administra en ciclos, de manera que cada período de tratamiento va seguido de un período de recuperación. Por lo general, el tratamiento dura varios meses.

Los medicamentos de quimioterapia más usados incluyen antraciclinas (por ejemplo, doxorubicina/adriamicina y epirubicina/Ellence) y los taxanos (tales como paclitaxel/Taxol y docetaxel/taxotere)(Girish *et al.*, 2014). En este tipo de terapia se utilizan combinaciones o cócteles de medicamentos para combatir el tumor, dependiendo del diagnóstico del paciente. Las combinaciones más comunes las observamos en la siguiente tabla:

Tabla 1.- Combinaciones comunes de fármacos para la quimioterapia de cáncer de mama temprano. Fuente: (Girish *et al.*, 2014).

Combinaciones de Fármacos para la Quimioterapia			
Nº	Nombre Genérico (Nombre comercial)		
1	Ciclofosfamida (Citoxan®)	Doxorrubicina (Adriamycin®)	Fluorouracilo (5-FU®)
2	Docetaxel (Taxotere®)	Doxorrubicina (Adriamycin®)	Ciclofosfamida (Citoxan®)
3	Doxorrubicina (Adriamycin®)	Ciclofosfamida (Citoxan®)	Paclitaxel (Taxol®)
4	Docetaxel (Taxotere®)	Carboplatino (Paraplatin®)	Trastuzumab (Herceptin®)
5	Ciclofosfamida (Citoxan®)	Metotrexato (Trexall®)	Fluorouracilo (5-FU®)
6	Doxorrubicina (Adriamycin®)	CMF (ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo)	
7	Epirubicina (Ellence®)	Ciclofosfamida (Citoxan®)	
8	Doxorrubicina (Adriamycin®)	Ciclofosfamida (Citoxan®)	

1.2.2.4 Terapia hormonal

La terapia hormonal es otra forma de terapia sistémica. Se usa con más frecuencia como terapia adyuvante para ayudar a reducir el riesgo de que el cáncer regrese después de la cirugía. También se usa para tratar el cáncer que se ha propagado o ha regresado después del tratamiento(AmericanCancerSociety, 2014d).

El estrógeno promueve el crecimiento de los tumores cancerosos que son positivos para receptores hormonales. Alrededor de dos de cada tres cánceres de mama son receptores hormonales positivos (contienen receptores para las hormonas estrógeno [ER+] y/o progesterona [PR+]).

La mayoría de los tipos de terapia hormonal para el cáncer de seno disminuye los niveles de estrógeno o evita que el estrógeno actúe en las células cancerosas del seno. Esta clase de tratamiento es útil para cánceres de seno con receptores hormonales positivos, pero no ayuda a pacientes cuyos tumores son negativos para receptores hormonales (ambos ER- y PR-) (AmericanCancerSociety, 2014d). En la siguiente tabla se presentan los medicamentos que bloquean el estrógeno:

Tabla 2.- Fármacos para la terapia hormonal de cáncer de mama. Fuente: (Girish et al., 2014).

Nombre Genérico	Descripción
Tamoxifeno (Novaldex®)	Actúa como un antiestrógeno en las células del seno, actúa como un estrógeno en otros tejidos, como el útero y los huesos, por esta razón se los denomina: Modulador Selectivo de los Receptores de Estrógeno (SERM).
Toremifeno (Fareston®)	SERM. Solamente aprobado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico. Es probable que este medicamento no funcione si se ha usado el tamoxifeno y ha dejado de surtir efecto.
Fulvestrant (Faslodex®)	No es SERM, actúa como anti-estrógeno en todo el cuerpo.

1.2.2.5 Terapia Dirigida

A medida que los investigadores han aprendido más sobre los cambios genéticos que causan cáncer en las células, recientemente se han podido desarrollar medicamentos diseñados para combatir estos cambios de manera específica. Estos medicamentos dirigidos funcionan de distinta manera que los que se usan comúnmente en la quimioterapia. Generalmente originan diferentes efectos secundarios y suelen ser menos severos (AmericanCancerSociety, 2014c).

Las terapias dirigidas están compuestas de fármacos de moléculas pequeñas y anticuerpos monoclonales. El éxito potencial revolucionario de la terapia dirigida contra el cáncer fue reconocido por primera vez en 1998, cuando un anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin 1) en contra del receptor de la tirosina quinasa HER2 (ErbB2) fue aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes de cáncer de mama metastásico con HER2+ (Huang et al., 2014).

En la actualidad, el descubrimiento de fármacos contra el cáncer está llevando a cabo casi todos los eventos esenciales para la supervivencia celular y progresión del cáncer. Este campo continúa siendo el más prometedor y activamente perseguido en el descubrimiento de fármacos contra el cáncer, incluyendo el reciente entusiasmo por el

direccionamiento a ALK y BRAF. Otros objetivos prometedores incluyen receptores, como MET, FGFR, PDGFR, y los no receptores, tales como PI3K, AKT y MEK.

Otra clase importante de blancos moleculares son los moduladores de la angiogénesis, tales como VEGFR y PDGFR, que funcionan para reducir el suministro de sangre al tumor (Huang *et al.*, 2014). Hoy en día se estudian diversos blancos moleculares para los diferentes tipos de cáncer; en la siguiente tabla se describen algunos para cáncer de mama:

Tabla 3.- Medicamentos molecularmente dirigidos contra el cáncer de mama en el uso clínico. ND = no disponible. Fuente: (Huang *et al.*, 2014).

Fármaco	Blanco Molecular	Autorización Inicial	Indicaciones	Bio-marcador
Lapatinib (Tykerb)	EGFR, ErbB2	2007	Cáncer de Mama Metastásico	Expresión HER2 (Geyer <i>et al.</i> , 2006)
Everolimus (Afinitor, Rad001)	mTOR	2009	Cáncer de Mama.	ND
Trastuzumab (Herceptin)	HER2/neu	1998	Cáncer de Mama metastásico y cáncer gástrico	Expresión HER2 (Hudis, 2007)

1.3 Nanotecnología

La nanotecnología es la ciencia de los materiales y sistemas de ingeniería a escala molecular. Su aplicación a la medicina, la nanomedicina, ha permitido el desarrollo de vehículos de liberación de fármacos de nanopartículas (Wang *et al.*, 2012).

Durante la última década, ha habido un creciente interés en el uso de la nanotecnología para la terapia del cáncer. El desarrollo de nanopartículas (NPs) inteligentes dirigidas, que pueden entregar medicamentos a un ritmo sostenido directamente a las células cancerosas, puede proporcionar una mejor eficacia y menor toxicidad para el tratamiento de tumores metastásicos primarios y avanzados (Gu *et al.*, 2007).

El reciente interés se ha centrado en el desarrollo de vehículos de entrega a nanoescala capaces de controlar la liberación de agentes quimioterapéuticos directamente en el interior de células de cáncer (Farokhzad *et al.*, 2004).

La liberación controlada se produce cuando un polímero natural o sintético se combina con un fármaco de una manera tal que el fármaco queda encapsulado dentro del “sistema polímero” para la posterior liberación de una manera predeterminada.

Los vehículos poliméricos pueden variar en tamaño desde 50 nm a más de 10 micras y pueden liberar fármacos encapsulados a través de la superficie o la erosión mayor, difusión, o hinchazón seguido por difusión, de una manera tiempo o condición dependiente. La liberación del agente activo puede ser constante durante un largo período, o puede ser desencadenada por el medio ambiente u otros eventos externos al sistema polímero(Langer & Tirrell, 2004).

En general, los sistemas de polímeros de liberación controlada pueden proporcionar niveles del fármaco en el rango óptimo durante un período de tiempo mejor que otros métodos de administración de fármacos, aumentando así la eficacia del fármaco y maximizando la conformidad del paciente. La consideración primordial de la administración de fármacos es lograr terapias más eficaces al tiempo que se elimina el potencial tanto de déficit o exceso de dosificación. Otras ventajas de la utilización de sistemas de suministro de liberación controlada puede incluir el mantenimiento de los niveles de fármaco dentro de un rango deseado, la necesidad de un menor número de administraciones, el uso óptimo de la droga en cuestión, y el aumento en la aceptación del tratamiento por parte del paciente(Gu *et al.*, 2007).

1.3.1 Direccionamiento Pasivo vs Direccionamiento Activo

Estrategias en la entrega de las NPs de fármacos encapsulados a los tejidos cancerosos se han centrado en la orientación pasiva y activa. El primer enfoque utiliza las propiedades únicas del microambiente del tumor, más en particular: (i) la vasculatura tumoral con fugas, que es altamente permeable a macromoléculas en relación con el tejido normal; y (ii) un sistema de drenaje linfático disfuncional, lo que resulta en la retención de líquidos incrementada en el espacio intersticial del tumor.

Como resultado de estas características, la concentración de NPs poliméricas y conjuntos macromoleculares que se encuentran en los tejidos tumorales pueden ser hasta 100 veces más altos que en el tejido normal(Gu *et al.*, 2007).

La deposición específica al tumor, también conocido como efecto de permeación y retención aumentada (EPR), se produce cuando las NPs extravasan la microvasculatura tumoral, lo que lleva a la acumulación del fármaco en el intersticio del tumor. El grado de extravasación de las NPs depende del tamaño de abertura de las uniones interendoteliales y los canales trans-endoteliales. El tamaño de poro de corte de estas vías de transporte se

ha reportado entre 400-600 nm y la extravasación de los liposomas en los tumores in vivo sugiere un tamaño de corte en el rango de 400 nm(Lollo *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 1995).

En general, las partículas con diámetros menores de 200 nm son los más eficaces para la extravasación de la microvasculatura tumoral(Kong *et al.*, 2000). La mayor limitación del direccionamiento pasivo al tumor es la incapacidad de lograr un nivel suficientemente alto de la concentración de fármaco en el sitio del tumor que resulta en una eficacia terapéutica baja y provoca efectos sistémicos adversos indeseables (Brigger *et al.*, 2002; Ferrari, 2005).

En comparación al direccionamiento pasivo, el direccionamiento activo se logra mediante la liberación de las NPs, con el fármaco encapsulado, dispuestas a identificar de manera única los sitios del cáncer mientras se tiene una mínima pérdida en sitios no deseados. El direccionamiento activo se consigue normalmente por administración local y sistémica de las NPs con moléculas dirigidas conjugadas en la superficie de la partícula que pueden reconocer y unirse a ligandos específicos que son exclusivos de las células cancerosas. En el caso de la administración local de fármacos, el fármaco citotóxico encapsulado en las NPs puede ser entregado directamente a las células cancerosas mientras se minimiza la toxicidad perjudicial para las células no cancerosas adyacentes al tejido blanco(Gu *et al.*, 2007). Este enfoque es útil para tumores primarios que aún no han metastatizado.

Para los cánceres metastásicos, en donde difícilmente se puede visualizar y acceder a la ubicación, la abundancia y el tamaño de la metástasis del tumor dentro del cuerpo; la administración local no es favorable. En este caso, el vehículo de administración de fármaco (con direccionamiento activo) se administra sistémicamente.

1.3.2 Nanotransportadores de Nanopartículas para terapia dirigida

El direccionamiento activo se puede lograr mediante la conjugación de NPs con ligandos tales como anticuerpos, péptidos, aptámeros de ácidos nucleicos, carbohidratos y moléculas pequeñas. Algunos de estos conjugados terapéuticos están, hoy en día, en fase de desarrollo clínico o en la práctica clínica actual.

Sin embargo, el éxito ha sido limitado en gran medida a conjugados de ligando-drogas y los intentos para mejorar estos sistemas se han hecho mediante la encapsulación de los agentes terapéuticos en NPs. Varias clases de materiales se han desarrollado para NPs específicas, incluyendo polímeros biodegradables, dendrímeros, nanocápsulas, NPs en base a ácidos nucleicos, y liposomas(Gu *et al.*, 2007). Las NPs poliméricas biodegradables han sido ampliamente investigadas para la terapia del cáncer(Moghimi *et al.*, 2001).

Las NPs poliméricas típicamente tienen una vida media sistémica prolongada en circulación por injerto, conjugación, o adsorción de polímeros estéricamente anfifílicos tales como polietilenglicol (PEG) en la superficie de la partícula(Owens & Peppas, 2006).

Estas NPs pueden utilizarse para liberar los fármacos encapsulados a una velocidad controlada a través de la erosión superficial o el abultamiento (bulk), difusión, o hinchazón seguido por difusión, de una manera tiempo o condición dependiente. La tasa de liberación del fármaco puede ser controlada por la modificación de la cadena lateral del polímero, el desarrollo de nuevos polímeros, o la síntesis de copolímeros. Estos sistemas de polímeros biodegradables pueden proporcionar los niveles de fármaco en un rango óptimo durante un período de tiempo mayor que otros métodos de administración de fármacos, aumentando así la eficacia del fármaco, al tiempo que mejora la capacidad de utilizar drogas altamente tóxicas, escasamente solubles o relativamente inestables(Gu *et al.*, 2007).

La combinación de la liberación dirigida y la liberación controlada podría disminuir la probabilidad de toxicidad sistémica significativa ya que el fármaco está encapsulado y biológicamente inasequible durante el tránsito en la circulación sistémica. El poli (D, L-lactida) y poli (glicólico) y su copolímero de poli (D, L-lactida-co-glicólico) (PLGA), polímeros biocompatibles, son los que más se utilizan para la liberación controlada de fármacos y se han revisado extensamente en el pasado(Astete & Sabliov, 2006).

1.3.3 Moléculas de direccionamiento para el desarrollo de nanopartículas dirigidas

1.3.3.1 Anticuerpos Monoclonales

El direccionamiento activo en sistemas de suministro de drogas nano-habilitados se lleva a cabo mediante el etiquetado de las NPs con biomoléculas que se adhieren específicamente a las células o tejidos diana(Aguilar, 2012). Durante la última década, una amplia variedad de moléculas dirigidas a base de anticuerpos han sido evaluados para su potencial aplicación en la terapia del cáncer(G. P. Adams & Weiner, 2005).

Los anticuerpos monoclonales fueron los primeros y siguen siendo la clase preferida de moléculas de direccionamiento. Algunos de estos fármacos basados en anticuerpos ya han sido objeto de desarrollo clínico y se han traducido con éxito en el entorno clínico(Gu *et al.*, 2007). En la siguiente tabla se presentan algunos ejemplos de anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA (U.S. Food and Drug Administration):

Tabla 4.- Anticuerpos Monoclonales para el tratamiento del cáncer. FDA = U.S. Food and Drug Administration; CD= grupo de diferenciación; VEGF= factor de crecimiento endotelial vascular; EGFR= receptor del factor de crecimiento epidérmico. Fuente: (Gerber, 2008).

Fármaco	Blanco	Tipo de Anticuerpo	Indicaciones aprobadas por la FDA
Alemtuzumab (Campath)	CD52	Humanizado, no conjugado	Leucemia linfocítica crónica
Bevacizumab (Avastin)	VEGF	Humanizado, no conjugado	Cáncer colon-rectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas (no escamoso)
Cetuximab (Erbix)	EGFR	Quimérico, no conjugado	Cáncer colon-rectal, cáncer de cabeza y cuello.
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)	CD33	Humanizado, conjugado de toxina (caliqueamicina)	Leucemia mieloide aguda
⁹⁰Y-Ibritumomab tiuxetan (Zevalin)	CD20	murino, radioisótopo (itrio-90) conjugado	Linfoma no Hodgkin
Panitumumab (Vectibix)	EGFR	humano, no conjugado	Cáncer colon-rectal
Rituximab (Rituxan)	CD20	Quimérico, no conjugado	Linfoma no Hodgkin, artritis reumatoide
¹³¹I-Tositumomab (Bexxar)	CD20	murino, radioisótopo (yodo-131) conjugado	Linfoma no Hodgkin
Trastuzumab (Herceptin)	HER2/neu	Humanizado, no conjugado	Cáncer de mama con sobreexpresión de HER2/neu

A pesar de los enormes esfuerzos dedicados a su desarrollo, los anticuerpos monoclonales conjugados con NPs todavía enfrentan muchos desafíos y limitaciones. Dado que las moléculas de anticuerpos monoclonales son muy grandes y complejas, requieren ingeniería significativa en el nivel molecular para ser eficaz (Brennan *et al.*, 2004). Además, los anticuerpos pueden ser caros de fabricar en relación con fármacos de pequeñas moléculas.

1.3.3.2 Péptidos

En comparación con los anticuerpos, los péptidos como segmentos de direccionamiento ofrecen varias ventajas, tales como la ausencia de inmunogenicidad y menor costo de producción. Sin embargo, tienen muy baja afinidad al blanco, mayor posibilidad de unión no específica, y mayor probabilidad de escisión proteolítica. Algunos de estos problemas pueden ser mejorados mediante el desplegamiento de los péptidos multivalentes para aumentar la afinidad de unión eficaz y mediante el uso de D-aminoácidos que evaden la

proteólisis(Aguilar, 2012). Los ligandos basados en péptidos son identificados a partir de las regiones de unión de las proteínas para el blanco de interés.

También pueden ser producidos utilizando desplegamiento de fagos, que es una técnica utilizada para la detección rápida y eficaz de los péptidos que poseen la unión a blancos de interés específico(McCarthy *et al.*, 2007). Este método utiliza bacteriófagos, virus que sólo infectan bacterias, y se modifican genéticamente para expresar múltiples copias de un solo péptido en su superficie formando una biblioteca que contiene más de 10⁹ secuencias diferentes. El problema con este método es que las moléculas de direccionamiento no están en su estado nativo y pueden no representar verdaderamente el ambiente *In vivo*(Aguilar, 2012).

1.3.3.3 Aptámeros

Una nueva clase de moléculas que pueden competir con los anticuerpos, en su potencial para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, son los ligandos de ácidos nucleicos (aptámeros)(Jayasena, 1999). Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN u oligonucleótidos modificados de ADN o ARN que se pliegan por la interacción intramolecular en conformaciones únicas con características de unión ligando(Wilson & Szostak, 1999). Estos aptámeros son oligonucleótidos cortos (15-40 bases) que se identifican a través de procesos de selección llamados evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial que potencialmente pueden ser utilizados como entidades terapéuticas y de direccionamiento(Farokhzad *et al.*, 2006).

Al igual que los anticuerpos, los aptámeros son altamente específicos para sus objetivos y poseen afinidades de unión alta que son en gran parte debido a la capacidad de las moléculas de estructuras tridimensionales complejas(Levy-Nissenbaum *et al.*, 2008).

Los aptámeros ofrecen ventajas sobre los anticuerpos tales como: fácil síntesis a través de metodologías de fase sólido e inmunogenicidad mínima. Sin embargo, los aptámeros no modificados poseen varias propiedades perjudiciales tales como el rápido aclaramiento de la sangre que es debido en gran medida a la degradación por nucleasas, que han sido eludidas por la inclusión de subunidades tales como 20-flúor pirimidinas sustituidas y enlaces con PEG(Aguilar, 2012).

1.3.3.4 Pequeñas Moléculas

Una estrategia popular para la detección de enfermedades es el uso de materiales de moléculas pequeñas modificadas como una estrategia de direccionamiento alternativa(McCarthy *et al.*, 2010).

Esto se atribuye a la diversidad que las pequeñas moléculas ofrecen a través de sus estructuras y propiedades, permitiendo un acceso rápido a las bibliotecas de diversas moléculas con diferentes funcionalidades. Cuando las moléculas pequeñas no demuestran unión eficaz al blanco, su pequeño tamaño permite la incorporación de un número de ligandos que aumentan la afinidad eficaz al objetivo a través de la multivalencia. Se ha reportado una biblioteca de 146 diversas pequeñas moléculas funcionalizadas que consisten en: aminas, alcoholes, ácidos carboxílicos, sulfhidrilos, o anhídridos que fueron utilizados para marcar NPs de óxido de hierro magnético fluorescente(Weissleder *et al.*, 2005).

Un sin número de pequeñas moléculas se han utilizado para el suministro de agentes terapéuticos que incluyen el ácido fólico y los carbohidratos. El ácido fólico es una vitamina soluble en agua (vitamina B6) que se produce raramente en los alimentos, mientras que la forma tetrahidrofolato se encuentra en alimentos y en el cuerpo humano. Las dietas que son ricas en folatos se han asociado con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Los folatos son de crucial importancia para el metabolismo de DNA y RNA, así como para la división celular rápida y el crecimiento especialmente durante el desarrollo de los embriones(Aguilar, 2012).

El receptor de folato puede ser regulado a fin de proporcionar células con la cantidad necesaria de ácido fólico en pacientes con cáncer. Por esta razón, el ácido fólico se ha utilizado para liberar un sin número de agentes formadores de imágenes y agentes terapéuticos para tumores(Low & Kularatne, 2009).Los carbohidratos son otra clase de pequeñas moléculas que han sido utilizadas como ligandos dirigidos; como resultado de su biocompatibilidad y su capacidad para ser reconocidos selectivamente por los receptores de la superficie celular, tales como las lectinas.

Aunque las glicoproteínas se expresan endógenamente en varios tejidos; ciertas células, tales como las células endoteliales, han demostrado sobreregular los receptores de carbohidratos en respuesta a la inflamación, tales como las selectinas. El hígado, en particular, los hepatocitos expresan la glicoproteína receptor ASGP-R que se une fácilmente a galactosa y puede servir como un medio para mejorar la administración de fármacos específicos para el hígado(Zhang *et al.*, 2010).

1.3.4 Nano partículas de Plata para el tratamiento del cáncer

Entre diferentes nanopartículas explotadas, las nanopartículas de plata (AgNPs) son uno de los nanoproductos prometedores y ampliamente utilizado en el campo de la nanomedicina debido a sus propiedades únicas.

Las AgNPs poseen alta actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, protozoos y ciertos virus(Jeyaraj *et al.*, 2013).

Aparte de esto, en los últimos años se han reportado los efectos antitumorales de las AgNPs contra diferentes líneas celulares cancerosas, tales como líneas celulares de cáncer de: pulmón(Palaniappan, Sathishkumar, & Sankar, 2015), leucemia mieloide aguda(Guo *et al.*, 2013), cáncer de seno(Gurunathan *et al.*, 2013; Gurunathan *et al.*, 2013); cáncer cérvico uterino(Sukirtha *et al.*, 2012).

La inducción de estrés oxidativo es el mecanismo prominente más reportado de toxicidad de AgNPs, que es la consecuencia de la generación de especies reactivas de oxígeno intracelulares (ROS), el agotamiento de glutatión (GSH), una reducción de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), y un aumento en la peroxidación de lípidos en las células(Arora *et al.*, 2008), induciendo a la apoptosis(Carlson *et al.*, 2008). La toxicidad de las AgNPs se ha reportado en diversos estudios in vitro.

Es de suma importancia mencionar que dentro de las propiedades que influyen en la toxicidad mediada por las nanopartículas son: la naturaleza química, el tamaño, la toxicidad química de la superficie, su capacidad de unirse y afectar a los sitios biológicos, así como su metabolismo y excreción(AshaRani *et al.*, 2008). Las nanopartículas de plata necesitan ser vectorizadas hacia los tejidos cancerosos para poder ser usadas como agentes quimioterapéuticos.

En la Figura 1 podemos observar el mecanismo de direccionamiento y entrada de las nanopartículas, con las características que son importantes para su adecuada interacción con los sistemas biológicos.

Las nanopartículas deben ser andamio de moléculas de direccionamiento que tienen afinidad con los receptores de las células tumorales, de esta manera el fármaco es internalizado y liberado al interior de la célula, de acuerdo a las propiedades que presente la célula diana(Albanese *et al.*, 2012).

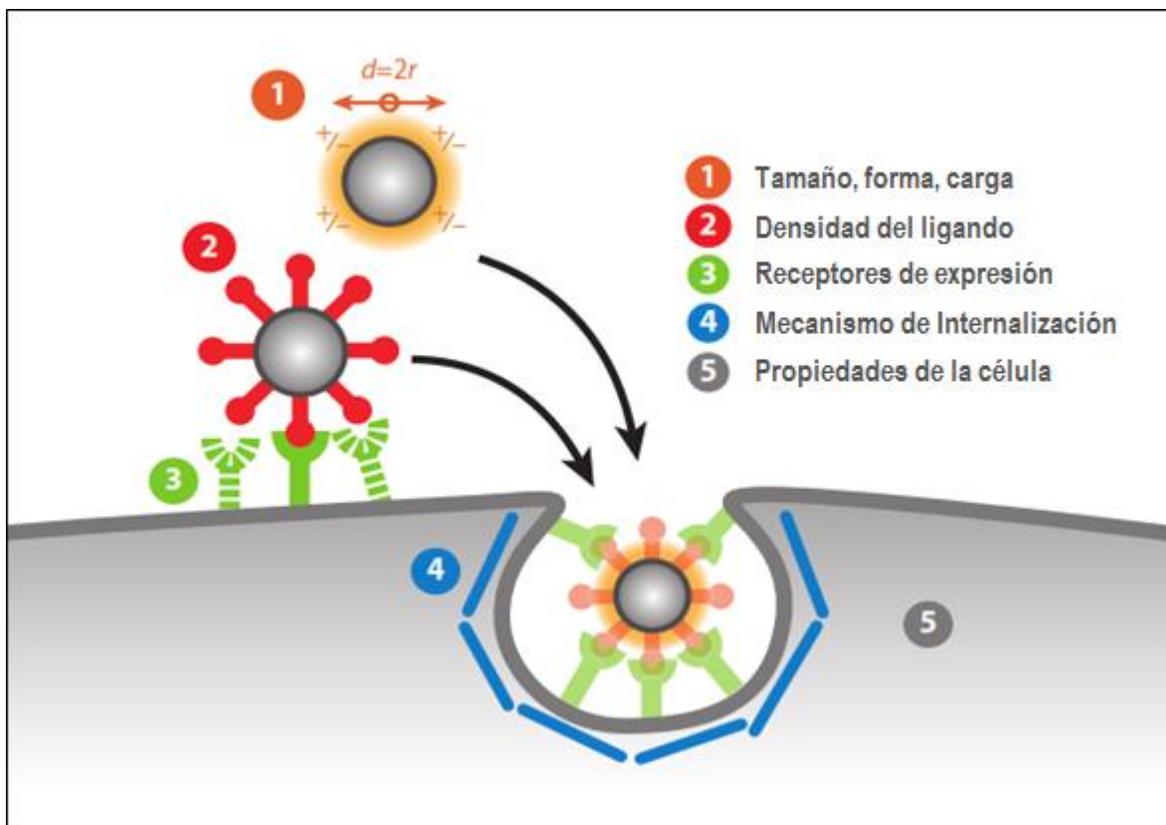


Figura 1.- Interacciones entre célula-nanopartícula. Fuente: (Albanese et al., 2012).

1.4 Síntesis de Nano partículas de Plata por el Método del Poliol

Las NPs metálicas se estudian intensamente, en la actualidad, debido a sus propiedades ópticas, eléctricas y catalíticas únicas. Para utilizar y optimizar las propiedades químico/físicas de las partículas metálicas nanométricas, las investigaciones se han centrado en el control del tamaño y forma, que es crucial para afinar la física, química, y propiedades ópticas (Y.-G. Kim *et al.*, 2004).

Muchas técnicas se han reportado, sin embargo en la mayoría de los casos los reactivos pasivantes de superficie, incluyendo moléculas surfactantes y polímeros, son necesarios para evitar que las NPs lleguen a agregarse (C. Luo *et al.*, 2005).

El polietilenglicol (PEG) se ha aplicado ampliamente como profármaco en las industrias farmacéutica y biomédica. El etilenglicol y sus dioles pueden utilizarse como agentes reductores para preparar partículas de metal a través del llamado proceso del poliol, a altas temperaturas (Pastoriza-Santos & Liz-Marzán, 2002).

Luo et al. (2005) reportaron el efecto dramático del PEG en la formación de NPs de plata y descubrieron la capacidad del PEG de actuar como agente reductor y al mismo tiempo como estabilizador.

1.5 Bioconjugación para el direccionamiento de fármacos

El diseño de nanopartículas dirigidas, ideales, requiere la optimización cuidadosa de muchas propiedades fundamentales como el tamaño y la forma, carga superficial, propiedades ópticas y magnéticas, y la funcionalización eficiente con ligandos buscadores de blancos apropiados para mejorar la amplificación de la señal y orientar la selectividad hacia las células malignas(Avvakumova *et al.*, 2014).

Los primeros enfoques de conjugación siguieron estrategias derivadas desde el tradicional marcaje químico de proteínas, explotando la formación de nuevos enlaces químicos entre los grupos funcionales reactivos en la molécula de interés y la nanopartícula. Además, las nanopartículas coloidales pueden ofrecer oportunidades únicas de unión gracias a sus superficies inorgánicas, que permiten la formación de complejos de iones, la coordinación del metal, y las interacciones electrostáticas o de Van Der Waals. Significativamente, las características estructurales de un nanoconjugado afectan fuertemente su función biológica, y ahora está claro que la química tradicional de bioconjugado suele ser inadecuada para la optimización del nanoconjugado, que requiere un control mucho mayor con los métodos convencionales de conjugación. Por lo tanto, la manifestación controlada de biomoléculas en la superficie de las nanopartículas es esencial para la producción de nanoconjugados con propiedades bien definidas y reproducibles(Algar *et al.*, 2011).

1.5.1 Pre-requisitos para la conjugación de nanopartículas con proteínas, mientras se preserva su función biológica

Como mencionábamos anteriormente, para direccionar las nanopartículas es necesario modificarlas con proteínas que reconozcan, de manera específica y selectiva, los receptores de las células del tejido objetivo o blanco.

Existe una gran diversidad de proteínas que pueden cumplir este propósito. El modo de conjugación de la proteína es de suma importancia para la retención de la capacidad de los conjugados para unirse eficazmente a moléculas diana, preservando tanto la conformación funcional y la orientación apropiada. Esto se puede lograr con uno de los tres siguientes enfoques: adsorción, conjugación covalente no-específica, y conjugación controlada-orientada selectiva.

Sólo este último garantiza un resultado óptimo en términos de capacidad de unión de proteínas; con los otros dos enfoques, los resultados son en gran medida impredecible(Avvakumova *et al.*, 2014).

1.5.1.1 Unión por adsorción

La unión de proteínas a las NPs por adsorción y los efectos resultantes sobre la estructura de proteínas se han investigado minuciosamente(Aubin-Tam & Hamad-Schifferli, 2008; Shemetov *et al.*, 2012). En general, la estabilidad de las proteínas es frecuentemente comprometida por este tipo de interacciones, que pueden venir acompañadas de distorsiones estructurales significativas o desnaturalización(Torcello-Gómez *et al.*, 2011).

1.5.1.2 Conjugación covalente no-específica

Este método explota protocolos de química sintética, en los que los grupos funcionales de las proteínas se enlazan a las de las NPs. Una variedad de NPs han sido sometidos a este tipo de biofuncionalización, incluyendo sílice, oro, y poliestireno. Muy a menudo, los procedimientos se basan en la química de las carbodiimidas, que permite la condensación de grupos amino y carboxilo. La ventaja obvia de la conjugación covalente, en contraste con la adsorción, es que asegura una asociación permanente entre nanopartículas y proteínas. Otra ventaja es que se evita las interacciones directas y potencialmente desnaturalizantes con la superficie de las nanopartículas. (Mahon *et al.*, 2012).

1.5.1.3 Conjugación controlada-orientada selectiva

En principio, este enfoque sería omitir todos los inconvenientes asociados con los otros dos, y por lo tanto representa la estrategia más eficaz disponible actualmente(Avvakumova *et al.*, 2014). En el siguiente apartado se describen los métodos que aplican este enfoque.

1.5.2 Métodos de Bioconjugación

Uno de los mayores desafíos en la nanobiotecnología es controlar finamente la disposición espacial de péptidos y proteínas “buscadores de blancos” (“homing”) en la superficie de las NPs(Medintz, 2006) con el fin de reducir la complejidad estructural de las nanoconstrucciones destinadas a aplicaciones biomédicas. Para lograr este objetivo, el número de bioligandos contenidos en la arquitectura de las NPs necesita ser minimizado mientras se mantiene una funcionalidad óptima, lo que requiere un enfoque para ajustar el posicionamiento de las biomoléculas complejas en la interfaz de las NPs(Sapsford *et al.*, 2013).

Maximizar la eficiencia del direccionamiento de la nanopartícula funcionalizada requiere: (i) un enlace irreversible apretado para reducir la energía libre del sistema; (ii) un sitio específico de unión; y (iii) una orientación espacial controlada de la biomolécula para hacer virtualmente activo todos los ligandos(Avvakumova *et al.*, 2014).

1.5.2.1 Conjugación Clásica de proteínas

Estos enfoques se dividen en dos categorías principales: (i) los métodos no-covalentes toman ventaja de las interacciones específicas entre homólogos bien establecidos, incluyendo estreptavidina/biotina(Tannous *et al.*, 2006) y ácido polihistidina/Ni-nitrilotriacético (NTA) (Yang *et al.*, 2009); y (ii) los métodos de conjugación covalente que explotan reacciones químicas específicas.

Ejemplos de la segunda categoría son la química del tiol, la reacción "clic" y variantes bioortogonales relativas, la ligadura de Staudinger, y la ligadura mediada por enzimas(Avvakumova *et al.*, 2014).

1.5.2.2 Química del Tiol

La química del tiol normalmente utiliza residuos de cisteína ya sea naturalmente presentes en la secuencia del polipéptido o intencionalmente introducidos en las posiciones específicas por mutagénesis sitio-dirigida, e incluye la formación de puentes disulfuro(Fiandra *et al.*, 2013), la adición de Michael a grupos maleimida previamente inmovilizados(Hou *et al.*, 2012) y las interacciones débiles entre grupos tiol con la superficie del metal(Baniukevici *et al.*, 2013).

Sin embargo, la posibilidad de alteraciones estructurales y la interferencia de múltiples residuos de cisteína en diferentes posiciones pueden limitar significativamente la aplicación de estos métodos(Avvakumova *et al.*, 2014).

1.5.2.3 Cicloadición azida-alquino cobre catalizada (CuAAC)

CuAAC se conoce como una reacción "Click"(Kolb *et al.*, 2001), y se ha utilizado ampliamente para la funcionalización de nanopartículas por ser un método rápido, que produce altos rendimientos, no requiere control de la temperatura, y no produce ningún subproducto(Polito *et al.*, 2008). Aunque este método se ha popularizado, algunas deficiencias limitan su versatilidad(Avvakumova *et al.*, 2014).

1.5.2.4 Ligadura de Staudinger

La ligadura Staudinger(Saxon & Bertozzi, 2000), que implica la formación de un enlace amida entre un arilfosfina y un grupo azida, también ha sido reportado para la inmovilización de un péptido de ácido aspártico-glicil-arginil(RGD) en nanomateriales para mejorar la captación celular en células de cáncer(Parkhouse *et al.*, 2008).

Esta reacción es favorable en comparación con CuAAC porque no requiere el uso de catalizadores, pero es generalmente más lenta y en la mayoría de los casos no se ejecuta una conversión completa (Avvakumova *et al.*, 2014).

1.5.2.5 Ligación mediada por enzimas

La ligación mediada por enzimas explota la aptitud natural de los biocatalizadores para promover la unión covalente de moléculas específicas en condiciones leves y por lo general de una manera sitio-selectiva (H. T. Ta *et al.*, 2012).

Por ejemplo, la enzima “Sortase” de *Staphylococcus aureus* mostró proporcionar un acoplamiento sitio-específico de anticuerpos scFv a las nanopartículas con buenos rendimientos y reproducibilidad (H. Ta *et al.*, 2011).

1.5.2.6 Conjugación no-clásica de proteínas

Estos métodos aprovechan la ingeniería de proteínas recombinantes para integrar sitios de ligación selectivos en la secuencia del péptido, idealmente sin afectar el reconocimiento eficiencia de la proteína inmovilizada hacia el receptor molecular específico.

En principio, los enfoques no clásicos son más fiables en el desarrollo de nanoconjugados dirigidos en comparación con las estrategias clásicas, porque explotan eventos biológicos espontáneos, por ejemplo, una reacción enzimática, para controlar el sitio de unión del polipéptido implicado en el proceso de inmovilización. Como resultado, la localización de las fuerzas funcionalidades reactivas obliga a la molécula a asumir una orientación definida en la nanopartícula (Mazzucchelli *et al.*, 2013). Un resumen de las ventajas y desventajas de los métodos vistos se presenta en la Tabla 5.

Es así que, por lo revisado en la literatura, se puede visualizar que todavía no se tiene definido una estrategia segura para el tratamiento de cáncer sin provocar efectos secundarios, se tienen varios estudios que se encaminan a disminuir o reducir los tumores malignos buscando controlar el efecto secundario en las células normales. Por esta razón en esta investigación se ha estudiado la formación de nanotransportadores poliméricos de nanopartículas de plata y su bioconjugación con proteínas o glicoproteínas (Lectina) para vectorizarlos de forma específica a tejidos tumorales de cáncer de mama.

Tabla 5.- Métodos avanzados para la conjugación de proteínas con nanopartículas: ventajas y desventajas. Fuente:(Avvakumova et al., 2014)

	Estrategia de Bioconjugación	Ventajas	Desventajas
Enfoque Clásico	Streptavidina / biotina	Interacciones altamente estables: una de las más altas afinidades en biología	Poco control en el sitio de unión; heterogeneidad en el etiquetado
	Puentes Disulfuro	Reacción espontánea que ocurre sin activación catalítica; estable y ampliamente aplicable	Alteraciones estructurales e interferencia debido a los múltiples residuos de cisteína en diferentes posiciones
	Adición de Michael	La cisteína puede ser fácilmente introducida en las secuencias de péptidos a través de mutagénesis dirigida al sitio para la inmovilización selectiva; la reacción espontánea	La estructura de la proteína puede ser alterada durante la mutagénesis; la inmovilización no puede ser específica si la secuencia polipeptídica contiene múltiples residuos de cisteína
	Soft-soft Thiol	Inmovilización rápida y ajustada con un aumento mínimo de tamaño	Alteraciones estructurales e interferencia debido a los múltiples residuos de cisteína en diferentes posiciones; efecto de rigidez superficial sobre la funcionalidad de las proteínas
	Ligamiento químico nativo	Se puede desarrollar en medio acuoso sin la protección de cualquier otro aminoácido, incluyendo residuos de cisteína	La sustitución de un átomo de nitrógeno por un átomo de azufre puede dar lugar a problemas en el plegamiento de proteínas
	Ligadura de Staudinger	No necesita el uso de catalizadores	Lento y no se ejecuta la conversión completa
	Ligación mediada por enzimas	Específico y leve; no se requieren medidas adicionales para añadir ligandos a proteínas objetivo	Si la enzima tiene amplio sustrato específico, puede catalizar la agregación de proteínas objetivo o dar lugar a la inmovilización en más de un sitio
	Cicloadición azida-alquino cobre catalizada ("Click reaction")	De fácil acceso; alto rendimiento sin necesidad de control de la temperatura; libre de subproductos	Inestabilidad y toxicidad del catalizador de cobre
	Reacción Bio-ortogonal	Derivados alquino promueven la cicloadición sin catalizador	Difícil tener control en el sitio de la ligadura en la secuencia peptídica
Enfoques No-clásicos	Secuencias selectivamente reactivas (SRS)	No se altera la actividad de la proteína; baja inmunogenicidad; reacción rápida, específica e irreversible; sin crosslinking	No hay evidencia de la seguridad <i>In vivo</i> ; su cinética puede ser lenta; posiblemente bajos rendimientos de bioconjugación
	Reacción Bio-click	Enfoque robusto y leve; el grupo reactivo de la proteína se puede introducir por clonación de la cadena con una polimerasa	Difícil de controlar la cantidad de proteínas acopladas
	La ligación mediada por proteínas pequeñas bio-linkers	Direccional, eficiente e inmovilización de anticuerpos monoclonales enteros con actividad biológica conservada	Tamaño grande; potencialmente inmunogénica

2. Justificación

El cáncer es una enfermedad que puede afectar a personas de cualquier edad. El cáncer de mamá es la primera causa de muerte en las mujeres de todo el mundo y las cifras van en aumento. Los tratamientos aplicados para combatirlo, no discriminan al tejido canceroso del tejido sano, generando efectos colaterales en el paciente y reduciendo considerablemente su calidad de vida. Por esta razón, la medicina ha ido evolucionando en el desarrollo de terapias con el uso de fármacos o sustancias que puedan enfrentar este tipo de cáncer sin afectar el estado físico y psicológico del paciente. Una forma de atacar los tejidos cancerosos sin comprometer tejidos sanos es la terapia dirigida, un tratamiento con mayor eficacia, ya que el fármaco actúa directamente en las células tumorales. Esta terapia presenta menos efectos adversos y ofrece una mejor calidad de vida al paciente durante el tratamiento. Con ayuda de la nanotecnología se han realizado estudios que reportan la efectividad citotóxica de nanopartículas de plata en líneas celulares de cáncer, pero también en células normales. Para poder dirigir estas nanopartículas de plata es necesario vectorizarlas con una molécula que sea afín a las células neoplásicas de tejidos mamarios. La aglutinina de soya es una proteína del frijol de soya que realiza unión de tipo ligando/receptor con azúcares que forman parte de los receptores de la superficie de las células de algunos tipos de cáncer, incluyendo al de mama. La bioconjugación de nanopartículas de plata con aglutinina de soya es una solución prometedora para la síntesis de fármacos vectorizados para el tratamiento de cáncer de mama. Por lo que en esta investigación se ha estudiado la estabilidad de los nanotransportadores de nanopartículas de plata sintetizados por el método del poliol, reduciendo su tamaño y estabilizándolos durante su almacenamiento, los nanotransportadores se bioconjugaron con SBA (aglutinina de soya), proceso de extracción y purificación establecido en el laboratorio. Para observar su efecto citotóxico se evaluó *in vitro* con líneas celulares tumorales de mama MDA-MB-231 los resultados a futuro se aplicarán en evaluaciones *In vivo*.

3. Objetivo General

- Sintetizar nanotransportadores de AgNPs bioconjugados con SBA, aislada del frijol de soya, y evaluar su citotoxicidad en cultivos de cáncer de mama.

3.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar AgNPs por el método del poliol.
- Caracterizar la reacción que ocurre en la Síntesis de AgNPs.
- Optimizar la técnica de síntesis de los Nanotransportadores de AgNPs, de forma que tengan una distribución monodal y diámetro medio menor a 200 nm.
- Extraer y purificar las lectinas (SBA), a partir del frijol de soya, mediante cromatografía de afinidad.
- Bioconjugar los Nanotransportadores de AgNPs con SBA comercial y la SBA purificada.
- Evaluar la toxicidad del nanotransportador de AgNPs bioconjugado con SBA comercial y la SBA purificada en ensayos *In vitro*.

4. Metodología y Materiales

4.1 Síntesis y caracterización de Nanopartículas de Plata

4.1.1 Síntesis de Nanopartículas de Plata

Se realizó la síntesis de nanopartículas de plata por el método del poliol. Se tomó una masa (99.5% m/m del total de la mezcla) de PEG de 8000 Da (Sigma-Aldrich, USA) en un vaso de precipitado, se llevó a tratamiento térmico y una vez que alcanzó la temperatura de 70°C se inició la reacción adicionando lentamente AgNO₃ (Sigma-Aldrich, USA), 0.5% m/m, y se mantuvo la reacción en agitación magnética durante diferentes tiempos (0, 30, 60, 90, 120 minutos).

4.1.2 Caracterización de Nanopartículas de Plata por Espectroscopía UV-Vis

Las nanopartículas de plata fueron disueltas en cloroformo y diclorometano para obtener los espectros de absorción óptica, en un intervalo de longitud de onda de 300 a 800nm, empleando un Espectrofotómetro UV-Vis Cary 100 de Agilent Technologies.

4.1.3 Caracterización del producto de la reacción del PEG con Nanopartículas de Plata por Espectroscopía RAMAN

Se realizó un análisis de dispersión Raman (MicroRaman, Horiba Jobin Yvon, Olympus BX 40, Japan) para la caracterización del producto obtenido a partir del PEG, tras su actividad reductora en la síntesis de las AgNPs; para ello se empleó un láser rojo a 632 nm, 20 mV.

4.2 Síntesis y Caracterización de Nanotransportadores de Nanopartículas de Plata

Los nanotransportadores se sintetizaron por autoensamble a partir de las muestras de nanopartículas de plata obtenidas por el método del poliol (0,5% AgNO₃), a diferentes concentraciones establecidas por el experimento, en agua desionizada. A continuación, se homogenizaron con vórtex por 90 segundos y se sometieron a baño ultrasónico (TI-H-5, Elma Schmidbauer GmbH) 25kHz, potencia 100%, durante 10 min. Las partículas se mantuvieron en maduración a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en la tabla 6 para cada experimento. Después se filtraron con membranas en disco (Millipore) con un diámetro de poro de 0.22 µm. Para la caracterización de los nanotransportadores, se ajustó el pH de las soluciones en un rango de 2 a 11 con el fin de evaluar su estabilidad.



Figura 2.- Procedimientos para la síntesis de nanotransportadores de AgNPs

Tabla 6.- Experimento para la síntesis de Nanotransportadores de AgNPs, con diferentes tiempos de maduración (24, 48, 72 h), con ajuste (9±0.1) de pH y sin ajuste de pH (SA).

Run	t (h)	pH
1	0	SA
2		8,928
3		SA
4		8,956
5		SA
6		8,961
7		SA
8		9,027
9		SA
10	24	8,935
11		SA
12		8,923
13		SA
14		9,099
15		SA
16	48	8,912
17		SA
18		8,967
19		SA
20		8,907
21		SA
22	72	8,969
23		SA
24		8,938

4.2.1 Caracterización de Nanotransportadores de AgNPs por DLS

Para determinar el diámetro hidrodinámico de los nanotransportadores se utilizó la dispersión de luz dinámica a 25 °C. El pH fue modificado mediante la adición de las soluciones de hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCL) (1mol/L). El potencial Z de cada muestra fue medido utilizando una cubeta específica que incluye dos electrodos para determinar la movilidad electroforética Zetasizer Nanoseries ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

4.3 Purificación y caracterización de la proteína de soya

Se estableció un método para realizar la purificación de SBA a partir de semillas de soya (*Glycine max*). La tabla que se presenta a continuación resume el proceso (Tabla 7):

Tabla 7.- Procedimientos generales para la purificación de Aglutinina de Soya (SBA).

PROCEDIMIENTO	CONDICIONES
Obtención de Materia Prima	Semillas de soya (<i>Glycine max</i>)
Molienda	Molino de disco (cierre 20), molino de martillo con malla.
Tamizado	Columna de tamices de pruebas físicas: 420, 250, 177, 149, 125 micrones de abertura.
Extracción de aceite	Harina retenida en malla de 177 micrones. Equipo Soxhlet; solvente: hexano.
Extracción de Proteínas	Harina desgrasada (g) y NaCl 0,15 M (ml) [1:5], agitación por 3 h a temperatura ambiente, 1 h a +4°C. Centrifugación: 13921 x g, +8°C, 10 minutos.
Salting Out	Sobrenadante más Sulfato de Amonio [(NH ₄) ₂ SO ₄], 40% de saturación, precipitación por 1 hora a +4°C. Centrifugación: 13921 x g, +8°C, 10 minutos. Sobrenadante más (NH ₄) ₂ SO ₄ , 80% de saturación, agitación por 2 h a +4°C. Centrifugación: 13921 x g, +8°C, 10 minutos. Pellet más solución de NaCl 0,15 M [1:2]. Dializar toda la noche en contra de solución de NaCl 0,15 M.
Cromatografía de afinidad	Se tomó 4 ml de dializado y se inyectó en una columna con Sefarosa 4B-CL acoplada con <i>N</i> -acetil-galactosamina (D= 9 mm; H= 51,8 mm). Fase móvil: solución de NaCl 0,15 M. Flujo: 2.5 ml/min. La elución se realizó mediante el intercambio de la solución salina con una solución de galactosa (25 mg/ml).

4.3.1 Obtención del material vegetal.

Las semillas de soya (*Glycine max*) fueron adquirida, para el aislamiento y purificación de lectinas, de una tienda local de alimentos situada en el mercado Argentina, Delegación Miguel Hidalgo.

4.3.2 Molienda.

Se tomaron las semillas de soya, fueron pesadas y luego se llevó a molienda en un molino de discos (The Bauer Bros. Co, Springfield Ohio – Brantford, Ontario) la distancia entre los discos fue de 20 μ m, seguidamente se pasó por molino de martillo (Raymond, Laboratory Mill) para separar los granos triturados de mayor tamaño y volver a pasarlos por el molino de discos con las mismas condiciones iniciales. El producto de molienda se dejó enfriar y secar.

4.3.3 Tamizado.

La harina obtenida, de las semillas de soya molidas, es acarreada en una columna de tamices de pruebas físicas (Montiel Inoxidables México, MONTINOX). Se utilizaron 5 tamaños de abertura descritos en la siguiente tabla:

Tabla 8.- Tamaño de abertura de los tamices utilizados.

Abertura (μ m)	Pulgadas de Abertura	Número U.S.
420	0,1650	40
250	0,0098	60
177	0,0070	80
149	0,0059	100
125	0,0019	120

Se seleccionó la harina retenida por la malla N°. 80, de 177 μ m de abertura.

4.3.4 Desgrasado.

Una vez realizada la clasificación granulométrica se seleccionó la harina que quedó retenida en la malla número 80. Se pesaron 12 ± 1 g de muestra en un cartucho de papel filtro para ser desgrasada en un equipo de Soxhlet durante seis horas, utilizando hexano como solvente.



Figura 3.- Equipo de Soxhlet utilizado para la extracción del aceite de la harina de soya.

4.3.5 Extracción de Proteínas (Globulinas).

Para la extracción de proteínas, se siguió el protocolo establecido por Larsson et al. (1996) con algunas variantes. Una mezcla de una parte de harina de soya desgrasada (g) y cinco partes de NaCl 0,15 M (ml) se colocaron en agitación por 3 h a temperatura ambiente y 1 h a 4°C. Se centrifugó (13921 x g, 8°C, 10 minutos), resultando en un sobrenadante claro.

4.3.6 Precipitación de Proteínas por “Salting Out”.

Del anterior procedimiento, se separa el sobrenadante, a este se agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40% de saturación y se deja llevar a cabo la precipitación por 1 hora a 4°C. El precipitado se centrifugó (Marca Sigma 2-16; rotor 12141) (13921 x g, 8°C, 10 minutos). La SBA después de este tratamiento se encuentra principalmente en el sobrenadante (Fountain & Yang, 1977). Sulfato de amonio se adicionó al sobrenadante por encima del 80% de saturación, la mezcla se agitó por 2 h a 4°C, seguido de centrifugación (13921 x g, 8°C, 10 minutos). El sobrenadante se descartó y el pellet se disolvió en dos veces su volumen en solución de NaCl 0,15 M. El pellet solubilizado se dializó toda la noche en contra de solución de NaCl 0,15 M (ml), en una membrana de 12-14 kD de MWCO (Spectra/Por 4 Dialysis Tubing, SpectrumLabs). La fracción final dializada obtenida se utilizó para la cromatografía de afinidad, algunos detalles de la separación de proteínas están indicada en la figura 4.

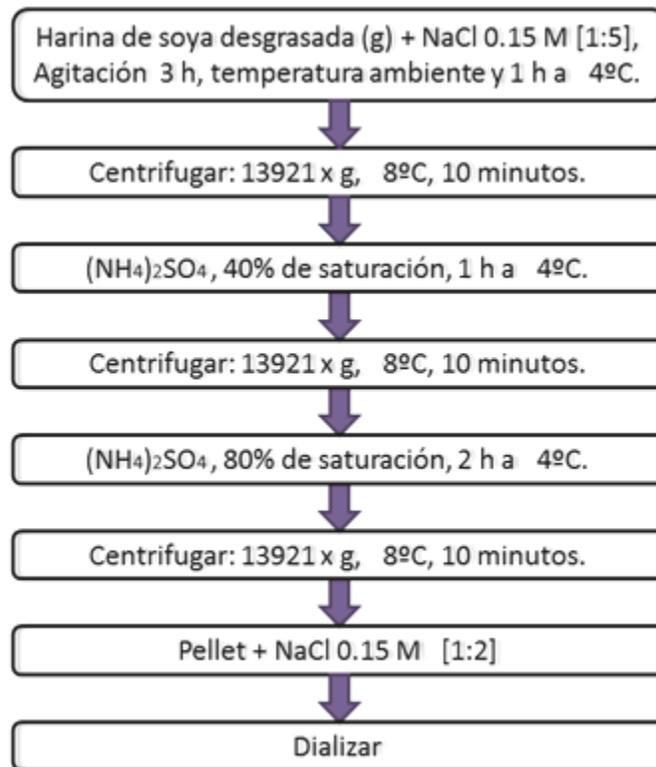


Figura 4.- Diagrama de flujo del proceso de precipitación de Proteínas

4.3.7 Cuantificación de Proteínas Totales

Se realizó la determinación cuantitativa de la concentración de proteínas totales siguiendo el Método descrito por Lowry (Lowry *et al.*, 1951); utilizando una solución de Albúmina bovina (1mg/ml) para construir la curva tipo y determinar la concentración de las proteínas. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific™ Multiskan FC microplate photometer) a una longitud de onda de 750 nm, como indica el método.

4.3.8 Cromatografía de afinidad

4.3.8.1 Preparación de la matriz de afinidad

El método elegido para la preparación de adsorbentes para cromatografía de afinidad, consiste en la adición de bisoxiranos (1,4-butanodiol diglicidil eter) para la introducción de grupos reactivos de oxiranos en la agarosa y para simultáneamente estabilizar el gel por cross-linking. La activación de la matriz polimérica (**P-OH**) se lleva a cabo de la siguiente manera:

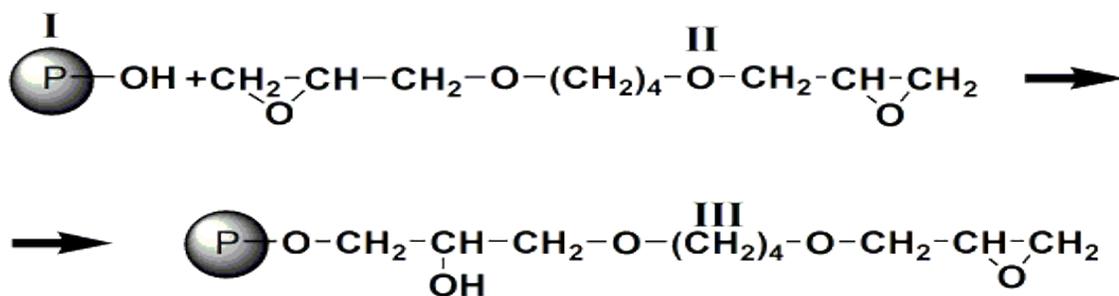


Figura 5.- Reacción de activación de matriz de agarosa con 1,4-butanodiol-diglicidil-éter.

Y el grupo amino conteniendo componentes $R-NH_2$ son acoplados a III de acuerdo a la siguiente reacción:

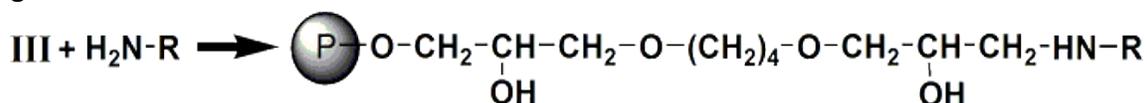


Figura 6.- Reacción de acoplamiento del ligando a la matriz de agarosa.

Se trabajó con 5 g de Sepharose CL-4B prehidratada (Sigma-Aldrich, USA), la cual fue secada por centrifugación a 4779 x g por 5 minutos, retirando el sobrenadante con mucho cuidado utilizando una micropipeta (BioPette, Labnet).

A continuación, se activa la matriz por incubación (Incu-Shaker® 10LR, Benchmark), 180 rpm a 25°C, durante toda la noche con 5 ml de NaOH (0,6 M) que contiene 10 mg de $NaBH_4$ (Sigma-Aldrich, USA) y 2,5 ml de 1,4-butanodiol-diglicidil-éter (Sigma-Aldrich, USA).

Para el acoplamiento del ligando de afinidad se siguió el protocolo de Vretblad (1976), con algunos cambios. Después de su activación, el gel fue lavado exhaustivamente con NaOH (0,1 M) y luego se mezcló con 150 mg de D-N-Acetil-Galactosamina (Sigma-Aldrich, USA) y 5 ml de NaOH (0,1 M). El acoplamiento se llevó a cabo por 48 h en una incubadora (Incu-Shaker® 10LR, Benchmark), en agitación a 100 rpm y 45°C.

La matriz se lavó con buffer Tris-HCl (0.1M, pH=7.5) y se dejó reposar, con el mismo buffer, a 4°C durante 1h. Posteriormente, se lavó con agua destilada, Tris-HCl 0.05M (pH 8.0), buffer citrato 0.05M (pH 4.0) y finalmente con solución de NaCl 0.15 M.

El gel se almacenó en una solución de etanol al 20% en refrigeración a 4-8°C. El gel se caracterizó por FTIR antes de ser activado, después de ser activado y después de haberse acoplado el ligando.

El gel de afinidad, en un volumen de 4 ml, se empacó en una columna de borosilicato y se llevó al equilibrio con una solución salina de NaCl 0.15 M a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min.

4.3.8.2 Procedimientos de la Cromatografía de Afinidad

Se cargó una muestra, de volumen 5 ml, a la misma velocidad de flujo (2.5 ml/min). A partir de entonces, la solución salina se bombea a través de la columna, hasta que la absorbancia del eluato alcance cero a 280 nm. La elución se realizó mediante el intercambio de la solución salina con una solución de galactosa (25 mg/ml en solución de NaCl 0.15 M).

4.3.9 Espectroscopía FTIR

Se evaluaron por espectroscopia FTIR (Cary 630, Agilent Technologies), la sepharosa CL-4B, el producto activado con el grupo epoxi y el producto conjugado con la N-acetil galactosamina, con el fin de corroborar que las reacciones se llevaron a cabo de manera satisfactoria.

4.3.10 Electroforesis

La masa molecular de las subunidades de las lectinas fue estimada por electroforesis SDS-PAGE (10%). El gel de electroforesis fue preparado de acuerdo al Manual de Instrucciones Mini-PROTEAN® Tetra Cell de Bio-Rad.

Las muestras de cada etapa de purificación de la proteína fueron mezcladas con buffer de muestra y cargadas a los pocillos del gel. Una vez corroborada la presencia de SBA en las muestras dializadas del salting out, se procedió a realizar la cromatografía de afinidad y recolectar las fracciones en las que el detector a 280 nm presentaba picos de absorbancia.

Los canales electroforéticos son cargados con un control negativo (muestra de Albúmina Bovina), un control positivo (muestra SBA, de Sigma-Aldrich, USA), marcadores de peso molecular, los productos dializados del salting out y las fracciones de la cromatografía de afinidad en donde el detector UV-Vis presentó picos de absorbancia (Fracción 3 y Fracción 7) (Tabla 9).

La corrida electroforética se trabajó en las siguientes condiciones: 80 V, 30 mA, 2 W, 2 h. Después de la corrida, se retiraron los geles y se lavaron con abundante agua destilada. Los geles se tiñeron con Blue Brilliant (Sigma-Aldrich, USA) para hacer visibles las bandas. Luego se dejaron en agitación a 50 rpm en agua destilada, en una incubadora (Incu-Shaker® 10LR, Benchmark), para ser desteñidos.

Tabla 9.- Muestras y controles cargados en los canales electroforéticos.

Nº Pocillo	Muestra	Descripción
1	MW	Marcador de Peso Molecular (SigmaMarker™, mol wt 36,000-200,000 Da, Sigma-Aldrich)
2	D1	Muestra dializada después del salting out.
3	D2	Muestra dializada después del salting out. Réplica 1.
4	D3	Muestra dializada después del salting out. Réplica 2.
5	D4	Muestra dializada después del salting out. Réplica 3.
6	D5	Muestra dializada después del salting out. Réplica 4.
7	T1	Fracción 7, cromatografía de afinidad.
8	T2	Fracción 3, cromatografía de afinidad.
9	Control (+)	SBA (Sigma-Aldrich, USA)
10	Control (-)	Albúmina de Suero Bovino (Merck Millipore,)

4.4 Bioconjugación

4.4.1 Caracterización de SBA y muestra purificada

Se evaluó el potencial Z de la SBA y la muestra purificada en un rango de pH de 4 a 8. Se utilizó la dispersión de luz dinámica a 25 °C (Nano Zetasizer ZS, Malvern Instruments).

4.4.2 Proceso de bioconjugación

Se tomó un volumen de nanotransportadores y un volumen de solución de SBA (1mg/ml) en una proporción de 9.24:5.47, basándonos en el IC50 de las AgNPs en la línea celular MDA-MB-231 de estudios realizados anteriormente. Se dejó en agitación en una incubadora (Incu-Shaker® 10LR, Benchmark) a 150 rpm por 8 h, a una temperatura de 9°C, pH 5.8.

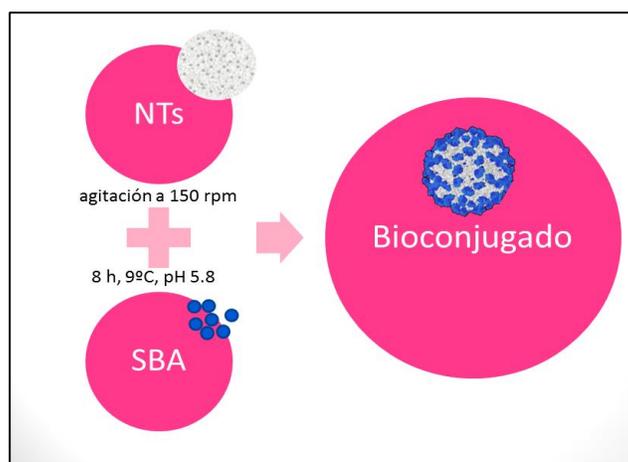


Figura 7.- Esquema de la Bioconjugación de los nanotransportadores de AgNPs.

4.5 Caracterización de los Nanotransportadores de AgNPs conjugados

Los nanotransportadores conjugados fueron analizados mediante dispersión de luz dinámica, técnica ya descrita anteriormente.

4.5.1 Ensayos de Toxicidad

4.5.1.1 Cultivo Celular

Se emplearon para el estudio: la línea celular de adenocarcinoma mamario MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar bajo buenas prácticas de laboratorio. Las líneas celulares MDA-MB-231 se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO), suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen) a pH 7.0, Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C y 5% de CO₂, durante 24 y 72h.

4.5.2 Preparación de las muestras

Los nanotransportadores autoensamblados y bioconjugados fueron disueltos a diferentes concentraciones en el medio de cultivo y filtrados con membranas estériles con tamaño de poro de 0.22 µm. Se emplearon los siguientes controles:

- 1) del vehículo, muestras de PEG disuelto en medio a las mismas concentraciones que las empleadas para los nanotransportadores
- 2) el medio de cultivo sólo; y
- 3) medio de cultivo con taxol 0.293 µM.

Adicionalmente, se preparó una solución de SBA (1 mg/ml) en PBS pH 7.4, ésta solución fue filtrada en esterilidad y empleada en los ensayos de toxicidad a la concentración de 2.0 µM.

4.5.3 Ensayo de Viabilidad Celular (MTT)

La toxicidad inducida por las muestras fue determinada de manera indirecta por la técnica colorimétrica MTT, que estudia la actividad mitocondrial mediante la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol por la succinato deshidrogenasa (enzima mitocondrial), dando como resultado la producción de formazán, un compuesto azulado que al ser disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) se puede cuantificar espectrofotométricamente.

Se sembraron 7000 células por pozo en placas de 96 pozos, con 100 uL de medio de cultivo; las células se mantuvieron en incubación durante 24 h para permitir su adhesión a la superficie de la placa.

Posteriormente, el medio fue retirado y se adicionaron los tratamientos señalados en la Tabla 10, con un volumen total de 150 uL por pozo, con 6 réplicas por tratamiento. Las células se mantuvieron en incubación por 24 y 72 h, respectivamente, y una vez concluidos los tratamientos se procedió a realizar el ensayo de viabilidad celular MTT.

Una vez completado el tiempo de tratamiento, se adicionaron a cada pozo 0.1 mg de MTT y se incubaron las placas durante 2 h a 37 °C en oscuridad. Una vez completado el tiempo de incubación se retiró el medio y se adicionaron 100 µl de DMSO. Las muestras fueron analizadas por espectroscopia en un lector de ELISA (Labsystem Multiskan Ms) a 570 nm.

Los diferentes tratamientos fueron comparados con el control negativo que empleó únicamente medio, a partir de éste, se calculó el porcentaje de viabilidad celular.

Tabla 10.- Tratamientos para la evaluación de la citotoxicidad evaluados mediante MTT

	Concentración de Ag (µg/ml)	Concentración de SBA (µg/ml)	Concentración de proteína (µg/ml)	Concentración de taxol (ug/ml)
Bio+SBA-D1	6.40	120		
Bio+SBA-D2	3.20	120		
Bio+SBA-D3	1.60	120		
Bio+Prot-D1	6.40		137.80	
Bio+Prot-D2	3.20			
Bio+Prot-D3	1.60		137.80	
NTs - D1	6.40			
NTs - D2	3.20			
NTs - D3	1.60			
SBA		240		
Proteína			137.80	
Taxol				0.25

5. Resultados y discusión

5.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata

5.1.1 Caracterización de nanopartículas de plata por Espectrofotometría UV-Vis

Las nanopartículas de plata (AgNPs) fueron sintetizadas a diferentes tiempos de reacción: 0, 30, 60, 90 y 120 minutos; posteriormente se tomó una porción de cada muestra para extender el tiempo de síntesis a 240 minutos.

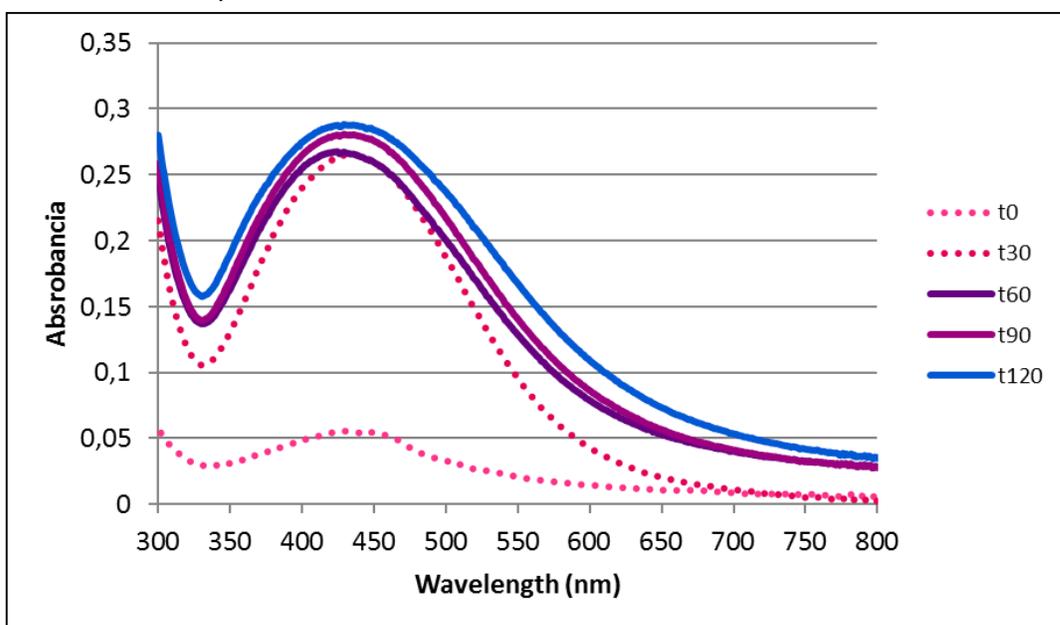


Figura 8.- Espectro UV-Vis de las AgNPs sintetizadas a diferentes tiempos de reacción (0, 30, 60, 90, 120 minutos), y disueltas en cloroformo para su caracterización. . t0= tiempo inicial, cero minutos; t30= treinta minutos; t60= sesenta minutos; t90= noventa minutos; t120= ciento veinte minutos.

Para la caracterización por espectroscopía UV-Vis, las AgNPs fueron disueltas en dos solventes orgánicos: cloroformo y cloruro de metileno, ambos de grado analítico. En la Figura 8, podemos observar el comportamiento de los espectros UV-Vis de las muestras sintetizadas y tenemos que las bandas de absorción del plasmón superficial oscilan entre 423 y 428 nm. Por la longitud de onda se puede indicar que el tamaño promedio de las nanopartículas de plata está alrededor de 20nm como indicado por Ortega-Arroyo *et al.* (2013).

En la figura 9 se observan dos modos de distribución de nanopartículas a 428 nm y un hombro a mayor longitud de onda (460 nm), lo que indica que se tienen nanopartículas menores junto con las de mayor tamaño y que la abundancia de cada modo de distribución depende del tiempo de síntesis.

A tiempo cero (t_0) la abundancia de NPs determinada por la absorbancia se encuentra en menor proporción comparado con la muestra sintetizada a 30 min (muestra que presenta, probablemente, mayor abundancia de NPS Ag). A tiempos de síntesis superiores a 30 min disminuye la absorbancia para las muestras disueltas en cloruro de metileno (Figura 9) y no así para las muestras disueltas en cloroformo (Figura 8) que se mantienen sin modificación significativa de absorbancia. Estas diferencias indican que, probablemente, las muestras disueltas en cloruro de metileno se estén agregando incrementándose su tamaño (disminuyendo su absorbancia); siendo más estables cuando están disueltas en cloroformo.

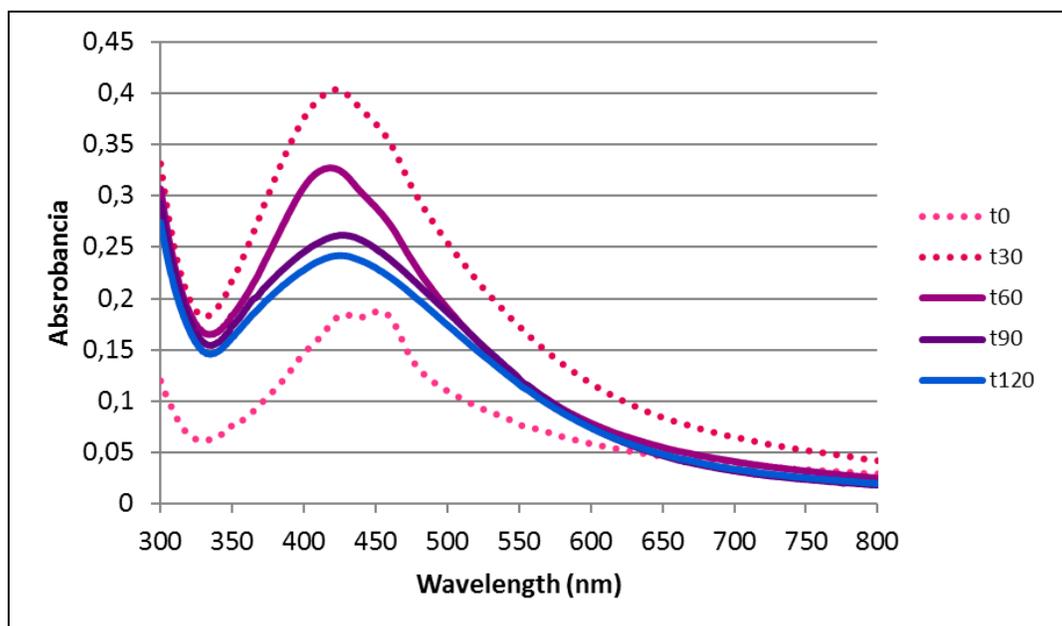


Figura 9.- Espectro UV-Vis de las AgNPs sintetizadas a diferentes tiempos de reacción (0, 30, 60, 90, 120 minutos), y disueltas en cloruro de metileno para su caracterización. t_0 = tiempo inicial, cero minutos; t_{30} = treinta minutos; t_{60} = sesenta minutos; t_{90} = noventa minutos; t_{120} = ciento veinte minutos.

La exposición de las AgNPs a diferentes tiempos de síntesis disueltas en cloruro de metileno permitió determinar la pérdida de absorbancia o disminución en la formación de nanopartículas de plata.

Para observar mejor este comportamiento se prolongó el tiempo de síntesis a 240 min, observándose mayor disminución en la absorbancia, como se indica en la tabla 11. Suponiendo que la absorbancia obtenida al tiempo de 30, 60, 90, 120 min sea el 100% de síntesis de nanopartículas de plata y si se deja un tiempo de reacción mayor (240 min) se tiene una disminución en la absorbancia en estas muestras, probablemente se deba a la agregación de las AgNPS que son promovidas en cloruro de metileno.

Tabla 11.- Rendimiento de la síntesis de AgNPs a diferentes tiempos de reacción.

Tiempo Reacción (min)	λ_{\max} (nm)	Abs	Abs (240min)	Abs-Abs240	%(Abs-Abs240)	%Rendimiento
120	425	0,2536	0,2290	0,0245	9,6	90,3
90	425	0,2947	0,1988	0,0958	32,5	67,5
60	423	0,3416	0,2554	0,0861	25,2	74,8
30	423	0,3883	0,3034	0,0849	21,8	78,1
0	428	0,2775	0,1879	0,0895	32,2	67,7

5.1.2 Caracterización de Nanopartículas de Plata por Espectroscopía RAMAN

En estudios anteriores, Luo et. al. (2005) sintetizaron AgNps empleando PEG 2000, los autores caracterizaron el producto mediante espectroscopia H NMR, concluyendo que existe la formación de un aldehído durante la reducción de la plata iónica a plata metálica.

En la Figura 10 se puede observar que la oxidación de un alcohol primario produce como resultado un grupo carbonilo en forma de aldehído o de un ácido carboxílico; esto es, el grupo hidroxilo puede ser oxidado inicialmente en un aldehído, seguido de la oxidación progresiva que da lugar a la formación de grupos carboxílicos (Dennany, 2010).

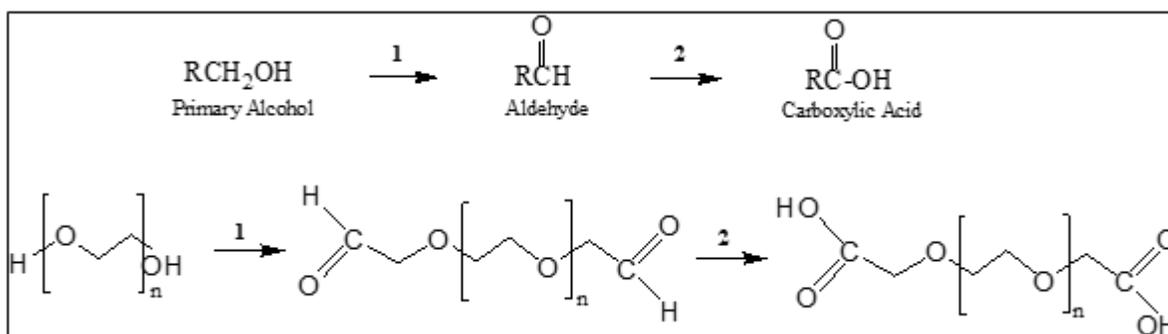


Figura 10.- Oxidación progresiva del grupo hidroxilo del PEG.

La espectroscopia Raman no genera señales intensas relacionadas con los alcoholes y los ácidos carboxílicos (Larkin, 2011; Schrader, 2008). Excitado con un láser rojo, el grupo carbonilo genera una señal débil a 2680-2740 cm^{-1} .

El espectro Raman del PEG oxidado, tras la síntesis de las AgNPs, se muestra en la Figura 11, en donde se puede observar la señal del éter alifático (830-930 cm^{-1}), con las vibraciones antisimétricas y simétricas características del metileno (2911 and 2862 cm^{-1}); así mismo, es posible observar una señal correspondiente al carbonilo de un aldehído (1720-1740 cm^{-1}) y de un grupo carboxilo (1649-1654 cm^{-1}) (ver figura 11b), por lo que se deduce que el producto final es una mezcla de los distintos estados de la oxidación progresiva del PEG.

Esta interpretación fue corroborada con el software RAMalyze (LabCognition).

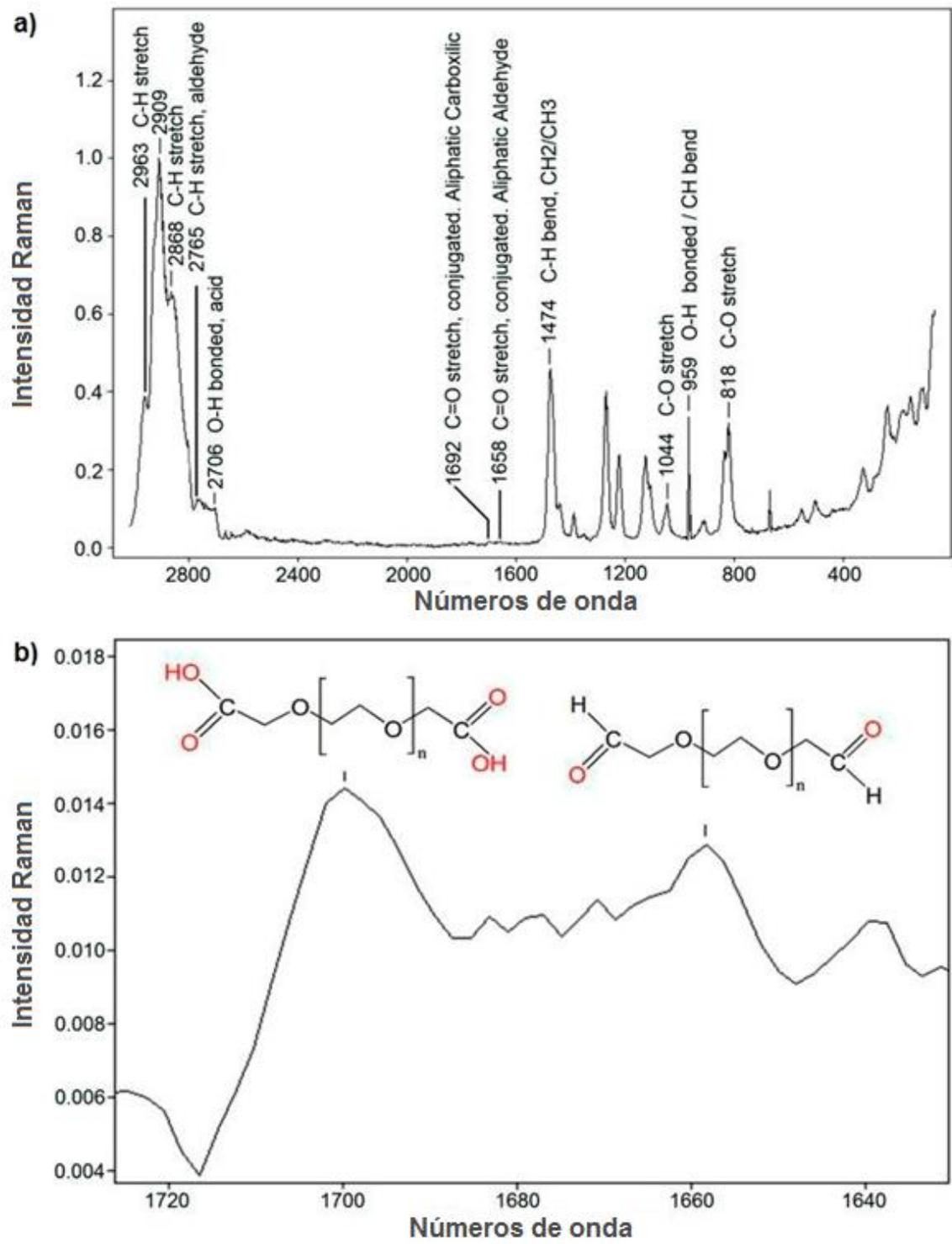


Figura 11.- Espectro de dispersión Raman de a) el PEG oxidado por la síntesis de AgNPs b) identificación del producto de oxidación.

5.2 Síntesis de nanotransportadores

Se evaluó la síntesis de nanotransportadores de AgNPs a diferentes concentraciones de PEG-AgNPs, con ajuste y sin ajuste de pH a través del Nano Zetasizer. En la Figura 12 observamos los resultados obtenidos para la síntesis de nanotransportadores sin ajuste de pH. Al utilizar la concentración de 1.48% de PEG-AgNPs para la síntesis obtuvimos tamaños hidrodinámicos de 186.3 ± 7.4 nm y el mayor porcentaje de abundancia, de estos tamaños hidrodinámicos, sin ajustar el pH. Las mediciones se realizaron una vez sintetizados los nanotransportadores. El equipo realiza cada medición por triplicado, de esta manera pudimos detectar que los nanotransportadores, sin ajuste de pH, van aumentando de tamaño con respecto al tiempo. El porcentaje de abundancia explica el modo de distribución de tamaño hidrodinámico de los nanotransportadores. Lo que buscamos es tener 100% de abundancia de tamaño hidrodinámico, para asumir que tenemos nanotransportadores de tamaño homogéneo.

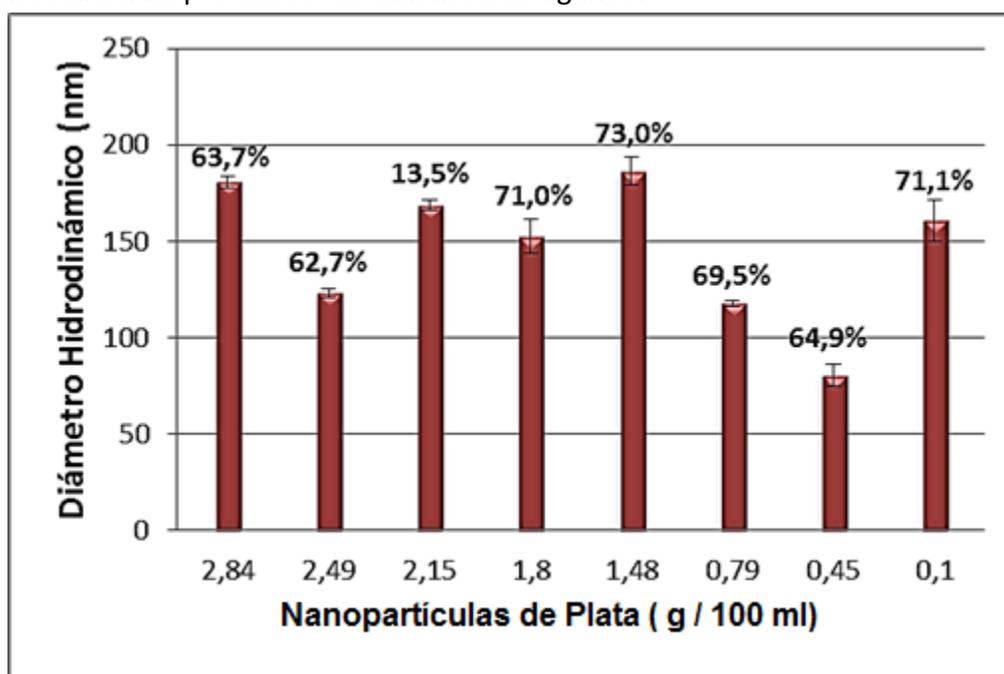


Figura 12.- Diámetro Hidrodinámico de los nanotransportadores a diferentes concentraciones de PEG-AgNPs, sin ajustar pH. %=Porcentaje de abundancia.

Complementando el análisis de estos resultados, observemos en la figura 13 la distribución del tamaño hidrodinámico por intensidad de los nanotransportadores sintetizados a diferentes concentraciones de nanopartículas de plata; buscamos distribuciones monomodales, es decir, cien por ciento de abundancia para la distribución del tamaño y diámetros hidrodinámicos próximos a los 200 nm, sin embargo, en todas las concentraciones probadas vemos distribuciones bimodales y en algunos casos hasta

trimodal, y variación del diámetro hidrodinámico . La concentración de 1.48%, en el inciso e), es la muestra que presenta mayor porcentaje de abundancia de la moda, y el pico de la campana gaussiana tiene su máximo en 186 nm.

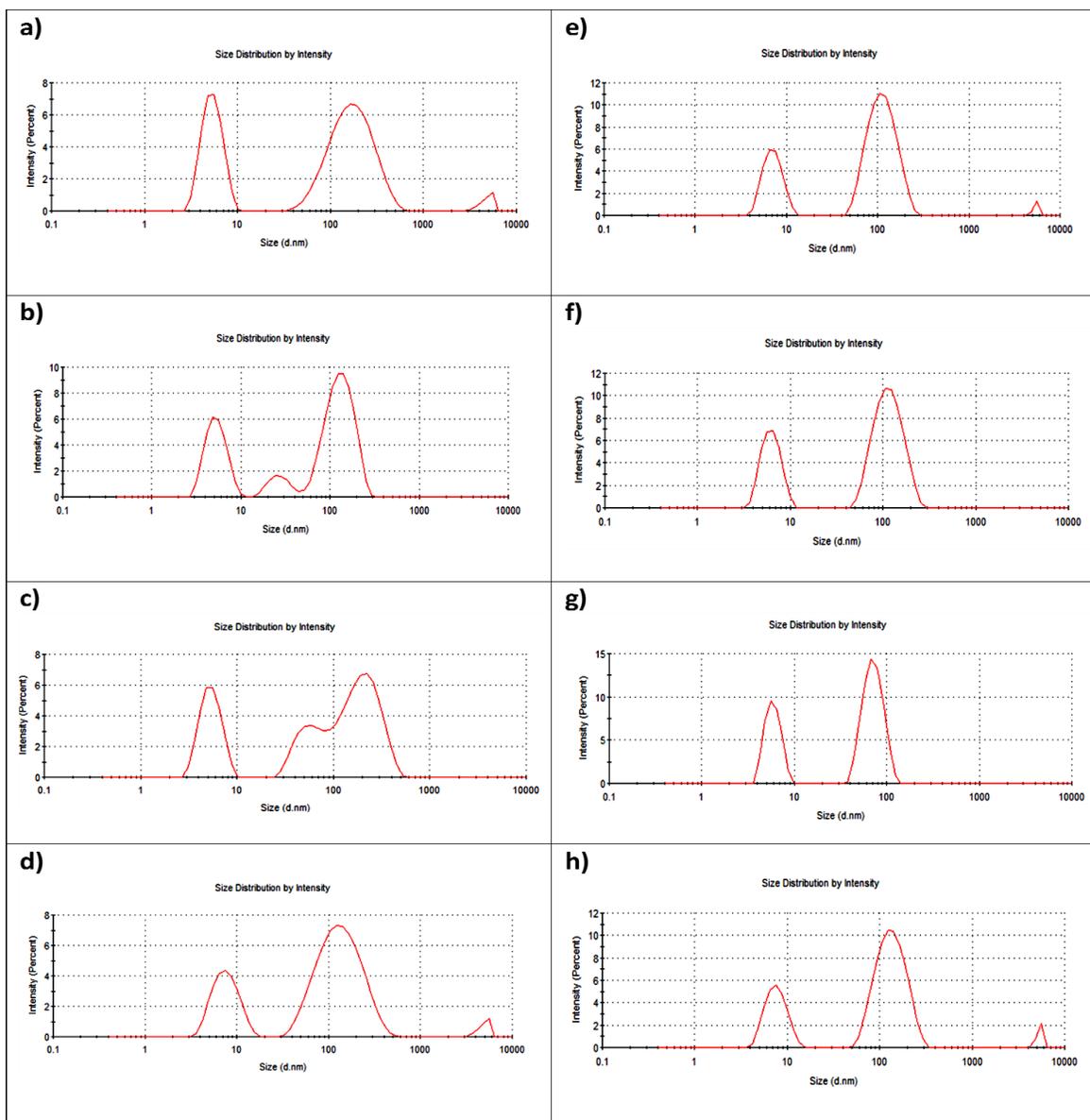


Figura 13.-Gráficos de distribución de tamaños por intensidad de los nanotransportadores sintetizados a diferentes concentraciones de PEG-AgNPs, sin ajustar pH. a) 2.84%; b) 2,49%; c) 2.15% d) 1.80%; e) 1.48%; f) 0.79%; g) 0.45%; h) 0.10%;

En la Figura 14 se presentan los resultados de las muestras a las que se les ajustó el pH a 9.0 ± 0.2 . Se alcanzó cien por ciento de abundancia para la concentración de 1.48% de PEG-AgNPs y un tamaño de 156.9 ± 6.1 .

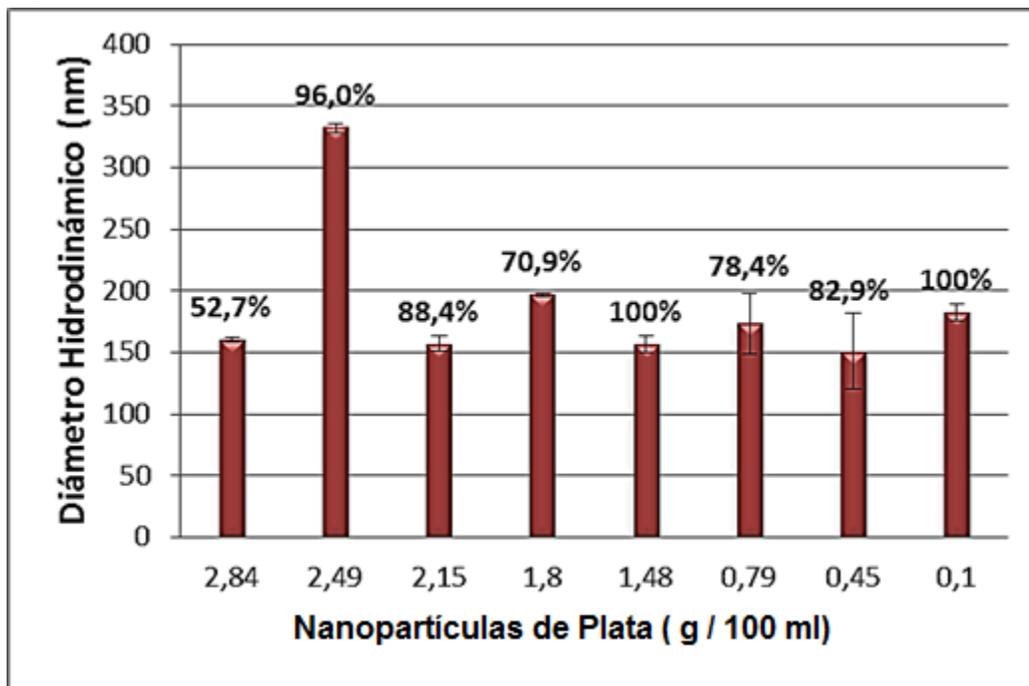


Figura 14.- Diámetro Hidrodinámico de los nanotransportadores a diferentes concentraciones de PEG-AgNPs, con ajuste de pH a $9,0 \pm 0,2$; %=Porcentaje de abundancia.

Al ajustar el pH del medio en donde se encuentran los nanotransportadores, observamos que se logra obtener una distribución monomodal del tamaño hidrodinámico en algunas de las concentraciones trabajadas en el diseño de experimentos. La figura 15 muestra los gráficos de distribución de tamaños por intensidad de los nanotransportadores sintetizados a diferentes concentraciones de PEG-AgNPs, con ajuste de pH a $9,0 \pm 0,2$; observamos que para las concentraciones de 1.48% y 0.1% el pH afecta a los nanotransportadores de manera que se consigue mayor estabilidad de los mismos, con diámetros hidrodinámicos dentro de los criterios que se requieren para su posterior vectorización.

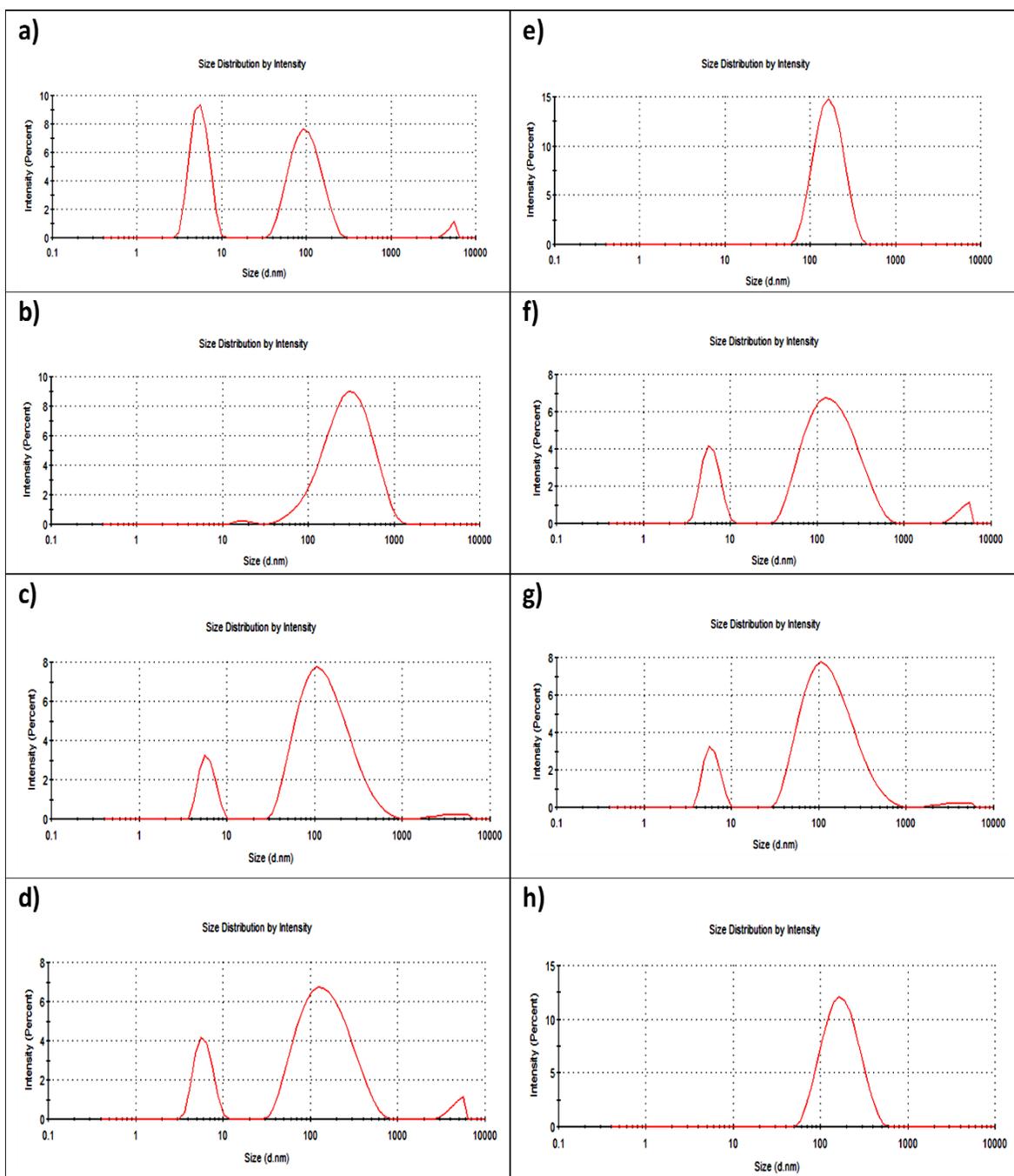


Figura 15.- Gráficos de distribución de tamaños por intensidad de los nanotransportadores sintetizados a diferentes concentraciones de PEG-AgNPs, con ajuste de pH a $9,0 \pm 0,2$. a) 2.84%; b) 2,49%; c) 2.15%;d) 1.80%; e) 1.48 %; f) 0.79%; g) 0.45%; h) 0.10%

5.3 Estudio de estabilidad de los nanotransportadores

Una vez obtenidos estos resultados, se trabajó con la concentración de 1,48% de AgNPs en PEG, a diferentes tiempos de maduración, con ajuste y sin ajuste de pH. Se prepararon muestras que se dejaron madurar a tiempos de 24, 48 y 72 horas y se ajustó el pH del medio a $9 \pm 0,1$. El tiempo cero "0" representa a las muestras que no fueron maduras, las muestras se prepararon por triplicado. Las muestras que fueron sintetizadas sin ajustar el pH presentaron tamaños hidrodinámicos menores a 200 nm; sin embargo, el porcentaje de distribución de estos tamaños fue menor al 90%, como se observa en la figura 16, es decir, se obtuvieron gráficas bimodales e incluso multimodales lo que no es favorable para nuestros estudios de estabilidad ya que obtenemos una diversidad de tamaños de nanotransportadores. El valor presentado en la figura 16 corresponde al modo de distribución de menor tamaño y de mayor abundancia entre los nanotransportadores a los diferentes tiempos de maduración.

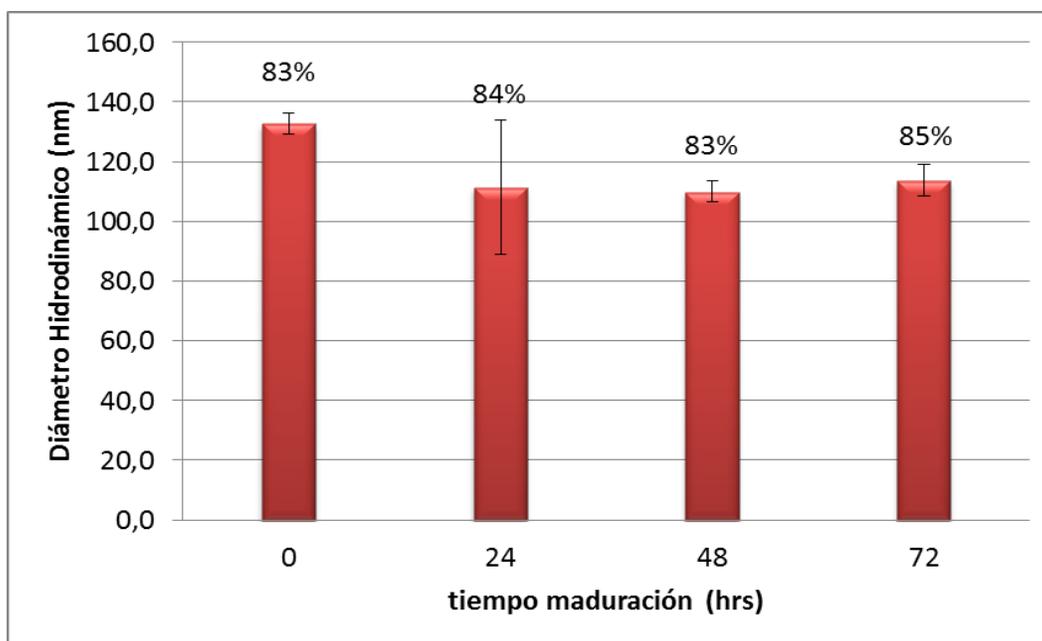


Figura 16.- Diámetro Hidrodinámico de los Nanotransportadores de AgNPS a diferentes tiempos de maduración, sin ajuste de pH; %=Intensidad.

La tabla 12 nos muestra los tamaños hidrodinámicos caracterizados por dispersión de luz dinámica de los NTs de AgNPs cuando no ajustamos el pH de la síntesis. De esta forma se puede observar que sin ajustar las condiciones de síntesis obtenemos partículas muy pequeñas menores a los 10 nm y al mismo tiempo aglomerados del orden micrométrico, lo que nos lleva a deducir que los NTs no son estables a estas condiciones de síntesis.

Tabla 12.- Diámetro Hidrodinámico de los Nanotransportadores de AgNPs, a diferentes tiempos de maduración, sin ajustar pH.

	t (h)	Pdl	pico 1	pico 2	pico 3
1	-	0,641±0,050	123,1±3,4	6,3±0,1	4614,0±417,8
2	-	0,652±0,006	157,2±2,9	5,8±0,1	1228,0±2126,9
3	-	0,705±0,011	117,7±4,9	5,9±0,0	4746 ±458
4	24	0,559±0,004	106,5±7,6	12,2±5,683	2,8±2,6
5	24	0,633±0,015	104,6±8,8	9,6±3,240	1669 ±2886
6	24	0,570±0,028	123,1±5,5	12,7±5,123	1690±2919
7	48	0,599±0,042	109,4±9,4	7,0±0,7	1738±2996
8	48	0,554±0,038	105,1±6,7	9,6±1,5	1794±3103
9	48	0,631±0,389	115,2±18,9	7,2±0,6	3341±2893
10	72	0,608±0,047	121,6±8,0	7,5±1,4	1,0±1,8
11	72	0,546±0,031	109,1±3,7	9,3±0,8	0
12	72	0,559±0,005	110,0±7,1	7,9±1,8	7,0±9,6

En la Figura 17 podemos observar el comportamiento del tamaño hidrodinámico de los nanotransportadores de AgNPs a diferentes tiempos de maduración, además vemos que a mayor tiempo de maduración obtenemos mejor estabilidad y tamaños próximos a los 200 nm, con un 100% en un solo modo de distribución.

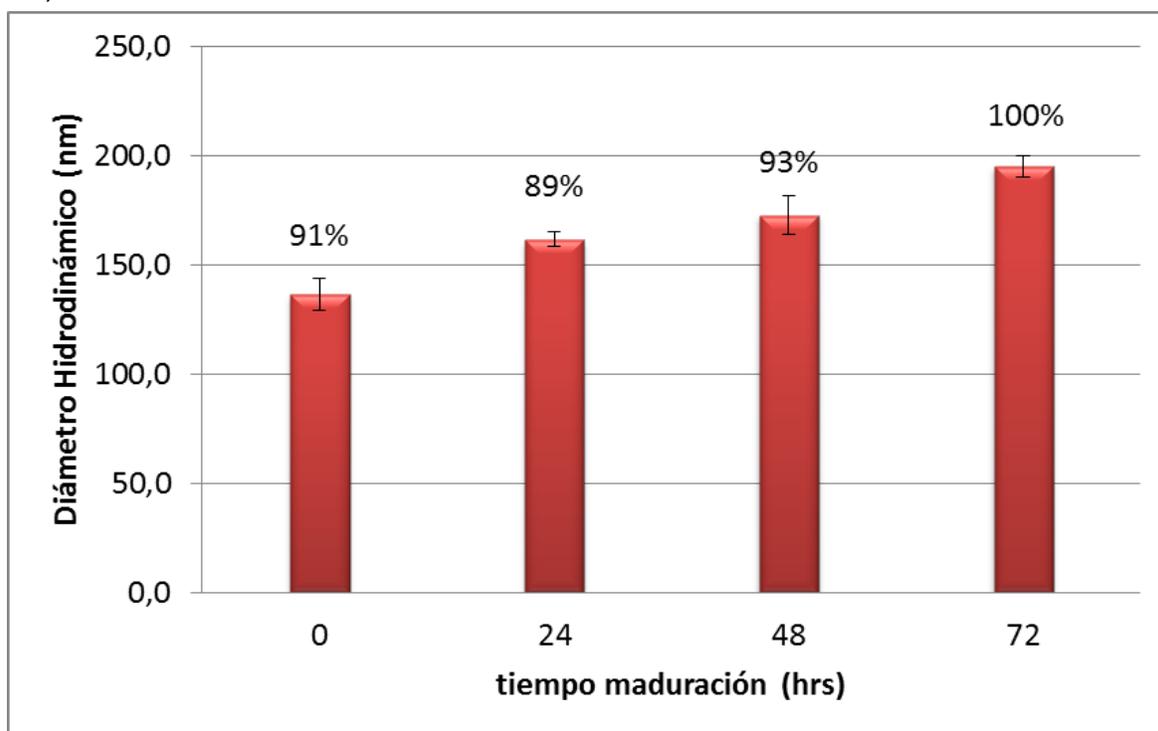


Figura 17.- Diámetro Hidrodinámico de los Nanotransportadores de AgNPS a diferentes tiempos de maduración, con ajuste a pH 9,0±0,1; %=Intensidad.

En la gráfica se indica como diámetro hidrodinámico el promedio del valor máximo en la campana de distribución del modo de distribución correspondiente a cada experimento. Es decir que los que tienen menores valores porcentuales indican que tienen otros modos mayores o menores de distribución de nanotransportadores. Por lo que para un tiempo de 72h de maduración se conserva un solo modo de distribución.

En la Tabla 13 vemos como al ajustar las muestras a distintos pH éstas mantienen diámetros hidrodinámicos que oscilan muy cercanamente a los 200 nm. El 100% de abundancia de tamaño se obtiene a un tiempo de maduración de 72 horas, con comportamiento monomodal del diámetro hidrodinámico de los NTs.

Tabla 13.- Diámetro Hidrodinámico de los Nanotransportadores de AgNPs, a diferentes tiempos de maduración, con ajuste de pH.

	t (h)	pH	Pdl	pico 1	pico 2	pico 3
1	-	8,928	0,527±0,054	132,9±5,4	6,2±0,2	1789±3098
2	-	8,956	0,578±0,002	137,1±11,8	6,1±0,6	1780±3069
3	-	8,961	0,519±0,013	139,5±3,9	5,7±0,3	0
4	24	9,027	0,221±0,007	199,9±3,5	0	0
5	24	8,935	0,326±0,051	168,2±0,7	1594±2749	1,5±2,7
6	24	8,923	0,553±0,040	116,7±5,8	7,0±0,9	1751,4±3020
7	48	9,099	0,469±0,030	175,0±11,0	15,8±9,2	8,6±10,8
8	48	8,912	0,504±0,007	174,5±9,2	8,6±2,6	17,2±11,9
9	48	8,967	0,446±0,008	168,8±6,6	3307±2871	1462±2532
10	72	8,907	0,190±0,012	205,2±3,5	0	0
11	72	8,969	0,225±0,003	182,9±6,6	0	0
12	72	8,938	0,163±0,024	197,8±4,7	0	0

La tabla 14 nos muestra que esta variable (Potencial Z) se ve afectada por el pH, con estos datos podremos continuar los estudios de bioconjugación del nanotransportador y evaluar a qué pH se da la mejor interacción con la proteína (tres réplicas de la determinación).

Tabla 14.- Potencial Z de los Nanotransportadores de AgNPS, a 72 h de maduración, con y sin ajuste de pH.

	t (h)	pH	ZP (mV)
1	72	-	-11,4±2,0
	72	8,911	-28,2±1,0
2	72	-	-6,0±0,9
	72	9,024	-25,2±0,1
3	72	-	-5,2±0,4
	72	8,98	-18,5±0,7

También los nanotransportadores con 72 horas de maduración fueron sometidos a ajustes de pH en el rango de 2 a 11, para evaluar el efecto de esta variable sobre el diámetro hidrodinámico y el potencial Z (Tabla 15).

Tabla 15.- Potencial Z de los Nanotransportadores de AgNPS, a 72 h de maduración, con ajuste de pH.

%PEG-AgNPs	pH	ZP (mV)	Conductividad (mS/cm)
1,48	2,307	-12,2	2,94
	4,685	-	0,0569
	4,958	-19,4	0,089
	5,305	-20	0,054
	6,956	-20,7	0,0603
	7,739	-24,3	0,0609
	10,200	-25,4	0,233

Como veíamos anteriormente, la estabilidad de estos nanovehículos se ve mejorada a un pH de 9, donde teníamos distribución de tamaño de una sola moda a las 72 horas de almacenamiento; sin embargo, al evaluar el potencial Z a este pH observamos que estos poseen carga negativa muy alta lo que no nos favorece para la síntesis del bioconjugado.

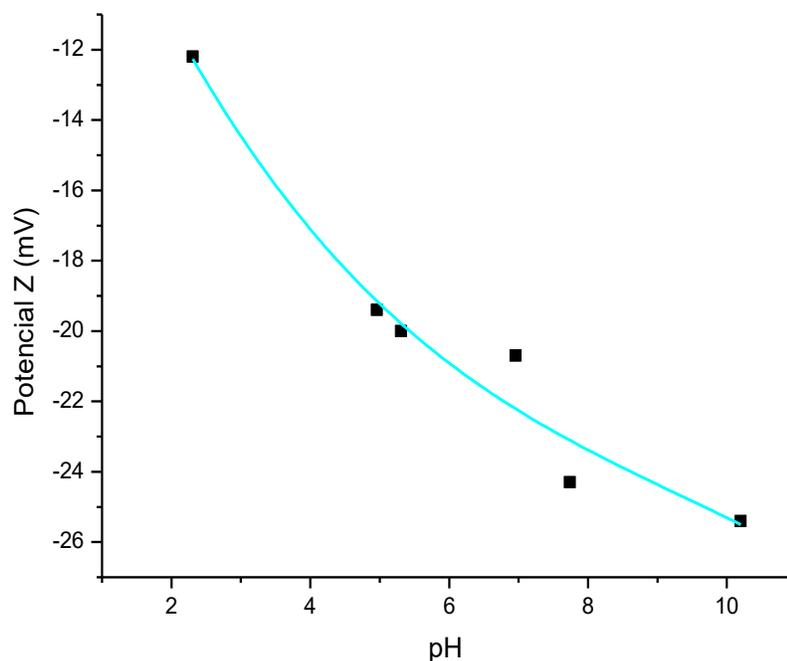


Figura 18.- Gráfico del Potencial Z en función del pH, para los nanotransportadores de AgNPs

Los datos de la tabla 15 se graficaron para poder observar el comportamiento de la función formada por el Potencial Z de los nanotransportadores y el pH de los mismos (Figura 18). El potencial Z para los nanotransportadores de AgNPS es negativo en todo el rango de pH estudiado y aumenta en su magnitud de carga a medida que aumenta el pH. Con esta información, ahora corresponde estudiar el comportamiento del potencial Z de la proteína a diferentes condiciones de pH, esperando obtener cargas positivas en algún rango de pH para realizar la bioconjugación por atracción de cargas.

5.4 Purificación y caracterización de la proteína de soya

Se realizó la cuantificación de Proteínas Totales de cada etapa del proceso de purificación de la lectina de soya (*Glycine max*) por el Método de Lowry, como ya se mencionó anteriormente, obteniéndose los resultados de la tabla 16. Se pudo corroborar la presencia de proteínas, por el tipo de solvente utilizado en el proceso (soluciones salinas) obtuvimos proteínas globulares, en cada etapa del proceso de purificación. Estos datos son muy importantes ya que nos ayudaron a determinar la concentración aproximada de proteínas para el cálculo de las dosis que se aplicaron en los estudios de viabilidad celular.

Tabla 16.- Contenido de Proteínas totales por el Método de Lowry, en las diferentes etapas del proceso.

Extracto	Contenido de Proteínas (mg/ml)	Volumen obtenido del proceso (ml)	Cantidad obtenida del proceso (mg)	Cantidad obtenida del proceso (mg/10 g harina desgrasada)
Sobrenadante-Extracto salino	7,37	50	368,5	2211
Sobrenadante, 40% (NH ₄) ₂ SO ₄	5,05	40	202	1212
Pellet disuelto dializado, 80% (NH ₄) ₂ SO ₄	2,54	30	76,2	914,4
Cromatografía de afinidad	2,72	32	87,04	696,32

Se tomaron muestras de cada extracto y se analizaron en un gel de electroforesis SDS-PAGE (10%), las cuales se corrieron junto a controles de SBA pura para comparar las bandas de corrida y poder certificar la presencia de aglutinina de soya en las muestras.

Está previamente definido que las subunidades de la SBA de *Glycine max* migran a una distancia equivalente a 30 Da (Lotan, Siegelman, Lis, & Sharon, 1974). Confirmación que se hace por comparación con el marcador de peso molecular y el control positivo.

5.4.1 Electroforesis

El gel de electroforesis nos muestra la separación electroforética de las proteínas presentes en las muestras de los extractos obtenidos durante el proceso de purificación (Figura 19).

Los dializados contienen proteínas con pesos moleculares menores a los 90 kDa, y en cada uno de ellos se puede observar la banda de la SBA, en un tamaño aproximado de 30 kDa.

En la muestra T1, que es la fracción 7 de la cromatografía de afinidad, no se puede percibir la presencia de alguna proteína, esto puede ser debido a:

- 1) Que la SBA no se haya ligado a la *N*-acetil galactosamina de la matriz de afinidad,
- 2) Que la solución de galactosa que se utilizó para separar la SBA de la matriz no tenía la suficiente concentración para competir con el ligando de la matriz.
- 3) Que algún parámetro de la cromatografía (como el flujo de la fase móvil) haya afectado a la elución de la SBA.

La muestra T2, fracción 3, es de las primeras fracciones antes de agregar la solución de galactosa para eluir la SBA. En este carril, podemos observar la presencia de nuestra proteína de interés junto con algunas otras proteínas que poseen menor intensidad de las bandas en comparación de los dializados (antes de la cromatografía).

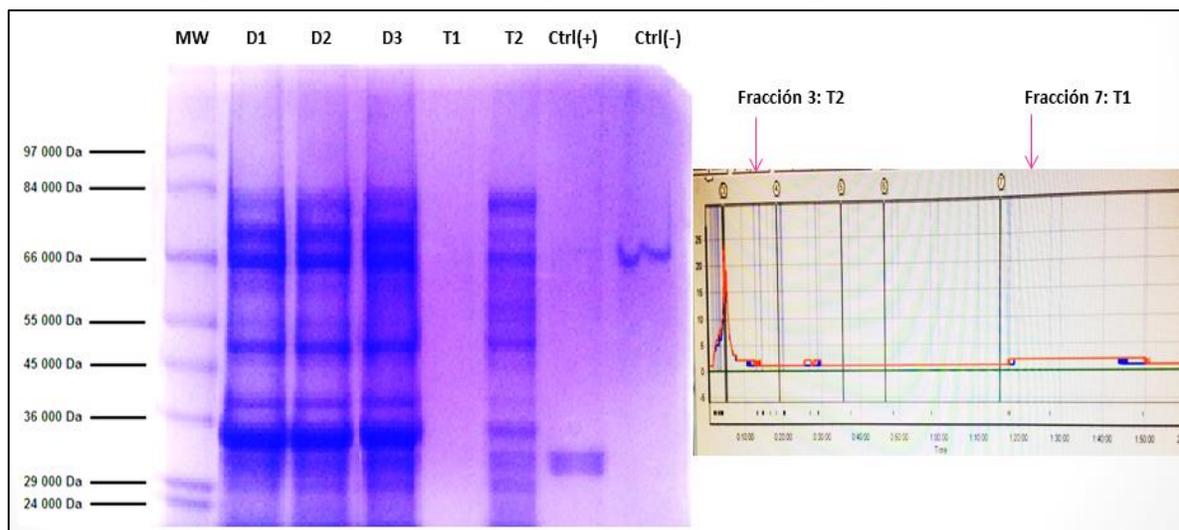


Figura 19.- Gel de electroforesis. MW= marcador de peso molecular; D1, D2, D3, D4, D5= muestras de dializados después del salting out; T1, T2= fracciones 7 y 3, respectivamente, de la cromatografía de afinidad; Ctrl(+)= SBA pura (Sigma-Aldrich); Ctrl(-)= Albúmina de Suero Bovino. Da= Daltons. A la izquierda: cromatograma de la elución de la SBA.

5.5 Bioconjugación

Para desarrollar la bioconjugación por atracción de cargas, se evaluó la influencia del pH sobre el potencial Z de la aglutinina de soya (SBA) y de la proteína purificada parcialmente (T2). Debido a que el bioconjugado se debe trabajar a pH cercanos al fisiológico, se estudió la variación del potencial Z en un rango de pH de 4 a 8. En la tabla 17 vemos los resultados obtenidos para la aglutinina de soya, en donde el potencial Z se ve afectado proporcionalmente al pH (figura 20). En la SBA comercial predominan las cargas negativas en todo el rango estudiado. Cabe mencionar que esta proteína fue resuspendida en PBS y, por este motivo, al realizar las mediciones vemos que la conductividad de la muestra es muy alta; para estudios futuros se sugiere probar otros medios de disolución para la bioconjugación.

Tabla 17.- Potencial Z de la Aglutinina de Soya (SBA) disuelta en PBS (pH 7.4) a diferentes condiciones de pH.

ph	ZP [mV]	Conductividad [mS/cm]
4,185	-1,53	18,1
4,819	-2,7	17,3
6,124	-3,04	19,3
7,089	-3,33	21,7
7,819	-4,1	20,4

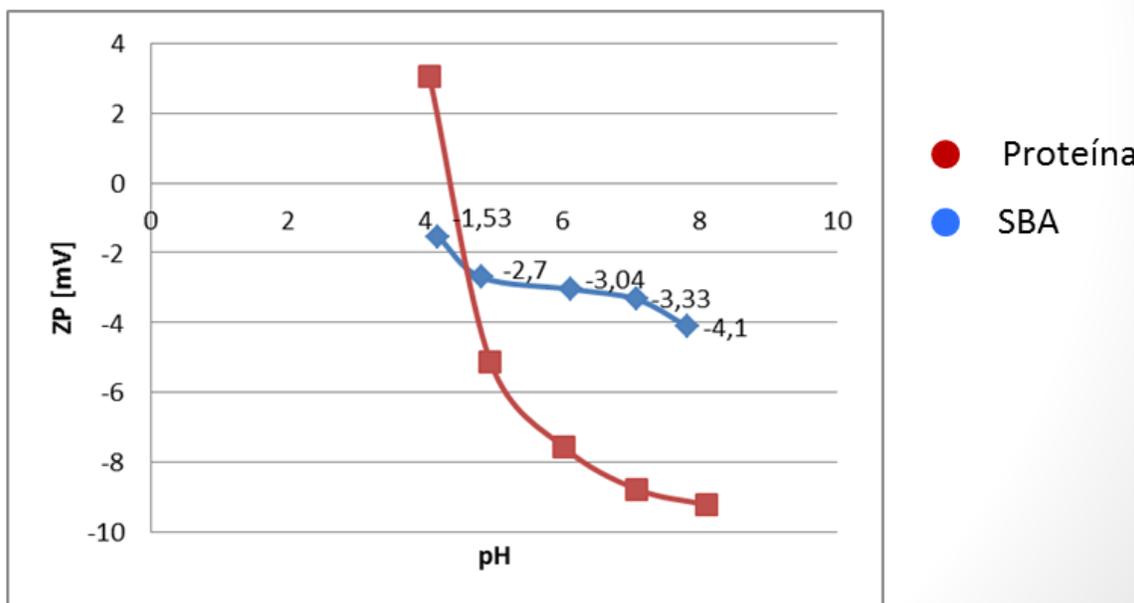


Figura 20.- Gráfico del Potencial Z en función del pH, para la aglutinina de Soya y la proteína extraída.

La tabla 18 nos muestra los resultados obtenidos para la muestra purificada (T2), en donde el potencial Z se ve afectado proporcionalmente al pH (figura 20). La SBA purificada parcialmente presenta cargas positivas predominantes cuando el pH es menor, aproximadamente, a 4.5. Las cargas negativas son superiores en cuanto tenemos pH mayor a 4.5 (figura 20). Esta muestra fue, también, resuspendida en PBS, es por esta razón que también posee muy alta conductividad.

Tabla 18.- Potencial Z de la muestra purificada (T2) disuelta en PBS (pH 7.4) a diferentes condiciones de pH.

pH	ZP [mV]	Conductividad [mS/cm]
4,063	3,03	18,6
4,950	-5,11	19,1
6,022	-7,56	19,1
7,088	-8,76	19,2
8,098	-9,2	19,1

Los nanotransportadores estudiados en el anterior apartado para su almacenamiento, presentan una estabilidad mejorada a pH 9, sin embargo, se cambió este pH al momento de ser funcionalizados debido a que las proteínas tienen cargas positivas predominantes a más bajo pH, para que puedan unirse por atracción de cargas.

5.5.1 Estudios de Citotoxicidad

En la figura 21 se puede observar que, a las 24 h, las células MDA-MB-231 mostraron una viabilidad del 100% para el control negativo, en donde se colocaron células con medio de cultivo sin tratamiento (Cel+Medio); mientras que el control positivo (Taxol 0.25 µg/mL) mostró una viabilidad cercana al 40 %; por su parte, el ensayo con SBA 2.0 µM no evidenció un efecto citotóxico en ésta línea celular, obteniéndose un 100 % de viabilidad. Las proteínas aisladas del frijol de soya, por su parte, mostraron una ligera disminución de la viabilidad celular, la cual tuvo un valor cercano al 80%.

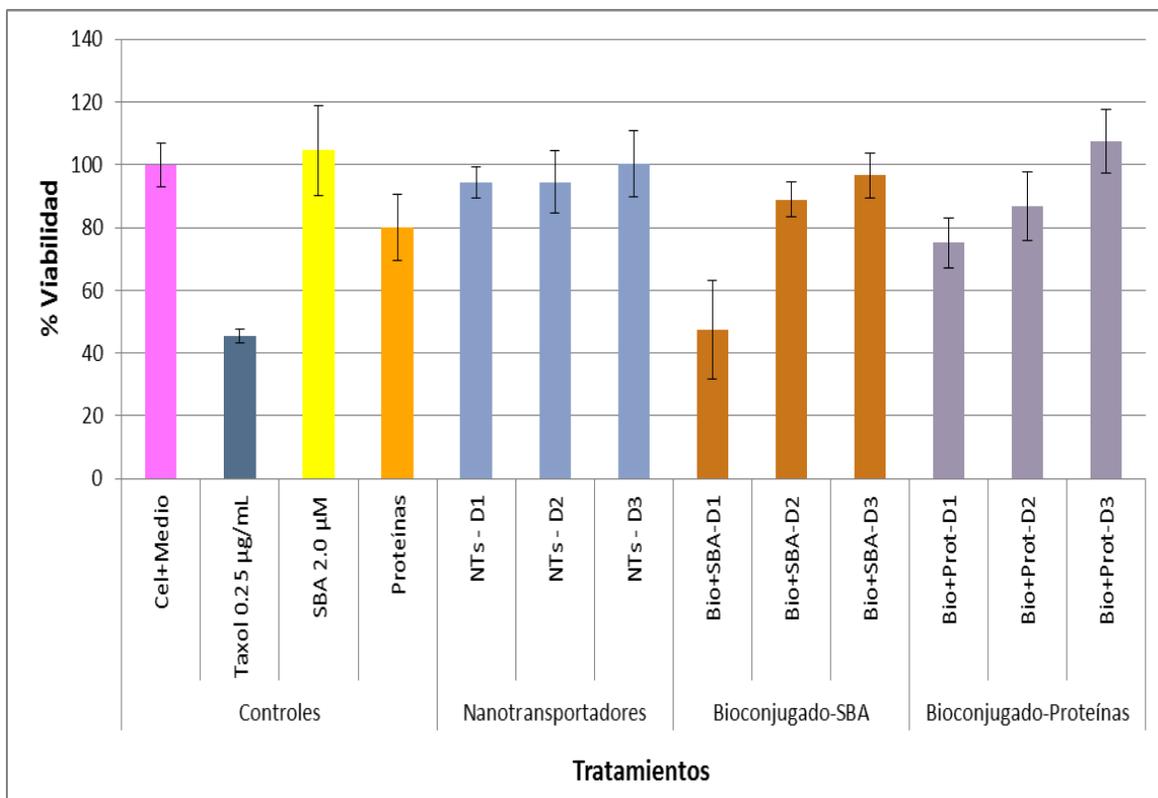


Figura 21.- Viabilidad celular determinada por MTT tras 24 h de tratamiento.

Por otro lado, los tratamientos con nanotransportadores (NT's-D1-D3) permitieron observar una ligera disminución de la viabilidad celular, exclusivamente para las dosis D1 y D2, las cuales, permitieron obtener una viabilidad cercana al 95%, sin embargo, es importante resaltar que la desviación de la dosis D2 podría indicar que no hay cambio en la viabilidad celular respecto al control negativo, mientras que la dosis D3, no indujo cambios en la viabilidad celular.

Por su parte, el bioconjugado con la SBA comercial permitió obtener resultados sobresalientes, en donde, una dosis de 1.0 µM SBA (menor a la evaluada como control) más la dosis D1 de los nanotransportadores (NT's-D1), que por separado mostraron un efecto prácticamente nulo sobre la viabilidad celular, en conjunto (Bio+SBA-D1), permitieron obtener una viabilidad cercana al 45%, este resultado permite evidenciar que la bioconjugación del nanotransportador con la SBA potencia la actividad citotóxica de las AgNPs contenidas en el nanotransportador, probablemente al facilitar la entrada de las mismas al interior de la célula.

Por su parte, las dosis Bio+SBA-D2 y Bio+SBA-D3, no mostraron cambios significativos en la viabilidad celular con respecto a los ensayos NTs-D2 y NTs-D3. Finalmente, la bioconjugación con la proteína (Bio+Prot-D1-D3) también mejoró la actividad de los nanotransportadores, sin embargo, la actividad citotóxica observada se encuentra dentro del nivel de actividad citotóxica de la proteína, como se vio en el control correspondiente, lo cual no permite concluir respecto a las posibles mejoras en la actividad del bioconjugado con la proteína aislada para las 24 h de tratamiento.

El ensayo de viabilidad para 72 h de tratamiento (Figura 22) permitió observar que el tratamiento con taxol indujo una disminución mayor de la viabilidad celular, con respecto a las 24 h de tratamiento, obteniéndose una viabilidad cercana al 20%. Por su parte, la SBA mostró citotoxicidad para las 72 h de tratamiento, obteniéndose una viabilidad celular cercana al 85%, la cual difiere del tratamiento a 24 h (100% de viabilidad). Las proteínas aisladas en el laboratorio no mostraron cambios significativos en su citotoxicidad entre las 24 y 72 h de tratamiento.

Por su parte, los nanotransportadores tampoco mostraron cambios en su citotoxicidad a las 72 h de tratamiento, respecto a las 24 h. El bioconjugado con SBA (Bio+SBA-D1-D3) no mostró cambios significativos entre las 24 y las 72 h de tratamiento; mientras que el bioconjugado con proteínas vio potenciada su actividad a las 72 h de tratamiento, particularmente en la dosis D1 (Bio+Prot-D1), donde la viabilidad celular alcanzó valores inferiores al 60%, para las 72 h, la cual es muy similar a la viabilidad celular obtenida para el bioconjugado con SBA comercial para la misma dosis de plata (Bio+SBA-D1).

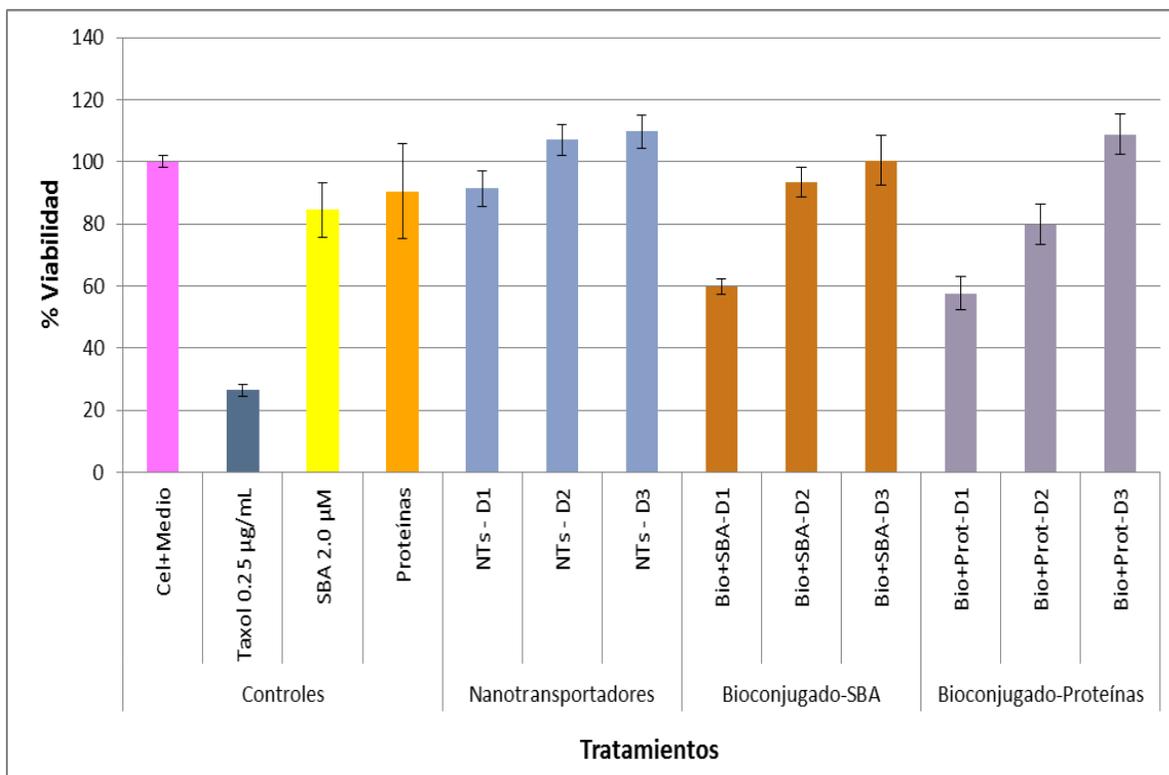


Figura 22.- Viabilidad celular determinada por MTT tras 72 h de tratamiento.

Los resultados obtenidos permiten observar que la bioconjugación de los nanotransportadores con la SBA comercial y con la proteína aislada del frijol de soya mejora la actividad citotóxica del nanotransportador, permitiendo una mayor disminución de la viabilidad celular cuando éste se encuentra bioconjugado. A pesar de que el aislado proteico muestra citotoxicidad, lo cual es un efecto deseable para el bioconjugado, es importante que en futuros ensayos se trabaje sobre la purificación completa de la SBA del frijol de soya en el laboratorio, debido a la selectividad que se busca obtener en el sistema bioconjugado, sin embargo, también sería recomendable evaluar el desempeño del bioconjugado con el aislado proteico (Bio+Prot) *In vivo*.

6 Conclusiones

Se sintetizaron nanopartículas de plata por el método del poliol, a una temperatura de 70°C y 120 minutos de síntesis, que presentan plasmón superficial entre 423 y 428 nm.

La reacción de óxido-reducción que se da para pasivar la plata iónica provoca la oxidación del polietilenglicol (PEG), dejando un polímero con grupos funcionales carbonilo de aldehído y, también, grupos carboxílicos.

Se logró sintetizar nanotransportadores de AgNPs, a una concentración de 1.48 % de AgNPs en agua desionizada, por autoensamble, pH a 9 y 72 h de reposo, consiguiendo distribución monomodal y diámetro medio de 182,9±6,6 nm.

Se logró extraer aglutinina de soya a partir del frijol de soya (*Glycine max*), pero con algunas impurificaciones de otras proteínas como se pudo observar en el gel de electroforesis, en donde, para las muestras de la fracción T2 de la cromatografía de afinidad se presenta la banda de SBA, comparada con el control positivo, específicamente de sus subunidades, a un peso molecular aproximado de 30 000 Da.

La bioconjugación, de los nanotransportadores de AgNPs con la SBA comercial y la muestra extraída por cromatografía de afinidad se desarrolló en condiciones de temperatura de 9°C, agitación de 150 rpm, por un tiempo de 8 horas y pH de 5.8.

Se evaluó la toxicidad del nanotransportador de AgNPs bioconjugado, con SBA comercial y SBA purificada, en ensayos *In vitro*. Las dosis D1 de 59.30 µM de ambos bioconjugados muestran efectos citotóxicos en las células utilizadas (MDA-MB-231), siendo mayor la del bioconjugado con la SBA comercial. Por lo tanto, la bioconjugación de los nanotransportadores con la SBA comercial y con la proteína aislada del frijol de soya mejora la actividad citotóxica del nanotransportador, permitiendo una mayor disminución de la viabilidad celular cuando éste se encuentra bioconjugado.

7 Recomendaciones

Es necesario mejorar la técnica de purificación de la proteína, o utilizar otro método para conseguir el mayor porcentaje de pureza de la SBA.

Se recomienda evaluar diferentes condiciones de pH para la bioconjugación de los nanotransportadores de AgNPs con la proteína. De esta manera determinar la efectividad de bioconjugación.

Realizar estudios *In vitro* del bioconjugado con la proteína purificada en células normales y en líneas celulares de cáncer de mama.

Además, continuar la investigación del bioconjugado en estudios *In vivo*.

8 Referencias

- Adams, G. P., & Weiner, L. M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature biotechnology*, 23(9), 1147-1157.
- Adams, J., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337.
- Aguilar, Z. (2012). *Nanomaterials for medical applications*: Newnes.
- Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*, 14, 1-16.
- Algar, W. R., Prasuhn, D. E., Stewart, M. H., Jennings, T. L., Blanco-Canosa, J. B., Dawson, P. E., & Medintz, I. L. (2011). The controlled display of biomolecules on nanoparticles: a challenge suited to bioorthogonal chemistry. *Bioconjugate chemistry*, 22(5), 825-858.
- AmericanCancerSociety. (2014a). Cirugía para el cáncer de seno Retrieved Junio, 2015, from <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-tratamiento-cirugia>
- AmericanCancerSociety. (2014b). Radioterapia para el cáncer de seno Retrieved Junio, 2015, from <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-tratamiento-radiacion>
- AmericanCancerSociety. (2014c). Terapia dirigida para el cáncer de seno Retrieved Junio, 2015, from <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-tratamiento-terapia-dirigida>
- AmericanCancerSociety. (2014d). Terapia hormonal para el cáncer de seno Retrieved Junio, 2015, from <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-tratamiento-terapia-hormonal>
- AmericanCancerSociety. (2014e). Tipos generales de tratamiento para cáncer de seno Retrieved June, 2015, from <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-tratamiento-informacion-general>
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J., & Paknikar, K. (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies. *Toxicology letters*, 179(2), 93-100.
- AshaRani, P., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2008). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano*, 3(2), 279-290.
- Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(3), 247-289.
- Aubin-Tam, M.-E., & Hamad-Schifferli, K. (2008). Structure and function of nanoparticle–protein conjugates. *Biomedical Materials*, 3(3), 034001.
- Avvakumova, S., Colombo, M., Tortora, P., & Prospero, D. (2014). Biotechnological approaches toward nanoparticle biofunctionalization. *Trends in biotechnology*, 32(1), 11-20.
- Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Baniukevic, J., Boyaci, I. H., Bozkurt, A. G., Tamer, U., Ramanavicius, A., & Ramanaviciene, A. (2013). Magnetic gold nanoparticles in SERS-based sandwich immunoassay for antigen detection by well oriented antibodies. *Biosensors and Bioelectronics*, 43, 281-288.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Fridman, W.-H., Pagès, F., & Galon, J. (2010). Natural immunity to cancer in humans. *Current opinion in immunology*, 22(2), 215-222.
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 611-622.

- BreastCancer.org. (2013). Experimental Genomic Test May Estimate Risk of Recurrence for Some Women Retrieved June, 2015, from <http://www.breastcancer.org/research-news/20130719>
- Brennan, F. R., Shaw, L., Wing, M. G., & Robinson, C. (2004). Preclinical safety testing of biotechnology-derived pharmaceuticals. *Molecular biotechnology*, 27(1), 59-74.
- Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced drug delivery reviews*, 54(5), 631-651.
- Burkhardt, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Review Cancer*, 8, 671-682.
- Cancer Basics. (2014, Noviembre 8). *American Cancer Society*. Retrieved from <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>
- Cancer, I. A. f. R. o. (2008). GLOBOCAN 2008.
- Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K. L., Jones, R. L., & Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The journal of physical chemistry B*, 112(43), 13608-13619.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073-1081.
- DeSantis, C., Siegel, R., & Jemal, A. (2013). Breast cancer facts and figures 2013-2014. *American Cancer Society*, 1-38.
- Farokhzad, O. C., Jon, S., Khademhosseini, A., Tran, T.-N. T., LaVan, D. A., & Langer, R. (2004). Nanoparticle-aptamer bioconjugates a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer research*, 64(21), 7668-7672.
- Farokhzad, O. C., Karp, J. M., & Langer, R. (2006). Nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer targeting.
- Feron, O. (2009). Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and oncology*, 92(3), 329-333.
- Ferrari, M. (2005). Nanovector therapeutics. *Current opinion in chemical biology*, 9(4), 343-346.
- Ferrone, C., & Dranoff, G. (2010). Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 28(26), 4045-4051.
- Fiandra, L., Mazzucchelli, S., De Palma, C., Colombo, M., Allevi, R., Sommaruga, S., . . . Corsi, F. (2013). Assessing the in vivo targeting efficiency of multifunctional nanoconstructs bearing antibody-derived ligands. *ACS nano*, 7(7), 6092-6102.
- Fountain, D. W., & Yang, W.-K. (1977). Isolectins from soybean (*Glycine max*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 492(1), 176-185.
- Gerber, D. E. (2008). Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am Fam Physician*, 77(3), 311-319.
- Geyer, C. E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C. G., Pienkowski, T., . . . Kaufman, B. (2006). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 355(26), 2733-2743.
- Girish, C., Vijayalakshmi, P., Mentham, R., Rao, C. B., & Nama, S. (2014). A Review of Breast Cancer. *Int J Pharm Bio Sc*, 4(2), 47-54.
- Gu, F. X., Karnik, R., Wang, A. Z., Alexis, F., Levy-Nissenbaum, E., Hong, S., . . . Farokhzad, O. C. (2007). Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano today*, 2(3), 14-21.
- Guo, D., Zhu, L., Huang, Z., Zhou, H., Ge, Y., Ma, W., . . . Zhang, Y. (2013). Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions. *Biomaterials*, 34(32), 7884-7894.

- Gurunathan, S., Han, J. W., Dayem, A. A., Eppakayala, V., Park, J. H., Cho, S.-G., . . . Kim, J.-H. (2013). Green synthesis of anisotropic silver nanoparticles and its potential cytotoxicity in human breast cancer cells (MCF-7). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *19*(5), 1600-1605.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Eppakayala, V., Jeyaraj, M., & Kim, J.-H. (2013). Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *BioMed research international*, 2013.
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, *86*(3), 353-364.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*, 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*, 646-674.
- Hardee, M. E., Dewhirst, M. W., Agarwal, N., & Sorg, B. S. (2009). Novel imaging provides new insights into mechanisms of oxygen transport in tumors. *Current molecular medicine*, *9*(4), 435.
- Hou, Y., Qiao, R., Fang, F., Wang, X., Dong, C., Liu, K., . . . Wang, F. (2012). NaGdF₄ nanoparticle-based molecular probes for magnetic resonance imaging of intraperitoneal tumor xenografts in vivo. *ACS nano*, *7*(1), 330-338.
- Huang, M., Shen, A., Ding, J., & Geng, M. (2014). Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends in pharmacological sciences*, *35*(1), 41-50.
- Hudis, C. A. (2007). Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *New England Journal of Medicine*, *357*(1), 39-51.
- Jayasena, S. D. (1999). Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical chemistry*, *45*(9), 1628-1650.
- Jeyaraj, M., Rajesh, M., Arun, R., MubarakAli, D., Sathishkumar, G., Sivanandhan, G., . . . Thajuddin, N. (2013). An investigation on the cytotoxicity and caspase-mediated apoptotic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using Podophyllum hexandrum on human cervical carcinoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *102*, 708-717.
- Junttila, M. R., & Evan, G. I. (2009). p53—a Jack of all trades but master of none. *Nature Reviews Cancer*, *9*(11), 821-829.
- Kennedy, K. M., & Dewhirst, M. W. (2010). Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncology*, *6*(1), 127-148.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, *26*(4), 239-257.
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, *121*(1), 1-14.
- Kim, Y.-G., Oh, S.-K., & Crooks, R. M. (2004). Preparation and characterization of 1-2 nm dendrimer-encapsulated gold nanoparticles having very narrow size distributions. *Chemistry of materials*, *16*(1), 167-172.
- Kolb, H. C., Finn, M., & Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, *40*(11), 2004-2021.
- Kong, G., Braun, R. D., & Dewhirst, M. W. (2000). Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size. *Cancer research*, *60*(16), 4440-4445.
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L., & Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, *11*(5), 325-337.
- Langer, R., & Tirrell, D. A. (2004). Designing materials for biology and medicine. *Nature*, *428*(6982), 487-492.

- Larsson, E. L., & Mattiasson, B. (1996). Evaluation of affinity precipitation and a traditional affinity chromatographic procedure for purification of soybean lectin, from extracts of soya flour. *Journal of biotechnology*, 49(1), 189-199.
- Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A. F., Wang, A. Z., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2008). Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery. *Trends in biotechnology*, 26(8), 442-449.
- Lollo, G., Rodríguez, G. R., López, D. T., & Fernández, M. J. A. (2011). *Nanoterapias oncológicas: aplicaciones actuales y perspectivas futuras*. Paper presented at the Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Lotan, R., Siegelman, H. W., Lis, H., & Sharon, N. (1974). Subunit structure of soybean agglutinin. *Journal of Biological Chemistry*, 249(4), 1219-1224.
- Low, P. S., & Kularatne, S. A. (2009). Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Current opinion in chemical biology*, 13(3), 256-262.
- Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307-315.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Luo, C., Zhang, Y., Zeng, X., Zeng, Y., & Wang, Y. (2005). The role of poly (ethylene glycol) in the formation of silver nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 288(2), 444-448.
- Luo, J., Solimini, N. L., & Elledge, S. J. (2009). Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene. *Cell*, 823-837.
- Mahon, E., Salvati, A., Bombelli, F. B., Lynch, I., & Dawson, K. A. (2012). Designing the nanoparticle-biomolecule interface for "targeting and therapeutic delivery". *Journal of Controlled Release*, 161(2), 164-174.
- Mazzucchelli, S., Sommaruga, S., O'Donnell, M., Galeffi, P., Tortora, P., Prosperi, D., & Colombo, M. (2013). Dependence of nanoparticle-cell recognition efficiency on the surface orientation of scFv targeting ligands. *Biomaterials Science*, 1(7), 728-735.
- McCarthy, J. R., Bhaumik, J., Karver, M. R., Erdem, S. S., & Weissleder, R. (2010). Targeted nanoagents for the detection of cancers. *Molecular oncology*, 4(6), 511-528.
- McCarthy, J. R., Kelly, K. A., Sun, E. Y., & Weissleder, R. (2007). Targeted delivery of multifunctional magnetic nanoparticles.
- Medintz, I. (2006). Universal tools for biomolecular attachment to surfaces. *Nature materials*, 5(11), 842-842.
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., & Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 15(2), 117-134.
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Murray, J. C. (2001). Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological reviews*, 53(2), 283-318.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(3), 220-228.
- Ortega-Arroyo, L., Martin-Martinez, E. S., Aguilar-Mendez, M. A., Cruz-Orea, A., Hernandez-Pérez, I., & Glorieux, C. (2013). Green synthesis method of silver nanoparticles using starch as capping agent applied the methodology of surface response. *Starch - Stärke*, 65(9-10), 814-821. doi: 10.1002/star.201200255
- Owens, D. E., & Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 307(1), 93-102.

- Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M., Tartour, E., Sautes-Fridman, C., & Fridman, W. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8), 1093-1102.
- Palaniappan, P., Sathishkumar, G., & Sankar, R. (2015). Fabrication of nano-silver particles using *Cymodocea serrulata* and its cytotoxicity effect against human lung cancer A549 cells line. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 138, 885-890.
- Parkhouse, S. M., Garnett, M. C., & Chan, W. C. (2008). Targeting of polyamidoamine–DNA nanoparticles using the Staudinger ligation: Attachment of an RGD motif either before or after complexation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(13), 6641-6650.
- Pastoriza-Santos, I., & Liz-Marzán, L. M. (2002). Synthesis of silver nanoprisms in DMF. *Nano Letters*, 2(8), 903-905.
- Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H.-J., Fusenig, N., Nieto, M. A., & Cano, A. (2004). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *Journal of cell science*, 117(13), 2827-2839.
- Polito, L., Monti, D., Caneva, E., Delnevo, E., Russo, G., & Prosperi, D. (2008). One-step bioengineering of magnetic nanoparticles via a surface diazo transfer/azide–alkyne click reaction sequence. *Chemical communications*(5), 621-623.
- Polyak, K., & Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 265-273.
- Potter, V. R. (1958). *The biochemical approach to the cancer problem*. Paper presented at the Federation proceedings.
- Raica, M., Cimpean, A. M., & Ribatti, D. (2009). Angiogenesis in pre-malignant conditions. *European journal of cancer*, 45(11), 1924-1934.
- Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B. J., Oh, E., . . . Medintz, I. L. (2013). Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical reviews*, 113(3), 1904-2074.
- Saxon, E., & Bertozzi, C. R. (2000). Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *science*, 287(5460), 2007-2010.
- Semenza, G. L. (2008). Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *The Journal of clinical investigation*, 118(12), 3835.
- Shemetov, A. A., Nabiev, I., & Sukhanova, A. (2012). Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles. *ACS nano*, 6(6), 4585-4602.
- Society, A. C. (2015, 26/02/2015). Tipos de cáncer de seno Retrieved June, 2015, from <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-what-is-breast-cancer-types>
- Stewart, B. W., Wild, Christopher P. (2014). *World Cancer Report 2014*. Lyon: IARC Nonserial Publication.
- Sukirtha, R., Priyanka, K. M., Antony, J. J., Kamalakkannan, S., Thangam, R., Gunasekaran, P., . . . Achiraman, S. (2012). Cytotoxic effect of Green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. *Process Biochemistry*, 47(2), 273-279.
- Ta, H., Prabhu, S., Leitner, E., Jia, F., Von Elverfeldt, D., Jackson, K. E., . . . von Zur Muhlen, C. (2011). Enzymatic Single-Chain Antibody Tagging A Universal Approach to Targeted Molecular Imaging and Cell Homing in Cardiovascular Disease. *Circulation research*, 109(4), 365-373.
- Ta, H. T., Peter, K., & Hagemeyer, C. E. (2012). Enzymatic antibody tagging: toward a universal biocompatible targeting tool. *Trends in cardiovascular medicine*, 22(4), 105-111.

- Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*, 70(14), 5649-5669.
- Tannous, B. A., Grimm, J., Perry, K. F., Chen, J. W., Weissleder, R., & Breakefield, X. O. (2006). Metabolic biotinylation of cell surface receptors for in vivo imaging. *Nature methods*, 3(5), 391-396.
- Teng, M. W., Swann, J. B., Koebel, C. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *Journal of leukocyte biology*, 84(4), 988-993.
- Torcello-Gómez, A., Santander-Ortega, M. J., Peula-García, J. M., Maldonado-Valderrama, J., Gálvez-Ruiz, M. J., Ortega-Vinuesa, J. L., & Martín-Rodríguez, A. (2011). Adsorption of antibody onto Pluronic F68-covered nanoparticles: link with surface properties. *Soft Matter*, 7(18), 8450-8461.
- Vajdic, C. M., & van Leeuwen, M. T. (2009). Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *International journal of cancer*, 125(8), 1747-1754.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*, 324(5930), 1029-1033.
- Vretblad, P. (1976). Purification of lectins by biospecific affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 434(1), 169-176.
- Wang, A. Z., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2012). Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annual review of medicine*, 63, 185-198.
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology*, 8(6), 519-530.
- Weissleder, R., Kelly, K., Sun, E. Y., Shtatland, T., & Josephson, L. (2005). Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nature biotechnology*, 23(11), 1418-1423.
- WHO, W. H. O. (2013). Global Health Estimates (GHE).
- Wilson, D. S., & Szostak, J. W. (1999). In vitro selection of functional nucleic acids. *Annual review of biochemistry*, 68(1), 611-647.
- Willis, S. N., & Adams, J. M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Current opinion in cell biology*, 17(6), 617-625.
- World Health Organization. (2015, Febrero). WHO. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Yang, L., Mao, H., Wang, Y. A., Cao, Z., Peng, X., Wang, X., . . . Adams, G. (2009). Single chain epidermal growth factor receptor antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor targeting and imaging. *Small*, 5(2), 235-243.
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D. A., Torchilin, V. P., & Jain, R. K. (1995). Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer research*, 55(17), 3752-3756.
- Zhang, H., Ma, Y., & Sun, X. L. (2010). Recent developments in carbohydrate-decorated targeted drug/gene delivery. *Medicinal research reviews*, 30(2), 270-289.