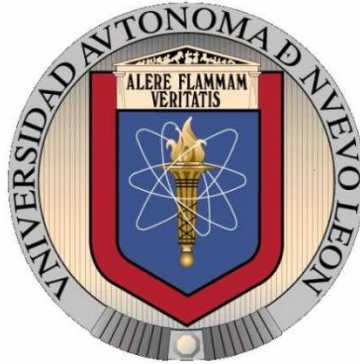


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFECTO CITOTÓXICO DE SOLUCIÓN DE PLATA LIBRE Y ENCAPSULADA EN
NANOPARTÍCULAS CONTRA EL LINFOMA TÍMICO MURINO L5178Y-R

Por

JOSÉ HORACIO LARA GONZÁLEZ

Como requisito para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Abril, 2012

EFFECTO CITOTÓXICO DE SOLUCIÓN DE PLATA LIBRE Y ENCAPSULADA
EN NANOPARTÍCULAS CONTRA EL LINFOMA TÍMICO MURINO L5178Y-R

Comité de Tesis

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

Dra. Patricia Tamez Guerra

Dr. Edgar Mendoza Gamboa

Dr. Moisés Armides Franco Molina

Dr. Pablo Zapata Benavides

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del comité de tesis (Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores, Dra. Patricia Tamez Guerra, Dr. Edgar Mendoza Gamboa, Dr. Moisés Armides Franco Molina y el Dr. Pablo Zapata Benavides): Por el apoyo otorgado en la evaluación de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT): Por el apoyo económico.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León: Por ser nuestro centro de formación y enseñanza.

DEDICATORIA

A todos los que me ayudaron a hacerlo posible:

A mi mamá por su incondicional apoyo, todo lo que he hecho en mi vida es gracias a ti, y has hecho por tus hijos tu sola lo que pocos padres podrían hacer juntos, ¡eres la mejor! igualmente a la sikis y a mi papá por haberme apoyado siempre en todo momento.

Al Dr. Ricardo Gómez, por su gran experiencia, apoyo, confianza, por ser un gran ejemplo y por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Patricia Tamez, por su comprensión, apoyo y sus valiosos consejos en los momentos más difíciles.

A todos los miembros del comité tutorial, nuevamente al Dr. Ricardo Gómez, la Dra. Patricia Tamez, el Dr. Edgar Mendoza el Dr. Moisés Franco y el Dr. Pablo Zapata, por sus importantes observaciones y por su participación en la revisión de tesis.'

A la Bióloga Enriqueta Monreal por su gran experiencia y apoyo técnico e igualmente a Humberto y Magda por sus recomendaciones con muchos de los experimentos y a la Dra. Diana Reséndez, Gini y Salomé por facilitarme el acceso al microscopio de fluorescencia.

A los pequeños blancos con ojos rojos, que dieron su vida para la realización de este trabajo, héroes y mártires de la ciencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante este período, y por darle la oportunidad a muchos jóvenes científicos de este país para seguir creciendo.

Y por supuesto, a Dios, por siempre darme la fuerza para seguir...

¡¡¡A todos Ustedes!!!

La perfección de la naturaleza pone en evidencia el producto de una fuerza suprema, y mientras sigan pasando cosas inexplicables para la ciencia Dios seguirá existiendo :)



LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Descripción de la línea celular L5178Y-R.....	17
II.	Grupos de tratamientos para ensayos <i>in vivo</i>	25

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estimación de citotoxicidad de los tratamientos de plata sobre la línea celular leucémica L5178Y-R <i>in vitro</i>	28
2. Efecto citotóxico/proliferativo de los tratamientos de plata sobre timocitos y células de bazo de ratón <i>in vitro</i>	31
3. Análisis de fragmentación de ADN en gel de agarosa.....	33
4. Análisis de detección de miembros de la familia de las caspasas por microscopía de fluorescencia.....	35
5. Porcentaje de animales vivos a lo largo del período de tratamiento y observación.....	36
6. Probabilidad de supervivencia obtenida por el método Kaplan-Meier a lo largo del período de tratamiento y observación.....	37
7. Probabilidad de supervivencia obtenida por el método actuarial (Cutler-Ederer) a lo largo del período de tratamiento y observación.....	38

NOMENCLATURA

Act D	Actinomicina D
<i>Ad libitum</i>	A placer
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Plata
ALL	Leucemia linfoblástica aguda del adulto
ATCC	Colección Norteamericana de Cultivos Celulares y Microbiológicos
BCR-ABL	Gen oncogénico de fusión Abelson y Breakpoint Cluster Region
CC₅₀	Concentración citotóxica 50
CD	Cúmulo de diferenciación
Con A	Concanavalina A
CL₅₀	Concentración letal 50
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
GIMEMA	Grupo Italiano para Enfermedades Hematológicas del Adulto
GMALL	Multicentro Alemán para ALL del adulto
h	hora
<i>In vitro</i>	Dentro del vidrio
<i>In vivo</i>	Dentro del organismo
LC₅₀	Concentración letal al 50%
MBA	Metilenobisacrilamida
min	minuto
mL	Mililitros
MT	Metaltioneína

MTT	Bromuro de 4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5 difeniltetrazoilo
NaCl	Cloruro de sodio
Ng	Nanogramos
Np	Nanopartículas
PEDF	Factor derivado del epitelio pigmentario
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
Pvp	Polivinilpirrolidona
Red-VAD-FMK	Inhibidor de caspasas activadas conjugado a rodamina
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SPSS	Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales
T-ALL	Leucemia linfoblástica aguda de células T
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
µg	Microgramos

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte y surge por mutaciones inducidas por agentes externos o por factores genéticos heredados y es necesario el desarrollo de nuevas terapias para tratarlo.

La plata es eficiente contra infecciones bacterianas, micóticas y las nanopartículas de plata ejercen un efecto antimicrobiano, antiviral y citotóxico antitumoral *in vitro*, pero no se ha investigado su efectividad para inhibir el crecimiento tumoral en fase pre-clínica. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antitumoral de nanopartículas de plata y plata ionizada sobre el crecimiento de la línea de linfoma L5178Y-R, y valorar su efectividad en fase pre-clínica. Para lo anterior se evaluaron los efectos de los tratamientos y controles por medio de ensayos de viabilidad en respuesta a distintas concentraciones, se comprobó el tipo de muerte celular en respuesta a los tratamientos y se evaluaron sus efectos en fase pre-clínica.

De acuerdo a los resultados mostrados *in vitro* la CL_{50} resultó 2.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la solución de plata ionizada y 26.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las nanopartículas, mientras que a esa misma concentración la solución de plata ionizada no indujo ningún efecto inhibitorio contra linfocitos sanos de timo y bazo, esto debido a que el índice de proliferación para ambos tipos de linfocitos fue igual a 1, manteniéndose este índice de inhibición incluso por encima de la concentración de 4.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Debido a esto podemos concluir que la plata ionizada presenta un mayor efecto citotóxico contra la línea de linfoma que contra ambos tipos de linfocitos sanos. Además, se demostró por primera vez la efectividad de ambos tratamientos para aumentar significativamente las distribuciones de supervivencia en un modelo tumoral *in vivo* al administrar los tratamientos al día 0 post-inducción. Con estos resultados se podrían abrir nuevas perspectivas a futuro para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, por medio de terapia formuladas a base de plata coloidal.

ABSTRACT

Cancer is one of the major death causes worldwide and arises from mutations induced by external agents or from genetic predisposition influence. New therapy approaches are required.

Silver is a potent antibacterial and antifungal agent, and silver nanoparticles have been reported to possess *in vitro* antimicrobial, antiviral and antitumor properties. However, no pre-clinical investigations to demonstrate tumor growth inhibition have been conducted to date. The aim of this study was to evaluate the antitumor potential of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles and ionic silver solution on the murine lymphoma cell line L5178Y-R in order to explore new insights in treating cancer cells with silver colloids *in vivo* in the near future. Concentration-response cell viability and apoptosis assays were performed *in vitro* and survival studies were done using a tumor-bearing mouse model.

According to these results, the *in vitro* LC₅₀ for ionic silver solution was 2.1 µg/mL and 26.74 µg/mL for pvp/Ag nanoparticles, whereas at this concentration silver ions showed no inhibitory response on healthy lymphocytes as the proliferation/inhibition index was close to 1 even at concentrations as high as 4.375 µg/mL. Hence, silver ions were effective on killing tumor cells without affecting normal lymphocytes at comparable concentrations. Furthermore, we demonstrated for the first time that both treatments increased the survival distributions response in an *in vivo* tumor model upon administration on day 0 post-induction. These results open further approaches on treating several types of cancer using silver colloids-based therapies.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
NOMENCLATURA.....	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	2
3. HIPÓTESIS.....	3
4. OBJETIVO GENERAL	4
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	5
6. ANTECEDENTES.....	6
6.1 Breve introducción al cáncer.....	6
6.2 La leucemia linfoblástica aguda del adulto, de linaje de células T (T-ALL).....	7
6.3 Tratamiento de la T-ALL (quimioterapia, trasplante de células madre y anticuerpos monoclonales).....	7
6.4 Pronóstico de la T-ALL y citogenética molecular.....	9
6.5 La plata coloidal.....	11
6.6 Metabolismo de la plata.....	12
6.7 Acarreamiento y entrega de fármacos por partículas nanométricas.....	13
6.8 Actividad biológica de los iones de plata y de las nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona.....	15

7. MATERIAL	Y
MÉTODOS.....	16
7.1 Material.....	16
7.1.1 Materiales y reactivos.....	16
7.1.2 Animales de experimentación.....	16
7.1.3 Línea celular.....	17
7.1.4 Fármacos empleados.....	17
7.2 Metodología.....	18
7.2.1 Estrategia experimental.....	18
7.2.2 Condiciones para el mantenimiento del cultivo.....	19
7.2.2.1 Mantenimiento <i>in vitro</i>	19
7.2.2.2 Mantenimiento <i>in vivo</i>	19
7.2.2.3 Congelación de la línea celular.....	19
7.2.2.4 Descongelación de la línea celular.....	20
7.2.2.5 Pruebas de citotoxicidad <i>in vitro</i>	20
7.2.2.6 Obtención de linfocitos de timo de ratón.....	21
7.2.2.7 Ensayo de reducción del MTT a linfocitos.....	21
7.2.2.8 Análisis de fragmentación de ADN en gel agarosa.....	22
7.2.2.9 Análisis de detección de miembros de la familia de las caspasas por microscopía de fluorescencia.....	23
7.2.2.10 Fase pre-clínica.....	24
7.2.2.11 Análisis estadísticos.....	26
8. RESULTADOS.....	27
8.1 Pruebas de citotoxicidad <i>in vitro</i>	27
8.2 Pruebas de linfoproliferación.....	29
8.3 Análisis de fragmentación de ADN en gel agarosa.....	32
8.4 Análisis de detección de miembros de la familia de las caspasas por microscopía de fluorescencia.....	34
8.5 Fase pre-clínica.....	36
9. DISCUSIÓN.....	39
10. CONCLUSIONES.....	46
APÉNDICES.....	49
Análisis de supervivencia por el método Kaplan-Meier.....	49
Análisis de supervivencia por el método Cutler-Ederer (método actuarial).....	58

Comparación de curvas de supervivencia por el método log-rank.....	67
Determinación de las concentraciones letales medias por análisis de regresión PROBIT.....	77
LITERATURA CITADA.....	81
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	89

1. INTRODUCCIÓN:

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, sólo durante 2007 causó 7.9 millones de muertes (alrededor del 13% de las muertes ocurridas). El cáncer surge de un cambio genético en una célula, este cambio puede ser iniciado por agentes externos y por factores genéticos heredados. Las muertes por cáncer siguen en aumento constante (World Health Organization, 2009).

En la leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) se presentan algunas complicaciones con las terapias usadas actualmente como por ejemplo el incremento en el riesgo de septicemias e infecciones fúngicas (Hurwitz *et al.*, 2000), la probabilidad ineficiente de alcanzar una remisión completa (Annino *et al.*, 2002) la incidencia de neutropenias severas después de varios ciclos de quimioterapia subsecuentes (Gökbuget y Hoelzer 2002) y la incapacidad de determinar en algunos casos un trasplante de células madres exitoso aunado a la cuestión de si todos los pacientes con apropiado donador consanguíneo deberían recibir trasplante alogénico o si esto debería estar reservado solamente para pacientes de alto riesgo (Hoelzer *et al.*, 1992). Lo anterior plantea la preocupación de seguir probando nuevos tipos de agentes quimioterapéuticos contra la T-ALL y en general contra otros tipos de cáncer.

Se ha reportado anteriormente la actividad bactericida, bacteriostática (Kim *et al.*, 2007) y virucida (Lara *et al.*, 2010) de partículas coloidales y nanopartículas de plata, y se ha demostrado su actividad citotóxica *in vitro* contra algunas líneas de tumor (Lara *et al.*, 2010). Sin embargo, hasta ahora no se ha investigado la efectividad que esta pudiera tener al inhibir el crecimiento de líneas tumorales en fase pre-clínica (pruebas en animales).

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN:

Se requiere desarrollar nuevos fármacos quimioterapéuticos que permitan enfocar nuevas perspectivas para tratar los diversos tipos de cáncer. Se ha reportado anteriormente la actividad bactericida, bacteriostática y virucida de partículas coloidales y nanopartículas de plata, esto demuestra que la plata coloidal tiene un efecto antimicrobiano; de igual manera se ha demostrado su actividad citotóxica *in vitro* contra algunas líneas de tumor. Sin embargo, hasta ahora no se han hecho investigaciones de la efectividad que esta pudiera tener al inhibir el crecimiento de líneas tumorales *in vivo*. Por lo tanto, el demostrar su efectividad al inducir remisión y comparar los resultados con sus respectivos controles nos permitirá en un futuro poder considerar a la plata coloidal como un posible agente farmacológico antitumoral.

3. HIPÓTESIS:

Las nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona y la solución de plata ionizada presentan un efecto citotóxico sobre las células de linfoma L5178Y-R *in vivo* e *in vitro*.

4. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la actividad de plata libre y encapsulada en nanopartículas sobre el crecimiento del linfoma L5178Y-R *in vitro* e *in vivo*.

5. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la CL_{50} (dosis letal para el 50% de la población celular) de plata libre y encapsulada en nanopartículas sobre el crecimiento del linfoma L5178Y-R *in vitro*.
- Determinar el potencial proliferativo/inhibitorio de plata libre y encapsulada en nanopartículas contra linfocitos sanos de timo y bazo de ratón.
- Determinar el tipo de muerte celular que la plata libre y la encapsulada en nanopartículas inducen en células L5178Y-R.
- Evaluar a nivel pre-clínico la respuesta citotóxica de la plata libre y la encapsulada en nanopartículas en ratones con linfoma inducido con células L5178Y-R.

6. ANTECEDENTES:

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, y representó 7.9 millones de muertes (alrededor del 13% del total) en el 2007. El cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama representan la mayoría de los casos de mortalidad anual. El cáncer surge de un cambio genético en una célula; este cambio puede ser iniciado por agentes externos y por factores genéticos heredados. Como dato epidemiológico se sabe que cerca del 72% de las muertes por cáncer en 2007 ocurrieron en países subdesarrollados y en desarrollo. Las muertes por cáncer siguen en aumento constante, con un estimado de 12 millones de muertes para el año 2030 (World Health Organization, 2009). Otros términos empleados para referirse al cáncer son tumores malignos y neoplasmas. Una característica del cáncer es la creación rápida de células anormales, que crecen más allá de sus límites usuales y pueden entonces invadir partes adyacentes del cuerpo y diseminarse a otros órganos. Este proceso se conoce como metástasis. La metástasis es la causa principal de muerte por cáncer. El cáncer surge de una célula única. La transformación de una célula normal a una célula de tumor es un proceso con múltiples estadios, típicamente una progresión de una lesión pre-cancerosa a tumores malignos. Estos cambios son resultado de la interacción de los factores de predisposición genética de la persona y algunas categorías de agentes externos: carcinógenos físicos tales como radiación ultravioleta y ionizante, carcinógenos químicos tales como el asbesto, componentes del humo del tabaco, aflatoxina (una toxina producida por hongos presentes en granos) y arsénico (un contaminante que puede estar presente en agua potable), potenciales inductores carcinógenos biológicos tales como la infección de ciertos virus, bacterias o parásitos, como por ejemplo la infección por virus de la hepatitis B en el caso de cáncer de hígado, el virus del papiloma humano en el caso del cáncer cervical, el virus de inmunodeficiencia adquirida en el caso del sarcoma de Kaposi, *Helicobacter pylori* en el caso de cáncer de estómago y la enfermedad parasitaria esquistosomiasis en el caso de cáncer de vejiga. El envejecimiento es otro factor fundamental para el desarrollo de cáncer. La incidencia del cáncer surge dramáticamente con la edad. La acumulación general de riesgos se combina

con la tendencia de los mecanismos de reparación celular que se vuelven menos efectivos a medida que una persona envejece. El uso de alcohol y tabaco, la baja ingesta de frutas y vegetales, además de infecciones microbianas ya mencionadas son factores que conllevan al desarrollo de cáncer en países de medio y bajos recursos. En especial el cáncer cervical, que es causado por el virus de papiloma humano es una causa de cáncer entre mujeres de países de bajos recursos. En países de ingresos altos, el uso de alcohol, tabaco y el sobrepeso son los factores de riesgo principales para el cáncer (World Health Organization, 2009).

La leucemia linfoblástica aguda del adulto (ALL), de linaje de células T (T-ALL) representa el 25% de todos los casos de leucemia linfoblástica aguda en adultos. Usando regímenes quimioterapéuticos estándar, la supervivencia a largo plazo libre de enfermedad queda limitada solamente al 32-46% de los pacientes (Hoelzer *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 2004). En la ALL parece, sin embargo, que con la intensificación de la quimioterapia, más trasplante de células madres la oportunidad de mejoría en el pronóstico es limitada. Esto se debe particularmente a que la alta proporción de pacientes adultos mayores no están cubiertos en muchos procesos. Debido a esto es una fortuna que en los últimos años nuevas modalidades de tratamientos han ido apareciendo (Hoelzer y Gökbuget, 2000).

La dexametasona es usada en vez de la prednisona debido a que ejerce actividad antileucémica más alta hacia la enfermedad sistémica pero también incrementa los niveles del fármaco en el fluido cerebro-espinal. El uso extensivo de la dexametasona puede, no obstante, estar asociado con un incremento en el riesgo de septicemias e infecciones fúngicas (Hurwitz *et al.*, 2000), las cuáles se pueden evitar si se reducen el tiempo de aplicación y la dosis. En varias pruebas no al azar se han alcanzado altas tasas de remisión completa (85-91%) con regímenes que incluyen pretratamiento con ciclofosfamida (Larson *et al.*, 1998; Kantarjian *et al.*, 2000), particularmente en T-ALL del adulto (Hoelzer *et al.*, 1990). El rol de la ciclofosfamida, generalmente administrada al comienzo de la terapia de inducción ha sido evaluado en varios estudios. Un estudio al azar por el grupo italiano GIMEMA comparó una terapia de inducción por 3 fármacos

con y sin ciclofosfamida no mostrando diferencia alguna en términos de tasa de remisión completa (81% vs 82%) (Annino *et al.*, 2002). La terapia de inducción con altas dosis de citarabina se ha usado en varias pruebas para alcanzar actividad antileucémica más alta y además la profilaxis del sistema nervioso central sin radiación craneal. La aplicación de antemano antes de la quimioterapia convencional produce altas tasas de remisión completa que la aplicación posterior, lo cual se atribuye a una alta mortalidad por inducción. Sin embargo, cualquier tipo de terapia de inducción con altas dosis de citarabina conlleva a un incremento en la incidencia de severas neutropenias después de varios ciclos de quimioterapia subsecuentes (Gökbuget y Hoelzer 2002). La terapia post-inducción consiste principalmente de terapia de consolidación rotacional intensiva, altas dosis de ciclos de quimioterapia y trasplante de células madre. Pruebas que implementan terapia multi-fármaco intensiva de consolidación tienen generalmente resultados superiores (27-36%), en comparación con las pruebas sin consolidación (25%) (Hoelzer y Gökbuget 2000). Esto también fue confirmado en estudios únicos al azar (Durrant *et al.*, 1997), pero no en todos (Annino *et al.*, 2002; Ribera *et al.*, 1998). Programar la dosis terapéutica (más intensa antes que después) puede que juegue un papel importante en el progreso de la enfermedad. La quimioterapia a altas dosis, principalmente de citarabina y metotrexato se ha usado para superar el problema de fármaco resistencia y para alcanzar niveles terapéuticos en el fluido cerebroespinal. La impresión general es que la inclusión de altas dosis de citarabina, de metotrexato o ambas puede que sea beneficioso, particularmente si se incluyen en regímenes con quimioterapia de dosis convencionales rotacionales intensivas, con tasas de supervivencia libre de leucemia de más del 40%, pero todo en series pequeñas (Hoelzer y Gökbuget 2000). El trasplante de células madre de injertos de médula ósea y de células madre de sangre periférica es una parte esencial del tratamiento de consolidación en ALL del adulto. La cuestión es si todos los pacientes en la primera remisión completa con apropiado donador consanguíneo deberían recibir trasplante de células madre alogénico o si esto debería estar reservado para pacientes con rasgos de alto riesgo. Además, se necesita determinar el valor de un trasplante exitoso de células madres no relacionadas, el cual puede estar asociado con una tasa más baja de recaída, trasplante de células madre autólogas, y nuevos enfoques tales como trasplante no miceloablatoivo, nuevos regímenes de acondicionamiento (con anticuerpos radio

etiquetados e infusiones de leucocitos de donador). Varios estudios recientes y en proceso incluyen el trasplante temprano de células madres (principalmente de donadores relacionados) pero hasta ahora no se ha demostrado que este enfoque tenga un impacto en resultados generales (Hoelzer *et al.*, 1992). Todos los blastos en la ALL expresan una variedad de antígenos específicos tales como CD20, CD19, CD22, CD33 y CD52 que pueden servir como blancos para el tratamiento con anticuerpos monoclonales. Sin embargo, este tipo de tratamiento no es una terapia establecida en la ALL del adulto. Un pre-requisito para la terapia con anticuerpos es la presencia del antígeno blanco en al menos 20-30% de las células blastos. CD20, definido como expresión en más del 20% de los blastos, esta expresado en más de un tercio de los blastos de ALL precursores de células B, particularmente en los pacientes de edad avanzada (40-50%), y en la mayoría de los blastos de ALL de células B maduras (80-90%) (Hoelzer y Gökbuget 2000). Esto proporciona una explicación a explorar el potencial del tratamiento con Rituximat (anti-CD20) en la ALL de precursor de células B, ALL de células B maduras, y linfoma de Burkitt.

La ALL de linaje de células T comprende los subtipos T-ALL temprana tímica (T-ALL cortical), y la T-ALL madura. La ALL está caracterizada por altas cuentas de células blancas en el diagnóstico, los tumores mediastínicos (50%) y con involucramiento del sistema nervioso central (8%) y una tasa más alta de recaídas del sistema nervioso central (10%). Frecuentemente los pacientes con T-ALL presentan grandes masas tumorales y muestran progresión rápida en el diagnóstico y recaída. Sin embargo, hay pocas recaídas después de 3 años o más del diagnóstico. En los estudios del Multicentro Alemán para ALL del adulto (GMALL) el factor pronóstico más relevante en la ALL del adulto fue el subtipo inmunológico con supervivencia libre de leucemia inferior (menos de 30%) para la T-ALL temprana y T-ALL madura en comparación con T-ALL tímica (cortical) (más del 50-60%) (Hoelzer *et al.*, 1999). Los pacientes con T-ALL, tanto niños como adultos, hace dos décadas tenían un mal pronóstico; la media de duración de la remisión era 10 meses o menos, con supervivencia libre de leucemia de menos del 10%. Con regímenes de tratamiento recientes, se pueden alcanzar tasas de remisión completa de más del 80% y una supervivencia libre de leucemia del 46% o más

en adultos (Hoelzer y Gökbuget 2000). La ciclofosfamida y citarabina son aparentemente fármacos importantes en la T-ALL (Hoelzer *et al.*, 1990). La citogenética/genética molecular demuestra que las más frecuentes aberraciones citogenéticas en la ALL del adulto son la translocación 9;22 del gen oncogénico de fusión Abelson y Breakpoint Cluster Region [t(9;22)/BCR-ABL] y la translocación 4;11 de los genes ALL1-AF4 [t(4;11)/ALL1-AF4], están asociadas con un pronóstico desfavorable (20-30% y 6% respectivamente). El impacto del pronóstico de otras aberraciones está menos claro. Debido a esto -7, +8 y la hipodiploidia ALL se han reportado como subgrupos de pronóstico desfavorable mientras que un resultado favorable se ha detectado para la translocación t(10;14) y para un cariotipo hiperdiploide alto (Wetzler *et al.*, 1999; Charrin 1996). El Grupo B Corporativo para Cáncer y Leucemia ha sugerido una estratificación en tres subgrupos pronósticos: poco favorable [incluye t(9;22), t(4;11), -7, y +8], diploidia normal y aberraciones estructurales misceláneas con tasas de supervivencia libre de leucemia de 11%, 38% y 52%, respectivamente (Wetzler *et al.*, 1999). No obstante, la pregunta de si las anomalías genéticas y las aberraciones tales como mutaciones de p53, p15/16 son factores pronósticos independientes porque algunos de ellos están asociados con ciertos subtipos inmunológicos, permanece abierta. Otros factores de pronósticos adversos en la ALL del adulto son las características clínicas del paciente como por ejemplo edad mayor a 50 años y cuentas altas de células blancas, los inmunofenotipos Pro B (linfocitos B CD10-) linfocitos T inmaduros (CD1a⁻ y sCD3⁺) y linfocitos T maduros (CD1a⁻ y sCD3⁻) y los factores relacionados con la respuesta al tratamiento como el alcance tardío de la remisión completa mayor a 3 semanas y la presencia de enfermedad mínima residual. Los pacientes sin ninguno de los factores de riesgo mencionados se definen según el GMALL como pacientes con riesgo estándar, de igual manera los pacientes con uno o más factores de riesgo se definen como con alto riesgo, los pacientes positivos para la translocación Ph/BCR-ABL son asignados como grupo de muy alto riesgo, debido a que son elegibles para nuevos enfoques de tratamiento experimentales tales como los inhibidores de la tirosina-kinasa (Gökbuget *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 1994). La supervivencia por 5 años de remisión completa fue de 55%, 36 y 20 % para los tres grupos respectivamente. Como consecuencia, los pacientes con riesgo estándar

no son candidatos para el trasplante de células madres en los estudios del GMALL, mientras que esto está claramente indicado en pacientes con características de alto riesgo. Sin embargo, en otros estudios todos los pacientes fueron tratados uniformemente, incluso con trasplante de células madre alogénico en la primera remisión completa para todos los pacientes con donador (Rowe *et al.*, 1999; Thiebaut *et al.*, 2000). La evaluación de la tasa molecular de remisión completa de la terapia de inducción y la estratificación de riesgos de la enfermedad mínima residual en las pruebas actuales del GMALL puede servir como ejemplo para aplicación práctica. Un análisis preliminar del estudio 06/99 del GMALL demostró que la tasa de remisiones moleculares definida como negativa para enfermedad mínima residual con una sensibilidad menor a 10^{-4} se alcanza en menos de la mitad de los pacientes con riesgo estándar alto en ALL de células B y en cerca del 60% de los pacientes con ALL de células T. Esto se correlaciona con el riesgo más alto de recaída en la ALL de células B en comparación con la ALL de células T. En la ALL positiva para Ph/BCR-ABL solamente el 4% de los pacientes alcanza valores negativos de enfermedad mínima residual, lo cual se alinea con la muy alta tasa de recaída en este subgrupo (Brueggemann *et al.*, 2001). En la leucemia positiva para Ph/BCR-ABL el gen de fusión bcr-abl se considera esencial para la transformación leucémica. Con un inhibidor selectivo de la tirosina-kinasa Abl (ST1571, Imatinib, Gleevec®) la proliferación celular de células de ALL positivas para BCR-ABL se puede inhibir selectivamente (Druker *et al.*, 2001).

La plata es el elemento químico número 47 de la tabla periódica, su peso atómico es de 107.87, algunas de sus propiedades físicas son el punto de fusión y ebullición, 961.78°C y 2162°C, respectivamente. Desde siglos remotos, la plata ha mostrado ser eficiente contra infecciones bacterianas y micóticas. El primer registro del uso de la plata con fines medicinales data en el siglo XVIII; su precio actual (de acuerdo a la cotización de la Asociación del Mercado de Metales Preciosos de Londres para el día 1 de Abril de 2012), es de \$1.043 dólares por gramo y con los avances de la tecnología se ha logrado obtener diferentes productos de este metal. Uno de ellos es la plata coloidal ionizada, la cual es el resultado de un proceso electrolítico que se lleva a cabo en agua destilada que

atrae partículas submicroscópicas de plata, es una solución que contiene partículas de plata dentro del rango de 0.01 a 0.001, las cuales permanecen suspendidas debido a que se encuentran eléctricamente cargadas (Wadhera 2005).

El transporte celular de la plata coloidal es vía pinocitosis, en donde la captación no selectiva de solutos disueltos son llevados al interior celular; en este punto la membrana comienza a dar formación a una vesícula que se desprende de la membrana y entra al citosol donde comienza a fusionarse con lisosomas que metabolizan la plata coloidal engullida (Essner y Haimes, 1977). El metabolismo de la plata es modulada por la inducción y unión a metalotioneínas. Las metalotioneínas (MTs), son proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa) con capacidad de ligar metales pesados, y son inducibles por agentes oxidantes, inflamación y estrés (Carrasco-Trancoso, 2000). Investigaciones en astrositos tratados con naftazarín para inducir estrés oxidativo, revelaron que la enzima lactato deshidrogenasa es bloqueada o inhibida cuando las células son tratadas con plata coloidal (Kim *et al.*, 2007). Por otro lado, se han realizado investigaciones en cuanto a la posibilidad de que la plata fuera un elemento carcinogénico, encontrándose que bajo las condiciones estudiadas la plata se comportaba como un metal noble y no carcinogénico (Furst y Schlauder, 1978). Los efectos adversos ocasionados por la plata dependen de la dosis, tiempo y vía de administración. En general, la población está expuesta a bajos niveles de plata presentes en los alimentos, agua y aire, encontrándose de 1×10^{-6} mg/m³ en el aire, 0.2-0.3 ppm en suelo y un máximo de 50 ppb en agua potable. La agencia de protección ambiental (EPA), sugiere una dosis oral de 5 mg/kg. Sin embargo, existen casos clínicos de personas que ingirieron plata coloidal ionizada muy por encima de la dosis recomendada por la EPA, presentando argiria, la cual es una condición asociada con la exposición crónica a productos que contienen plata, causada por el depósito de partículas de plata en piel, membranas mucosas y en órganos internos, causando una coloración grisácea en la piel, sobre todo en áreas expuestas al sol. Cabe mencionar que este padecimiento es causado por una ingestión regular de plata coloidal por períodos prolongados, pero sobre todo por las altas concentraciones administradas (450mg/L, por 10 meses). La mayor proporción de plata coloidal ingerida es absorbida en el intestino delgado y es eliminada por el sistema renal y gastrointestinal (Lansdown, 2006). Se ha

determinado que la plata coloidal ionizada administrada oralmente en agua para beber a dosis de 0.03 $\mu\text{g}/250\text{ mL}$ a una frecuencia de cada 4 días durante 14 meses no produce argiria, mortalidad, infertilidad ni es inductor de efectos teratogénicos en ratones durante el período de ingesta. Los hallazgos patológicos en piel, riñones e hígado no demuestran daños ni acumulación de partículas de plata en sus tejidos (tesis de licenciatura de Crystel Aleyvick Sierra Rivera).

Las partículas de tamaño nanométrico popularmente conocidas como nanopartículas presentan diferentes rangos de tamaño para diferentes personas. Algunos investigadores han considerado las partículas coloidales sólidas de diámetro entre 10 y 1000 nm (Kreuter, 1983; Allemann *et al.*, 1993) como nanopartículas mientras que otros han usado términos como nanofase y nanoestructuras para referirse a partículas de 100 nm o menores (Gurav *et al.*, 1993). Otros han usado el término para referirse a partículas con diámetros de 50 nm o menos (David *et al.*, 1997). Las partículas poliméricas cargadas con fármacos han sido extensivamente investigadas dirigiéndolas tanto a tejidos, células y organelos celulares. Sus aplicaciones se espera que sean por vía inyectable, oral, ocular y nasal. Estas partículas como acarreadoras de fármacos o acarreadoras de moléculas traza se presentan como nanoesferas sólidas donde las sustancias activas se encuentran incorporadas ya sea dentro de las esferas o absorbidas en sus superficies o ambas. También se presentan como nanocápsulas donde las sustancias activas se encuentran incorporadas en el núcleo o han sido cargadas en la superficie por absorción física o enlaces químicos (Allemann *et al.*, 1993). La entrega sitio-dirigida del fármaco es aún bastante empírica y los métodos disponibles son considerablemente imperfectos, los polímeros no tóxicos en nanotamaño en la entrega de fármaco controlada están sin embargo jugando un rol importante y ha surgido la hipótesis de que el fármaco debe de ser entregado en proporciones que mantengan su actividad terapéutica óptima en los sitios activos, así mismo los efectos laterales se deben minimizar al máximo (Mill y Davis, 1987). Se considera que la entrega de fármacos por nanoacarreadores poliméricos ayuda a reducir las reacciones adversas y efectos laterales. Los acarreadores poliméricos deben de tener ciertas características: 1) Deben de ser compatibles con el cuerpo en términos de adaptabilidad (no tóxico o antigénico) y deberá ser biodegradable, 2) deben

preservar y proteger el fármaco y no deberá liberarlo sino hasta que alcance el sitio de acción, 3) no deben de interactuar o tener efectos nocivos en las células del cuerpo o tejidos, 4) deben ser capaces de ser permeables en las membranas correspondientes, 5) deben de reconocer los sitios de acción y deberán unirse o asociarse con estos, 6) los fármacos deberán ser liberados en proporciones en las que se alcancen los efectos terapéuticos deseados de forma continua, y 7) después de la liberación del fármaco las partículas deberán ser degradadas o eliminadas del cuerpo (Mill y Davis, 1987; Davis *et al.*, 1985; Jalil y Nixon, 1990). Los acarreadores poliméricos de fármacos que se han diseñado entregan los fármacos por uno o más de los tres mecanismos físico-químicos: 1) por el hinchamiento de las partículas de polímero mediado por hidratación seguido por liberación por medio de difusión, 2) por una reacción enzimática que conlleva a una ruptura, 3) liberando al fármaco del núcleo interno, o 4) por rompimiento del fármaco del polímero y su liberación de las nanopartículas hinchadas. Tras la inyección de un nanosistema polimérico, el destino de la partícula dentro del cuerpo será gobernado por su tamaño, forma, carga superficial y las características hidrofóbicas o hidrofílicas de superficie (Langer, 1994, 1998). El mayor reto en el desarrollo de acarreadores de fármacos particulados y poliméricos ha sido crear condiciones para que las partículas puedan evadir los mecanismos inmunológicos tales como el sistema retículo-endotelial al ir circulando por el cuerpo (Frier, 1981; Bradfield, 1984). Se ha encontrado que el polímero polivinilpirrolidona entrecruzado por medio del agente N-N' metilenobisacrilamida (MBA) engloba efectivamente moléculas comparativamente grandes como las inmunoglobulinas bovinas y moléculas antigénicas de *Aspergillus fumigatus* o moléculas marcadoras como FIT-Dx (masa molecular 19.3 kDa). Estas nanopartículas englobadas son no tóxicas y presentan respuesta antigénica satisfactoria en ratones. Este sistema de nanopartículas poliméricas hidrofílicas de polivinilpirrolidona con entrecruzamiento controlado por MBA sostiene el potencial para englobar diferentes moléculas bio-activas solubles en agua de masa molecular de 5 kDa o más; estas partículas englobadas tienen la posibilidad de dirigirse como objetivo a los tejidos corporales, especialmente a células de tumor (Ghosh, 2000.) Estas nanopartículas no son fácilmente eliminadas por el sistema retículo-endotelial, en contraste con la mayoría de las nanopartículas presentemente disponibles que son

ampliamente hidrofóbicas en sus características de superficie. Estas nanopartículas hidrofílicas poliméricas no son apropiadas para englobar sustancias bio-activas insolubles en agua (Gaur *et al.*, 2000) pero engloban fármacos que pueden ser efectivamente esterilizados por simple filtración por membrana debido a su pequeño tamaño y pueden ser presentados como productos liofilizados. Después del procesamiento estos productos retienen los fármacos englobados al ser reconstituidos y pueden ser administradas por vía inyectable (Ghosh, 2000).

Se ha reportado que las partículas coloidales y nanopartículas de plata (100nm) ejercen un efecto bacteriostático y bactericida potencial, con investigaciones en *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados han sugerido que las partículas coloidales de plata inhiben y causan muerte de estos microorganismos, dependiente de concentración, mostrando así que la plata coloidal posee un efecto antimicrobiano (Kim *et al.*, 2007). La acción antimicrobiana de la plata (Ag^+) es proporcional a los iones de plata biológicamente activos liberados y que son capaces de interactuar con las membranas celulares bacterianas y fúngicas. La plata es un metal ácido de Lewis blando, debido a que la carga que posee es baja (Ag^+). La plata metálica y los compuestos inorgánicos de la plata ionizan en presencia de agua, fluidos corporales o exudado de los tejidos; desnaturaliza proteínas por la unión a los grupos reactivos, inactiva enzimas reaccionando con grupos sulfhidrilo, amino, carboxilo, imidazol y disminuye la actividad de lactato deshidrogenasa y glutatión peroxidasa, interaccionan con las bases del ADN (adenina, guanina, citosina y timina), por lo cual son utilizadas como ligandos moleculares debido a su importancia biológica (Basu *et al.*, 2008; Garner *et al.*, 1994). La sulfadiazina de plata y nitrato de plata son sales que ejercen su efecto antimicrobiano a través de sus iones de plata (McDonnell y Russell 1999.). Ambas sales inhiben la infección por VIH-1 *in vitro*. Sin embargo sus índices terapéuticos son 12 veces más bajos que el de las nanopartículas de plata, lo cual indica que los iones de plata por si mismos tienen una eficiencia mas baja que las nanopartículas. Las nanopartículas de plata ejercen una actividad anti VIH en un estadio temprano de la replicación, más probablemente como un agente virucida o como inhibidor de la entrada. Las nanopartículas de plata se unen a gp120 en una forma que previene la unión

del virión dependiente de CD4, la fusión y la infectividad, actuando como un agente virucida efectivo contra los virus extracelulares y virus asociados a las células. Además, las nanopartículas de plata inhiben los estadios post-entrada del ciclo de vida del VIH-1. Anteriormente, se han definido por medio de ensayos basados en la luciferasa, las concentraciones citotóxicas medias (CC_{50}) de las nanopartículas de plata coloidal recubiertas de polivinilpirrolidona. Estas se han calculado como 3.9 ± 1.6 mg/mL contra células HeLa-CD4-LTR-b-gal, 1.11 ± 0.32 mg/mL contra células mononucleares de sangre periférica y 1.3 ± 0.58 mg/mL contra la línea de células linfoides humana MT-2 (Lara *et al.*, 2010).

7. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1. Material.

7.1.1. Materiales y reactivos.

La solución de penicilina-estreptomina, L-glutamina, fungizona, medio AIM-V y medio RPMI 1640 se obtuvieron de Life Technologies (Grand Island NY). El suero fetal bovino (SFB), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoilo (MTT), Conavalina A (Con A), dimetil sulfóxido (DMSO), dodecilsulfato de sodio (SDS) y filtros milipore de 0.22 μ m se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los reactivos no especificados se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a los más altos grados de pureza.

7.1.2. Animales de experimentación.

Se utilizó el modelo murino debido a su mantenimiento poco costoso y de fácil manipulación, se emplearon ratones hembra de la cepa Balb/c (Harlan Sprague Dawley Inc., Indianápolis, IN) para evitar niveles elevados de estrés en la población debido a la agresividad mostrada por machos de esta cepa al competir por las hembras (DeFries y McClearn 1970). La edad de los ratones empleados fue de 4-6 semanas. Se mantuvieron

en un ambiente libre de patógenos y de estrés a 24°C, bajo un ciclo de luz-oscuridad (fase lumínica 7:00-19:00 horas, y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*).

7.1.3. Línea celular.

La línea celular se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection, 1994). Esta línea celular deriva de un tumor de timo inducido con metilcolantreno, en ratones DBA/2. Las células fueron adaptadas a crecimiento *in vitro*, en una suspensión celular llamada L5178Y-R (Tabla 1).

Tipo	Células de linfoblastoma tímico murino
Tejido	Linfoide
Origen	Timo de ratón DBA/2
Crecimiento	Suspensión
Procedencia	ATCC
Características	Esta línea celular se deriva del linfoma tímico L5178 inducido por metilcolantreno en un ratón DBA/2. Las células son resistentes a los rayos X, pero sensibles a la radiación ultravioleta, calor y a algunos fármacos potenciales antineoplásicos. Después 6 años a 3 años en cultivo, la línea se convierte a un estado sensible a rayos X.
Aplicaciones	Análisis de citotoxicidad.

Tabla 1. Descripción de la línea celular L5178Y-R

7.1.4. Fármacos empleados.

Los tratamientos a probar fueron plata coloidal ionizada (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), y nanopartículas de plata coloidal de 30-50 nm de diámetro recubiertas al 0.2% con polivinilpirrolidona (Nanoamor, Houston, TX, USA), ambos inyectados vía intramuscular.

7.2. Metodología.

7.2.1. Estrategia experimental.

Para cubrir nuestros objetivos específicos, primeramente se calculó la CL_{50} para ambos tratamientos *in vitro* mediante el método de diluciones seriadas en placa de 96 pozos y detectando viabilidad mediante MTT. Posteriormente se investigó si los tratamientos inducían una respuesta proliferativa o inhibitoria en linfocitos sanos de ratón, esto se hizo incubando una suspensión celular a distintas dosis de los tratamientos en presencia o en ausencia del mitógeno concanavalina A y obteniendo el índice de viabilidad a las diferentes concentraciones dividiendo el porcentaje de viabilidad permitido por el tratamiento entre el porcentaje de viabilidad del cultivo control de células sin tratamiento. Para determinar el tipo de muerte celular inducido por los tratamientos se purificó el ADN de células que anteriormente habían sido incubadas con los tratamientos a concentraciones citotóxicas (30 $\mu\text{g/mL}$), el ADN se separó por electroforesis en gel agarosa y se buscó un patrón fragmentado característico de muerte por apoptosis, así mismo se determinó si los tratamientos inducían la transcripción de algún miembro de la familia de las proteínas caspasas para descartar o comprobar que los tratamientos indujeran muerte por apoptosis en la línea celular, para esto se utilizó el kit “CaspGLOW Red Active Caspase Staining”, cual utiliza el inhibidor de caspasas Red-VAD-FMK conjugado a sulfo-rodamina, que en presencia de caspasas se une irreversiblemente a estas y emite una señal de fluorescencia de color rojo.. Finalmente se investigó la efectividad de los tratamientos para inducir remisión en ratones con tumor inducido. Para esto se administraron los tratamientos cada segundo día a una dosis de 20 mg/kg durante 30 días por vía intramuscular en ratones con tumor intramuscular. A lo largo del período de tratamiento se monitoreó si se presentaba remisión o muerte, se midió 3 veces por semana el volumen de masa tumoral y peso corporal de los ratones. Una vez terminado el período de tratamiento se determinó el tiempo de sobrevida, o si se presentaba remisión completa.

7.2.2. Condiciones para el mantenimiento del cultivo.

7.2.2.1. Mantenimiento *in vitro*.

Las células L5178Y-R se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado de la misma casa comercial, 2 mM glutamina (GibcoBRI, Grand Island, NY, USA) y antibióticos (0.5% de solución penicilina-estreptomicina, 0.1% de fungizona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda, conteniendo un 5% de CO₂ en frascos de 25 cm³ (Corning, New York, NY, USA).

7.2.2.2. Mantenimiento *in vivo*.

Para el mantenimiento del linfoma *in vivo* se utilizaron ratones hembra Balb/c (H-2^d), que se inocularon vía intraperitoneal en la parte media de la región ventral abdominal con la suspensión (0.2 mL) de la línea tumoral L5178Y-R, a una concentración de 5x10⁶ células/mL en buffer de fosfatos salino (PBS).

De 12 a 15 días posteriores a la inoculación, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el líquido ascítico y se colectó en tubos cónicos de 50 mL con tapón de rosca (Corning, New York, NY, USA) en 10 mL de PBS a pH 7.2 (se mantuvieron en frío durante la colección del líquido peritoneal para mantener viables las células del linfoma). Las células se lavaron por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente en 10 mL de PBS. A continuación se realizó una dilución de la muestra para cuenta celular y cuenta viable con azul tripan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

7.2.2.3. Congelación de la línea celular.

Para asegurar la disponibilidad de la línea en el laboratorio, se congelaron muestras (stocks) de aproximadamente 2x10⁷ células/mL, para lo cual las células se concentraron

mediante centrifugación a 1800 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el concentrado celular se resuspendió en una solución de 70% medio de cultivo, 20% SFB y 10% DMSO como anticongelante que impide la formación de cristales de agua en el interior de las células manteniendo la integridad celular, y se dispensó 1 mL por criotubo (Corning); este material se almacenó a -80°C durante una semana y después se guardó en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento en que fue requerido.

7.2.2.4.Descongelación de la línea celular.

Al descongelar cada uno de los stocks de células se aseguró una alícuota para congelar de nuevo, este procedimiento tiene como objetivo eliminar el medio de congelación, que contiene DMSO, pues esta molécula resulta tóxica para las células en crecimiento. Para ello se descongeló el criotubo rápidamente y una vez descongelado, el volumen de células se transfirió a un tubo con 5 mL de medio de cultivo frío y se procedió a centrifugar 5 min a 1800 rpm, posterior a esto se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo previamente atemperado a 37°C en un frasco de 25 cm^3 y se dejó en incubación a 37°C atmósfera húmeda con 5% CO_2 .

7.2.2.5.Pruebas de citotoxicidad *in vitro*.

La efectividad de los tratamientos se evaluó por medio del ensayo dosis-respuesta tomando lecturas de absorbancia en placa a partir de cultivos en placas de 96 pozos. Dichas lecturas se obtuvieron a partir del rendimiento de toxicidad/viabilidad permitido a través de una serie de diluciones, obteniendo así una estimación cercana de la CL_{50} .

Se utilizó la línea celular L5178Y-R y linfocitos normales de timo de ratón como control, ambas fueron sembradas en placas de 96 pozos de fondo plano en $200\ \mu\text{L}$ de medio por pozo obteniendo una suspensión celular de 5000 células por pozo, y el medio se suplementó con nanopartículas de plata coloidal recubiertas por polivinilpirrolidona y plata coloidal ionizada a distintas concentraciones, se incubó por 44 h a $37\ ^{\circ}\text{C}$ en una

atmósfera de CO₂ al 5%, posteriormente se añadió 13 µL de MTT a una concentración de 0.5 mg/mL, el MTT es un tetrazol amarillo, el cual es reducido a azul formazán en células vivientes y permite detectar la presencia de células muertas, se añadieron 100 µL de amortiguador de lisis celular incubando por 16 horas más, posteriormente se tomaron las lecturas de absorbancia a 570 nm de longitud de onda, con ayuda de un lector de microplacas (DTX 880 Multimode detector, Becton Dickinson, Austria). Los tratamientos y controles utilizados fueron los que a continuación se describen:

Tratamientos:

- Plata coloidal ionizada
- Nanopartículas de plata coloidal protegidas superficialmente con polivinilpirrolidona.

Controles:

- Medio RPMI-1640 sin tratamiento.

7.2.2.6.Obtención de linfocitos de timo de ratón.

Una vez sacrificados los animales por dislocación cervical se procedió a remover el timo inmediatamente. Se preparó una suspensión unicelular al disgregar el timo en medio RPMI 1640 suplementado con una solución 0.5% de penicilina-estreptomicina (RPMI completo). Esta suspensión se lavó tres veces en este mismo medio, y las células finales se resuspendieron y ajustaron a una densidad de 10⁷ células/mL en medio RPMI-1640.

7.2.2.7.Ensayo de reducción del MTT por linfocitos normales.

Se determinó la reducción de MTT por las células en un cultivo. Como se describió previamente, se preparó una suspensión celular del timo y otra de bazo en medio RPMI-1640, y se ajustó a 10⁷ células/mL. Alícuotas de 100 µL/pozo de esta suspensión se depositaron en placas de 96 pozos de fondo plano las cuales contenían cultivos por

tiplicado (100 μ L/pozo) de medio RPMI-1640, el cual sirvió como control no estimulado, o bien cultivos por triplicado con Con A a concentraciones óptimas y subóptimas (0.6, 1.2 y 2.4 μ g/mL), para estimular la proliferación de linfocitos, todo esto en presencia o ausencia de los tratamientos en un rango de concentraciones de 0 a 0.5 mg/mL para las nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona y 0 a 35 μ g/mL para la solución de plata ionizada.

Después de incubar por 44 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire, se añadió MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a una concentración final de 0.5 mg/mL, y los cultivos se incubaron por cuatro horas adicionales. Se añadieron 100 μ L de buffer para lisis celular (50% de DNF + 50% SDS al 20%) a cada pozo, y se incubaron durante toda la noche. Al terminar esta incubación, se leyeron las densidades ópticas a 540 nm en un lector de microplacas (DTX 880 Multimode detector, Becton Dickinson, Austria).

7.2.2.8. Análisis de fragmentación de ADN en gel agarosa.

El tipo de muerte celular se determinó por análisis de fragmentación de ADN, las células se incubaron por 6 h con los tratamientos a 30 μ g/mL y con los respectivos controles *in vitro*, finalizado el tiempo de incubación las células se colectaron y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min, posteriormente se lavaron con PBS y el concentrado celular fue lisado utilizando 0.5 mL de buffer (100 mM Tris HCl pH 8.5, 0.5 M EDTA, 2% SDS, 5M NaCl y 20 mg/mL de proteinasa K) durante 2 h a 37 °C en agitación de 500 rpm, después se adicionó 0.5 mL de isopropanol agitando 30 min a 37°C a 450 rpm, con el fin de precipitar el ADN, se tomó el precipitado, se colocó en un tubo nuevo con 0.3 mL de buffer (Tris HCl 10 mM y EDTA 0.1 M pH 7.5) y se agitó de 12 a 16 h para disolver el precipitado (Laird *et al.*, 1991).

El extracto de ADN se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, se utilizó buffer SB para el corrimiento electroforético a 70 V durante 20 min y 110 V

durante 1 h, una vez finalizada la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 5 ng/mL y las fotografías se documentaron bajo luz ultravioleta.

Tratamientos:

- Plata coloidal ionizada.
- Nanopartículas de plata coloidal recubiertas con polivinilpirrolidona.

Controles:

- Actinomicina D 1 µg/mL .
- Medio RPMI-1640 sin tratamiento
- Medio sin células

7.2.2.9. Análisis de detección de miembros de la familia de las caspasas por microscopía de fluorescencia.

Para determinar si los tratamientos inducían la transcripción de algún miembro de la familia de las proteínas caspasas y descartar que los tratamientos indujeran muerte por apoptosis en la línea celular L5178Y-R se utilizó el kit “CaspGLOW Red Active Caspase Staining”. Los tratamientos fueron incubados por 6 h con los tratamientos a concentraciones citotóxicas (30 µg/mL) en placas de 24 pozos de fondo plano en 1 mL de medio RPMI-1640. Se tomaron 30 µL del cultivo inducido y los cultivos control en tubos Eppendorf. Se añadió 1 µL del inhibidor de los miembros de la familia de las caspasas conjugado a sulfo-rodamina Red-VAD-FMK a cada tubo y se incubó por 30 minutos a 37 °C al 5% de CO₂ . Se centrifugaron las células a 3000 rpm por 5 min y se removió el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 0.5 mL de buffer de lavado y se centrifugó de nuevo repitiendo posteriormente el lavado. Posteriormente se resuspendieron las muestras en 100 µL de buffer de lavado. Se colocó una gota de la suspensión celular de cada muestra en un portaobjetos y se cubrió con un portaobjetos. Se observaron las muestras bajo el microscopio de fluorescencia usando el filtro de rodamina.

Tratamientos:

- Plata coloidal ionizada.
- Nanopartículas de plata coloidal recubiertas con polivinilpirrolidona.

Controles:

- Actinomicina D 2.5µg/mL .
- Medio RPM1-1640 sin células, sin tratamiento.
- Células sin tratar.

7.2.2.10. Fase pre-clínica.

Se formaron 8 grupos de 5 ratones cada grupo y a 5 de estos ocho grupos se les indujo un tumor intramuscular L5178Y-R en el muslo derecho. A los 3 grupos restantes de ratones no se les indujo tumor, y estos conformaron el grupo control de ratones sin crecimiento tumoral sin tratar y los controles de toxicidad para ambos tratamientos. Primeramente se registró el peso de los ratones antes de llevar a cabo la inducción del tumor y el período de tratamiento. Posteriormente se indujo un tumor intramuscular inyectando 0.2 mL de células ajustadas a una concentración de 5×10^7 /mL suspendidas en PBS en los 5 grupos correspondientes (Tabla 2).

A los 7 días post-inducción del tumor se comenzaron a administrar los tratamientos cada tercer día durante 20 días por vía intramuscular en el tejido adyacente al tumor en el mismo músculo donde se indujo el tumor en las dosis indicadas en la tabla 1. A lo largo del período de tratamiento los ratones se pesaron diariamente y se monitoreó el número de ratones muertos.

Así mismo, se observó cualquier cambio en el aspecto del tumor y tejidos adyacentes. Después de terminado el período de tratamiento (30 días) se suspendió la administración de los tratamientos. Entonces se monitoreó por 35 días adicionales si los ratones presentaron remisión completa, recaída o muerte.

Grupo	Tratamiento	Descripción del tratamiento	Dosis
I	Control negativo	Ratones sin crecimiento tumoral sin tratar	
II	Tratamiento	Solución de plata ionizada en ratones con tumor tratados a los 0 días post-inducción	20 mg/kg por vía intramuscular, cada 2 días.
III	Tratamiento	Nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona en ratones con tumor tratados a los 0 días post-inducción	20 mg/kg por vía intramuscular, cada 2 días.
IV	Tratamiento	Solución de plata ionizada en ratones con tumor tratados a los 7 días post-inducción	20 mg/kg por vía intramuscular, cada 2 días.
V	Tratamiento	Nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona en ratones con tumor tratados a los 7 días post-inducción	20 mg/kg por vía intramuscular, cada 2 días.
VI	Control positivo	Vincristina	0.05 mg/kg por vía intramuscular, cada 3 días.
VII	Control de toxicidad 1	Nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona administradas a ratones sanos sin tumor	20 mg/kg por vía intramuscular, cada 2 días
VIII	Control de toxicidad 2	Solución de plata ionizada administrada a ratones sanos sin tumor	20 mg/kg por vía intramuscular, cada 2 días.
IX	Control positivo de crecimiento tumoral	Ratones con tumor sin tratar	

Tabla 2. Grupos de tratamientos para ensayo *in vivo*.

7.2.2.11. Análisis estadísticos.

Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con ayuda del Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS de sus siglas en inglés). Para calcular la CL_{50} se realizó un análisis de regresión PROBIT en el que se obtuvo una recta a partir de la nube de puntos construida a partir de la curva de citotoxicidad y se obtuvo la CL_{50} por medio de la ecuación de la recta. Se calcularon las distribuciones de supervivencia *in vivo* por medio de los análisis Kaplan-Meier y Cutler-Ederer. Así mismo se realizaron contrastes de hipótesis de comparación de curvas de supervivencia por el método log-rank.

8. RESULTADOS:

8.1. Pruebas de citotoxicidad *in vitro*.

Para poder determinar la CL_{50} *in vitro* se estimó una curva de citotoxicidad, la cual resultó de las lecturas de absorbancia de cultivos células L5178Y-R tratadas con los compuestos de plata. Esto nos permitió calcular el porcentaje de citotoxicidad para ambos tratamientos (Figura 1). La CL_{50} de las nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona se definió como 26.74 $\mu\text{g/mL}$ y 2.1 $\mu\text{g/ml}$ para la solución de plata ionizada por medio de un análisis de regresión PROBIT (apéndice D).

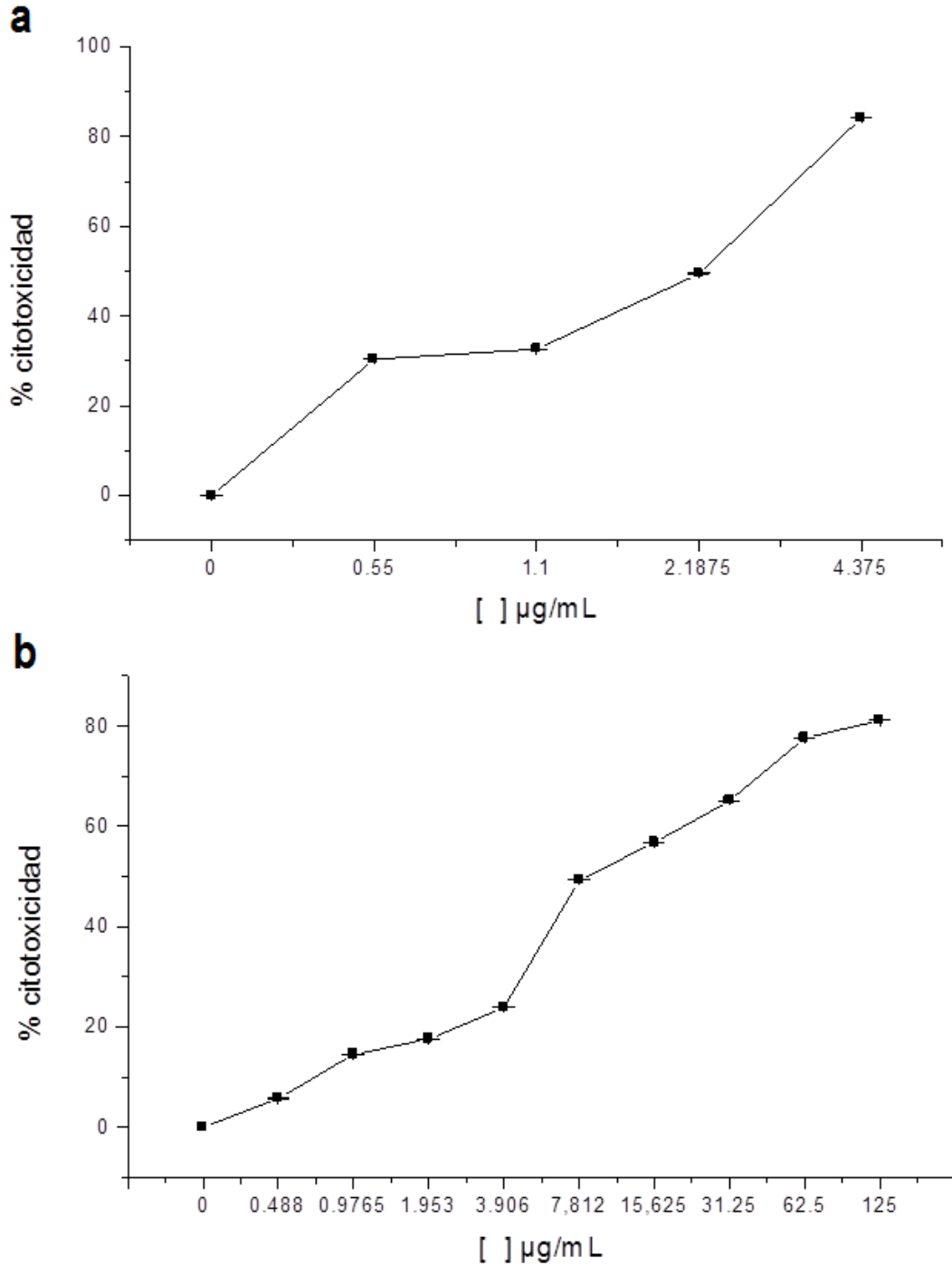


Figura 1. Estimación de citotoxicidad de los tratamientos de plata contra la línea celular leucémica L5178Y-R. La suspensión celular (5×10^4 células/mL) se incubó por 48 h en presencia de los tratamientos a diferentes concentraciones (0-0.5 mg/mL para nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona y 0-35 $\mu\text{g/mL}$ para la plata ionizada), el porcentaje de toxicidad celular se calculó por medio del ensayo colorimétrico de MTT, las densidades ópticas se leyeron a 570 nm. (a) Nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona. (b) Solución de plata ionizada.

8.2. Pruebas de linfoproliferación.

Para evaluar la respuesta inhibitoria/proliferativa en células no cancerosas, linfocitos de timo y bazo de ratón se ajustaron a las concentraciones en la sección de material y método y se evaluó la reducción de MTT en cultivos *in vitro*. Las células fueron crecidas en presencia de los tratamientos a diferentes concentraciones y presencia de concanavalina A a una concentración de 2.4 $\mu\text{g/mL}$, o solamente en presencia de los tratamientos a las mismas concentraciones (control no estimulado) (Figura 2). Nuestros resultados indican que los tratamientos probados no muestran estimulación proliferativa sobre los linfocitos sanos. Además, las lecturas de absorbancia en todos los casos fueron más altas en los cultivos estimulados en comparación con los no estimulados. Esta diferencia entre ambos grupos sugiere la falta de actividad linfoproliferativa.

Después de tratar los cultivos con nanopartículas de pvp/Ag, y basándose en los bajos índices de proliferación mostrados (Figura 2 a, b), una respuesta inhibitoria se observó para ambos tipos de linfocitos por encima de la concentración de 3.9 $\mu\text{g/mL}$, los índices de proliferación/inhibición para las células de bazo fueron 0.73, 0.64, 0.38, 0.26, 0.09 y 0.05 para las concentraciones 3.9, 7.82, 15.63, 31, 62.5 y 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, también se observaron niveles de inhibición en el caso de linfocitos preactivados con concanavalina A por encima de la concentración de 15.63 $\mu\text{g/mL}$, los índices de proliferación de esplenocitos en este caso fueron 0.63, 0.29, 0.07 y 0.05 para las concentraciones más altas probadas, respectivamente (Figura 2 a). Los índices de proliferación para timocitos tratados con nanopartículas pvp/Ag fueron 0.78, 0.72, 0.46, 0.34, 0.04 y 0.039 para las concentraciones más altas probadas, y de la misma manera en el caso de los cultivos estimulados con concanavalina A los índices de proliferación fueron 0.69, 0.4, 0.041 y 0.048 para las concentraciones 15.63, 31, 62.5 y 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 2 b).

Después de tratar los cultivos con solución de plata ionizada, y basándose en los bajos índices de proliferación mostrados (Figura 2 c, d), una respuesta de tipo inhibitoria se observó para ambos tipos de linfocitos por encima de la concentración de 4.375 $\mu\text{g/mL}$,

los índices de proliferación para esplenocitos fueron 0.79, 0.56, 0.41 y 0.1 para las concentraciones 4.375, 8.75, 17.5, y 35 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, también se observaron niveles de inhibición en el caso de linfocitos preactivados con concanavalina A a las mismas concentraciones de los tratamientos, los índices de proliferación de esplenocitos en este caso fueron 0.87, 0.78, 0.37 y 0.04 para las concentraciones más altas probadas, respectivamente (Figura 2 c). Los índices de proliferación para timocitos tratados con solución de plata ionizada fueron 0.89, 0.83, 0.77 y 0.41 para las concentraciones más altas probadas, y de la misma manera en el caso de los cultivos estimulados con concanavalina A los índices de proliferación fueron 1.41, 1.46, 1.01 y 0.34 para las concentraciones más altas probadas (Figura 2 d).

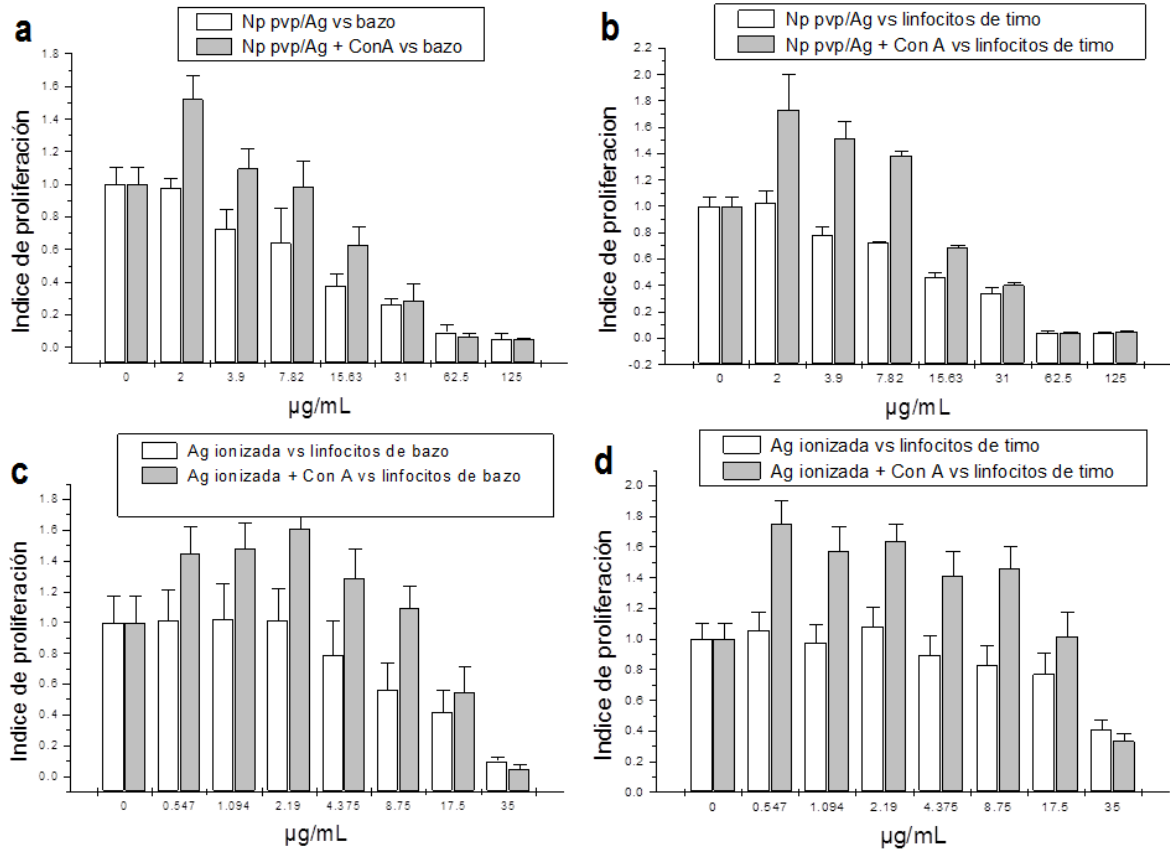


Figura 2. Efecto citotóxico/proliferativo *in vitro* de los tratamientos de plata sobre timocitos y esplenocitos de ratón. Después de que los ratones fueron sacrificados el timo y el bazo fueron removidos. Se prepararon suspensiones celulares después de disgregar los órganos en medio RPMI-1640, las células fueron resuspendidas y ajustadas a las densidades apropiadas. La suspensión celular fue depositada en microplacas de 96 pozos de fondo plano (100 µl/pozo), los cuales contenían cultivos en triplicado de medio RPMI-1640 (control no estimulado), o cultivos estimulados con concanavalina A a una concentración de 2.4 µg/mL y en presencia de los tratamientos. Los cultivos se incubaron por 44 h a 37 °C, se agregó MTT y los cultivos fueron incubados por 4 h adicionales. Se agregó buffer de lisis a cada pozo (100 µL/pozo) y los cultivos se incubaron durante toda la noche. Se midieron las densidades ópticas a una longitud de onda de 570 nanómetros. (a) Nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona + linfocitos esplénicos, (b) Nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona + linfocitos tímicos. (c) Plata ionizada + linfocitos esplénicos. (d) Plata ionizada + linfocitos tímicos.

8.3. Análisis de fragmentación de ADN en gel agarosa.

Para dilucidar el tipo de muerte celular inducido por los tratamientos se incubaron las células con los tratamientos a concentraciones citotóxicas y posteriormente se purificó el ADN, y este se separó por electroforesis en gel agarosa. Se observa para ambos tratamientos un patrón en barrido de muerte posiblemente por necrosis (Figura 3). En el carril del control negativo de células con medio sin tratamiento y en el de células tratadas con nanopartículas de polivinilpirrolidona/Ag y plata ionizada se observa en la parte superior del corrimiento un barrido muy marcado, por otro lado a esta misma altura del corrimiento en el carril del control positivo para apoptosis de actinomicina D este barrido está ausente y se observa muy poca cantidad de ADN a este nivel, esto pone en evidencia que en este carril de actinomicina D casi no hay fragmentos de ADN de gran tamaño molecular y la mayor parte migra hacia la parte inferior, donde se observan bandas segmentadas, esto es característico de muerte por apoptosis. Esta marcada diferencia entre el control con actinomicina D pone en evidencia que los tratamientos inducen muerte por necrosis. La ausencia del barrido en el control de actinomicina D en la parte superior confirma la diferencia que hay entre el tratamiento y el control para inducir muerte celular.

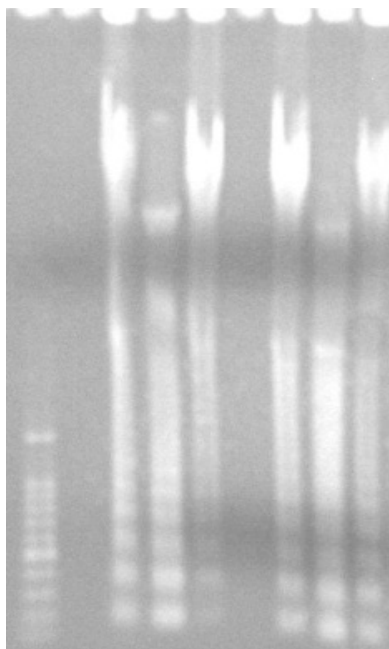


Figura 3. Análisis de fragmentación de ADN en gel agarosa. Después de haber incubado suspensiones celulares con los tratamientos a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se procedió a purificar el ADN y separarlo por electroforesis en gel agarosa, se observa para ambos tratamientos un patrón de ADN característico de muerte por necrosis. De izquierda a derecha: Carril 1: Marcador molecular de ADN. Carril 2: Control negativo de contaminación (medio solo sin células). Carril 3: Control negativo de células sin tratar. Carril 4: Control positivo para apoptosis de células tratadas con Act D a una concentración de 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Carril 5: Células tratada con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de solución de plata ionizada. Carril 6: Control negativo de contaminación (medio solo sin células). Carril 7 Control negativo de células sin tratar. Carril 8: Control positivo para apoptosis de células tratadas con Act D a una concentración de 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Carril 9: Células tratadas con suspensión de nanopartículas polivinilpirrolidona/Ag a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

8.4. Análisis de detección de miembros de la familia de las caspasas por microscopía de fluorescencia.

Para confirmar si los tratamientos inducían la transcripción de algún miembro de la familia de las proteínas caspasas y descartar que los tratamientos indujeran muerte por apoptosis en la línea celular L5178Y-R se utilizó el kit “CaspGLOW Red Active Caspase Staining”. No se observó la presencia aumentada de algún miembro de la familia de las caspasas en células tratadas con ambos tratamientos (células muertas por los tratamientos a una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$), la presencia de proteínas caspasas fue considerablemente igual al que se observó en células vivas no tratadas, y se observó una diferencia muy marcada en los cultivos del control positivo para apoptosis tratados con Actinomicina D (Figura 4).

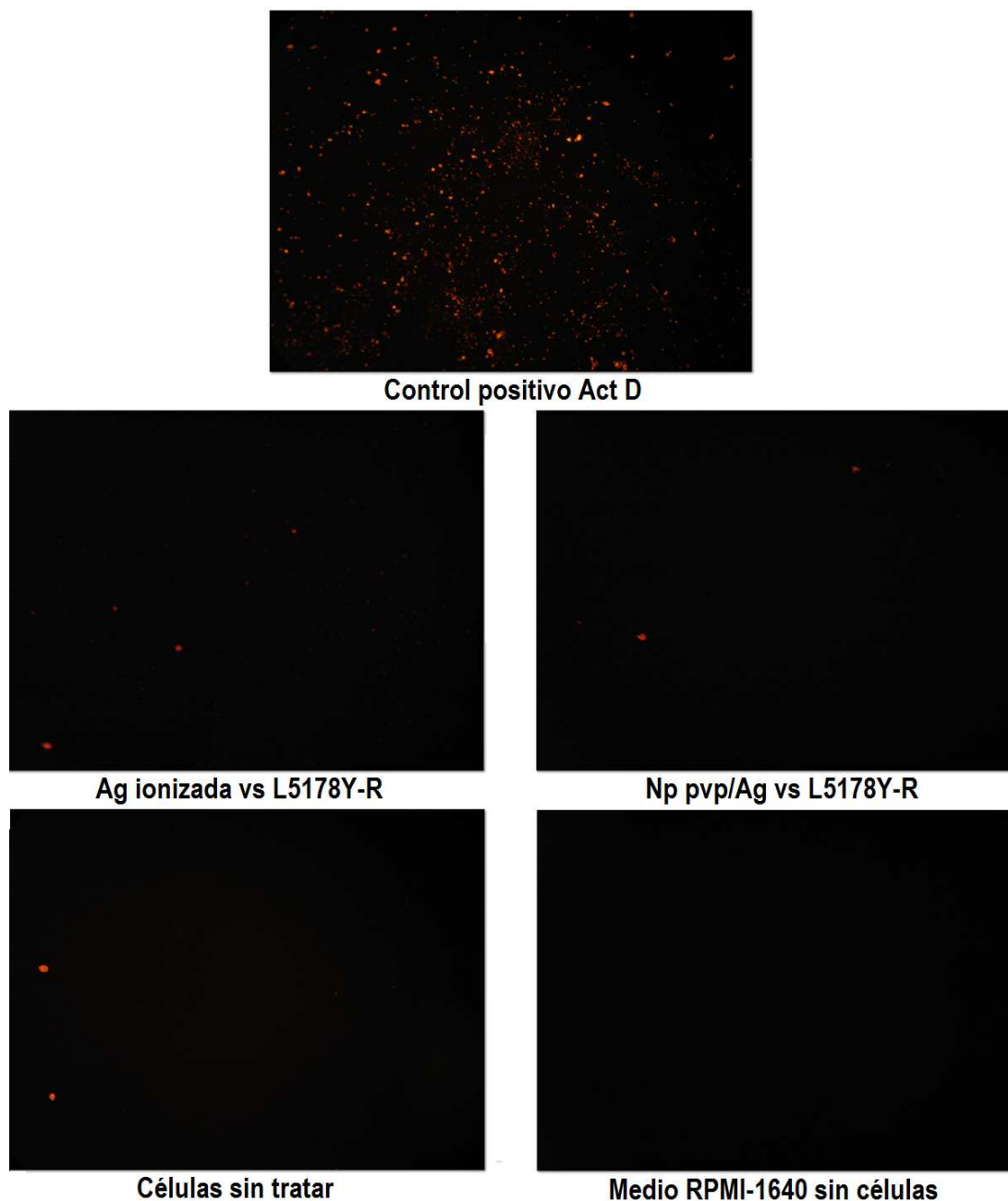


Figura 4. Análisis de detección de miembros de la familia de las caspasas por microscopía de fluorescencia. Las células de las 5 imágenes (contando la imagen de medio RPMI-1640 sin células) fueron tratadas con el inhibidor de caspasas Red-VAD-FMK conjugado a sulfo-rodamina, que en presencia de caspasas se une irreversiblemente a estas y emite una señal de fluorescencia de color rojo. De izquierda a derecha: Control positivo de apoptosis de células tratadas con Actinomicina D (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Células L5178Y-R tratadas con solución de Ag ionizada a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *in vitro*. Células L5178Y-R tratadas con nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *in vitro*. Control negativo de células sin tratar. Control negativo de medio RPMI-1640 sin células sin tratar.

8.5.Fase pre-clínica.

Ambos tratamientos inducen un aumento en las distribuciones de supervivencia en un modelo animal de linfoma murino, siendo este aumento en la supervivencia significativamente mayor en comparación con el grupo control con tumor sin tratar considerando un margen de error estadístico del 10% para las nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona y del 2.5% para la solución de plata ionizada (apéndice C), y estos tratamientos fueron efectivos en aumentar la distribución de supervivencia en animales que iniciaron su tratamiento en el día 0 post-inducción. Así mismo los tratamientos indujeron una mejor respuesta en la supervivencia en comparación con la vincristina administrada a los 7 días post-inducción, la cual es un agente quimioterápico utilizado en la leucemia aguda (Figuras 5, 6 y 7).

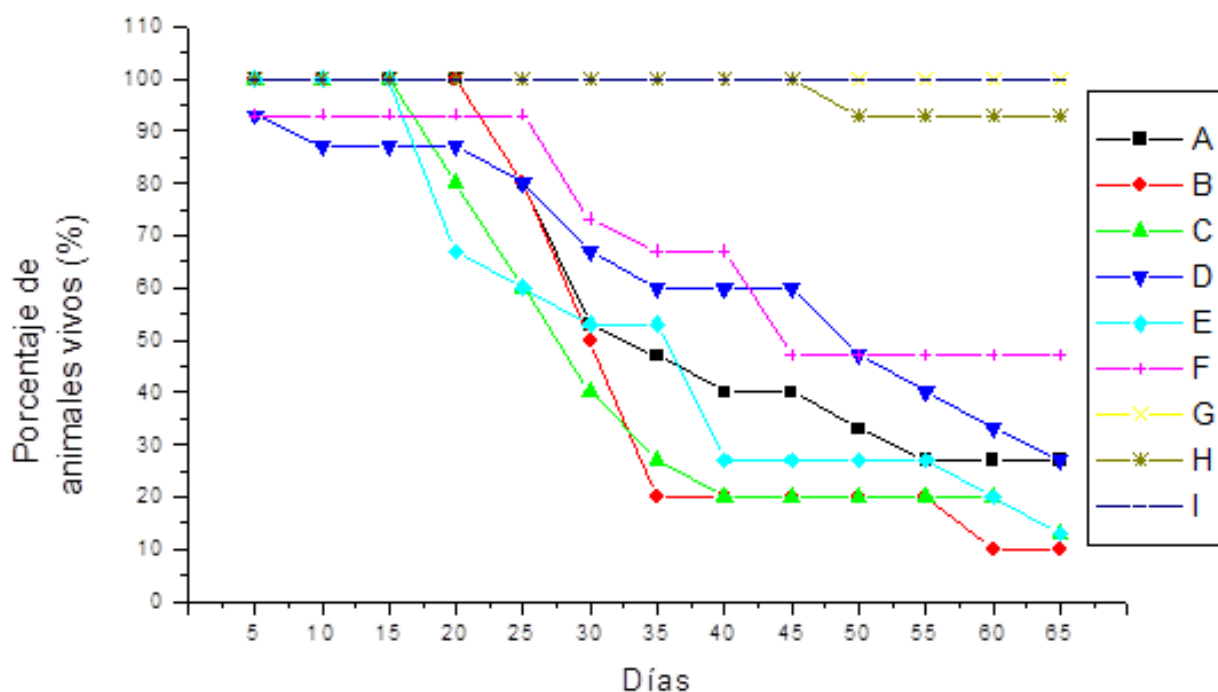


Figura 5. Porcentaje de animales vivos a lo largo del período de tratamiento (días 1-30) y el período de observación (días 31-65). A: Vincristina. **B:** Ratones con tumor sin tratar. **C:** Np polivinilpirrolidona/Ag administradas a los 7 días post-inducción del tumor. **D:** Np polivinilpirrolidona/Ag administradas a los 0 días post-inducción del tumor. **E:** Ag ionizada administrada a los 7 días post-inducción del tumor. **F:** Ag ionizada administrada a los 0 días post-inducción del tumor. **G:** Grupo sin tumor tratado con np polivinilpirrolidona/Ag. **H:** Grupo sin tumor tratado con Ag ionizada. **I:** Ratones sin tumor sin tratar.

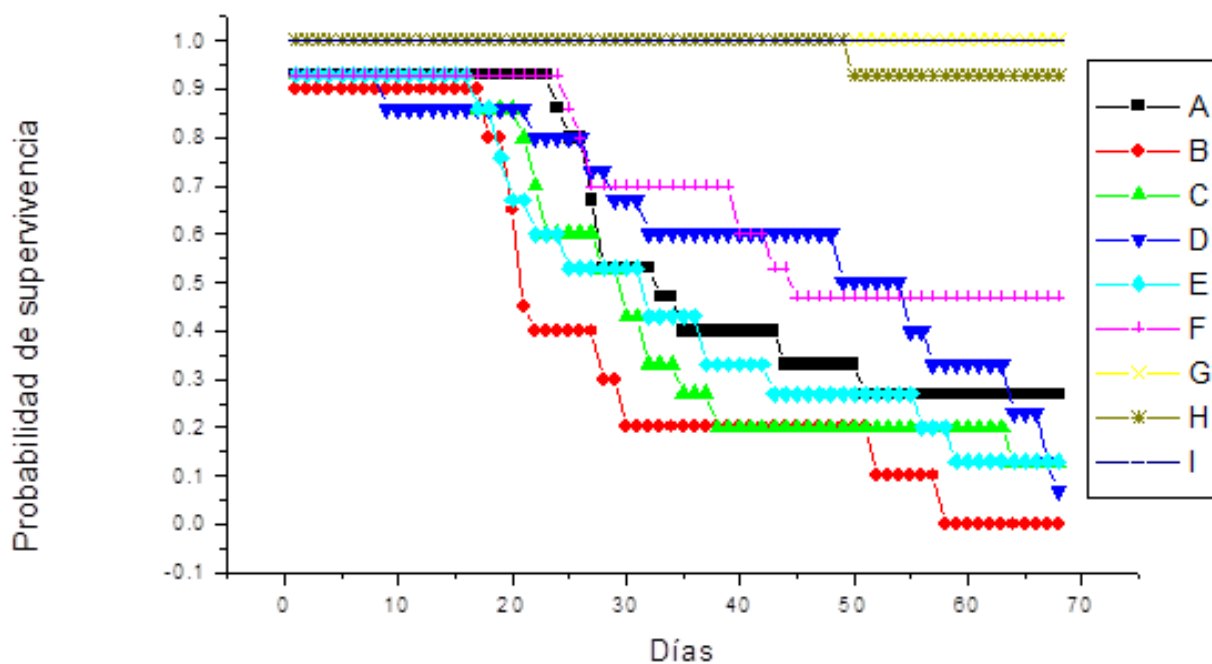


Figura 6. Probabilidad de supervivencia obtenida por el método Kaplan-Meier (apéndice A) a lo largo del período de tratamiento (días 1-30) y el período de observación (días 31-65). **A:** Vincristina. **B:** Ratones con tumor sin tratar. **C:** Np polivinilpirrolidona/Ag administradas a los 7 días post-inducción del tumor. **D:** Np polivinilpirrolidona/Ag administradas a los 0 días post-inducción del tumor. **E:** Ag ionizada administrada a los 7 días post-inducción del tumor. **F:** Ag ionizada administrada a los 0 días post-inducción del tumor. **G:** Grupo sin tumor tratado con np polivinilpirrolidona/Ag. **H:** Grupo sin tumor tratado con Ag ionizada. **I:** Ratones sin tumor sin tratar.

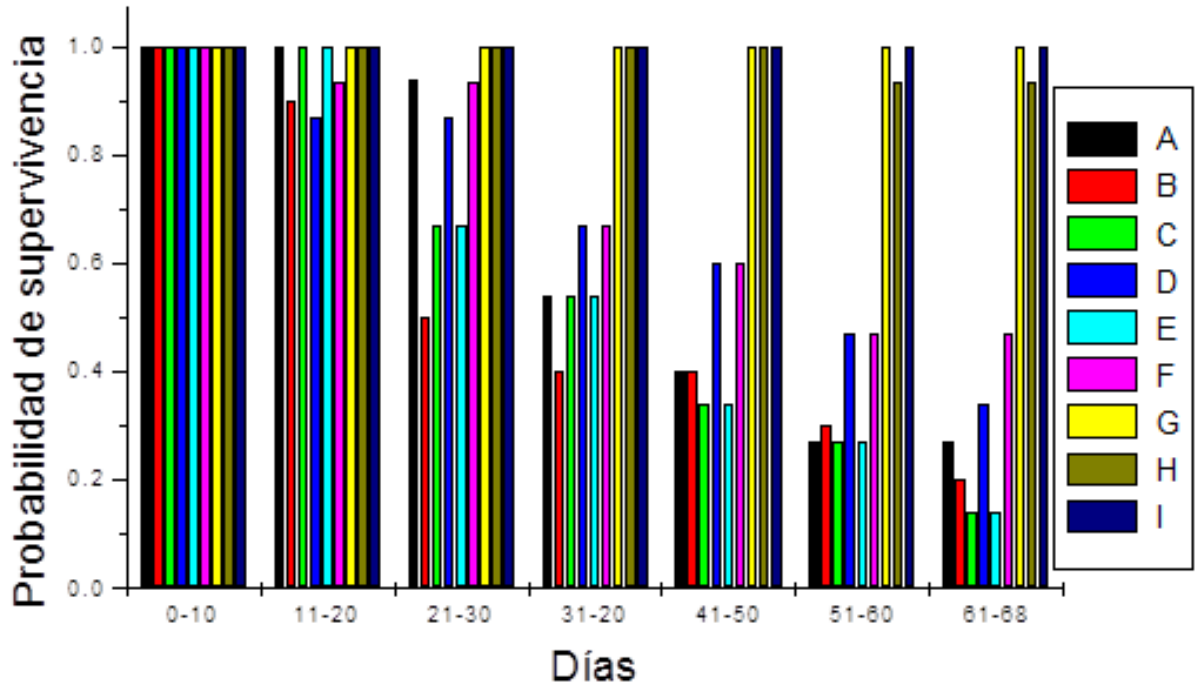


Figura 7. Probabilidad de supervivencia obtenida por el método actuarial (Cutler-Ederer) (apéndice B) a lo largo del período de tratamiento (días 1-30) y el período de observación (días 31-65). A: Vincristina. **B:** Ratones con tumor sin tratar. **C:** Np polivinilpirrolidona/Ag administradas a los 7 días post-inducción del tumor. **D:** Np polivinilpirrolidona/Ag administradas a los 0 días post-inducción del tumor. **E:** Ag ionizada administrada a los 7 días post-inducción del tumor. **F:** Ag ionizada administrada a los 0 días post-inducción del tumor. **G:** Grupo sin tumor tratado con np polivinilpirrolidona/Ag. **H:** Grupo sin tumor tratado con Ag ionizada. **I:** Ratones sin tumor sin tratar.

9. DISCUSIÓN:

Nuestros resultados concuerdan con reportes anteriores en los que se había descrito la actividad bactericida y bacteriostática de partículas coloidales y nanopartículas de plata (Kim *et al.*, 2007; McDonnell y Russell, 1999.) así como también la actividad virucida y citotóxica contra algunas líneas tumorales *in vitro* (Lara *et al.*, 2010), debido a que se observó un efecto citotóxico posiblemente por necrosis en células L5178Y-R, para ambos tratamientos. Así también se menciona en la literatura que las nanopartículas recubiertas con polímero polivinilpirrolidona tienen la capacidad de dirigirse hacia varios tejidos del cuerpo, y en especial específicamente hacia células de tumor (Ghosh 2000). No obstante, se observó que las nanopartículas de platas recubiertas con polivinilpirrolidona tenían un efecto citotóxico contra células tumorales L5178Y-R *in vitro*, y estas no mostraron una mejor respuesta citotóxica significativa en comparación con la solución de plata ionizada no encapsulada, siendo este último tratamiento el que mostró mejor respuesta citotóxica *in vivo*, esta diferencia probablemente pudo deberse al bajo nivel de solubilidad mostrado por las nanopartículas.

Se ha investigado la actividad citotóxica y genotóxica de nano-compuestos particulados de plata sobre líneas celulares animales (Youn-Jung *et al.*, 2010; AshaRani *et al.*, 2009), siendo la IC₂₀ (concentración inhibitoria 20) 1,796.88 µg/mL para la línea celular L5178Y, además demostrándose que los nano-compuestos pueden causar daño primario al ADN en cultivos de células animales, no obstante siendo incapaces de inducir mutagenicidad (Youn-Jung *et al.*, 2010); al comparar nuestros resultados con este reporte observamos una diferencia muy marcada entre ambos estudios siendo la CL₅₀ 26.74 µg/ml para las nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona y 2.1 µg/ml para la solución de plata ionizada. No sabemos porque las CL₅₀ demostradas en este estudio son muy diferentes a las del estudio de Youn-Jung, pero esto probablemente se deba a que tal vez en este estudio se intentó filtrar/esterilizar las nanopartículas; observamos en alguna ocasión que filtrar/esterilizar las nanopartículas no era posible y

obtuvimos valores de CL_{50} parecidas a las de Youn-Jung realizando pruebas de citotoxicidad *in vitro* con una suspensión de nanopartículas filtradas (las nanopartículas quedaron retenidas en el filtro millipore casi en su totalidad) (datos no mostrados). Sin embargo, concordamos que aunque probablemente se indujo daño al ADN en linfocitos sanos de timo y bazo, los tratamientos no indujeron un fenotipo con proliferación descontrolada en dichas células sanas, siendo los índices de proliferación menores a 1 con todas las concentraciones probadas en células no estimuladas con el mitógeno concanavalina A.

Se ha reportado que la entrega de nanopartículas de plata por el nano-acarreador quitosán a células de mamífero induce apoptosis a concentraciones muy bajas de las nanopartículas en células de cáncer de colon humano HT 29, induciendo citotoxicidad en un 50% a una concentración de $0.33 \mu\text{g mL}^{-1}$, proponiendo esta concentración en ser mucho más efectiva que datos previamente reportados (Sanpui *et al.*, 2011). Nuestros resultados indican que no hay una gran diferencia entre esta concentración de nanopartículas acarreadas por quitosán, en comparación con los iones de plata libres y las nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona, induciendo estos citotoxicidad al 50% en células de linfoblastoma L5178Y-R a una concentración de 2.1 $\mu\text{g/ml}$, y 26.74 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Así mismo se ha indicado que el efecto biológico de las nanopartículas de plata es mediado principalmente por iones de plata que están presentes en la fase inicial de dispersión o que son liberados por las nanopartículas con el tiempo (Koch *et al.*, 2011). Sin embargo, en este estudio observamos que las CL_{50} *in vitro* para la línea L5178Y-R estuvieron relativamente cercanas para ambos tratamientos.

Anteriormente se ha investigado el efecto citotóxico y el tipo de muerte celular que las nanopartículas de plata ejercen contra varias líneas celulares y varios tipos de tejido *in vitro*; datos han revelado que el tamaño de nanopartícula es un factor potencial que contribuye al exhibir toxicidad siendo las nanopartículas de plata de 15 nm más tóxicas en comparación con nanopartículas más grandes (30nm y 55 nm) al exponer estas a macrófagos alveolares, siendo que además el mecanismo de toxicidad es debido a la

generación de especies reactivas del oxígeno, induciendo estrés oxidativo (Carlson *et al.*, 2008) y resultando en apoptosis. También se ha demostrado que nanopartículas de plata de un diámetro de 7-20 nm inducen muerte por necrosis en células de fibrosarcoma humano HT-1080 y en células de carcinoma humano de piel A431 a una concentración de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ para ambas líneas celulares, no obstante estas mismas nanopartículas también inducen muerte por apoptosis a las concentraciones de 0.78 $\mu\text{g/mL}$ y 1.56 $\mu\text{g/mL}$ en las mismas líneas celulares respectivamente (Arora *et al.*, 2008). Así mismo se ha demostrado que el tipo de muerte celular inducido por las nanopartículas de plata en células de cáncer de pulmón A540 se debe principalmente a un incremento dependiente de dosis (2.5-15 $\mu\text{g/ml}$) que induce necrosis/apoptosis tardía en la mayor parte de las células, mientras que este incremento induce apoptosis temprana solamente en un bajo porcentaje de células A540 (Foldbjerg *et al.*, 2010). Nuestros resultados concuerdan con estos reportes anteriores, debido a que en las pruebas de fragmentación de ADN la mayor parte de este se muestra en forma de fragmentos grandes en la parte superior del corrimiento y en una conformación en barrido para el caso del ADN de células incubadas con ambos tratamientos, lo cual difiere por completo con el patrón de distribución de ADN observado en el control positivo para apoptosis, donde la mayor parte del ADN se encuentra en un patrón de bandas segmentado en la parte inferior del corrimiento y el barrido en la parte superior se observa casi por completo ausente. Además, en este estudio quedó descartado por completo que los tratamientos indujeran muerte por apoptosis, debido a que no se observó la presencia de algún miembro de la familia de las caspasas tras 6 horas de inducir muerte celular *in vitro* en presencia de los tratamientos a las concentraciones probadas (30 $\mu\text{g/mL}$ para ambos tratamientos).

De igual manera existen reportes en los que se ha mencionado que las nanopartículas de plata inducen neurotoxicidad por estimulación de la generación de estrés oxidativo y expresión génica alterada, lo cual conduce a apoptosis (Rahman *et al.*, 2009). También se ha demostrado que las nanopartículas de plata inducen generación de especies reactivas del oxígeno y supresión de glutatión reducido en células de hígado humano Chang. Las especies reactivas del oxígeno resulta en daño a varios componentes

celulares, rompimiento del ADN, peroxidación de lípidos de membrana y carbonilación proteica; la viabilidad celular disminuye debido a apoptosis. Las nanopartículas de plata inducen una ruta apoptótica dependiente de mitocondrias por modulación de Bax y expresión de Bcl-2 en células de hígado humano Chang, resultando en el perturbamiento del potencial de membrana mitocondrial, lo cual es seguido por liberación del citocromo c de las mitocondrias, resultando en activación de caspasas 9 y 3 (Piao *et al.*, 2011). Así mismo se ha demostrado que las nanopartículas de plata inducen apoptosis en células de cáncer de colon humano HCT116 (Hsin *et al.*, 2008), e incluso se ha comprobado la actividad de la caspasa 3, una molécula que juega un rol clave en la inducción de apoptosis, en células de linfoma ascítico de Dalton tratadas con nanopartículas de plata (Sriram *et al.*, 2010), no obstante a pesar de quedar demostrada la actividad de la caspasa 3, en este estudio se muestra una separación de ADN en gel de agarosa donde se observa un patrón que no es el típico de muerte por apoptosis, y curiosamente en ese mismo análisis de fragmentación de ADN los autores no muestran ningún control positivo para apoptosis. En nuestros resultados en gel agarosa mostramos un control positivo para apoptosis el cual difiere por completo de aquél en el estudio hecho por Sriram *et al.* (2010) en células de linfoma ascítico de Dalton. Por lo tanto se sugiere que los tratamientos utilizados son capaces de inducir muerte por un mecanismo diferente al de apoptosis a una concentración de 30 µg/mL en células L5178Y-R en un tiempo de exposición de 6 horas, incluso aunque también se presente muerte por apoptosis al demostrarse la actividad de la caspasa 3. Probablemente ambos eventos inductores de muerte celular (necrosis/apoptosis) sean simultáneamente posibles, como anteriormente se ha demostrado (Arora *et al.*, 2008), y el tipo de muerte celular resultante será determinado por la dosis/concentración del tratamiento, el tiempo de exposición (Foldbjerg *et al.*, 2009) y/o el tipo de tejido o línea celular investigado.

Se ha demostrado que las nanopartículas de plata conjugadas con heparina poseen propiedades inhibitorias de la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2) (Kemp *et al.*, 2009), y también se ha demostrado que nanopartículas de plata con un diámetro de 50 nm pueden actuar como un potente agente antiangiogénico en dos modelos *in vivo* de rata y ratón, y que esta inhibición de la

angiogénesis en células endoteliales retinales de bovino inducidas por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es mediada por la inhibición de la señal de supervivencia celular PI3K/Akt en un modo parecido a como lo hace la proteína antiangiogénica factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) (Gurunathan *et al.*, 2009). No obstante otro estudio sugiere que la exposición a nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona de un tamaño promedio de 2.3 nm puede inducir angiogénesis a través de la producción de factores angiogénicos tanto en un modelo *in vivo* como en la línea celular endotelial SVEC4-10 *in vitro* (Kang *et al.*, 2011). En nuestro estudio se utilizaron nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona con un diámetro aproximado de 30-50 nm, siendo similares a las utilizadas por Gurunathan *et al.* (2009) y además utilizamos solución de plata coloidal ionizada. Ambos tratamientos indujeron una distribución de supervivencia significativamente mayor a la mostrada por el grupo control sin tratar en un modelo de linfoma murino, y de acuerdo a lo anterior, posiblemente esta diferencia pudo haberse debido al efecto antiangiogénico de los tratamientos en combinación con el efecto citotóxico que se pudo observar en las pruebas *in vitro*.

Se ha demostrado además que la exposición a nanopartículas de plata resulta en anomalías cromosómicas, inhibición de la proliferación, observada como falla al formar colonias y ausencia de recuperación selectivamente en células de tumorales de glioblastoma humanas U251, lo cual podría añadir nuevas esperanzas al prevenir la metástasis de células cancerosas (Asharani *et al.*, 2009). De acuerdo a lo anterior, ambos tratamientos efectivamente mostraron significativamente una mejoría en las distribuciones de supervivencia *in vivo* al iniciarse el período de tratamiento a los 0 días post-inducción.

Se ha sugerido que los efectos celulares de las nanopartículas de plata podrían estar mediados por dos distintos mecanismos que son contribuidos ya sea por la partícula en sí misma o por la naturaleza del recubrimiento superficial (Xu *et al.*, 2009). Y que el sistema de nanopartículas poliméricas hidrofílicas de polivinilpirrolidona al englobar partículas estas tienen la posibilidad de dirigirse como objetivo a los tejidos corporales,

especialmente a células de tumor (Ghosh, 2000.) En nuestro estudio pudimos observar que el polímero polivinilpirrolidona no influyo en inducir mejoría en la respuesta citotóxica *in vivo* al englobar partículas de plata de un diámetro de 30-50 nm y al dirigir estas partículas contra la línea L5178Y-R, siendo que la solución de plata ionizada no recubierta indujo una mejor respuesta citotóxica *in vivo*.

Se ha sugerido que la toxicidad de las nanopartículas de plata está asociada a estrés oxidativo y apoptosis en el hígado del pez cebra adulto (Choi *et al.*, 2010) y se ha demostrado toxicidad en los embriones la cual impide su desarrollo normal (Asharani *et al.*, 2008). También se ha investigado la propiedad de una línea celular espermatogénica murina como un modelo para medir nanotoxicidad en la línea germinal masculina *in vitro*; los resultados mostraron toxicidad dependiente de concentración para todos los tipos de partículas probados, siendo las nanopartículas de plata las más tóxicas mientras que su respectiva sal soluble no tuvo efecto significativo (Braydich-Stolle *et al.*, 2005). También se ha reportado que las nanopartículas de plata tienen un efecto citotóxico en embriones murinos en el estadio de blastocisto, mostrando estos apoptosis, disminución en el número total de células y disminución en la tasa de éxito al implantarse y ser transferido a un ratón hospedero, así mismo el tratamiento *in vitro* con nanopartículas de plata estuvo asociado con la re-absorción del embrión tras la implantación y disminución en el peso fetal. La citotoxicidad estimulada por las nanopartículas de plata fue menor a la inducida por los iones de plata. (Li *et al.*, 2010). Sin embargo en nuestro estudio solo se observó mortalidad en el 6.7% (1 ratón) de los ratones sin tumor tratados con solución de plata ionizada y 0% de mortalidad en los ratones sin tumor tratados con nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona. Los ratones no presentaron disminución en peso corporal sino por el contrario en todos se observó crecimiento y ganancia de peso. Así mismo no presentaron cambios en su conducta o signos de debilidad y enfermedad en comparación con el grupo de ratones sin tumor sin tratar a lo largo del período de tratamiento y observación (65 días).

Anteriormente un estudio había demostrado la efectividad de dispersiones acuosas de nanopartículas de óxido de plata obtenidas por tratamiento de agua con pulsos de descargas eléctricas que confiablemente inhibieron el crecimiento tumoral *in vivo* en ratas con linfosarcoma de Pliss (Rutberg *et al.*, 2008). Con base en este estudio anterior, nosotros también hemos demostrado por primera vez la efectividad de nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona y solución de plata ionizada para aumentar las distribuciones de supervivencia en un modelo animal *in vivo* de ratones con tumor L5178Y-R intramuscular.

10. CONCLUSIONES:

- Las nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona y la plata disuelta en su forma iónica muestran actividad citotóxica *in vitro* contra la línea de linfoblastoma tímico murino L5178Y-R, siendo la CL_{50} 2.1 $\mu\text{g/mL}$ para la plata ionizada y 26.74 $\mu\text{g/mL}$ para las nanopartículas.
- No se indujo ningún efecto inhibitorio contra linfocitos sanos de timo y bazo a la CL_{50} para la línea tumoral en el caso de la solución de plata ionizada, esto debido a que a esta misma concentración el índice de proliferación para ambos tipos de linfocitos fue aproximadamente igual a 1, manteniéndose este índice de inhibición incluso por encima de la concentración de 4.375 $\mu\text{g/mL}$. Debido a esto podemos concluir que la plata ionizada presenta un mayor efecto citotóxico contra la línea de linfoma que contra ambos tipos de linfocitos sanos. Así mismo, se concluye que ambos tratamientos no inducen un fenotipo de proliferación descontrolada en ambos tipos de linfocitos sanos.
- En las pruebas de apoptosis por fragmentación de ADN en gel agarosa se observa un barrido de ADN típico de un mecanismo de muerte diferente al de apoptosis en la parte superior del gel, este se encuentra casi por completo ausente en el carril de control positivo para apoptosis, donde se observa un patrón segmentado con un brillo muy intenso en la parte inferior del gel, este patrón segmentado también se observa en los carriles para los tratamientos aunque con una intensidad mucho menor y de igual manera se observa con la misma baja intensidad en el control de células no tratadas; esto indica que las células sufrieron muerte por un mecanismo diferente al de apoptosis, lo cual fue confirmado por análisis de inducción de caspasas, rechazando la presencia de estas en cultivos tratados con los tratamientos a concentraciones citotóxicas. Estos resultados nos permiten concluir que los tratamientos inducen muerte por un mecanismo diferente al de apoptosis en células L5178Y-R después de ser incubadas por 6 horas a una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ para ambos

tratamientos, y de acuerdo a la literatura disponible también se sugiere que probablemente los tratamientos son capaces de inducir una proporción variable apoptosis/necrosis según la concentración probada, el tiempo de incubación y/o la línea celular o tejido investigado.

- En este estudio se demuestra por primera vez la efectividad de dos tipos de terapia de plata coloidal para inducir un aumento en las distribuciones de supervivencia en un modelo animal de linfoma murino, siendo este aumento en la supervivencia significativamente mayor en comparación con el grupo control con tumor sin tratar considerando un margen de error estadístico del 10% para las nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona y del 2.5% para la solución de plata ionizada, y estos tratamientos fueron efectivos en aumentar la distribución de supervivencia solamente en animales que iniciaron su tratamiento en el día 0 post-inducción. En base a los resultados observados se propone que estos tratamientos pueden ser de utilidad en un futuro para tratar tumores sólidos en los estadios iniciales de desarrollo del tumor o como terapia de mantenimiento para evitar recaídas después de haber recibido terapia de inducción, y se propone también que los tratamientos no son de utilidad en el caso de tumores sólidos en un estado avanzado. Así mismo los tratamientos indujeron una mejor respuesta en la supervivencia en comparación con la vincristina administrada a los 7 días post-inducción, la cual es un agente quimioterapéutico comúnmente utilizado para tratar la leucemia aguda.
- Para ganar perspectivas sobre los mecanismos de citotoxicidad inducidos en esta línea celular se sugiere que en el futuro se realicen análisis en cortes histológicos en tumor sólido así como evaluar su efecto antiangiogénico *in vivo*. Por otro lado también se recomienda que se hagan estudios de tecnologías combinadas *in vivo*, por ejemplo la conjugación de nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona y iones de plata con anticuerpos específicos para marcadores de tumor, la administración de los tratamientos en conjunto con radiaciones ionizantes, el efecto citotóxico en otras líneas celulares y modelos

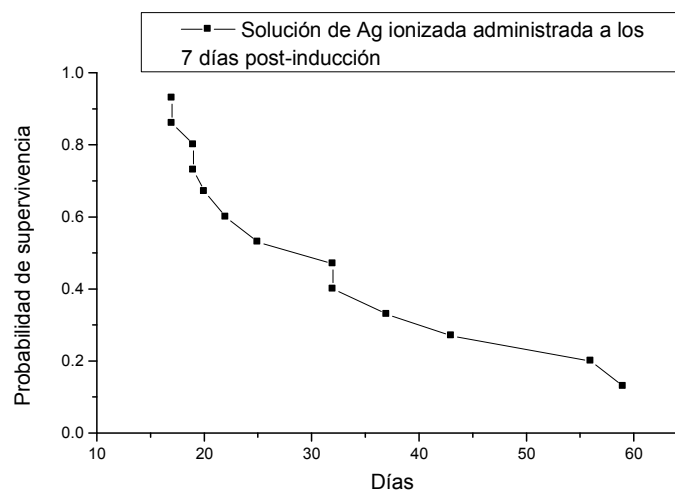
animales o de igual manera investigar otras formas de entrega sitio-específica al tumor, para mejorar la especificidad hacia el tumor y minimizar los efectos de toxicidad sistémica

APÉNDICE A

ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA POR EL MÉTODO KAPLAN-MEIER

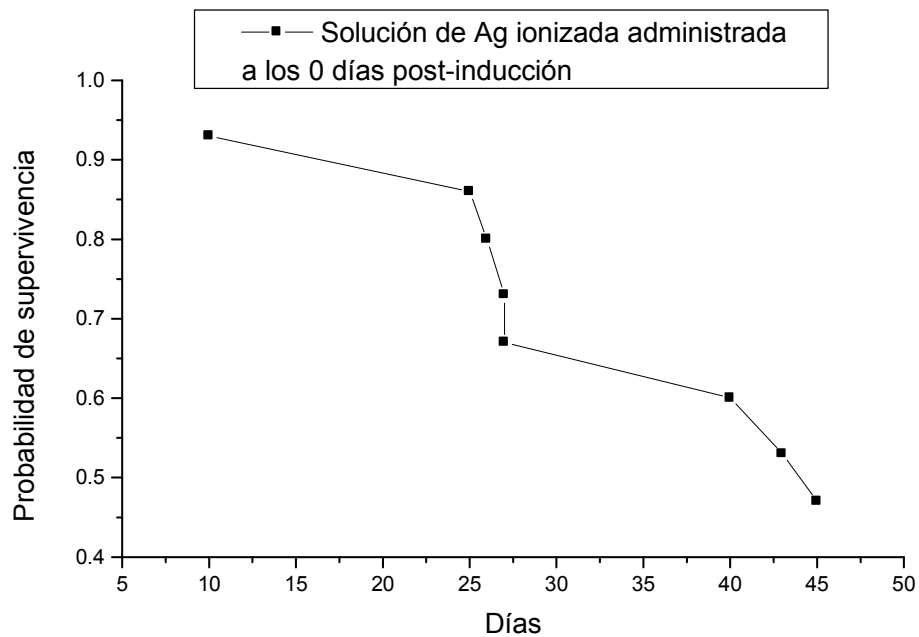
Solución de Ag ionizada a los 7 días post-inducción. Método de Kaplan-Meier.

Tiempo de supervivencia (días)	Número de orden	Orden de las observaciones no censuradas (r)	$\frac{(n-r)}{(n-r+1)}$	Proporción de supervivencia acumulado al final del intervalo
17	1	1	14/15=0.93	0.93
17	2	2	13/14=0.93	0.86
19	3	3	12/13=0.92	0.8
19	4	4	11/12=0.92	0.73
20	5	5	10/11=0.91	0.67
22	6	6	9/10=0.9	0.6
25	7	7	8/9=0.89	0.53
32	8	8	7/8=0.875	0.47
32	9	9	6/7=0.86	0.4
37	10	10	5/6=0.83	0.33
43	11	11	4/5=0.8	0.27
56	12	12	3/4=0.75	0.2
59	13	13	2/3=0.67	0.13
68+	14			
68+	15			



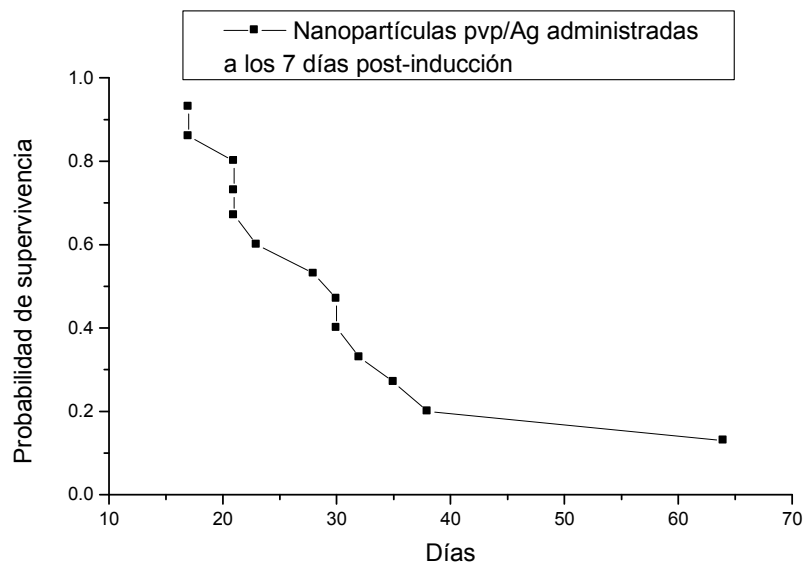
Solución de Ag ionizada a los 0 días post-inducción. Método de Kaplan-Meier.

Tiempo de supervivencia (días)	Número de orden	Orden de las observaciones no censuradas (r)	$\frac{(n-r)}{(n-r+1)}$	Proporción de supervivencia acumulado al final del intervalo
10	1	1	14/15=0.93	0.93
25	2	2	13/14=0.93	0.86
26	3	3	12/13=0.92	0.8
27	4	4	11/12=0.92	0.73
27	5	5	10/11=0.91	0.67
40	6	6	9/10=0.9	0.6
43	7	7	8/9=0.89	0.53
45	8	8	7/8=0.875	0.47
68+	9			
68+	10			
68+	11			
68+	12			
68+	13			
68+	14			
68+	15			



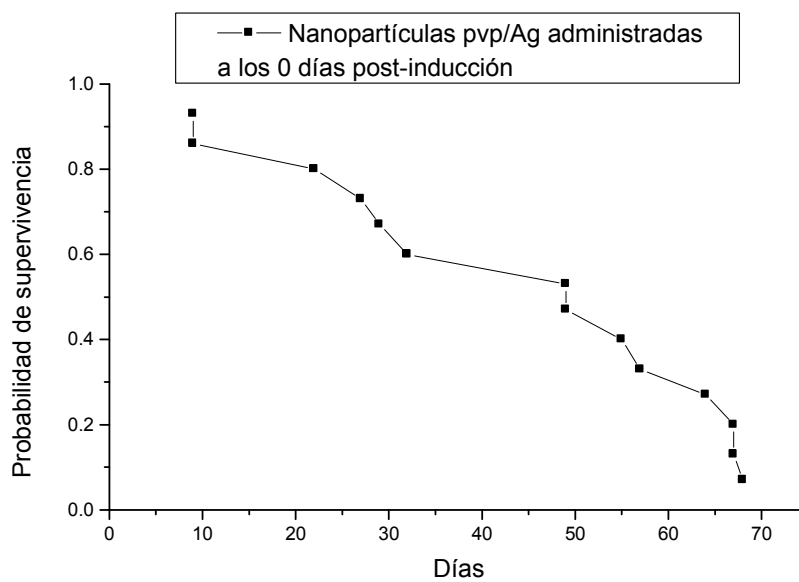
Nanopartículas polivinilpirrolidona/Ag a los 7 días post-inducción. Método de Kaplan-Meier.

Tiempo de supervivencia (días)	Número de orden	Orden de las observaciones no censuradas (r)	$\frac{(n-r)}{(n-r+1)}$	Proporción de supervivencia acumulado al final del intervalo
17	1	1	14/15=0.93	0.93
17	2	2	13/14=0.93	0.86
21	3	3	12/13=0.92	0.8
21	4	4	11/12=0.92	0.73
21	5	5	10/11=0.91	0.67
23	6	6	9/10=0.9	0.6
28	7	7	8/9=0.89	0.53
30	8	8	7/8=0.875	0.47
30	9	9	6/7=0.86	0.4
32	10	10	5/6=0.83	0.33
35	11	11	4/5=0.8	0.27
38	12	12	3/4=0.75	0.2
64	13	13	2/3=0.67	0.13
68+	14			
68+	15			



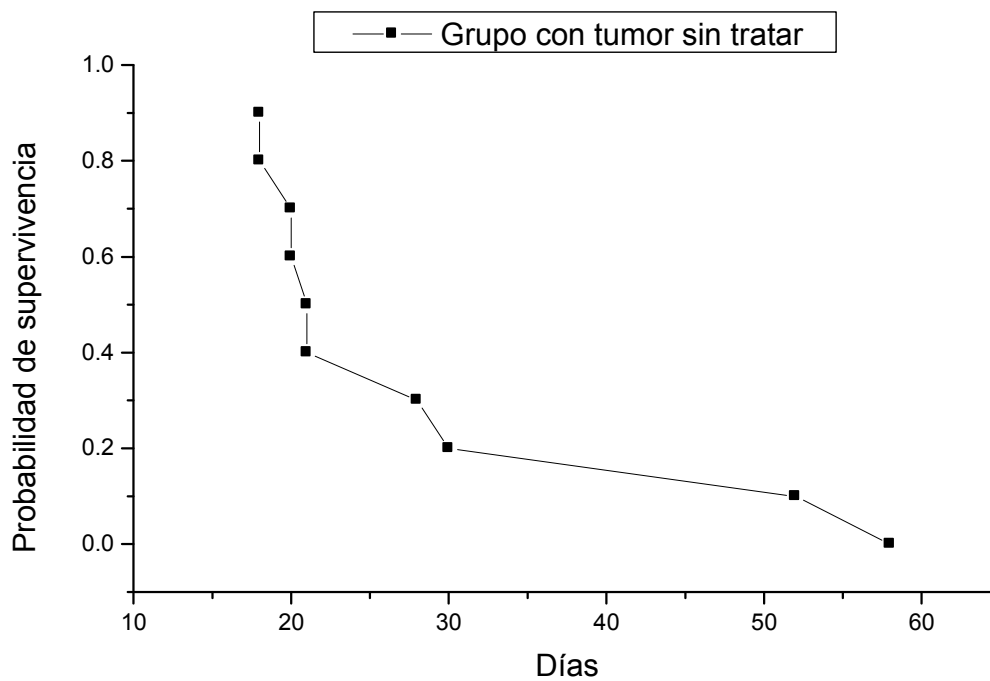
Nanopartículas polivinilpirrolidona/Ag a los 0 días post-inducción. Método de Kaplan-Meier.

Tiempo de supervivencia (días)	Número de orden	Orden de las observaciones no censuradas (r)	$\frac{(n-r)}{(n-r+1)}$	Proporción de supervivencia acumulado al final del intervalo
9	1	1	14/15=0.93	0.93
9	2	2	13/14=0.93	0.86
22	3	3	12/13=0.92	0.8
27	4	4	11/12=0.92	0.73
29	5	5	10/11=0.91	0.67
32	6	6	9/10=0.9	0.6
49	7	7	8/9=0.89	0.53
49	8	8	7/8=0.875	0.47
55	9	9	6/7=0.86	0.4
57	10	10	5/6=0.83	0.33
64	11	11	4/5=0.8	0.27
67	12	12	3/4=0.75	0.2
67	13	13	2/3=0.67	0.13
68	14	14	1/2=0.5	0.07
68+	15			



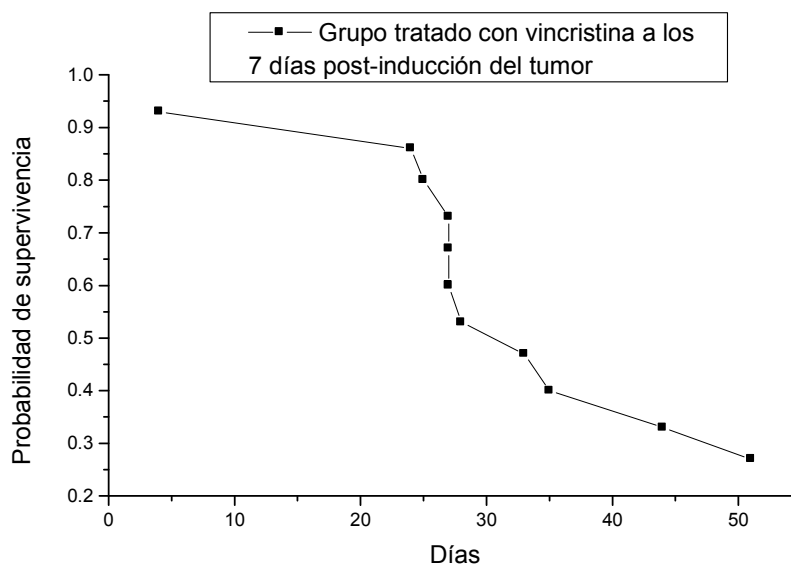
Control con tumor sin tratar. Método de Kaplan-Meier.

Tiempo de supervivencia (días)	Número de orden	Orden de las observaciones no censuradas (r)	$\frac{(n-r)}{(n-r+1)}$	Proporción de supervivencia acumulado al final del intervalo
18	1	1	9/10=0.9	0.9
18	2	2	8/9=0.89	0.8
20	3	3	7/8=0.875	0.7
20	4	4	6/7=0.86	0.6
21	5	5	5/6=0.83	0.5
21	6	6	4/5=0.8	0.4
28	7	7	3/4=0.75	0.3
30	8	8	2/3=0.67	0.2
52	9	9	1/2=0.5	0.1
58	10	10	0/1=0	0



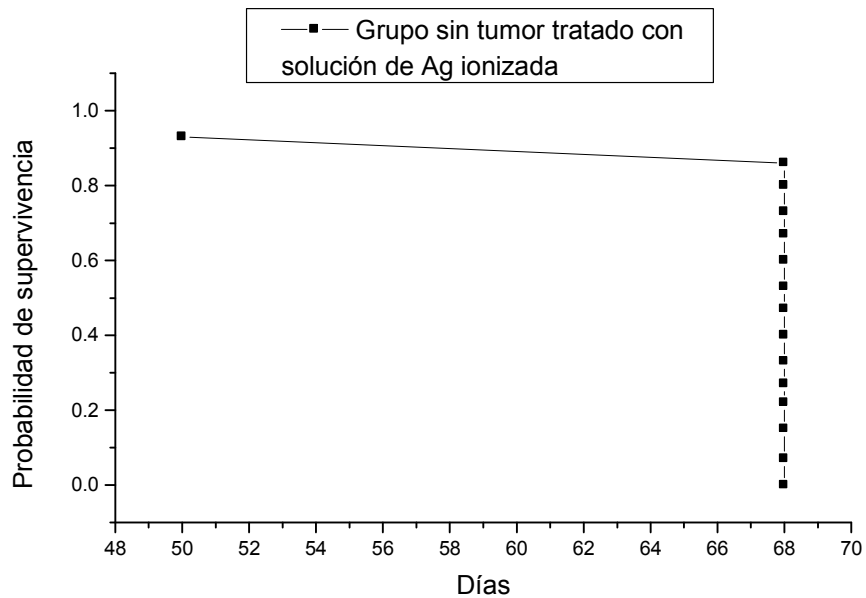
Control tratado con vincristina a los 7 días post-inducción. Método de Kaplan-Meier.

Tiempo de supervivencia (días)	Número de orden	Orden de las observaciones no censuradas (r)	$\frac{(n-r)}{(n-r+1)}$	Proporción de supervivencia acumulado al final del intervalo
4	1	1	14/15=0.93	0.93
24	2	2	13/14=0.93	0.86
25	3	3	12/13=0.92	0.8
27	4	4	11/12=0.92	0.73
27	5	5	10/11=0.91	0.67
27	6	6	9/10=0.9	0.6
28	7	7	8/9=0.89	0.53
33	8	8	7/8=0.875	0.47
35	9	9	6/7=0.86	0.4
44	10	10	5/6=0.83	0.33
51	11	11	4/5=0.8	0.27
68+	12	12	3/4=0.75	
68+	13	13	2/3=0.67	
68+	14	14	1/2=0.5	
68+	15			



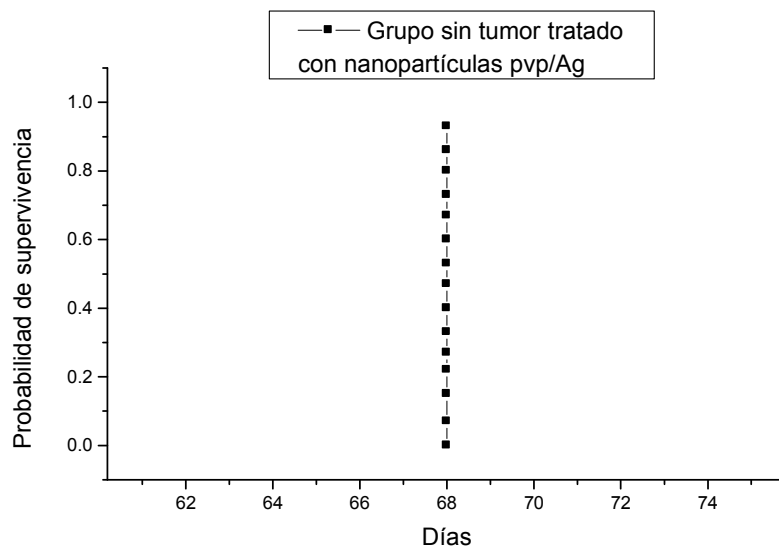
Grupo sin tumor tratado con solución de Ag ionizada. Método de Kaplan-Meier.

Tiempo de supervivencia (días)	Número de orden	Orden de las observaciones no censuradas (r)	$\frac{(n-r)}{(n-r+1)}$	Proporción de supervivencia acumulado al final del intervalo
50	1	1	14/15=0.93	0.93
68	2	2	13/14=0.93	0.86
68	3	3	12/13=0.92	0.8
68	4	4	11/12=0.92	0.73
68	5	5	10/11=0.91	0.67
68	6	6	9/10=0.9	0.6
68	7	7	8/9=0.89	0.53
68	8	8	7/8=0.875	0.47
68	9	9	6/7=0.86	0.4
68	10	10	5/6=0.83	0.33
68	11	11	4/5=0.8	0.27
68	12	12	3/4=0.75	0.22
68	13	13	2/3=0.67	0.15
68	14	14	1/2=0.5	0.07
68	15	15	0/1=0	0



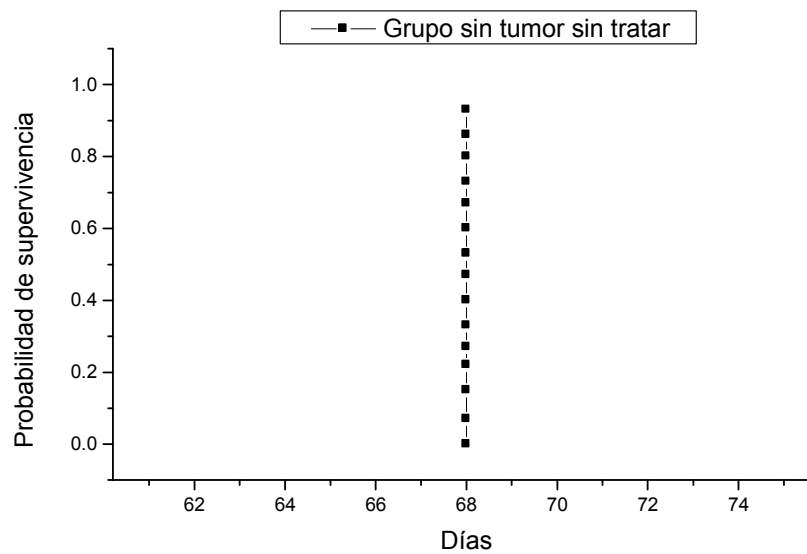
Grupo sin tumor tratado con nanopartículas polivinilpirrolidona/Ag. Método de Kaplan-Meier.

Tiempo de supervivencia (días)	Número de orden	Orden de las observaciones no censuradas (r)	$\frac{(n-r)}{(n-r+1)}$	Proporción de supervivencia acumulado al final del intervalo
68	1	1	14/15=0.93	0.93
68	2	2	13/14=0.93	0.86
68	3	3	12/13=0.92	0.8
68	4	4	11/12=0.92	0.73
68	5	5	10/11=0.91	0.67
68	6	6	9/10=0.9	0.6
68	7	7	8/9=0.89	0.53
68	8	8	7/8=0.875	0.47
68	9	9	6/7=0.86	0.4
68	10	10	5/6=0.83	0.33
68	11	11	4/5=0.8	0.27
68	12	12	3/4=0.75	0.22
68	13	13	2/3=0.67	0.15
68	14	14	1/2=0.5	0.07
68	15	15	0/1=0	0



Grupo sin tumor sin tratar. Método de Kaplan-Meier.

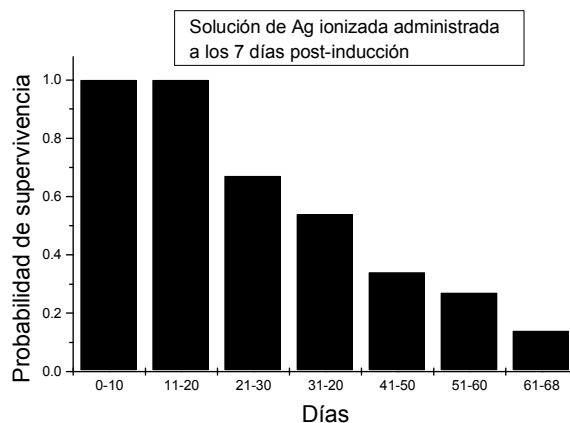
Tiempo de supervivencia (días)	Número de orden	Orden de las observaciones no censuradas (r)	$\frac{(n-r)}{(n-r+1)}$	Proporción de supervivencia acumulado al final del intervalo
68	1	1	14/15=0.93	0.93
68	2	2	13/14=0.93	0.86
68	3	3	12/13=0.92	0.8
68	4	4	11/12=0.92	0.73
68	5	5	10/11=0.91	0.67
68	6	6	9/10=0.9	0.6
68	7	7	8/9=0.89	0.53
68	8	8	7/8=0.875	0.47
68	9	9	6/7=0.86	0.4
68	10	10	5/6=0.83	0.33
68	11	11	4/5=0.8	0.27
68	12	12	3/4=0.75	0.22
68	13	13	2/3=0.67	0.15
68	14	14	1/2=0.5	0.07
68	15	15	0/1=0	0



APÉNDICE B
ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA POR EL MÉTODO CUTLER-EDERER
(MÉTODO ACTUARIAL)

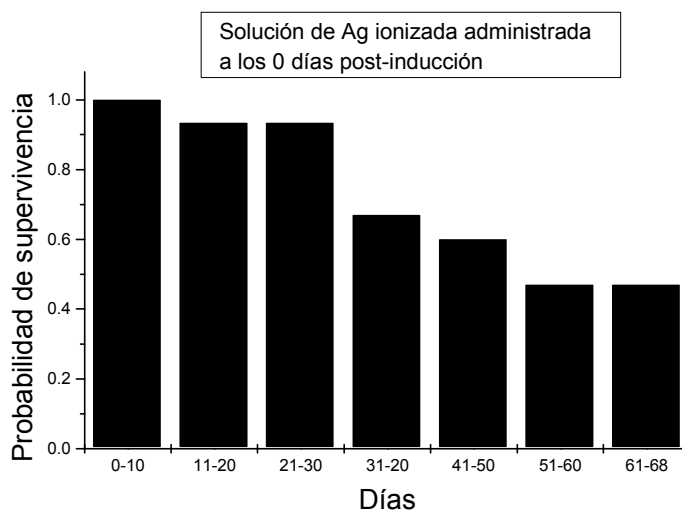
Solución de Ag ionizada administrada a los 7 días post-inducción del tumor.
Método de Cutler-Ederer (método actuarial).

Intervalos de tiempo	Vivos al inicio del intervalo	Muertes durante el intervalo (d)	Abandono vivo o pérdida del seguimiento (w)
0-10	15	0	0
11-20	15	0	0
21-30	10	5	0
31-20	8	7	0
41-50	5	10	0
51-60	4	11	0
61-68	2	13	0
	Probabilidad de muerte $q = \frac{d}{(n - [w/2])}$	Probabilidad de supervivencia $p_i = 1 - q$	Probabilidad acumulada de supervivencia $s = p_i \cdot p_{i-1}$
0-10	0	1	1
11-20	0	1	1
21-30	0.33	0.67	(1)(0.67)=0.67
31-20	0.46	0.54	(0.67)(0.54)=0.36
41-50	0.66	0.34	(0.36)(0.34)=0.12
51-60	0.73	0.27	(0.12)(0.27)=0.032
61-68	0.86	0.14	(0.032)(0.14)=0.004



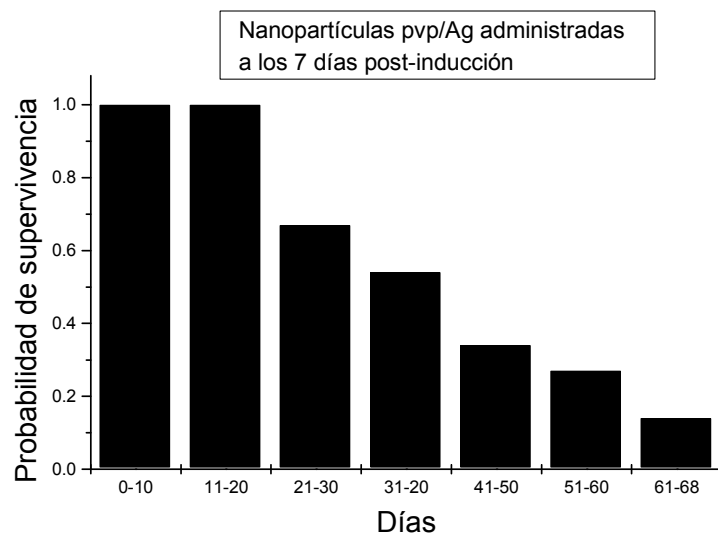
**Solución de Ag ionizada administrada a los 0 días post-inducción del tumor.
Método de Cutler-Ederer (método actuarial).**

Intervalos de tiempo	Vivos al inicio del intervalo	Muertes durante el intervalo (d)	Abandono vivo o pérdida del seguimiento (w)
0-10	15	0	0
11-20	14	1	0
21-30	14	1	0
31-20	10	5	0
41-50	9	6	0
51-60	7	8	0
61-68	7	8	0
	Probabilidad de muerte $q = \frac{d}{(n - [w/2])}$	Probabilidad de supervivencia $p_i = 1 - q$	Probabilidad acumulada de supervivencia $s = p_i \cdot p_{i-1}$
0-10	0	1	1
11-20	0.066	0.934	(1)(0.934)=0.934
21-30	0.066	0.934	(0.934)(0.934)=0.87
31-20	0.33	0.67	(0.87)(0.67)=0.58
41-50	0.4	0.6	(0.58)(0.6)=0.348
51-60	0.53	0.47	(0.348)(0.47)=0.16
61-68	0.53	0.47	(0.16)(0.47)0.075



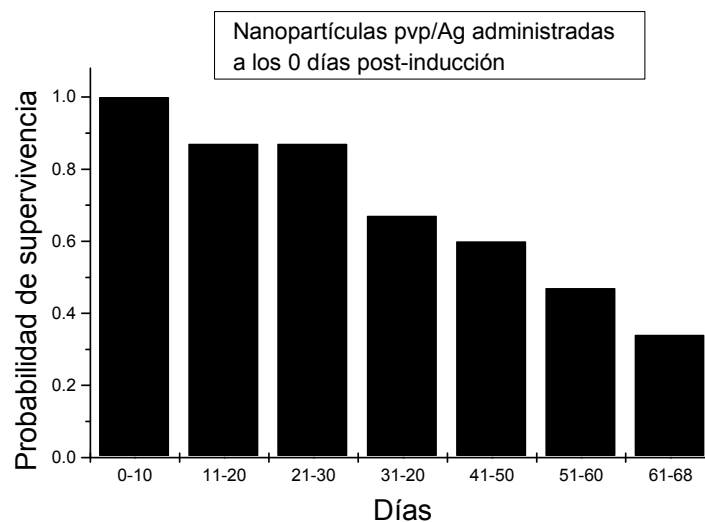
Nanopartículas polivinilpirrolidona/Ag administradas a los 7 días post-inducción del tumor. Método de Cutler-Ederer (método actuarial).

Intervalos de tiempo	Vivos al inicio del intervalo	Muertes durante el intervalo (d)	Abandono vivo o pérdida del seguimiento (w)
0-10	15	0	0
11-20	15	0	0
21-30	12	5	0
31-20	6	7	0
41-50	3	10	0
51-60	3	11	0
61-68	3	13	0
	Probabilidad de muerte $q = \frac{d}{(n - [w/2])}$	Probabilidad de supervivencia $p_i = 1 - q$	Probabilidad acumulada de supervivencia $s = p_i \cdot p_{i-1}$
0-10	0	1	1
11-20	0	1	(1)(1)=1
21-30	0.33	0.67	(1)(0.67)=0.67
31-20	0.46	0.54	(0.67)(0.54)=0.36
41-50	0.66	0.34	(0.36)(0.34)=0.12
51-60	0.73	0.27	(0.12)(0.27)=0.032
61-68	0.86	0.14	(0.032)(0.14)=0.0045



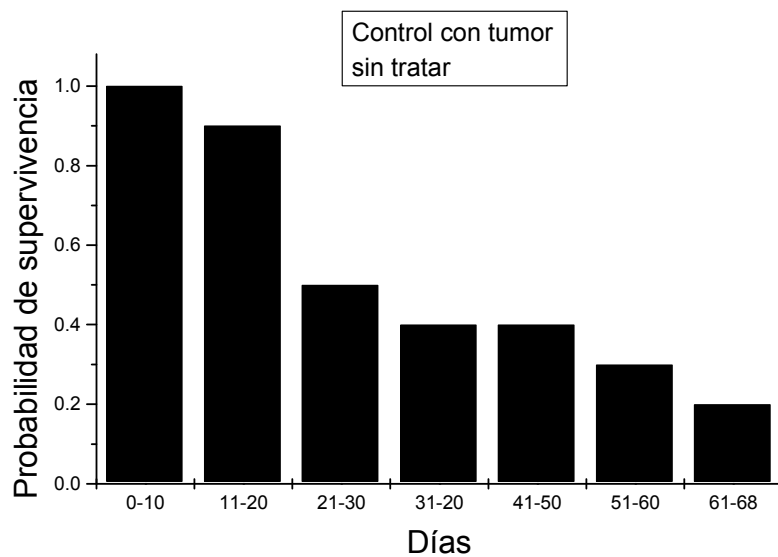
Nanopartículas polivinilpirrolidona/Ag administradas a los 0 días post-inducción del tumor. Método de Cutler-Ederer (método actuarial).

Intervalos de tiempo	Vivos al inicio del intervalo	Muertes durante el intervalo (d)	Abandono vivo o pérdida del seguimiento (w)
0-10	15	0	0
11-20	13	2	0
21-30	13	2	0
31-20	10	5	0
41-50	9	6	0
51-60	7	8	0
61-68	5	10	0
	Probabilidad de muerte $q = \frac{d}{(n - [w/2])}$	Probabilidad de supervivencia $p_i = 1 - q$	Probabilidad acumulada de supervivencia $s = p_i \cdot p_{i-1}$
0-10	0	1	1
11-20	0.13	0.87	(1)(0.87)=0.87
21-30	0.13	0.87	(0.87)(0.87)=0.76
31-20	0.33	0.67	(0.76)(0.67)=0.51
41-50	0.4	0.6	(0.51)(0.6)=0.306
51-60	0.53	0.47	(0.306)(0.47)=0.144
61-68	0.66	0.34	(0.144)(0.34)=0.049



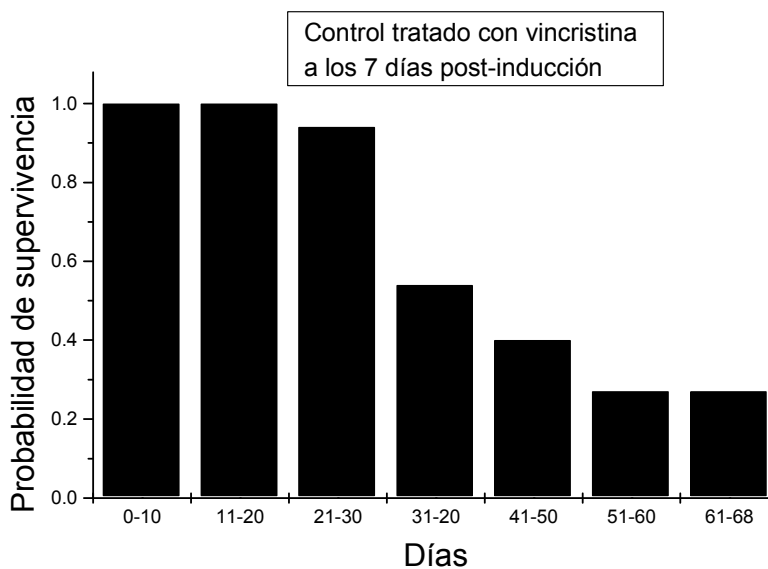
Control con tumor sin tratar. Método de Cutler-Ederer (método actuarial).

Intervalos de tiempo	Vivos al inicio del intervalo	Muertes durante el intervalo (d)	Abandono vivo o pérdida del seguimiento (w)
0-10	10	0	0
11-20	9	1	0
21-30	5	5	0
31-20	4	6	0
41-50	4	6	0
51-60	3	7	0
61-68	2	8	0
	Probabilidad de muerte $q = \frac{d}{n - [w/2]}$	Probabilidad de supervivencia $p_i = 1 - q$	Probabilidad acumulada de supervivencia $s = p_i \cdot p_{i-1}$
0-10	0	1	1
11-20	0.1	0.9	(1)(0.9)=0.9
21-30	0.5	0.5	(0.9)(0.5)=0.45
31-20	0.6	0.4	(0.45)(0.4)=0.18
41-50	0.6	0.4	(0.18)(0.4)=0.072
51-60	0.7	0.3	(0.072)(0.3)=0.022
61-68	0.8	0.2	(0.022)(0.2)=0.004



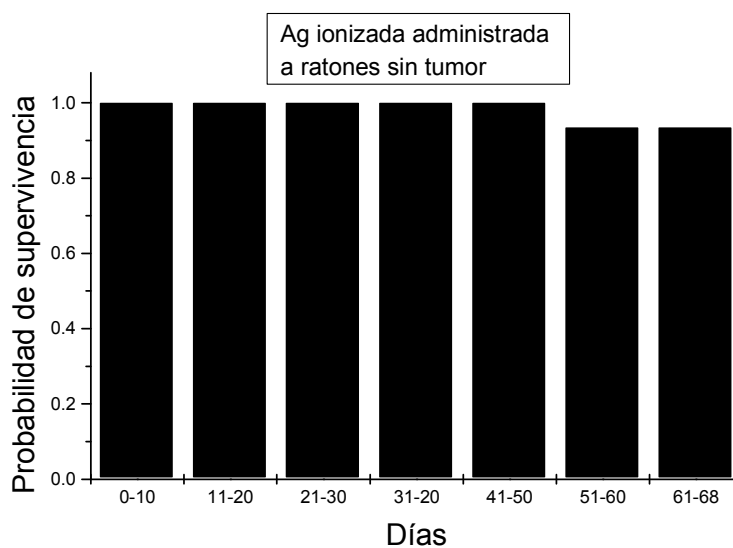
Control tratado con vincristina a los 7 días post-inducción. Método de Cutler-Ederer (método actuarial).

Intervalos de tiempo	Vivos al inicio del intervalo	Muertes durante el intervalo (d)	Abandono vivo o pérdida del seguimiento (w)
0-10	15	0	0
11-20	15	0	0
21-30	14	1	0
31-20	8	7	0
41-50	6	9	0
51-60	4	11	0
61-68	4	11	0
	Probabilidad de muerte $q = \frac{d}{(n - [w/2])}$	Probabilidad de supervivencia $p_i = 1 - q$	Probabilidad acumulada de supervivencia $s = p_i \cdot p_{i-1}$
0-10	0	1	1
11-20	0	1	(1)(1)=1
21-30	0.06	0.94	(1)(0.94)=0.94
31-20	0.46	0.54	(0.94)(0.54)=0.51
41-50	0.6	0.4	(0.51)(0.4)=0.203
51-60	0.73	0.27	(0.203)(0.27)=0.055
61-68	0.73	0.27	(0.055)(0.27)=0.015



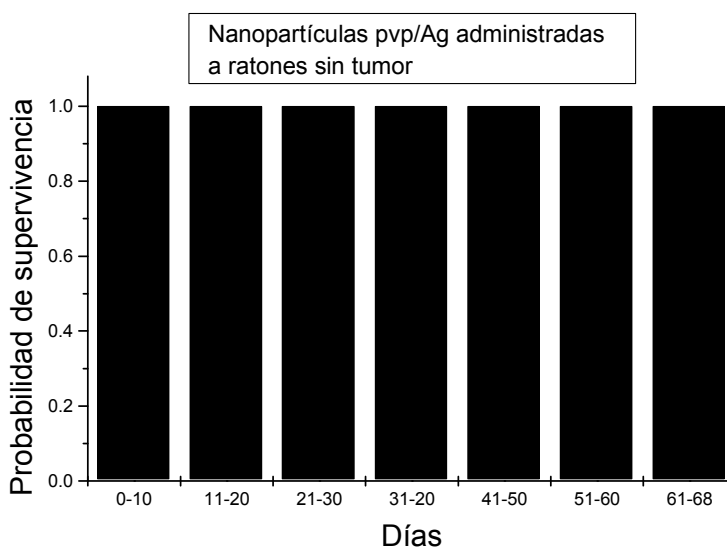
Control de solución de Ag ionizada administrada a ratones sin tumor. Método de Cutler-Ederer (método actuarial).

Intervalos de tiempo	Vivos al inicio del intervalo	Muertes durante el intervalo (d)	Abandono vivo o pérdida del seguimiento (w)
0-10	15	0	0
11-20	15	0	0
21-30	15	0	0
31-20	15	0	0
41-50	15	0	0
51-60	14	1	0
61-68	14	1	0
	Probabilidad de muerte $q = \frac{d}{(n - [w/2])}$	Probabilidad de supervivencia $p_i = 1 - q$	Probabilidad acumulada de supervivencia $s = p_i \cdot p_{i-1}$
0-10	0	1	1
11-20	0	1	(1)(1)=1
21-30	0	1	(1)(1)=1
31-20	0	1	(1)(1)=1
41-50	0	1	(1)(1)=1
51-60	0.066	0.934	(1)(0.934)=0.934
61-68	0.066	0.934	(0.934)(0.934)=0.87



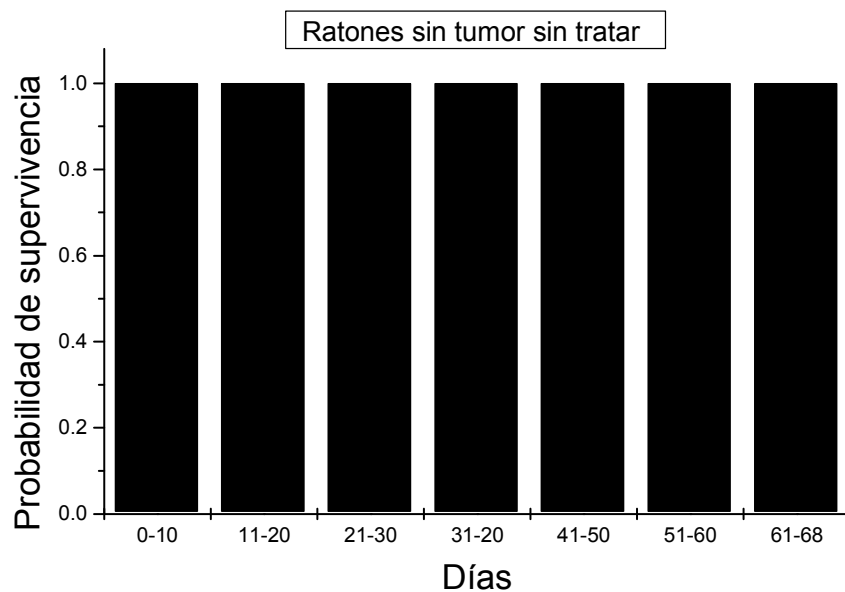
Control de toxicidad nanopartículas polivinilpirrolidona/Ag administradas a ratones sin tumor. Método de Cutler-Ederer (método actuarial).

Intervalos de tiempo	Vivos al inicio del intervalo	Muertes durante el intervalo (d)	Abandono vivo o pérdida del seguimiento (w)
0-10	15	0	0
11-20	15	0	0
21-30	15	0	0
31-20	15	0	0
41-50	15	0	0
51-60	15	0	0
61-68	15	0	0
	Probabilidad de muerte $q = \frac{d}{(n - [w/2])}$	Probabilidad de supervivencia $p_i = 1 - q$	Probabilidad acumulada de supervivencia $s = p_i \cdot p_{i-1}$
0-10	0	1	1
11-20	0	1	(1)(1)=1
21-30	0	1	(1)(1)=1
31-20	0	1	(1)(1)=1
41-50	0	1	(1)(1)=1
51-60	0	1	(1)(1)=1
61-68	0	1	(1)(1)=1



Ratones sin tumor sin tratar. Método de Cutler-Ederer (método actuarial).

Intervalos de tiempo	Vivos al inicio del intervalo	Muertes durante el intervalo (d)	Abandono vivo o pérdida del seguimiento (w)
0-10	15	0	0
11-20	15	0	0
21-30	15	0	0
31-20	15	0	0
41-50	15	0	0
51-60	15	0	0
61-68	15	0	0
	Probabilidad de muerte $q = \frac{d}{(n - [w/2])}$	Probabilidad de supervivencia $p_i = 1 - q$	Probabilidad acumulada de supervivencia $s = p_i \cdot p_{i-1}$
0-10	0	1	1
11-20	0	1	(1)(1)=1
21-30	0	1	(1)(1)=1
31-20	0	1	(1)(1)=1
41-50	0	1	(1)(1)=1
51-60	0	1	(1)(1)=1
61-68	0	1	(1)(1)=1



APÉNDICE C
COMPARACIÓN DE CURVAS DE SUPERVIVENCIA POR EL MÉTODO
LOG-RANK

Comparación de curvas de supervivencia. Solución de Ag ionizada administrada a los 7 días post-inducción vs control con tumor sin tratar.

Ho: Las distribuciones de supervivencia son iguales entre los dos grupos.

Ha: Las distribuciones de supervivencia no son iguales entre los dos grupos.

Día del evento (muerte)	Ratones en riesgo Ag	Ratones en riesgo (control)	Total	Muertes observadas Ag	Muertes observadas (control)	Total	Muertes esperadas Ag	Muertes esperadas (control)	Total
17	15	10	25	0	0	0	0	0	0
18	12	10	22	3	0	3	1.64	1.36	3
19	12	10	22	0	0	0	0	0	0
20	10	10	20	2	0	2	1	1	2
21	10	8	18	0	2	2	1.11	0.89	2
22	9	8	17	1	0	1	0.53	0.47	1
25	9	8	17	0	0	0	0	0	0
28	8	8	16	1	0	1	0.5	0.5	1
30	8	4	12	0	4	4	2.7	1.3	4
32	6	3	9	2	1	3	2	1	3
37	6	2	8	0	1	1	0.75	0.25	1
43	4	2	6	2	0	2	1.33	0.67	2
52	4	2	6	0	0	0	0	0	0
56	3	1	4	1	1	2	1.5	0.5	2
58	3	1	4	0	0	0	0	0	0
59	2	1	3	1	0	1	0.67	0.33	1
				13	9	22	13.73	8.27	22

$$x^2 = \frac{(O_1 - E_1)^2}{E_1} + \frac{(O_2 - E_2)^2}{E_2}$$

Grados de libertad=1

$$x^2 = \frac{(13 - 13.73)^2}{13.73} + \frac{(9 - 8.27)^2}{8.27} = 0.039 + 0.064 = 0.103$$

Alfa=0.05

0.103 < 3.841, por lo tanto la hipótesis nula se acepta: No hay diferencia significativa entre el grupo tratado y el control.

Comparación de curvas de supervivencia. Solución de Ag ionizada administrada a los 0 días post-inducción vs control con tumor sin tratar.

Ho: Las distribuciones de supervivencia son iguales entre los dos grupos.

Ha: Las distribuciones de supervivencia no son iguales entre los dos grupos.

Día del evento (muerte)	Ratones en riesgo Ag	Ratones en riesgo (control)	Total	Muertes observadas Ag	Muertes observadas (control)	Total	Muertes esperadas Ag	Muertes esperadas (control)	Total
10	14	10	24	1	0	1	0.58	0.42	1
18	14	10	24	0	0	0	0	0	0
20	14	10	24	0	0	0	0	0	0
21	14	9	23	0	1	1	0.61	0.39	1
25	14	8	22	0	1	1	0.64	0.36	1
26	13	6	19	1	2	3	2.05	0.95	3
27	11	6	17	2	0	2	1.29	0.71	2
28	10	6	16	1	0	1	0.62	0.375	1
30	10	5	15	0	1	1	0.67	0.33	1
40	10	2	12	0	3	3	2.5	0.5	3
43	9	2	11	1	0	1	0.82	0.18	1
45	8	2	10	1	0	1	0.8	0.2	1
52	7	2	9	1	0	1	0.78	0.22	1
58	7	1	8	0	1	1	0.87	0.125	1
				8	9	17	12.23	4.76	17

Grados de libertad=1

$$x^2 = \frac{(8 - 12.23)^2}{12.23} + \frac{(9 - 4.76)^2}{4.76} = 1.46 + 3.78 = 5.24$$

Alfa=0.05%

5.24 > 3.841, por lo tanto la hipótesis nula se rechaza: Si hay diferencia significativa entre el grupo tratado y el control.

Alfa=0.025%

5.24 > 5.024, por lo tanto la hipótesis nula se rechaza: Si hay diferencia significativa entre el grupo tratado y el control.

Comparación de curvas de supervivencia. Nanopartículas polivinilpirrolidona/Ag administradas a los 7 días post-inducción vs control con tumor sin tratar.

Ho: Las distribuciones de supervivencia son iguales entre los dos grupos.

Ha: Las distribuciones de supervivencia no son iguales entre los dos grupos.

Día del evento (muerte)	Ratones en riesgo np pvp/Ag	Ratones en riesgo (control)	Total	Muertes observadas np pvp/Ag	Muertes observadas (control)	Total	Muertes esperadas Ag	Muertes esperadas (control)	Total
17	15	10	15	0	0	0	0	0	0
18	13	10	23	2	0	2	1.13	0.87	2
20	12	9	21	1	1	2	1.14	0.86	2
21	11	9	20	1	0	1	0.55	0.45	1
23	10	8	18	1	1	2	1.11	0.89	2
28	7	5	12	3	3	6	3.5	2.5	6
30	6	3	9	1	2	3	2	1	3
32	5	2	7	1	1	2	1.43	0.67	2
35	4	2	6	1	0	1	0.67	0.33	1
38	3	2	5	1	0	1	0.6	0.4	1
52	3	2	5	0	0	0	0	0	0
58	3	1	4	0	1	1	0.75	0.25	1
64	3	1	4	0	0	0	0	0	0
				12	9	21	12.88	8.22	21

$$x^2 = \frac{(12 - 12.88)^2}{12.88} + \frac{(9 - 8.22)^2}{8.22} = 0.06 + 0.074 = 0.134$$

Grados de libertad=1

Alfa=0.05

0.134 < 3.841, por lo tanto la hipótesis nula se acepta: No hay diferencia significativa entre el grupo tratado y el control.

Comparación de curvas de supervivencia. Nanopartículas polivinilpirrolidona/Ag administradas a los 0 días post-inducción vs control con tumor sin tratar.

Ho: Las distribuciones de supervivencia son iguales entre los dos grupos.

Ha: Las distribuciones de supervivencia no son iguales entre los dos grupos.

Día del evento (muerte)	Ratones en riesgo np pvp/Ag	Ratones en riesgo (control)	Total	Muertes observadas np pvp/Ag	Muertes observadas (control)	Total	Muertes esperadas Ag	Muertes esperadas (control)	Total
9	14	10	24	1	0	1	0.58	0.42	1
18	13	10	23	1	0	1	0.56	0.44	1
20	13	9	22	0	1	1	0.59	0.41	1
21	13	9	22	0	0	0	0	0	0
22	13	8	21	0	1	1	0.62	0.38	1
27	11	5	16	2	3	5	3.44	1.56	5
28	10	5	15	1	0	1	0.67	0.33	1
29	10	4	14	0	1	1	0.72	0.28	1
30	10	3	13	0	1	1	0.77	0.23	1
32	9	2	11	1	1	2	1.64	0.36	2
49	7	2	9	2	0	2	1.55	0.44	2
52	7	2	9	0	0	0	0	0	0
55	6	1	7	1	1	2	1.71	0.29	2
57	5	1	6	1	0	1	0.83	0.17	1
58	5	1	6	0	0	0	0	0	0
64	4	1	5	1	0	1	0.8	0.2	1
				11	9	20	14.48	5.51	20

$$x^2 = \frac{(11-14.48)^2}{14.48} + \frac{(9-5.51)^2}{5.51} = 0.836 + 2.21 = 3.046$$

Grados de libertad=1

Alfa=0.05

3.046 < 3.841, por lo tanto la hipótesis nula se acepta: No hay diferencia significativa entre el grupo tratado y el control.

Alfa=0.1

3.046 > 2.706, por lo tanto la hipótesis nula se rechaza: Hay diferencia significativa entre el grupo tratado y el control

Comparación de curvas de supervivencia. Solución de Ag ionizada administrada a los 0 días post-inducción vs solución de Ag ionizada administrada a los 7 días post-inducción.

Ho: Las distribuciones de supervivencia son iguales entre los dos grupos.

Ha: Las distribuciones de supervivencia no son iguales entre los dos grupos.

Día del evento (muerte)	Ratones en riesgo Ag 7 días	Ratones en riesgo Ag 0 días	Total	Muertes observadas Ag 7 días	Muertes observadas Ag 0 días	Total	Muertes esperadas Ag 7 días	Muertes esperadas Ag 0 días	Total
10	15	14	29	0	1	1	0.52	0.48	1
17	13	14	27	2	0	2	0.96	1.04	2
19	11	14	25	2	0	2	0.88	1.12	2
20	10	14	24	1	0	1	0.42	0.58	1
22	10	14	24	0	0	0	0	0	0
25	9	14	23	1	0	1	0.39	0.61	1
26	9	13	22	0	1	1	0.41	0.59	1
27	8	13	21	1	0	1	0.38	0.62	1
32	8	11	19	0	2	2	0.84	1.16	2
37	6	10	16	2	1	3	1.125	1.875	3
40	4	10	14	2	0	2	0.57	1.43	2
43	4	8	12	0	2	2	0.66	1.33	2
45	4	7	11	0	1	1	0.36	0.64	1
56	4	7	11	0	0	0	0	0	0
59	3	7	10	1	0	1	0.3	0.7	1
				12	8	20	7.815	12.175	20

$$x^2 = \frac{(12 - 7.815)^2}{7.815} + \frac{(8 - 12.175)^2}{12.175} = 2.24 + 1.43 = 3.67$$

Grados de libertad=1

Alfa=0.05

3.67 < 3.841, por lo tanto la hipótesis nula se acepta: No hay diferencia significativa entre ambos tratamientos.

Comparación de curvas de supervivencia. Solución de Ag ionizada administrada a los 0 días post-inducción vs nanopartículas polivinilpirrolidona/Ag administradas a los 7 días post-inducción.

Ho: Las distribuciones de supervivencia son iguales entre los dos grupos.

Ha: Las distribuciones de supervivencia no son iguales entre los dos grupos.

Día del evento (muerte)	Ratones en riesgo np pvp/Ag 7 días	Ratones en riesgo Ag 0 días	Total	Muertes observadas np pvp/Ag 7 días	Muertes observadas Ag 0 días	Total	Muertes esperadas np pvp/Ag 7 días	Muertes esperadas Ag 0 días	Total
10	15	14	29	0	1	1	0.52	0.48	1
17	14	14	28	1	0	1	0.5	0.5	1
21	11	14	25	3	0	2	0.88	1.12	2
23	10	14	24	1	0	1	0.42	0.58	1
25	9	14	23	1	0	1	0.39	0.61	1
26	8	13	21	1	1	2	0.76	1.24	2
27	8	13	21	0	0	0	0	0	0
28	7	12	19	1	1	2	0.74	1.26	2
30	6	11	17	1	1	2	0.71	1.29	2
32	5	10	15	1	1	2	0.67	1.33	2
35	4	10	14	1	0	1	0.29	0.71	1
38	3	10	13	1	0	1	0.23	0.77	1
40	3	10	13	0	0	0	0	0	0
43	3	8	11	0	2	2	0.54	1.45	2
45	3	7	10	0	1	1	0.3	0.7	1
65	2	7	9	1	0	1	0.22	0.78	1
				13	8	20	7.17	12.82	20

$$x^2 = \frac{(13 - 7.17)^2}{7.17} + \frac{(8 - 12.82)^2}{12.82} = 4.74 + 1.81 = 6.55$$

Grados de libertad=1

Alfa=0.05

6.55 > 3.841, por lo tanto la hipótesis nula se rechaza: Hay diferencia significativa entre los tratamientos

Comparación de curvas de supervivencia. Solución de Ag ionizada administrada a los 0 días post-inducción vs nanopartículas polivinilpirrolidona/Ag administradas a los 0 días post-inducción.

Ho: Las distribuciones de supervivencia son iguales entre los dos grupos.

Ha: Las distribuciones de supervivencia no son iguales entre los dos grupos.

Día del evento (muerte)	Ratones en riesgo np pvp/Ag 0 días	Ratones en riesgo Ag 0 días	Total	Muertes observadas np pvp/Ag 7 días	Muertes observadas Ag 0 días	Total	Muertes esperadas np pvp/Ag 0 días	Muertes esperadas Ag 0 días	Total
9	14	14	28	1	1	2	1	1	2
10	13	14	27	1	0	1	0.48	0.52	1
22	12	14	26	1	0	1	0.46	0.54	1
25	12	14	26	0	0	0	0	0	0
26	12	13	25	0	1	1	0.48	0.52	1
27	11	13	24	1	0	1	0.46	0.54	1
29	10	12	22	1	1	2	0.91	1.09	2
32	10	10	20	0	2	2	1	1	2
40	9	10	19	1	0	1	0.47	0.53	1
43	9	8	17	0	2	2	1.06	0.94	2
45	9	7	16	0	1	1	0.56	0.44	1
49	7	7	14	2	0	2	1	1	2
55	6	7	13	1	0	1	0.46	0.54	1
57	6	7	13	0	0	0	0	0	
64	4	7	11	2	0	2	0.73	1.27	2
67	4	7	11	0	0	0	0	0	
68	4	7	11	0	0	0	0	0	
				11	8	19	9.07	9.93	19

$$x^2 = \frac{(11 - 9.07)^2}{9.07} + \frac{(8 - 9.93)^2}{9.93} = 0.41 + 0.375 = 0.785$$

Grados de libertad=1

Alfa=0.05

0.785 < 3.841, por lo tanto la hipótesis nula se acepta: No hay diferencia significativa entre el grupo tratado y el control.

Comparación de curvas de supervivencia. Vincristina administrada a los 7 días post-inducción vs grupo con tumor sin tratar.

Ho: Las distribuciones de supervivencia son iguales entre los dos grupos.

Ha: Las distribuciones de supervivencia no son iguales entre los dos grupos.

Día del evento (muerte)	Ratones en riesgo Vincristina	Ratones en riesgo (Control)	Total	Muertes observadas Vincristina	Muertes observadas (Control)	Total	Muertes esperadas Vincristina	Muertes esperadas (Control)	Total
4	15	10	25	0	0	0	0	0	0
18	15	10	25	0	0	0	0	0	0
20	15	10	25	0	0	0	0	0	0
21	14	8	22	1	2	3	1.91	1.09	3
24	13	8	21	1	0	1	0.62	0.38	1
25	12	8	20	1	0	1	0.6	0.4	1
27	10	8	18	2	0	2	1.11	0.89	2
28	10	8	18	0	0	0	0	0	0
30	8	3	11	2	5	7	5.1	1.9	7
33	7	3	10	1	0	1	0.7	0.3	1
35	7	2	9	0	1	1	0.78	0.22	1
44	6	2	8	1	0	1	0.75	0.25	1
51	5	2	7	1	0	1	0.71	0.29	1
52	5	2	7	0	0	0	0	0	0
58	4	1	5	1	1	1	0.8	0.2	1
				11	9		13.08	5.92	19

$$x^2 = \frac{(11 - 13.08)^2}{13.08} + \frac{(9 - 5.92)^2}{5.92} = 0.331 + 1.6 = 1.931$$

Grados de libertad=1

Alfa=0.05

1.931 < 3.841, por lo tanto la hipótesis nula se acepta: No hay diferencia significativa entre el grupo tratado y el control.

Comparación de curvas de supervivencia. Vincristina administrada a los 7 días post-inducción vs Solución Ag ionizada administrada a los 0 días.

Ho: Las distribuciones de supervivencia son iguales entre los dos grupos.

Ha: Las distribuciones de supervivencia no son iguales entre los dos grupos.

Día del evento (muerte)	Ratones en riesgo Vincristina	Ratones en riesgo Ag 0 días	Total	Muertes observadas Vincristina	Muertes observadas Ag 0 días	Total	Muertes esperadas Vincristina	Muertes esperadas Ag 0 días	Total
4	15	14	29	0	1	1	0.52	0.48	1
10	15	14	29	0	0	0	0	0	0
24	13	14	27	2	0	2	0.96	1.04	2
25	12	14	26	1	0	1	0.46	0.54	1
26	11	13	24	1	1	2	0.92	1.08	2
27	10	13	23	1	0	1	0.43	0.56	1
28	10	12	22	0	1	1	0.45	0.54	1
33	7	10	17	3	2	5	2.06	2.94	5
35	7	10	17	0	0	0	0	0	0
40	6	10	16	1	0	1	0.375	0.625	1
43	6	8	14	0	2	2	0.86	1.14	2
44	6	8	14	0	0	0	0	0	0
45	6	7	13	0	1	1	0.46	0.54	1
51	5	7	12	1	0	1	0.42	0.58	1
55	4	7	11	1	0	1	0.36	0.64	1
				11	8	19	8.275	10.705	19

$$x^2 = \frac{(11 - 8.275)^2}{8.275} + \frac{(8 - 10.705)^2}{10.705} = 0.897 + 0.68 = 1.577$$

Grados de libertad=1

Alfa=0.05

1.577 < 3.841, por lo tanto la hipótesis nula se acepta: No hay diferencia significativa entre el grupo tratado y el control.

Comparación de curvas de supervivencia. Vincristina administrada a los 7 días post-inducción vs nanopartículas administradas a los 0 días.

Ho: Las distribuciones de supervivencia son iguales entre los dos grupos.

Ha: Las distribuciones de supervivencia no son iguales entre los dos grupos.

Día del evento (muerte)	Ratones en riesgo Vincristina	Ratones en riesgo np pvp/Ag 0 días	Total	Muertes observadas Vincristina	Muertes observadas np pvp/Ag 0 días	Total	Muertes esperadas Vincristina	Muertes esperadas np pvp/Ag 0 días	Total
4	15	14	29	0	1	1	0.52	0.48	1
9	15	13	28	0	1	1	0.54	0.46	1
22	14	13	27	1	0	1	0.52	0.48	1
24	13	12	25	1	1	2	1.04	0.96	2
25	12	12	24	1	0	1	0.5	0.5	1
27	10	11	21	2	1	3	1.43	1.57	3
28	10	11	21	0	0	0	0	0	0
29	9	10	19	1	1	2	0.95	1.05	2
32	8	10	18	1	0	1	0.44	0.56	1
33	7	9	16	1	1	2	0.875	1.125	2
35	7	9	16	0	0	0	0	0	0
44	6	9	15	1	0	1	0.4	0.6	1
49	5	7	12	1	2	3	1.25	1.75	3
51	5	7	12	0	0	0	0	0	0
55	4	6	10	1	1	2	0.8	1.2	2
57	4	6	10	0	0	0	0	0	0
64	4	4	8	0	2	2	1	1	2
67	4	4	8	0	0	0	0	0	0
68	4	4	8	0	0	0	0	0	0
				11	11	22	10.265	11.735	22

$$x^2 = \frac{(11-10.265)^2}{10.265} + \frac{(11-11.735)^2}{11.735} = 0.0526 + 0.046 = 0.0986$$

Grados de libertad=1

Alfa=0.05

0.0986 < 3.841, por lo tanto la hipótesis nula se acepta: No hay diferencia significativa entre ambos tratamientos.

APÉNDICE D

DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES LETALES MEDIAS POR ANÁLISIS DE REGRESIÓN PROBIT

Solución de plata ionizada sobre el crecimiento de la línea L5178Y-R:

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for concentration		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	-2.039	-14.672	-.272
	.020	-1.554	-12.553	.028
	.030	-1.246	-11.213	.224
	.040	-1.015	-10.208	.374
	.050	-.827	-9.393	.498
	.060	-.666	-8.701	.606
	.070	-.526	-8.097	.703
	.080	-.400	-7.558	.792
	.090	-.285	-7.069	.874
	.100	-.180	-6.621	.952
	.150	.256	-4.792	1.298
	.200	.603	-3.383	1.619
	.250	.900	-2.234	1.953
	.300	1.167	-1.280	2.332
	.350	1.414	-.500	2.786
	.400	1.649	.121	3.337
	.450	1.876	.602	3.989
	.500	2.1	.976	4.730
	.550	2.323	1.278	5.544
	.600	2.551	1.534	6.422
	.650	2.785	1.761	7.365
	.700	3.033	1.975	8.386
	.750	3.300	2.186	9.508
	.800	3.597	2.404	10.773
	.850	3.944	2.644	12.263
	.900	4.380	2.931	14.152
	.910	4.485	2.998	14.610
	.920	4.600	3.071	15.108
	.930	4.726	3.151	15.656
	.940	4.866	3.239	16.269
	.950	5.026	3.338	16.970
	.960	5.215	3.454	17.793
	.970	5.446	3.595	18.807
	.980	5.754	3.781	20.156
	.990	6.239	4.071	22.286

a. A heterogeneity factor is used.

Probit Analysis

[DataSet4] C:\Users\LACHO\Documents\tesis posgrado\citotoxicidad in vitro\ag ionizada citotoxicidad.sav

Warnings

Relative Median Potency Estimates are not displayed because there is no grouping variable in the model.

Data Information

	N of Cases
Valid	5
Rejected	0
Missing	0
Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group	1

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	12	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a concentration	.562	.048	11.591	.000	.467	.657
Intercept	-1.180	.100	-11.779	.000	-1.281	-1.080

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	23.842	3	.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

	Number	concentration	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	.000	100	0	11.894	-11.894	.119
	2	.547	100	30	19.135	11.238	.191
	3	1.000	100	33	26.821	5.804	.268
	4	2.188	100	49	51.963	-2.534	.520
	5	4.000	100	84	85.724	-1.590	.857

Nanopartículas pvp/Ag sobre el crecimiento de la línea L5178Y-R:

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for concentracion		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	.010	-42.911	-158.867	-18.153
	.020	-34.750	-134.691	-12.938
	.030	-29.571	-119.409	-9.572
	.040	-25.676	-107.955	-6.998
	.050	-22.508	-98.672	-4.870
	.060	-19.811	-90.801	-3.029
	.070	-17.446	-83.927	-1.387
	.080	-15.329	-77.799	.110
	.090	-13.403	-72.252	1.498
	.100	-11.631	-67.171	2.800
	.150	-4.292	-46.510	8.568
	.200	1.540	-30.810	13.873
	.250	6.544	-18.296	19.379
	.300	11.038	-8.303	25.569
	.350	15.202	-.476	32.737
	.400	19.153	5.596	40.894
	.450	22.976	10.408	49.849
	.500	26.74	14.404	59.402
	.550	30.500	17.903	69.452
	.600	34.323	21.119	80.003
	.650	38.274	24.203	91.148
	.700	42.438	27.274	103.073
	.750	46.931	30.447	116.083
	.800	51.935	33.860	130.690
	.850	57.768	37.729	147.825
	.900	65.106	42.484	169.499
	.910	66.879	43.619	174.748
	.920	68.804	44.846	180.455
	.930	70.922	46.191	186.735
	.940	73.286	47.686	193.756
	.950	75.983	49.385	201.770
	.960	79.152	51.372	211.193
	.970	83.047	53.805	222.788
	.980	88.225	57.024	238.217
	.990	96.387	62.069	262.564

a. A heterogeneity factor is used.

Probit Analysis

[DataSet0]

Warnings

Relative Median Potency Estimates are not displayed because there is no grouping variable in the model.

Data Information

		N of Cases
Valid		9
Rejected	Missing	1
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		1

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	11	Yes

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a concentracion	.033	.003	13.253	.000	.028	.038
Intercept	-.893	.059	-15.261	.000	-.952	-.835

a. PROBIT model: PROBIT(p) = Intercept + BX

Chi-Square Tests

	Chi-Square	df ^a	Sig.
PROBIT Pearson Goodness-of-Fit Test	97.776	7	.000 ^b

a. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

b. Since the significance level is less than .150, a heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Cell Counts and Residuals

	Number	concentracion	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	.000	100	0	18.591	-18.591	.186
	2	.488	100	6	19.030	-13.301	.190
	3	.977	100	15	19.477	-4.947	.195
	4	1.953	100	18	20.388	-2.787	.204
	5	3.906	100	24	22.285	1.563	.223
	6	7.812	100	49	26.365	22.880	.264
	7	15.625	100	57	35.525	21.247	.355
	8	31.250	100	65	55.990	9.119	.560
	9	62.500	100	78	88.386	-10.736	.884

LITERATURA CITADA:

Allemann E, Gurny R, and Doelkar E. 1993. Drug loaded nanoparticles-Preparation methods and drug targeting issues. *Eu.r J. Pharm. Biopharm.* 39 : 173.

Annino L, Vegna ML, Camera A. 2002. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): long-term follow-up of the GIMEMA ALL 0288 randomized study. *Blood.* 99:863-871.

Asharani PV, Hande MP, Valiyaveetil S. 2009. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol.* 10:65.

Asharani PV, Lian WY, Gong Z, Valiyaveetil S. 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* 19:255102.

Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett.* 179:93–100.

Asharani PV, Mun GLK, Hande MP, Valiyaveetil S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.* 3(2):279-90.

Basu S, Jana S, Pande S, Pal T. 2008. Interaction of DNA bases with silver nanoparticles: assembly quantified through SPRS and SERS. *Colloid Interface.* 321(2):288-93.

Bradfield J. 1984. The reticulo-endothelial system and blood clearance. Microspheres and drug therapy. Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects. J. G. McVie and E. Tomlison, ed. *Elsevier*, Amsterdam, The Netherlands.

Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann M. 2005. *In Vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci.* 2005 December; 88(2): 412–419.

Brueggemann M, Droese J, Raff T. 2001. The prognostic significance of minimal residual disease in adult standard risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 98:314a.

Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B.* 112(43):13608-19.

Carrasco-Trancoso J. 2000. Regulation of metallothionein during stress and inflammation and its role in the inflammatory response. *Trabajo de tesis, Universidad de Barcelona.* 1-10.

Charrin C. 1996. Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: Correlations with hematologic findings and outcome. A collaborative study of the Groupe Francais de Cytogénétique Hématologique. *Blood.* 87:3135-3142.

Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang JS, Park K, Yi J, Ryu DY. 2010. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat Toxicol.* 100(2):151-9.

David Y, Pui H, Da-ren Chem. 1997. Generation of high concentration nanoparticles for filtration Studies. *J Aerosol Sci.* 28(4): 593-594.

Davis S, Hunneyball I, Ilium L. 1985. Recent advances in the use of microspheres for targeted therapy. *Drugs Esp Clin Res.* 4: 633-640

DeFries JL, McClearn G. E. 1970. Social dominance and Darwinian fitness in the laboratory mouse. *Am. Naturalist.* 104: 408-411.

Druker BJ, Sawyers C, Kantarjian H. 2001. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leucemia with the Philadelphia chromosome. *New Engl J Med.* 344:1038-1042.

Durrant IJ, Prentice HG, Richards SM. 1997. Intensification of treatment for adults with acute lymphoblastic leukaemia: results of U.K. Medical Research council randomized trial UKALL XA. *Br J Haematol.* 99:84-92.

Essner E, Haimes H. 1977. Ultrastructural study of gerl in beige niyse alveolar macrophages. *The Journal of cell biology.* 75: 381-387.

Foldbjerg R, Dang, DA, Autrup H. 2010. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol.* 3: 279-290.

Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. 2009. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett.* 28;190(2):156-62.

Frier M. 1981 Phagocytosis. In: Cox PM (ed) Progress in Radiopharmacology 1981. (vol 2). *Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam*, pp 249–260.

Furst A, Schlauder MC. 1978. Inactivity of two noble metals as carcinogens. *Toxicology.* 1(1):51-7.

Garner M, Reglinski J, Smith WE, Stewart MJ. 1994. The interaction of colloidal metals with erythrocytes. *Inorganic Biochem.* 56(4): 283-90.

Gaur U, Sahoo S, De T, Ghosh P, Maitra A and Gosh P. 2000. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *Int J Pharmaceutics.* 202: 1-10.

Ghosh P. 2000. Hydrophilic polymeric nanoparticles as drug Carriers. *Indian J Biochem Biophys.* 37: 273-282.

Gökbuget N, Hoelzer D. 2002. The role of high-dose cytarabine in induction therapy for adult ALL. *Leuk Res.* 26:473-476.

Gökbuget N, Hoelzer D, Arnold R. 2000. Treatment of adult ALL according to the protocols of the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL). *Hemat/Oncol Clin North Am.* 14:1307-1325.

Gurav A, Kodas T, Pluym T, Xiaong Y. 1993. Micrometre-sized zinc silicate phosphor powders prepared using a size-controllable droplet generator from a polyethylene glycol spray solution. *Aerosol Sci Technol.* 19: 411-542.

Gurunathan S, Lee KJ, Kalishwaralal K, Sheikpranbabu S, Vaidyanathan R, Eom SH. 2009. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. *Biomaterials.* 30(31):6341-50.

Hoelzer D, Arnold R, Freund M. 1999. Characteristics, outcome and risk factors in adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood.* 94:2926a.

Hoelzer D, Gökbuget N. 2000. New approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults: Where do we go? *Semin Oncol.* 27:540-559.

Hoelzer D, Gökbuget N, Ottmann O, Pui CH, Relling MV, Appelbaum FR. 1992. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 162-92.

Hoelzer D, Thiel E, Löffler H. 1990. Intensified chemotherapy and mediastinal irradiation in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. En: Gale RP, Hoelzer D, eds. *Acute Lymphoblastic Leukemia.* Alan R. Liss, Inc. 221-229.

Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett.* 179:130–139.

Hurwitz CA, Silverman LB, Schorin MA. 2000. Substituting dexamethasone for prednisone complicates remission induction in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 88:1964-1969.

Jalil R, Nixon JJ. 1990. Microencapsulation using poly(DL-lactic acid). III: Effect of polymer molecular weight on the release kinetics. *Microencapsulation.* 7: 297-325.

Kang K, Lim DH, Choi IH, Kang T, Lee K, Moon EY, Yang Y, Lee MS, Lim JS. 2011. Vascular tube formation and angiogenesis induced by polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles. *Toxicol Lett.* 10;205(3):227-34.

Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL. 2000. Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.*18:547-561.

Kemp MM, Kumar A, Mousa S, Dyskin E, Yalcin M, Ajayan P, Linhardt RJ, Mousa SA. 2009. Gold and silver nanoparticles conjugated with heparin derivative possess anti-angiogenesis properties. *Nanotechnology.* 11;20(45):455104.

Kim DW, Hong GH, Lee HH. 2007. Effect of colloidal silver against the cytotoxicity of hydrogen peroxide and naphthazarin on primary cultured cortical astrocytes. *Nanomedicine.* 3 (1):95-101.

Kim JS, Kuk E. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine.* 3(1) :95-101.

Koch M, Kiefer S, Cavalius C, Kraegeloh A. 2011. Use of a silver ion selective electrode to assess mechanisms responsible for biological effects of silver nanoparticles. *J Nanoparticle Res.* 14: 646, DOI: 10.1007/s11051-011-0646-y.

Kreuter J. 1983. Poly(Methyl Methacrylate) nanoparticles as vaccine adjuvants. *Pharma Acta Helv.* 58: 196-208.

Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research.* 19:15 4293.

Langer R. 1994. New methods of drug delivery. *Science.* 24: 1527-1533.

Langer R. 1998. Drug delivery and targeting. *Nature.* 392: 5-10.

Lansdown ABG. 2006. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Dermatology.* 33:17-34.

Lara HH, Ayala-Nuñez NV, Ixtepan-Turrent L, Rodriguez-Padilla C. 2010. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J Nanobiotechnol.* 8:1.

Larson RA, Dodge RK, Linker CA. 1998. A randomized controlled trial of filgrastim during remission induction and consolidation chemotherapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: CALGB study 9111. *Blood.* 92:1556-1564.

Li PW, Kuo TH, Chang JH, Yeh JM, Chan WH. 2010. Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles. *Toxicol Lett.* 16;197(2):82-7.

Ludwig WD, Raghavachar A, Thiel E. 1994. Immunophenotypic classification of acute lymphoblastic leukemia. *Bailliere's Clinical Haematology.* 7(2):235.

McDonnell G, Russell AD. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 12:147-179.

Mill S, Davis S. 1987. Polymers in Controlled Drug Delivery. (Illum L and Davis S Ed) Pub: 10P Publishing, Bristol, UK, pp 1-14.

Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, Choi J, Hyun JW. 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol Lett.* 25;201(1):92-100.

Rahman MF, Wang J, Patterson TA, Saini UT, Robinson BL, Newport GD, Murdock RC, Schlager JJ, Hussain SM, Ali SF. 2009. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol Lett* 187:15–21.

Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A. 1998. Late intensification chemotherapy has not improved the results of intensive chemotherapy in adult acute lymphoblastic leukemia. Results of a prospective multicenter randomized trial (PETHEMA ALL-89). *Haematologica.* 83:222-230.

Rowe JM, Richards S, Wiernik PH. 1999. Allogeneic bone marrow transplantation (BMT) for adults with acute lymphoblastic leukemia (ALL) in first complete remission (CR): Early results from the international ALL trial (MRC UKALL/ECOG E2993). *Blood.* 94:732a.

Rutberg FG, Dubina MV, Kolikov VA, Moiseenko FV, Ignat'eva EV, Volkov NM, Snetov VN, Stogov AY. 2008. Effect of silver oxide nanoparticles on tumor growth in vivo. *Dokl Biochem Biophys.* 421:191-3.

Sanpui P, Chattopadhyay A, Ghosh SS. Induction of Apoptosis in Cancer Cells at Low Silver Nanoparticle Concentrations using Chitosan Nanocarrier. 2011. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 3 (2), 218–228.

Sriram MI, Kanth SBM, Kalishwaralal K. 2010. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *Int J Nanomedicine.* 5: 753–762.

Thiebaut A, Vernant JP, Degos L. 2000. Adult acute lymphocytic leukemia study testing chemotherapy and autologous and allogeneic transplantation. A follow-up report of the French protocol LALA 87. *Hematol Oncol Clin North Am.*14:1353-66.

Thomas X, Boiron JM, Huguet F, Dombret H, Bradstock K, Vey N. 2004. Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of the LALA-94 trial. *J Clin Oncol.* 22:4075-86.

Wadhera MD. 2005. Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver. *Dermatology.* 11(1):12.

Wetzler M, Dodge RK, Mrozek K. 1999. Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: The Cancer and Leukemia Group B experience. *Blood.* 93:3983-3993.

World Health Organization. Fact sheet N°297
February 2009.

Xu R, Ma J, Sun X, Chen Z, Jiang X, Guo Z, Huang L, Li Y, Wang M, Wang C, Liu J, Fan X, Gu J, Chen X, Zhang Y, Gu N. 2009. Ag nanoparticles sensitize IR-induced killing of cancer cells. *Cell Res.* 2009. 19(8):1031-4.

Youn-Jung K, Sungi, Sung Yang, Jae-Chu. Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian cell lines. *Mol Cell Toxicol.* 6:119-125.

RESUMEN BIOGRÁFICO

José Horacio Lara González.

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología

Tesis: EFECTO CITOTÓXICO DE SOLUCIÓN DE PLATA LIBRE Y ENCAPSULADA EN NANOPARTÍCULAS CONTRA EL LINFOMA TÍMICO MURINO L5178Y-R

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Nuevo Laredo, Tamaulipas, México el 30 de Agosto de 1985, hijo de José Horacio Lara García y Dora Elia González Garza.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2010.