

Las nanopartículas de oro de 20 nm inhiben la proliferación e invasión de células de carcinoma mamario humano MCF7, *in vivo*¹

Roberto Lazzarini,* Omar Alcántar-Ramírez,** Ricardo Jaime-Cruz,***
Esbeydy García-Monterrubio,** María Concepción Gutiérrez-Ruiz**
y Luis Enrique Gómez-Quiroz**

RESUMEN: El cáncer de mama se posiciona como la neoplasia más común entre las mujeres a nivel mundial, haciendo importante la búsqueda de nuevos agentes que actúen contra esta enfermedad. La nanotecnología propone el uso de nanomateriales principalmente elaborados con oro (nanoAu). Ensayos *in vitro* sobre células tumorales indican que las nanoAu inducen su captación, eventualmente se dirigen cerca del núcleo celular y causan su fragmentación, produciendo la muerte de las células. Aunque los efectos de las nanoAu *in vivo* con modelo murino son prometedores, los altos costos y cuidados especiales de los animales (ratones desnudos) es un obstáculo para investigar este tema. La membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de pollo es un modelo abordable y económico que permite imitar las condiciones microambientales de la mayoría de las neoplasias que afectan al hombre. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto sobre la proliferación e invasión de las células de carcinoma mamario humano MCF7 en condiciones *in vivo* de la CAM del embrión de pollo. Nuestros resultados sugieren que las nanoAu pueden inhibir la proliferación de las células MCF7 y retrasan su diseminación sobre la CAM del embrión de pollo.

PALABRAS CLAVE: nanopartículas de oro, cáncer de mama, xenoimplante, proliferación celular.

ABSTRACT: Breast cancer ranks as the most common malignancy among women worldwide, so it becomes important to search for new agents that act against the disease. Nanotechnology proposes the use of nanomaterials mainly made from gold (nanoAu). *In vitro* essays on tumor cells indicate that nanoAu induce uptake, possibly near the target cell nucleus and cause its fragmentation, resulting in cell death. Although the effects of nanoAu *in vivo* mouse model are promising, high costs and special care of animals (nude mice) is an obstacle to investigating this issue. The chorioallantoic membrane (CAM) of chick embryo is a robust economic model to

Recibido: 7 de octubre de 2015. Aceptado: 18 de octubre de 2015.

¹ Agradecemos las facilidades para la realización de este trabajo al Laboratorio Divisivo de Microscopía Confocal de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa. Alcántara-Ramírez O. y García-Monterrubio E. contaron con becas SEP para Capacitación y Titulación, respectivamente.

* Departamento Biología de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I). San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, México D.F. Correspondencia: (lazzarini@xanum.uam.mx).

** Departamento Ciencias de la Salud, UAM-I.

*** Licenciatura en biología, UAM-I.

mimic microenvironmental conditions of most tumors that affect humans. The aim of this study was to evaluate the effect on the proliferation and invasion of human breast carcinoma cells MCF7 *in vivo* chick embryo CAM conditions. Our results suggest that nanoAu can inhibit the proliferation of MCF7 cells and delay spread on the chick embryo CAM.

KEYWORDS: gold nanoparticles, breast cancer, xenoinplant, cell proliferation.

Introducción

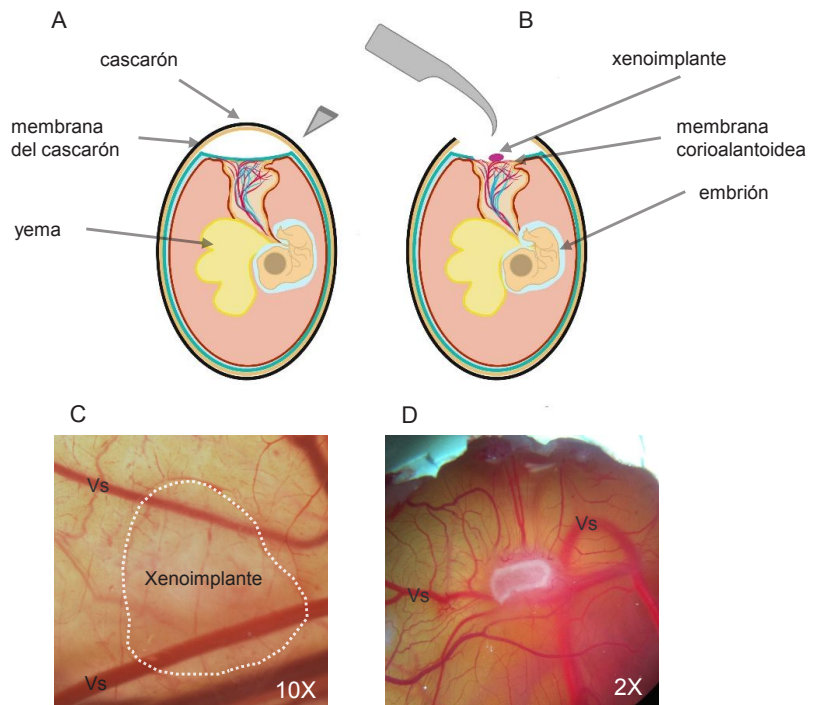
El cáncer de mama es considerado un problema de salud pública en el mundo, es la neoplasia más frecuente en las mujeres a nivel mundial, aunque también puede presentarse en el hombre (Giordano *et al.*, 2004). Las terapias antineoplásicas han demostrado mejorar la supervivencia en pacientes con cáncer de mama, pero también se caracterizan por presentar efectos secundarios potencialmente graves (Diest *et al.*, 2004). Así, es imprescindible la búsqueda de nuevas terapias que permitan aumentar la esperanza y calidad de vida de las personas con esta enfermedad. La nanotecnología se posiciona como una opción, al proponer el suministro de fármacos con mayor eficacia contra varios tipos de cánceres humanos. Las nanoAu desnudas o asociadas a ligandos, se sugieren como uno de los productos nanotecnológicos más aptos como terapia contra el cáncer. Trabajos que han evaluado los efectos de las nanoAu sobre líneas celulares de las principales neoplasias humanas *in vitro* indican que las nanoAu son inicialmente endocitadas (Dam *et al.*, 2012), en el citoplasma celular, incrementan las especies reactivas de oxígeno (Mateo *et al.*, 2014), se desplazan selectivamente a la periferia del núcleo celular y producen daño al material genético, el núcleo pierde estructura (Dam *et al.*, 2012) y, finalmente, las células cancerosas mueren por apoptosis (Kang *et al.*, 2010; Selim y Hendi, 2012; Tsai *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014). Sin embargo, las evaluaciones de los efectos anticarcinogénicos de las nanoAu en modelos *in vivo*, adquieren cada vez mayor relevancia. La membrana corioalantoidea del embrión de pollo (CAM) es un modelo abordable y económico que proporciona características microambientales muy similares a los tumores *in situ* de los humanos (Ossowski y Reich, 1980; Armstrong, 1982; Deryugina y Quigley 2008). La inhibición de la proliferación celular durante eventos carcinogénicos es de vital importancia y uno de los principales objetivos de la lucha contra el cáncer, por lo que propusimos evaluar el efecto de las nanoAu sobre la proliferación e invasión de células de carcinoma mamario humano MCF7 en un modelo *in vivo* de la CAM del embrión de pollo. En este estudio encontramos que las nanoAu disminuyeron significativamente la proliferación y relentizaron la invasión de las células de carcinoma mamario humano MCF7 en condiciones *in vivo*.

Materiales y métodos

Modelo de membrana corioalantoidea CAM

Se emplearon huevos fértiles de gallina (*Gallus domesticus*), libres de patógenos específicos, adquiridos en la granja ALPES S.A. (Tehuacán, Puebla). Se incubaron a 37.8°C y a 60% de humedad, durante 7 días hasta obtener embriones en estadio 32HH de la clasificación de Hamburger y Hamilton (1952). Se hizo una ventana de aproximadamente 1 cm² en los cascarones, disecamos la membrana del cascaron para exponer la CAM (figura 1A), posteriormente se realizaron xenoimplantes utilizando colonias de células de carcinoma mamario humano MCF7 crecidas en Matrigel (BD Biosciences,

FIGURA 1. Modelo de membrana corioalantoidea. A y B muestran las diferentes estructuras internas del embrión de pollo de 7 días de incubación. En B, se esquematiza el procedimiento para sembrar el xenoimplante. C, vista superior representativa de un xenoimplante formado con 1×10^6 células de carcino mamario humano MCF7, embebidas en Matrigel™ y adicionadas con 10µl de nanoparticulas de oro de 20 nm. Con líneas punteadas se realizaron digitalmente sus bordes. Los vasos sanguíneos se encuentran inmersos en la membrana corioalantoidea (imperceptible en C y D). D. Aspecto del xenoimplante después de cuatro días de re-incubación de los huevos. Abreviatura: Vs = vaso sanguíneo.



Fuente: Elaboración propia.

USA) en presencia o no de nanoAu de 20 nm (figura 1B y C), posteriormente, se reincubaron los huevos con los xenoinplantos, en las mismas condiciones iniciales por 4 días, para finalmente disecar la CAM con los xenoinplantos (figura 1D).

Cultivo celular, trazado y formación de tumoraciones para xenoinplante

Para hacer los xenoinplantos utilizamos la línea celular de carcinoma mamario humano MCF7, las cultivamos en medio DMEM adicionado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico, a 37 °C y atmosfera con 5% CO₂. Una vez alcanzada una confluencia celular del 80%, las células fueron trazadas con Lysotreaker® Red (LTR) (Invitrogen, USA) por 30 min. Más adelante, hicimos lavados con búfer de fosfatos, las células se recuperaron de las cajas de cultivo, se centrifugaron a 3,500 rpm, y se procedió a sembrar 1×10^6 células MCF7 en 30 μ l de Matrigel™. En 5 xenoinplantos MCF7/Matrigel™ se adicionó 10 μ l de nanoAu de 20 nm [6.59×10^9 nanoAu/mL] (Sigma-Aldrich No. 753610), se consideró como el grupo de exposición. El grupo control se conformó con 5 xenoinplantos de MCF7/Matrigel™. Posteriormente, se colocaron los xenoinplantos en CAMs independientes, como se muestra en la figura 1C.

Inmunodetección

Una vez transcurrido el tiempo de exposición, se disecó la CAM con los xenoinplantos y fueron inmediatamente fijados con una solución al 4% de formaldehído en búfer de fosfatos por 24 h, después, los tejidos se deshidrataron y los incluimos en parafina, se realizaron cortes coronales de 5 μ m mediante micrótopo (Leica, Alemania), y se montaron en portaobjetos electrocargados. Las muestras se rehidrataron y se hizo recuperación de antígenos con búfer de citratos (BioGenex, USA) en autoclave a 15 lb de presión por 5 min y, finalmente, se adicionó anticuerpos anti-Ki-67 (ABCam, UK) y anti- β -catenina (Santacruz, EU) en concentración 1/200, las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, tratamos las muestras con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-rabbit (Life Technology, USA) por 1 h a temperatura ambiente, los núcleos celulares se tiñeron con yoduro de propidio y/o DAPI (Santacruz, USA) diluidos 1/1000. Por último, las muestras se montaron y se observaron en un microscopio confocal LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Alemania). Se obtuvieron microfotografías panorámicas compuestas de la CAM/xenoinplante con aumento de 10X (software, ZEN 2010). Se procesaron microfotografías con aumento de 40X de las distintas zonas histológicas de las muestras.

Análisis de los datos

Para la cuantificación de células en proliferación, se utilizó el *software* Image J. Los datos están representados como promedio, desviación estándar, y se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para comparación entre grupos. Los valores de significancia los calculamos por la prueba t de *Student* con valor $p < 0.05$.

Resultados y discusión

El modelo de la CAM del embrión de pollo nos permitió, de una manera rápida y económica, evaluar el efecto de las nanoAu sobre células de carcinoma mamario humano MCF7 *in vivo*, como una alternativa al modelo murino, en el cual, los altos costos en la adquisición de los ratones nude (*nu/nu*), la manutención, los cuidados, instalaciones especiales que se requieren, así como el tiempo de crecimiento tumoral de 4-8 semanas (Fogh *et al.*, 1977), son un impedimento para su utilización. La CAM del embrión de pollo es un modelo utilizado para el estudio de tumores y la metástasis desde principios del siglo pasado (Rous y Murphy, 1911). Los embriones de pollo, al presentar de manera temporal inmunodeficiencia natural, aceptan el trasplante de tejidos de diversas especies (xenoimplante). La CAM también presenta gran vascularización que permite el rápido crecimiento de los xenoimplantes de entre 2 y 5 días después de la implantación (Fidler, 1975).

Para evidenciar si las nanoAu de 20 nm interfieren en la proliferación y/o invasión de las células de carcinoma mamario humano MCF7, en condiciones *in vivo*, trazamos inicialmente las células MCF7 con Lysotreaker Red, formamos xenoimplantes con Matrigel™, y les adicionamos o no, nanoAu de 20 nm; procesamos los tejidos para microscopía confocal y rastreamos la distribución de las células MCF7 en la CAM, asimismo, cuantificamos la proliferación celular con Ki-67 y mediante β -catenina e indagamos la integridad de la membrana peri-xenoimplante.

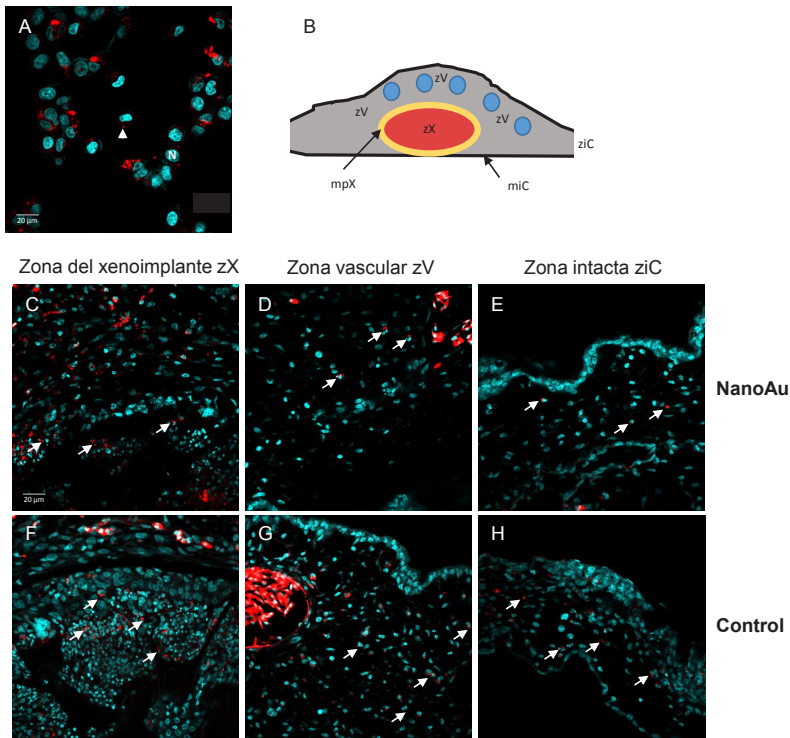
Características histológicas de la CAM/xenoimplante

Encontramos que en todas las CAM/xenoimplantes del experimento se presentaron 4 zonas con características histológicas fácilmente diferenciables: 1. La membrana inferior (miC), compuesta de células propias de la CAM, con características endodérmicas y que separan la CAM del vitelo. 2. Una membrana peri-xenoimplante (mpX) formada por envolvimiento de las células de la membrana inferior de la CAM. 3. La zona propia del xenoimplante (zX). 4. La zona vascular (zV), rica en vasos sanguíneos y vasos aéreos. En la figura 2B se muestra un esquema de las zonas histológicas que serán descritas en este trabajo.

Trazado y distribución de las células MCF7 en la CAM/xenoimplante

En la figura 2A mostramos la tinción del trazado de las células MCF7 *in vitro*, se observa la característica tinción puntual color rojo proveniente de los lisosomas dentro del citoplasma de las células, la tinción roja del LTR no es uniforme en todo el citoplasma de las células. La distribución de las células MCF7 trazadas, tanto en los xenoimplantes tratados con nanoAu, como en los xenoimplantes control, mostró gran cantidad de células MCF7 en la zona del xenoimplante (zX) (figura 2C y F) como era de esperarse; también las localizamos en la zona vascular (zV) (figura 2D y G), incluso las rastreamos en zonas intactas de la CAM (ziC) muy alejadas del sitio original de la siembra del xenoimplante (figuras 2E y H). El patrón de tinción del LTR no permite

FIGURA 2. Trazado, seguimiento y distribución histológica de las células de carcinoma mamario humano MCF7 en los xenoimplantes después de 4 días de re-incubación. El trazado celular se realizó en condiciones *in vitro*, como se muestra en A, la tinción roja en el citoplasma de las células corresponde a los lisosomas (cabeza de fecha), los núcleos celulares en color cian. B. Esquema de la zonificación histológica que presentaron todos los xenoimplantes del experimento. De C a H, seguimiento de las células MCF7 trazadas, en todas las zonas histológicas de los xenoimplantes encontramos células MCF7. Abreviaturas N= Núcleo celular; miC= Membrana inferior de la CAM; mpX= Membrana peri-xenoimplante; zV= Zona vascular de la CAM; ziC= Zona intacta de la CAM.



Fuente: Elaboración propia.

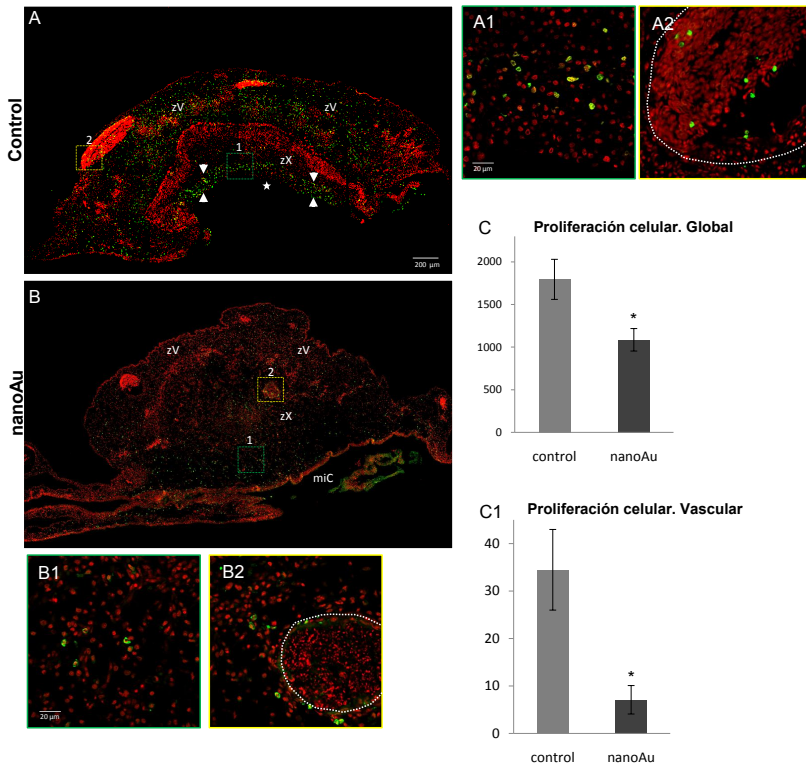
contabilizar el número de células MCF7 en las distintas zonas histológicas, sin embargo, estimamos que la presencia de células MCF7 en la zV y la zC fue menor en el grupo de xenoinplantos tratados con nanoAu en comparación con los de control.

Proliferación celular

Se determinó el efecto de las nanoAu sobre la capacidad de proliferación de las células MCF7 por medio de la inmunodetección de Ki-67, marcador ampliamente utilizado en el cáncer de mama, al mostrar resultados similares con el índice mitótico y bromodesoxiuridina (Thor *et al.*, 1999). Encontramos un patrón distintivo en los xenoinplantos del grupo control, consistente en un “cinturón” de células MCF7 proliferantes, en la zX (figura 3A y A1). Por el contrario, en los xenoinplantos del grupo tratado con nanoAu, ese carácter fue menos evidente (figura 3B y B1). El “cinturón” de células en proliferación observado en el grupo control, lo encontramos en la porción inferior del xenoinplante, en vecindad con la miC; sin embargo, ésta no se encontraba presente (figura 3A). Por otro lado, el vitelo del embrión de pollo es rico en nutrientes, pues proporciona los requerimientos necesarios para el crecimiento constante del embrión (Armstrong, 1982). Es probable que las células MCF7 de los xenoinplantos sin tratamiento, causaran la desintegración de la membrana basal entre las células de la miC, propiciando así, su desaparición. La pérdida de la miC permitió acceso directo a la gran cantidad de nutrientes del vitelo, lo cual podría favorecer la proliferación de las células MCF7; en contraparte, el grupo de xenoinplantos tratados con nanoAu, la miC, no sufrió cambios en su estructura (figura 3B).

Posteriormente, cuantificamos la proliferación celular global entre ambos grupos del experimento; encontramos en el grupo de xenoinplantos tratados con nanoAu, una disminución significativa del 39.49%, de las células en proliferación en comparación con los xenoinplantos control (figura 3A, B y C). También, comparamos la proliferación en la luz de los vasos sanguíneos y encontramos que, en los xenoinplantos del grupo con tratamiento de nanoAu, el número de células en proliferación disminuyó en 5 veces comparándolo con el grupo control (figura 3C1). Generalmente, se considera que la proliferación celular tiene relación con la evolución clínica del cáncer de mama; así, el incremento de la actividad proliferativa se correlaciona fuertemente con mal pronóstico (Diest *et al.*, 2004). Por lo tanto, uno de los grandes retos en el combate de esta enfermedad es bajar el índice de proliferación. Nuestros datos muestran que las nanoAu lograron bajar la proliferación en alrededor del 40% en comparación con los xenoinplantos sin tratamiento, incluso pudimos evidenciar que en los xenoinplantos tratados con nanoAu se registró también una menor actividad proliferante que pudiera provenir de células MCF7 que invadieron la vasculatura, desafortunadamente por microscopía confocal no fue posible identificar el trazador LTR en

FIGURA 3. Proliferación celular. A y B microfotografías panorámicas compuestas de xenoinplantos con inmunodetección de Ki-67. En A xenoinplante control, se observa un prominente “cinturón” de células MCF7 en proliferación dentro de la zona del xenoinplante (cabeza de flechas), también hay abundante proliferación celular en la zona vascular; la membrana inferior de la CAM, esta ausente (*). B, xenoinplante con tratamiento de nanoAu, el “cinturón” proliferante es menos evidente; la proliferación de la zona vascular también es menor en comparación con A. A1 y B1, magnificación del “cinturón proliferante”. A2 y B2, magnificación de vasos sanguíneos, mostrando células MCF7 en proliferación. En C, grafica que muestra disminución en la proliferación en los xenoinplantos con tratamiento de nanoAu. C1, grafica de la proliferación en la vasculatura de los xenoinplantos.



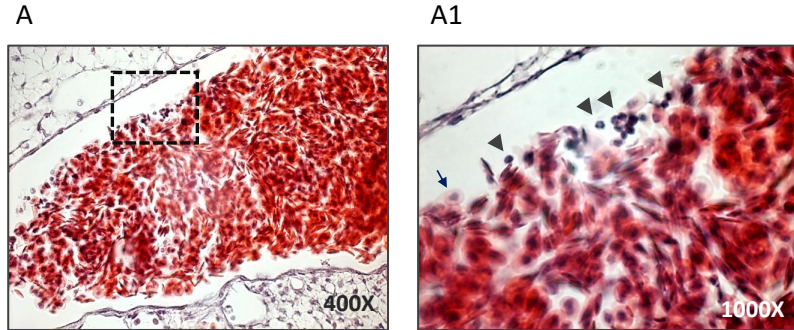
Fuente: Elaboración propia.

la luz vascular, debido, en parte, a que los eritrocitos emiten alta autofluorescencia al ser excitados con la línea láser que utilizamos para visualizar LTR; sin embargo, en muestras teñidas por la técnica de hematoxilina-eosina (HE), identificamos en la luz vascular células con forma redonda y el núcleo central, estas características no son propias de los eritrocitos de las aves (figura 1 de datos suplementarios).

Pérdida de continuidad de la membrana peri-xenoinplante

Derivado de observaciones de cortes histológicos teñidos por la técnica HE, observamos en algunas preparaciones, la aparente presencia de “puntos de

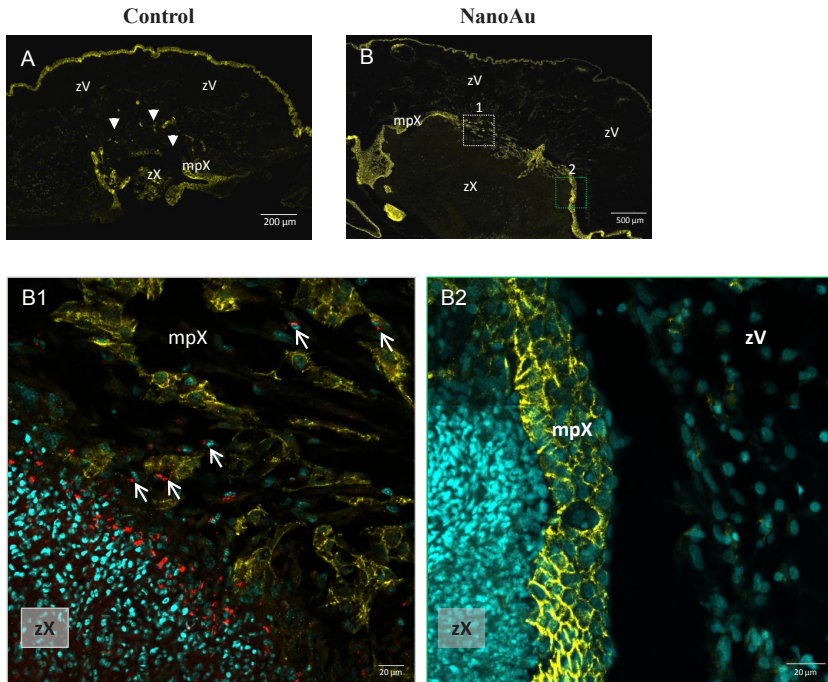
FIGURA 1 DE DATOS SUPLEMENTARIOS. Corte coronal de un xenoinplante del grupo control. Tinción de hematoxilina-eosina. A y A1, luz vascular de un xenoinplante, se observan algunas células redondas de escaso citoplasma y con un gran núcleo central (cabezas de flecha en A1), mismas que contrastan con las características propias de los eritrocitos de las aves. Abundante citoplasma aplanado y núcleo difuso (flecha azul en A1)



Fuente: Elaboración propia.

fuga” en la mpX, lo que permitiría el paso de las células MCF7 entre la zX y la zV (datos no mostrados); dado lo anterior, hicimos inmunodetección de β -catenina para visualizar la estabilidad de las uniones entre las células que integran la mpX. Encontramos en los xenoinplantes del grupo control, grandes áreas con desintegración de la mpX (figura 4A), incluso en algunos xenoinplantes, no fue posible distinguir el límite entre la zX de la zV, pensamos que la desintegración de la mpX permitió la invasión rápida y constante de las células MCF7 hacia la zV. Por el contrario en los xenoinplantes tratados con nanoAu, encontramos mayor integridad de la mpX; no obstante, evidenciamos segmentos de la mpX donde las células perdían las uniones entre ellas, a pesar de que aún se observa expresión cortical de β -catenina, sugiriendo que la formación de los “puntos de fuga” se debe a la pérdida de la membrana basal de las células de la mpX. En el momento que las células de la mpX perdieron su basamento, se alejaron unas de otras y permitieron la invasión de las células MCF7 hacia la zV de manera paulatina (figura 4B y B1). A pesar de la presencia de los “puntos de fuga”, la contención de las células MCF7 dentro de la zX fue mayor en el grupo tratado con nanoAu que en los xenoinplantes control (comparar 3A con 3B, zX), información que puede estar relacionada con la disminución del conteo global de la proliferación de los xenoinplantes tratados con nanoAu, pues es probable que la invasión lenta desde la zX hacia la zV impactara en la cuantificación baja de la proliferación, ya que, por otro lado, la rápida invasión de las células MCF7 a la zV de los xenoinplantes sin tratamiento tuvo mejores condiciones microambientales para la proliferación. Se conoce que la invasión local de los tumores *in situ* depende de la degradación de las proteínas de las membranas basales, como colágeno tipo IV o V y proteólisis del colágeno intersticial tipo I, II o III presente en el tejido conjuntivo que rodea los tumores, la familia de las

FIGURA 4. Pérdida de continuidad de la membrana peri-xenoimplante. En A y B microfotografías panorámicas compuestas con inmunodetección de β -catenina de los xenoimplantes control y con tratamiento de nanoAu, respectivamente (se omitió la tinción nuclear). A, se observan evidentes áreas con desintegración la mpX (cabezas de flecha). B1 magnificación de un “punto de fuga” de un xenoimplante con tratamiento de nanoAu, las células de la mpX han perdido su basamento y comienzan a separarse unas de otras; permitiendo que las células MCF-7 trazadas invadan la zV rica en nutrientes (flechas cortas). B2 magnificación de una zona de la mpX del mismo xenoimplante, donde aun sus células no han perdido su membrana basal; la compartimentación entre la zX y la zV es evidente. Tinciones: núcleos celulares = cian; β -catenina = amarillo; células MCF-7 trazadas = rojo. Abreviaturas: mpX = membrana peri-xenoimplante; zV= zona vascular; zX = zona del xenoimplante.



Fuente: Elaboración propia.

metalopectidasas (MMP) son las responsables de este proceso, incluso se les considera como las principales mediadoras en las alteraciones observadas en el microambiente tumoral durante la progresión del cáncer (Rucci *et al.*, 2011). Los niveles de expresión de las MMP están relacionados con la conducta invasora de los tumores (Vizoso *et al.*, 2007); a pesar de que en nuestro estudio no indagamos el papel de las MMP, es conocido que las células MCF7 tienen alta expresión de la MMP-7, de la cual se puede utilizar su patrón de expresión para calcular la probabilidad de metástasis en el cáncer de mama (Jinga *et al.*, 2006). En nuestro experimento fue posible observar dos comportamientos distintos en la desintegración de la mpX, incluso en algunos xenoimplantes sin tratamiento, la desintegración de la mpX fue total; en contraparte, en los xenoimplantes con nanoAu, la desintegración de la mpX se restringió a los “puntos de fuga”, por lo que es probable que en las nanoAu,

al disminuir la proliferación de las células MCF7, su población fuera menor, retrasando de esta forma la invasión. También las nanoAu podrían haber interferido en la síntesis y/o liberación de las MMP-7 en condiciones *in vivo* y en conjunto retrasaron la degradación de la mpX.

Conclusiones

En este trabajo mostramos que las nanoAu de 20nm son capaces de inhibir la proliferación así como retrasar la invasión de las células de carcinoma mamario humano MCF7 en un modelo tumoral *in vivo*.

Referencias

- Armstrong P, Quigley J, Sidebottom E. (1982). Transepithelial invasion and intramesenchymal infiltration of the chick embryo chorioallantois by tumor cell lines. *Cancer Res.*, 42: 1826-1837.
- Chen, W., Lou, G., Xu, X. *et al.* (2014). Cancer-targeted functional gold nanoparticles for apoptosis induced and real-time imaging based on FRET. *Nanoscale*, 6(16): 9531-5.
- Dam, D., Lee, J., Sisco, P. *et al.* (2012). Direct observation of nanoparticles-cancer cell nucleus interactions. *ACSNANO*, vol. 6 núm. 4: 3318-3326.
- Deryugina, E. y Quigley, J. (2008) Chick embryo chorioallantoic membrane model system to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol.* Dec., 130(6): 1119-1130.
- Diest P, Wall E, Baak J. (2004). Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: review. *J. Clin. Pathol.*, 57: 175-681.
- Fidler I. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. *Cancer Res.*, 35: 218-224.
- Fogh J, Fogh J, Orfeo T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 59: 221-226.
- Giordano S, Cohen D, Buzdar A. *et al.* (2004). Breast carcinoma in men: A population based study. *Cancer*, 101: 51-57.
- Hamburger, B. y Hamilton, L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88: 49-92.
- Jinga D, Blidaru A, Condrea I. *et al.*, (2006). MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: Correlations with prognostic factors. *J. Cell. Mol. Med.*, 10: 499-510.
- Kang, B., Mackey, M. y El-Sayed, M. (2010) Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(5): 1517-1519.
- Mateo, D., Morles, S., Ávalos *et al.* (2014). Oxidative stress contributes to gold nanoparticle-induced cytotoxicity in human tumor cells. *Toxicol Mech. methods*, 24(3): 161-72.

- Ossowski L, y Reich E. (1980). Experimental model for quantitative study of metastasis. *Cancer Res.*, 40: 2300-2309.
- Rous P. y J, Murphy (1911). Tumor implantations in the developing embryo. *J. Am. Med. Assoc.*, 56: 741.
- Rucci N, Sanità P, Angelucci A. (2011). Expanding view of the role of matrix metalloproteases in metastatic growth. *Curr. Mol. Med.*, 42, 11: 609-22.
- Selim, M. y Hendi, A. (2012). Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 13.
- Thor, A., Lui S, Moore H 2nd. *et al.* (1999). Comparison of mitotic index, *in vitro* bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitative proliferation in breast cancer. *J Clin. Oncol.*, 17: 470-7.
- Tsai, T., Hou, C., Wang, H. *et al.* (2012). Nucleocytoplasmic transport blockage by SV40 peptide-modified gold nanoparticles induces cellular autophagy. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 5214-5234.
- Vizoso F, González L, Corte M. *et al.* (2007). Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br. J. Cancer.*, 96: 903-11.