

Capítulo 1 Desarrollo de puntos cuánticos de CdS/dextrina como forma innovadora de entrega de fármacos: estudio de biodisposición, biocompatibilidad, hemocompatibilidad y eficacia

Chapter 1 Development of CdS/dextrin quantum dots as an innovative form of drug delivery: study of bioavailability, biocompatibility, hemocompatibility, and efficacy

RODRIGUEZ-FRAGOSO, Lourdes*†, RODRÍGUEZ-LÓPEZ, Anahí, RODRIGUEZ-FRAGOSO, Patricia y REYES-ESPARZA, Jorge

*Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, México
Departamento de Física, CINVESTAV - I.P.N. Apartado Postal 14-740, 07000. Ciudad de México, México*

ID 1^{er} Autor: *Lourdes, Rodriguez-Fragoso* / **ORC ID:** 0000-0002-3966-8521 y **CVU CONACYT ID:** CVU 11763

ID 1^{er} Coautor: *Anahí, Rodríguez-López* / **ORC ID:** 0000-0002-5464-9361y **CVU CONACYT ID:** 581876

ID 2^{do} Coautor: *Patricia, Rodriguez-Fragoso* / **ORC ID:** 0000-0002-5854-0953 y **CVU CONACYT ID:** 62943

ID 3^{er} Coautor: *Jorge, Reyes-Esparza* / **ORC ID:** 0000-0001-7978-540X y **CVU CONACYT ID:** 11762

DOI: 10.35429/H.2020.5.1.21

L. Rodriguez, A. Rodríguez, P. Rodriguez y J. Esparza

mrodriguezf@uaem.mx

A. Marroquín, J. Olivares, L. Cruz y A. Bautista. (Coord) Ingeniería. Handbooks-©ECORFAN-Mexico, Querétaro, 2020.

Resumen

Los nanomateriales están teniendo un gran impacto en todas las áreas del conocimiento. En biomedicina se están utilizando para solucionar importantes problemas de salud. Las nanopartículas semiconductoras (puntos cuánticos), en particular, pueden unirse a la membrana celular y ser absorbidas por la célula, de ahí su utilidad en biología como marcadores celulares y biosensores. Sin embargo, debido a su amplio espectro de emisión de fluorescencia, estas nanopartículas tienen importantes aplicaciones en medicina, pueden ser utilizadas en imagenología para diagnóstico y tratamiento médico, para la liberación inteligente de fármacos o material genético dentro de las células, por mencionar algunos. No obstante, el principal problema de estos nanomateriales es su toxicidad, ya que el núcleo de los puntos cuánticos está formado por materiales tóxicos, como el cadmio, un elemento nocivo para las células y los organismos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la disposición, biocompatibilidad, hemocompatibilidad de puntos cuánticos de CdS pasivados con dextrina, así como realizar la biosíntesis de un bioconjugado CdS-dextrina/doxorubicina para mostrar su uso como nanotransportador de fármacos. Estudios *in vitro*, *in vivo*, así como espectrofotométrica, microscopía de epifluorescencia, microscopía confocal, microscopía de fuerza atómica, difracción de rayos X y espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier se utilizaron también para realizar el estudio. El presente capítulo muestra evidencia de que los puntos cuánticos de CdS-dextrina tienen un perfil de distribución tisular diferente, un tiempo medio de residencia diferente en cada órgano estudiado y pueden cruzar barreras biológicas (hematoencefálicas y testiculares). Además, los estudios de biocompatibilidad a los 30, 60 y 90 días mostraron que son biocompatibles ya que no produjeron alteraciones funcionales y tisulares en los diferentes órganos, excepto en los testículos, donde ocurrió atrofia testicular, luego de 90 días de exposición. El estudio de hemocompatibilidad mostró que no producen hemólisis, pero sí inducen alteraciones morfológicas de los eritrocitos. Finalmente, se realizó la síntesis de un bioconjugado de nanopartículas/doxorubicina y se estudió la eficacia farmacológica. El bioconjugado se caracterizó con las mismas técnicas antes descritas. En las células tratadas con doxorubicina conjugada a nanopartículas de CdS-Dex, se observó mayor citotoxicidad, un aumento en el tamaño de las células y núcleos comparado con las células tratadas solo con doxorubicina. Por tanto, los puntos cuánticos CdS-Dex que estudiamos en este trabajo tienen el potencial de ser utilizados en biomedicina para bioimagen y como nanovehículos para transporte de fármacos, teniendo la ventaja de que pueden distribuirse a cualquier tejido, atravesar barreras fisiológicas, ser bien tolerados y biocompatible, a corto y medio plazo. Además, permite que el fármaco llegue a su sitio objetivo para ejercer el efecto farmacológico.

Puntos cuánticos, disposición, biocompatibilidad, hemocompatibilidad y nanotransportador

Abstract

Nanomaterials are having a major impact in all areas of knowledge. In biomedicine they are being used to solve important health problems. Semiconductor nanoparticles (quantum dots), in particular, can bind to the cell membrane and be taken up by the cell, hence their usefulness in biology as cell markers and biosensors. However, due to their broad spectrum of fluorescence emission, these nanoparticles have important applications in medicine, they can be used in imaging for medical diagnosis and treatment, for the intelligent release of drugs or genetic material inside cells, for mention some. However, the main problem with these nanomaterials is their toxicity, since the nucleus of the quantum dots is made of toxic materials, such as cadmium, a harmful element for cells and organisms. The objective of the present work was to study the disposition, biocompatibility, hemocompatibility of dextrin-passivated CdS quantum dots, as well as to perform the biosynthesis of a CdS-dextrin/doxorubicin bioconjugate to show its use as a nanocarrier for drugs. *In vitro* and *in vivo* studies, as well spectrophotometric, epifluorescence microscopy, confocal microscopy, atomic force microscopy, X-ray diffraction and infrared spectroscopy by Fourier transform were also used to carry out the study. Present chapter shows evidence that CdS-dextrin quantum dots have a different tissue distribution profile, a different mean residence time in each organ studied and can cross biological barriers (blood-brain and testicular). Furthermore, the biocompatibility studies at 30, 60 and 90 days showed that they are biocompatible since they did not produce functional and tissue alterations in the different organs, except in testicles, where testicular atrophy occurred, after 90 days of exposure. The hemocompatibility study showed that they do not produce hemolysis, but they do induce morphological alterations of the erythrocytes. Finally, the synthesis of a nanoparticle / doxorubicin bioconjugate was carried out, and the pharmacological efficacy was studied. The bioconjugate was characterized with different techniques.

In cells treated with doxorubicin conjugated to CdS-Dex nanoparticles, greater cytotoxicity, an increase in the size of cells and nuclei was observed than in those cells treated only with doxorubicin. Therefore, the CdS-Dex quantum dots that we study in this work have the potential to be used in biomedicine for bioimaging and as nanovehicles for drug transport, having the advantage that they can be distributed to any tissue, cross physiological barriers, be well tolerated, and biocompatible, in the short and medium term. In addition, it allows the drug to reach its target site to exert the pharmacological effect.

Quantum dots, disposición, biocompatibilidad, hemocompatibilidad y nanotransportador

1. Introducción

En la actualidad la nanotecnología está influyendo directamente en un sinnúmero de campos y está permitiendo dar grandes avances para la sociedad. En el área biomédica, en particular, los nanomateriales tienen el potencial para ser usados como herramienta para el diagnóstico temprano y como una forma innovadora de entrega de fármacos (Mitragotri et al., 2015). Las técnicas de imagen son un ejemplo de ello, pues están impactando en la comprensión de los procesos celulares fundamentales, facilitando su visualización. El uso de nanomateriales está permitiendo: (1) entender los mecanismos que llevan a la enfermedad, (2) reconocer y diagnosticar enfermedades tempranamente, (3) ayudar a entender cómo funcionan las terapias y (4) monitorear la efectividad de los nanomateriales (Quesada-González, Merkoçi, 2018). Uno de los principales desafíos en este proceso es desarrollar "nanoterapias", especialmente dirigidas a tejidos y órganos enfermos, y que se logre evitar el daño a células sanas circundantes; es decir, que reduzcan los temidos efectos secundarios.

Sin embargo, para utilizar un nanomaterial con fines teranóstico (diagnóstico y tratamiento), es necesario conocer su biodisposición, biocompatibilidad y seguridad para comprender qué le sucede al nanomaterial después de ser administrado a un organismo, y sobretodo saber que efectos puede producir a corto y largo plazo. La predicción de la disposición de un nanomaterial es muy importante en el proceso de desarrollo de nuevos nanomateriales en biomedicina (Mir et al., 2017). La disposición de un nanomaterial dependerá de sus propiedades fisicoquímicas, el sitio de administración, la formulación y la dosificación, entre otros (Jurj et al., 2017).

Para que un nanomaterial sea utilizado en medicina, debe ser esencial conocer el tiempo que permanecerá en el organismo para estimar el período de tiempo que podría tener para identificar su blanco terapéutico (bacterias, células, antígenos, etc.), pero sobretodo, es fundamental para conocer la seguridad, es decir, demostrar que es inocuo y que no produce efectos secundarios importantes en el ser humano. Varios estudios han demostrado que los nanomateriales se entregan a varios órganos e incluso que cruzan barreras biológicas (Ali, Ansari, Ahmad, Akhtar & Jahan, 2017), además se sabe que tienen selectividad para tejidos específicos y permanecen dentro de ellos durante un largo período de tiempo. Estas propiedades podrían ser ideales si queremos usarlos como nanovehículos para transportar medicamentos, anticuerpos o vacunas, en la clínica. Existen pocos estudios en los que se haya realizado un análisis de la distribución de nanopartículas, así como la monitorización temporal para saber cuánto tiempo permanecen dentro de los tejidos y cuándo se eliminan por completo después de administrar una dosis única (Ding & Li, 2017).

Las nanopartículas semiconductoras o también llamados puntos cuánticos (PCs) han despertado gran interés en los últimos años, debido a sus potenciales aplicaciones en biología y medicina (Fang, Chen, Liu, & Li, 2017). En el arsenal de nanopartículas, los PCs son nanopartículas muy luminiscentes y están emergiendo como una nueva clase de marcaje fluorescente que han encontrado numerosas aplicaciones en bioimagen, biodiagnóstico y administración de fármacos. En los últimos años, este grupo de trabajo ha sintetizado y ha llevado a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* de PCs de CdS recubiertas con maltodextrina y dextrina; a través de esos estudios se ha demostrado que ellos son biocompatibles y bien tolerados en animales de experimentación, tras su exposición por periodos de tiempo corto. Nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* han mostrado que estos PCs tienen una efectiva captación celular y tisular, además tiene una distribución uniforme en tejidos animales, y no se ha observado que produzcan alteraciones morfológicas en los mismos (Rodríguez-Fragoso, Reyes-Esparza, León-Buitimea & Rodríguez-Fragoso, 2012; Gutiérrez-Sancha, Reyes-Esparza, Rodríguez-Fragoso, García-Vázquez & Rodríguez-Fragoso, 2015; Reyes-Esparza, J. et al., 2015).

Además, estos PCs han mostrado tener potenciales aplicaciones en medicina para bioimagen y entrega de fármacos, debido a su tamaño y emisión de fluorescencia.

Por lo tanto, en el presente capítulo mostramos resultados sobre: (1) La caracterización de la disposición de los PCs de CdS-Dextrina (CdS-Dex) tras la administración de una dosis única en ratas. Nuestro interés fue analizar una serie de parámetros farmacocinéticos, como la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$), tiempo al que se alcanza la $C_{m\acute{a}x}$ ($T_{m\acute{a}x}$), área bajo la curva de 0 a tiempo (ABC_{0-t}), área bajo la curva de 0 a infinito ($ABC_{0-\infty}$), vida media ($T_{1/2}$) y tiempo medio de residencia (TMR) de los PCs, así como el análisis de los parámetros químico-clínicos para saber si éstos sufren alteraciones mientras los PCs permanecen en el organismo. La investigación de dosis única se extendió a un período de 90 días, con el fin de saber cuándo se eliminan por completo los PCs; (2) Un estudio de biocompatibilidad de PCs de CdS-Dex después de administrar dosis múltiples, el estudio se extendió a 30, 60 y 90 días de exposición; (3) La evaluación de la hemocompatibilidad *in vitro*; y (4) El desarrollo, caracterización y eficacia de un bioconjugado de PCs de CdS-Dex con doxorubicina (Dox).

1.1 Disposición de PCs CdS-Dex.

Todos los estudios preclínicos sobre nanomateriales deberían incluir un estudio farmacocinético que permita predecir y entender la disposición de un nanomaterial; es decir, saber que pasa con el nanomaterial una vez que entre al organismo, a donde se va, si cruza barreras, cuando se elimina por completo, y sobretodo qué tan seguro es su uso en general. El destino y la disposición de cualquier nanomaterial se basa en sus propiedades fisicoquímicas, lugar de administración, formulación y dosificación (Yoshikawa, Nabeshi, & Yoshioka, 2008). Por esta razón, es necesario caracterizar el perfil farmacocinético de cada nanomaterial sintetizado. Un parámetro importante para considerar en estudios farmacocinéticos es el tiempo medio de residencia, es decir, el tiempo estimado que un medicamento permanece en el cuerpo dentro de tejidos específicos. El tiempo medio de residencia (MRT) puede ayudar a evaluar el alcance de su eficacia y tolerabilidad (Ďurišová et al., 2014). El tiempo de residencia específica cuánto tiempo permanece en el organismo y el periodo de tiempo estimado durante el cual podría identificar un microorganismo patógeno, células tumorales o marcadores moleculares para fines de diagnóstico, así como para la entrega de medicamentos o genes con fines terapéuticos. Varios estudios han demostrado que los nanomateriales pueden llegar a varios órganos y que estos incluso cruzan barreras biológicas (Kettiger, Schipanski, Wick, & Huwyler, 2013). Además, los nanomateriales tienen selectividad para tejidos específicos y permanecen dentro de ellos por largos períodos de tiempo, lo cual es ideal si se usan para transportar fármacos, anticuerpos o vacunas. Existen pocos estudios sobre la disposición de nanopartículas que indiquen, incluso el tiempo que permanecieron dentro de los tejidos antes de ser eliminados completamente después de una administración de una dosis única (Hara, 2012). Para evaluar la disposición de los PCs de CdS-Dex se utilizaron ratas Wistar macho (110-130 g). Todas las ratas se mantuvieron en un ambiente controlado, y se les permitió comer y beber agua *ad libitum*. Las ratas estuvieron en ayunas durante 12 h antes del tratamiento. La investigación fue dirigida de acuerdo con las leyes públicas de la Ley de Prácticas en Animales y Bienestar Social del Estado de Morelos (México) y las guías internacionales de manejo de animales (Albus, 2012; Ley Estatal de Fauna, 2001). Las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos: (1) grupo control (5 ratas), los animales se trataron con una dosis única i.p. de PBS (200 μ L); (2) PCs de CdS-Dex (65 animales), los animales se trataron con una dosis única i.p. de 100 μ g/Kg de PCs preparadas en 200 μ L de PBS. Los PCs de CdS-Dex se sintetizaron como se describió previamente (Reyes-Esparza et al., 2015), una característica de estas nanopartículas es que emiten fluorescencia en color verde y tienen un tamaño de 3 nm. Durante el estudio, los roedores se controlaron de cerca para garantizar que no presentaran efectos secundarios a las nanopartículas. Las evaluaciones de tolerabilidad consistieron en observaciones clínicas diarias, cuantificación del peso corporal y del consumo de alimentos. Se realizó una rigurosa evaluación clínica para detectar alteraciones en: aparato motor (ataxia, temblor, arqueamiento, balanceo, extensión tónica o convulsiones clónicas), sistema nervioso central (anestesia, sedación, depresión o hipnosis) y cambios en el aspecto físico (lagrimeo, exoftalmos, pilo-erección, salivación o diarrea).

Los animales se sacrificaron a 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 150, 300, 600, 960, 1440 y 2160 horas (90 días). Se realizó un examen macroscópico post mortem del animal para visualizar alteraciones morfológicas. Se consideraron los siguientes órganos: hígado, riñón, pulmón, corazón, músculo estriado, bazo, timo, cerebro y testículo. Los tejidos se procesaron para obtener microfotografías bajo microscopio visible y de epifluorescencia. Para el estudio de disposición y el análisis farmacocinético de los PCs, realizamos un análisis semicuantitativo de fluorescencia.

La cantidad de PCs se estimó midiendo la intensidad de fluorescencia por espectrofotometría en homogeneizados tisulares, la intensidad de fluorescencia se expresó como unidades arbitrarias (UA). La fluorescencia se cuantificó por espectrofotometría (Perkin Elmer) usando la longitud de onda de excitación de 485 nm. Las curvas de concentración de tejido individual versus tiempo real se construyeron para un análisis farmacocinético no compartamental. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos incluyeron: $C_{m\acute{a}x}$, $T_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-t} , $ABC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$ y TMR.

Para el análisis de los parámetros bioquímico-clínicos se utilizó un método colorimétrico. El estudio incluyó la cuantificación de los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol, aspartato amino transferasa (AST), alanina amino transferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA), urea, creatinina y niveles de ácido úrico; las mediciones se hicieron utilizando kits comerciales (ELITech, México) siguiendo los protocolos del fabricante.

En la Figura 1.1 observamos la disposición de los PCs, visto como curva concentración-tiempo medido como intensidad de fluorescencia en hígado, riñón, corazón, pulmón, bazo, músculo, cerebro y testículo, posterior a la administración de una dosis única. El $T_{m\acute{a}x}$, el tiempo para alcanzar la concentración tisular máxima de los PCs ($C_{m\acute{a}x}$) observada para la mayoría de los tejidos estuvo entre las 24 y 48 horas, aunque en el músculo se encontró a 150 horas. Como podemos ver, el perfil de la curva fue diferente para cada tejido, así como los parámetros farmacocinéticos estudiados (Tabla 1.1).

El tejido donde se detectó fluorescencia con mayor intensidad fue el hígado (65,739 UA). En este tejido, alcanzaron el $T_{m\acute{a}x}$, a las 72 horas (Tabla 1 y la Figura 1). Los niveles de nanopartículas permanecieron elevados en el hígado durante 40 días, y fueron disminuyendo gradualmente; sin embargo, a los 90 días, se detectaron aún niveles significativos de fluorescencia. Fue interesante encontrar que el MRT calculado para el hígado fue de 69 días con un $T_{1/2} = 48$ días (tiempo medio de eliminación). La intensidad de fluorescencia en pulmón, riñón, corazón, bazo, y músculo fue baja comparado con el hígado, particularmente en este último tejido (7339, 6018, 3679, 4386, 2515 y 573 UA, respectivamente, Tabla 1). El TMR encontrado fue diferente en cada tejido, para riñón 9.3 días, corazón 16 días, pulmón 14.8 días, bazo 10.4 días y músculo 59 días. El $T_{1/2}$ fue menos de 12 días en riñón, corazón, pulmón y bazo (ver Figura 1,1 y Tabla 1.1); el músculo tuvo una $T_{1/2}$ alargada (41.3 días). Un hallazgo interesante fue descubrir la presencia de nanopartículas en el cerebro y los testículos. En el cerebro, la intensidad de la fluorescencia fue baja (6561), un MRT = 8.5 días y una $T_{1/2} = 5.9$ días. Sin embargo, la intensidad de la fluorescencia fue muy alta en testículos (16,810 UA), con un MRT = 83.3 días y una $T_{1/2} = 58$ días.

Figura 1.1 Curvas concentración-tiempo de los PCs CdS-Dex en tejidos de rata posterior a una administración única.

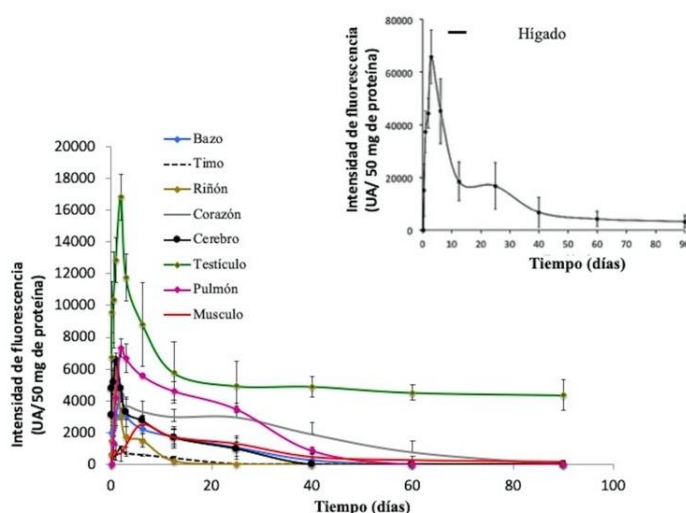


Tabla 1.1 Parámetros farmacocinéticos de QDs CdS-Dex.

Tejido	C _{máx} (AU)	T _{máx} (h)	ABC _{0-t} (AU *h)	ABC _{0-∞} (AU*h)	TMR (d)	T _{1/2} (d)
Hígado	65,739	72	26,484,058	54,455,011	69	48
Riñón	6,018	24	519,582	565,186	9.3	6.41
Corazón	3,679	72	3,637,750	3,938,695	16.0	11.1
Pulmón	7,339	48	3,794,373	4,105,768	14.8	10.31
Bazo	4,386	48	1,147,335	1,578,883	10.4	7.04
Cerebro	6,561	24	1,487,975	1,687,604	8.5	5.9
Testículos	16,810	48	11,677,942	12,551,992	83.3	58
Músculo	2,515	150	1,582,380	1,610,047	59	41.3

En la Figura 1.2 se muestra un corte histológico representativo de los tejidos analizados con microscopio de luz y epifluorescencia, en muestras teñidas y no teñidas, respectivamente; se tomaron microfotografías en el momento en que se observó la máxima fluorescencia (T_{máx}). La identificación de las nanopartículas de CdS-Dex se logró porque éstas emiten fluorescencia en color verde. La intensidad de la fluorescencia fue diferente en cada tejido. El análisis histopatológico no reveló alteraciones morfológicas en ningún tejido que pudiese indicar daño por la presencia de nanopartículas.

El análisis bioquímico-clínico mostró que las nanopartículas de CdS-Dx indujeron cambios en casi todos los parámetros analizados. La Figura 1.3 muestra las variaciones observadas a lo largo de los 90 días del estudio, podemos observar que la glucosa, los triglicéridos y la fosfatasa alcalina (FA) tuvieron variaciones importantes. Se observaron cambios desde las primeras horas hasta los 45 días. Sin embargo, después de este tiempo, la glucosa y FA alcanzaron los valores normales al final del estudio. Mientras que, los niveles de triglicéridos se mantuvieron altos hasta el final del estudio. Se observaron ligeros cambios en los niveles de AST, ALT y urea. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de colesterol, ácido úrico y creatinina.

Figura 1.2 Microfotografías de tejidos al tiempo de máxima concentración de fluorescencia. Los PCs CdS-Dex emiten fluorescencia en color verde. Los tejidos fueron teñidos con H&E, amplificación 20X.

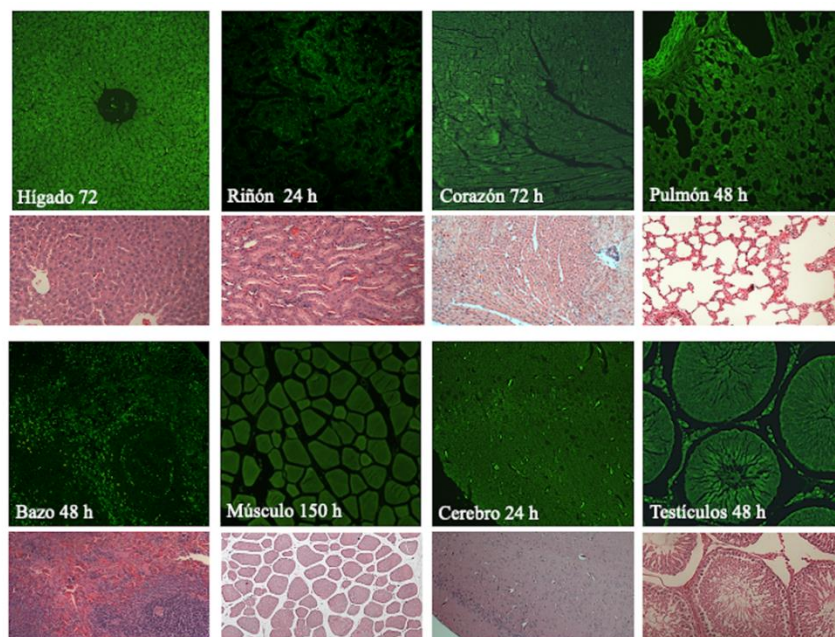
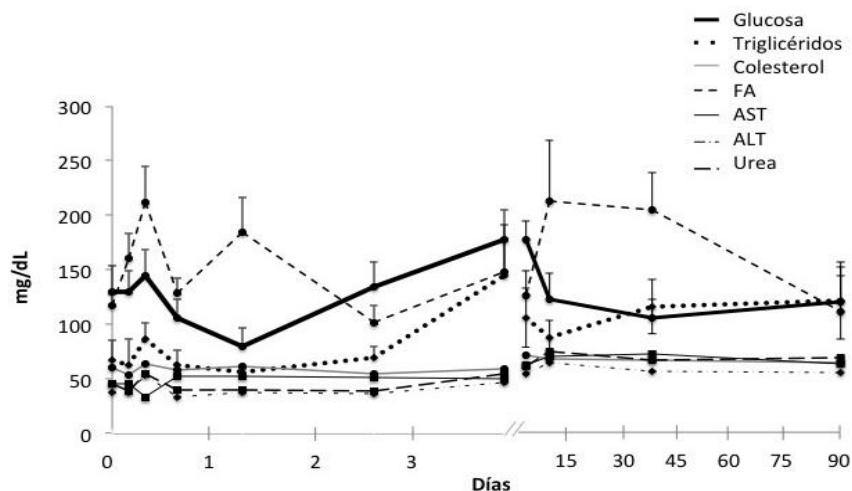


Figura 1.3 Variaciones en los parámetros bioquímico clínicos de los PCs CdS-Dex en rata.



La cuantificación de los PCs en sangre, es difícil de realizar por todos los elementos que ésta contiene. Por lo que, la cuantificación de los nanomateriales en los tejidos refleja como es la distribución de éstos a nivel tisular. En el presente estudio nosotros administramos una dosis única de PCs e hicimos la cuantificación a lo largo de 90 días para hacer un estudio de disposición o farmacocinético. Encontramos que, el hígado es el principal órgano captador de PCs de CdS-Dex, (10-20 veces más que en otros órganos). Mientras que, en músculo, corazón y bazo, la cantidad fue mucho menor. Algo que llamo la atención fue la baja cantidad de nanopartículas detectadas en riñón, lo cual indica que probablemente su paso por este órgano es muy corto, y que son eliminadas fácilmente. Debido a que los PCs de CdS-Dex tienen un tamaño pequeño (3nm) esto les facilito atravesar barreras biológicas, en particular las barreras hemato-encefálica y hemato-testicular. Estas barreras son una interfase y actúan como barreras físicas y metabólicas para regular y proteger el microambiente del cerebro y/o testículo. La ventaja de que los PCs de CdS-Dex atraviesen la barrera hemato-encefálica es que podrían fungir como nanovehículos para llevar fármacos al sistema nervioso central para ejercer efectos terapéuticos. Sin embargo, el inconveniente que tienen es que estos órganos en ocasiones son susceptibles a presentar daño por agentes tóxicos (Arami, Khandhar, Liggitt, & Krishnan, 2015). Aunque la cantidad de PCs que se detectó varió en los diferentes tejidos estudiados, fue evidente que no hubo alteración morfológica en ninguno de ellos.

La determinación de los parámetros farmacocinéticos es de gran utilidad en farmacología, pues esto permite saber que cantidad de una molécula determinada hay dentro del organismo, que tiempo permanecen en el organismo y en que tiempo se eliminarán. El TMR es uno de los principales parámetros que son usados en investigaciones en estudios farmacocinéticos, pues indirectamente indica como son los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME) y da una estimación del tiempo promedio que los PCs permanecen en el organismo (Rodallec, Benzekry, Lacarelle, Ciccolini & Fanciullino, 2018). Al cuantificar el TMR en este estudio encontramos que el sitio donde permanecieron mayor tiempo los PCs fue en los testículos, hígado y músculo, y en los que menor tiempo permanecieron fue en el cerebro y riñón. Las imágenes tomadas con microscopio de epifluorescencia también pusieron en evidencia que los PCs pueden ser utilizados para bioimagen, pues permitieron visualizar claramente la morfología de los diferentes tejidos estudiados.

Si bien, no observamos alteraciones morfológicas en los tejidos, fue interesante conocer que a su paso por el organismo los PCs sí pueden producir una serie de alteraciones bioquímicas que pueden ser detectadas en la sangre de los animales. Las principales alteraciones ocurrieron en los primeros 3 días posterior a la administración de los PCs, hubo alteraciones en los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol, FA, AST, ALT y urea. Posterior a este tiempo, algunos siguieron elevados, pero la mayoría de los parámetros analizados regresaron a su normalidad a los 90 días. Puesto que el hígado es el principal órgano metabolizador del organismo, los hallazgos bioquímicos nos sugieren que el paso de los PCs por el hígado si altera temporalmente su funcionamiento, pero que este órgano es capaz de adaptarse a su presencia y retornar a su funcionamiento normal, sin producir alteraciones morfológicas. Con estos resultados demostramos que los PCs de CdS-Dex fueron bien tolerados por las ratas.

Se ha reportado previamente, que la presencia de nanopartículas de oro de 5-10 nm produjeron daño hepático agudo severo en rata, el cual se caracterizó por alteraciones en la estructura de estos órganos (Singh, Jairath, & Ahlawat, 2016).

Por otro lado, el hecho de no haber encontrado alteraciones en los niveles de creatinina a lo largo del tiempo sugiere que el riñón no se ve afectado funcionalmente por los PCs, y esto es importante si consideramos que el riñón es el principal órgano excretor del organismo. En estudios previos, han mostrado que PCs de Ag₂S también se acumulan principalmente en hígado y bazo y, son gradualmente depurados; también observaron que no causaron alteraciones bioquímicas y hematológicas importantes en un periodo de 60 días (Zhang, Zhang, Hong & He, 2013). Los resultados mostraron que los PCs de CdS-Dex tienen una amplia distribución y un MRT muy largo sin producir toxicidad significativa. Debido a la alta intensidad de fluorescencia emitido por las nanopartículas CS-DX, fue posible visualizar claramente la morfología del tejido; por lo tanto, estos PCs tienen el potencial de ser utilizados en bioimagen en actividades de diagnóstico y tratamiento.

1.2 Biocompatibilidad de PCs de CdS-Dex en ratas

Biocompatibilidad es una palabra que se usa extensamente en la ciencia de biomateriales. La incorporación de PCs dentro de sistemas biológicos requiere estrategias para la manipulación de ligandos unidos a la superficie de los PCs para hacerlos más solubles en agua y biocompatibles, es decir, compatibles con tejidos vivos por no ser tóxicos, dañinos o fisiológicamente reactivos (Shang et al., 2014). Los PCs deben volverse solubles en agua a través de la modificación de su superficie en preparación para aplicaciones biológicas. Sin embargo, los PC de alta calidad están hechos principalmente con metales pesados como el cadmio, cuya toxicidad a largo plazo es en gran parte desconocido (Yoo, Chambers, & Mitragotri, 2010).

La estabilidad y biocompatibilidad de los PCs que contienen cadmio puede ser obtenida a través de un procedimiento de intercambio completo de ligando, o mediante estabilización estérica, donde la superficie hidrofóbica nativa se recubre con polímeros anfifílicos (Zhang & Clapp, 2011; Zhou, Gao, Xu, Wang & Xum, 2009). Los polímeros pueden actuar como sitios de coordinación para la agregación de iones de cadmio y proteger los PCs. Polímeros solubles añadidos durante la síntesis han sido utilizados como agente de protección de PCs de CdS y CdSe, lo que resulta en un tamaño de partícula uniforme, esto al parecer, les permite entrar a células y tejidos sin producir daño, es decir ser biocompatibles.

Para evaluar la biocompatibilidad de PCs de CdS-Dex se utilizaron 24 ratas Wistar machos (110-130 g), y se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos: Control (6 animales), las ratas se trataron diariamente con un i.p. dosis de PBS (200 µL) durante 90 días; (2) PCs de CdS-Dex (18 animales), las ratas se trataron diariamente con una dosis de 100 µg/Kg de PCs de CdS-Dex i.p. durante 30, 60 o 90 días. Después de un tiempo, los animales fueron sacrificados como se describió anteriormente. Las muestras de tejido se procesaron y observaron bajo un microscopio de luz y epifluorescencia con el objetivo de realizar un análisis histopatológico. También se realizó un análisis bioquímico clínico en muestras de sangre para saber si la exposición a los PCs de CdS-Dex producían alteraciones.

La Figura 1.4 muestra un corte histológico representativo de los tejidos observados bajo microscopio de epifluorescencia tras la administración de dosis múltiples de PCs de CdS-Dex durante 30, 60 y 90 días. Como podemos observar, hubo una distribución homogénea de PCs en los tejidos en todos los tiempos analizados. La intensidad de la fluorescencia fue bastante similar en todos los tiempos, aún cuando el tiempo de tratamiento de los animales varió. El análisis histológico del hígado, el riñón y el cerebro no mostraron ninguna alteración morfológica, los tejidos son bastante similares al control. Sin embargo, las microfotografías de pulmón evidenciaron la presencia de un infiltrado inflamatorio después de 90 días de tratamiento; y, por otro lado, los testículos mostraron datos de atrofia y degeneración, 90 días después de recibir los PCs de CdS-Dx. La Tabla 2 muestra la cuantificación de los parámetros bioquímico clínicos analizados en suero de ratas a 30, 60 y 90 días. No se observó ninguna alteración en ratas tratadas diariamente con los PCs de CdS-Dx durante 30 días. Sin embargo, los animales tratados con PCs durante 60 días mostraron solamente niveles elevados de FA (73%) y urea (41%) en comparación con el grupo control ($p < 0,05$). Mientras que, a 90 días de tratamiento, solamente se observó que los niveles de urea permanecieron elevados (28%, $p < 0,05$).

Figura 1.4 Microfotografías de tejidos obtenidas de ratas tratadas diariamente con los PCs CdS-Dex durante 30, 60 y 90 días, amplificación 20X

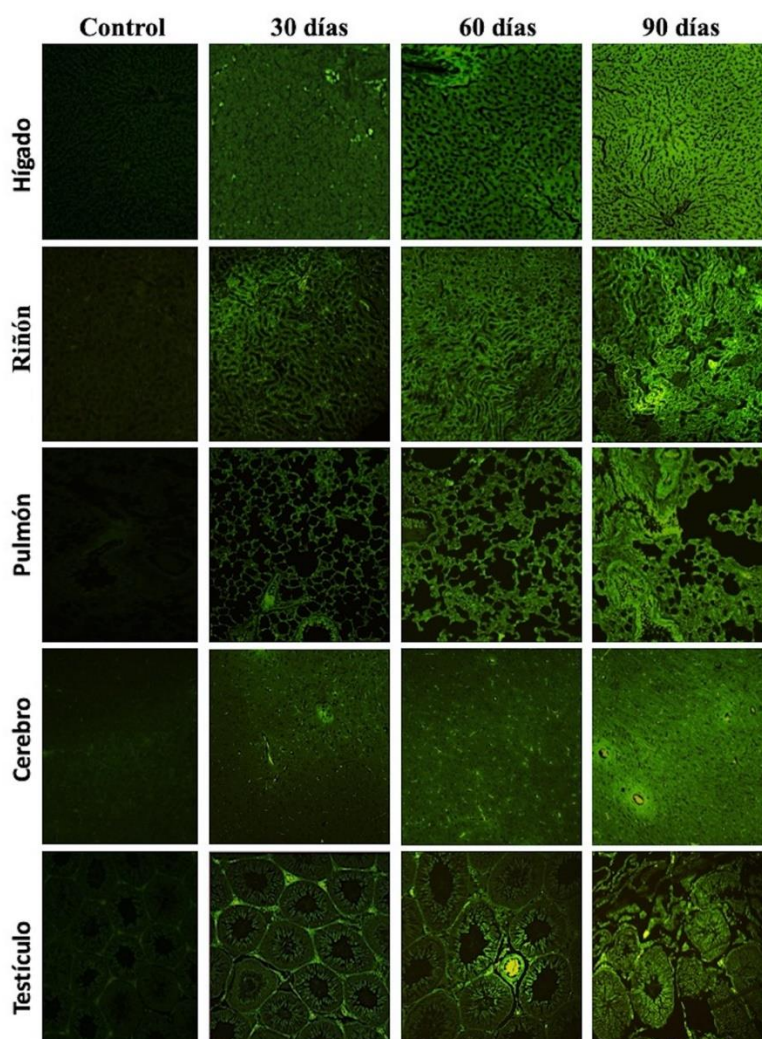


Tabla 1.2 Efecto de QDs de CdS-Dex sobre los parámetros bioquímico-clínicos después de 30, 60 y 90 días

Parámetro	Control	30 días	60 días	90 días
Glucosa	140.2 ± 19.4	120.5 ± 36.1	152.0 ± 43.3	159.9 ± 19.4
Triglicéridos	60.8 ± 13.7	112.3 ± 51.7	122.4 ± 34.4	187.0 ± 15.5
Colesterol	54.9 ± 8.9	59.4 ± 12.9	58.7 ± 3.3	64.9 ± 10.3
ALT	54.3 ± 8.6	54.5 ± 8.9	74.9 ± 25	57.5 ± 9.7
AST	160.2 ± 26	168.3 ± 20.1	146.5 ± 40.9	176.1 ± 29.0
FA	121.6 ± 33.7	156.9 ± 13	210 ± 31.4 *#&	113.8 ± 23.8
Urea	39.6 ± 8.4	35.8 ± 6.6	55.9 ± 8.3 *#	50.8 ± 2.0 #
Creatinina	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.04
Ácido Úrico	5.2 ± 1.8	5.6 ± 1.7	10.6 ± 5.4	10.5 ± 3.4

Cada valor representa el promedio ± SD. * p<0.05 comparado con el grupo control; # p<0.05 comparado con el grupo de 30 días; **p<0.05 comparado con el grupo de 60 días; y & p<0.05 comparado con el grupo de 90 días.

En el presente estudio observamos que la exposición continua de PCs no produjo alteraciones morfológicas en hígado, riñón, y cerebro. Sin embargo, si hubo la presencia de un exudado inflamatorio en los pulmones, así como atrofia y degeneración testicular tras 90 días de exposición. Este último hallazgo era de esperarse si consideramos que tras la exposición con una sola dosis los PCs permanecieron por un periodo de tiempo muy prolongado. La exposición durante 90 días debió de causar una acumulación importante de los PCs en este órgano sensible a tóxicos. Algo interesante fue encontrar que no hubo alteraciones bioquímicas importantes, solo la FA a los 60 días y la urea desde los 60 días permanecieron elevados. La incorporación de polímeros a PCs le confiere ventajas en sus propiedades ópticas y biocompatibles.

Varios grupos han usado polímeros biocompatibles y los han considerado de utilidad para proteger las superficies químicas, hay una gran variedad descritos en la literatura, uno de los más usados es el polietilenglicol, el cual tiene muchas aplicaciones en medicina para preparar PCs fluoroforos biocompatibles (Fard, Jafari & Eghbal, 2015; Hassan & Singh, 2014). A pesar de que las nanopartículas han demostrado tener toxicidad selectiva (testículo). Se necesitan más estudios para asegurar que los PCs sean utilizadas de forma segura y eficiente en medicina.

1.3 Hemocompatibilidad de PCs de CdS-Dex en ratas

El uso de puntos cuánticos para fines teranósticos con mayor frecuencia requiere la ruta intravascular y, una vez que ingresan al torrente sanguíneo, deben contactar todos los componentes sanguíneos. Los eritrocitos son células sanguíneas que están continuamente expuestas a la agresión durante su vida útil, lo que produce constantes cambios bioquímicos y morfológicos (Zhang, 2016; Kim, Heo & Shin, 2016). Si bien se ha informado que algunos nanomateriales son seguros para estas células (Li, Guo, Zhang, Xue, & Liu, 2015; Barshtein, Livshits, Shvartsman & Arbell, 2016), es bien sabido que su interacción con los nanomateriales tiene efectos variados dependiendo del nanomaterial empleado. Algunos nanomateriales pueden inducir hemólisis (destrucción inmediata de los eritrocitos), que depende de la concentración y el tiempo de exposición (Zeng et al., 2018; Chen et al., 2018). Es posible evitar que una nanopartícula produzca hemólisis mediante el uso de tensoactivos (Thasneem, Sajeesh & Sharma, 2011) y recubrimientos (Ferdous, Beegam, Tariq, Ali & Nemmar, 2018). Sin embargo, la hemólisis no es la única alteración asociada hasta ahora a la interacción nanomaterial/eritrocito. Algunas nanopartículas inducen alteraciones que pueden conducir al estrés de los eritrocitos e inducen la muerte, lo que desencadenará diversos efectos fisiopatológicos asociados con la compensación deficiente de la eritropoyesis y la pérdida consecutiva de su presencia en la sangre (Lang & Lang, 2015).

Para evaluar la hemocompatibilidad los eritrocitos se prepararon con base al método descrito por Nemmar, Zia, Subramaniyan, Al-Amri & Ali, 2012. Los eritrocitos se separaron por centrifugación. El sobrenadante fue utilizado para el ensayo de hemólisis y análisis topográfico. El ensayo de hemólisis utilizado en el presente estudio siguió el método descrito previamente por Neun & Dobrovolskaia, 2011. Por cada ensayo, se colocaron 1×10^7 eritrocitos y se resuspendieron con una solución amortiguadora (KCl 150mM + Tris 3mM), los eritrocitos fueron incubado con PCs de CdS-Dex a concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Luego de 30 minutos de exposición, se recolectó el sobrenadante, se transfirió a una placa de 96 pozos, y la cantidad de hemoglobina se midió a una longitud de onda de 550 nm en un lector de placas (VICTOR x3 PerkinElmer, Massachusetts, EE. UU.). Se utilizó una solución de NaCl 35mM control positivo.

Para el análisis topográfico, los eritrocitos fueron tratados con PCs de CdS-Dex a las concentraciones antes señaladas y se incubaron nuevamente durante 30 y 60 min. Transcurrido este tiempo se realizaron frotis en portaobjetos y se analizaron por microscopía de fuerza atómica XE-Bio (Park Systems Co., Suwan, Corea) para obtener imágenes topográficas de los eritrocitos. El análisis se realizó mediante el software XEP y XEI Park Systems.

La Figura 1.5 muestra el efecto de PCs de CdS-Dex sobre la integridad de los eritrocitos tratados con las diferentes concentraciones (0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los eritrocitos se incubaron durante 30 minutos. Se observó que los PCs de CdS-Dex causaron mínima hemólisis (5%) con todas las concentraciones usadas ($p < 0.05$). La Figura 6 muestra imágenes obtenidas por AFM de eritrocitos en 3D tratados con PCs de CdS-Dex con concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 30 y 60 min. Las dos primeras imágenes corresponden a eritrocitos no tratados (grupo control) y a eritrocitos que se les indujo hemólisis. El eritrocito normal tiene características típicas de una célula sanguínea sana, con morfología ovalada, biconcava con una depresión central. El eritrocito hemolizado es un eritrocito destruido en totalidad, la célula muestra una pérdida de su morfología, sin bordes definidos debido a la ruptura de su membrana y la salida de contenido celular. A continuación, observamos eritrocitos tratados con 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PCs de CdS-Dex durante 30 min, el eritrocito muestra una morfología abultada y bordes indefinidos, planos, con grietas en la superficie de la membrana y ausencia de depresión central, como se muestra en la reconstrucción 3D. En el caso de los eritrocitos tratados con PCs de CdS-Dex 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 30 minutos, las células mostraron bordes lisos y definidos, aumentados en ancho, planitud y falta de depresión central, así como "artefactos" que hicieron que la superficie se notara rugosa, lo que sugiere que podrían ser nanopartículas. Cabe destacar que, los eritrocitos tratados durante 60 minutos sí mostraron cambios significativos.

El eritrocito se observó con una membrana intacta, pero hubo una pérdida de biconcavidad, un aumento de tamaño y mayor presencia de abultamientos en su superficie, que aumentaron conforme aumento la concentración de PCs. Si bien, el análisis de hemólisis reveló que sólo un 5% de ellos sufrieron lisis, el análisis AFM no mostró evidencia de este efecto hemolítico con ninguna concentración. Esta discordancia en los resultados puede indicar que la hemólisis observada podría deberse a la manipulación de la muestra. Un dato curioso obtenido en el análisis topográfico es que los eritrocitos mostraron pérdida de la biconcavidad.

Figura 1.5 Efecto de los PCs de CdS-dex sobre la integridad de los eritrocitos.

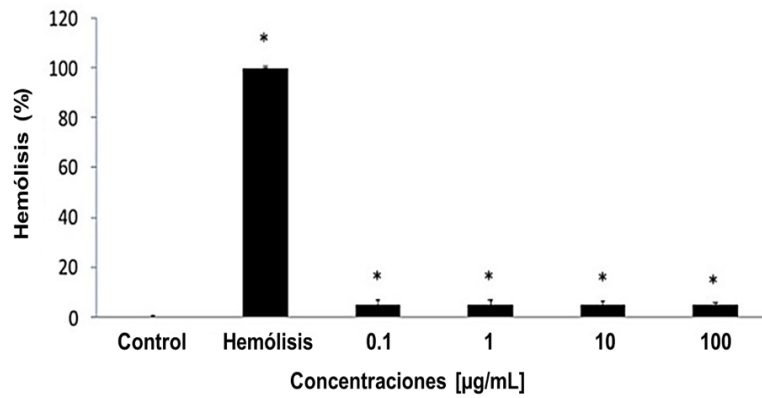
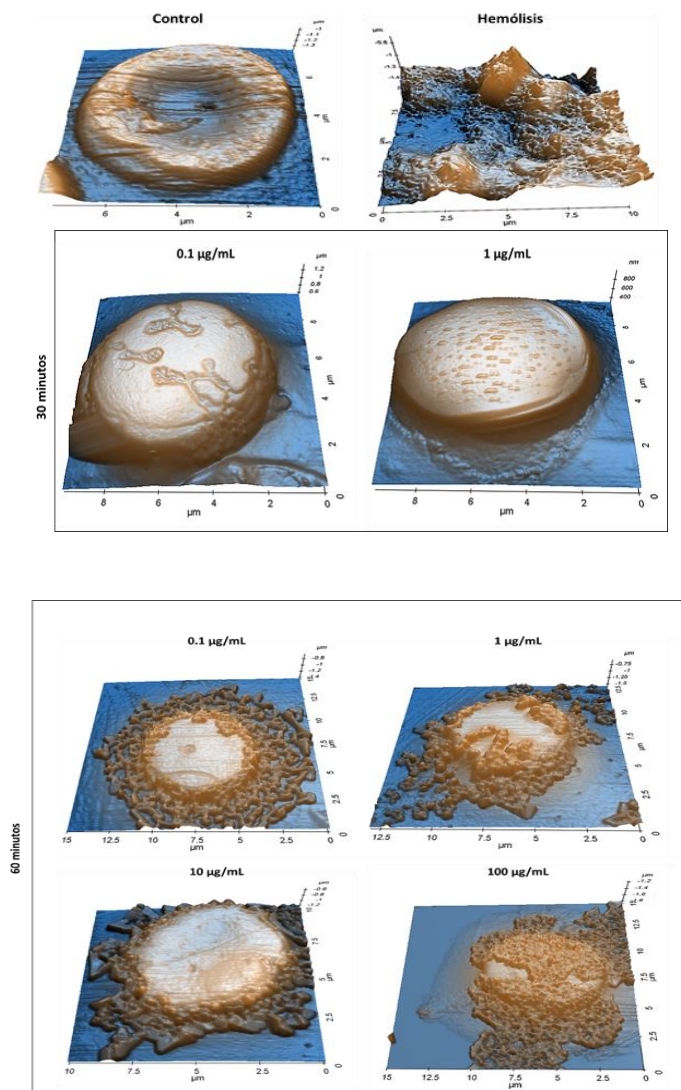


Figura 1.6 Imágenes representativas de AFM que muestran la morfología de la superficie de eritrocitos tratados con PCs CdS-Dex.



Previos estudios han demostrado que la interacción de nanomateriales/eritrocitos está asociado con efectos tóxicos. Un ejemplo de esto son los reportes sobre nanopartículas de oro de un tamaño de 30 nm, las cuales demostraron ser hemolíticas, este efecto de hemólisis no se observó en las nanopartículas más pequeñas (5, 10, 20 nm) (Cenni & Baldini, 2008). No obstante, otro estudio con nanopartículas de plata demostró que nanopartículas más pequeñas (1-3 nm) produjeron una mayor actividad hemolítica (60%) (Aseichev & Sergienko, 2014), lo que sugiere que la inducción de hemólisis no necesariamente está asociada al tamaño de las nanopartículas. También, se sabe que nanopartículas de oro de 3.2 nm recubiertas con polietilenglicol causaron ligera hemólisis (<5%) a concentraciones de 100 µg/mL; sin embargo, las nanopartículas no recubiertas pueden producir mayor efecto hemolítico (70%) incluso a menores concentraciones de 30 µg/mL (Hermanson, 2008).

En el presente trabajo los eritrocitos fueron incubados con PCs de CdS-Dex durante 30 minutos y observamos que sólo se produjo un mínimo efecto hemolítico (<5%), incluso a la mayor concentración de 100 µg/mL. Se observó que los eritrocitos tratados con PCs de CdS-dextrina (3-5 nm) causaron cambios morfológicos en la membrana eritrocitaria a concentraciones de 0.1 y 1 µg/mL después de 30 minutos de exposición. También se observaron alteraciones como pérdida de la biconcavidad, grietas y pequeños bultos en la superficie de la membrana. Sin embargo, en los eritrocitos tratados durante 60 minutos, se observó además aglomeración de las nanopartículas en la superficie de los eritrocitos. El análisis de las imágenes obtenidas en AFM y las mediciones topográficas mostraron evidencia de que los PCs de CdS-Dex produjeron cambios en su morfología similares a las ya reportadas en otros estudios. Sin embargo, no es claro si esos cambios pueden estar asociados con cambios funcionales de estas células, por lo que es necesario realizar estudios adicionales para elucidar esta cuestión.

1.4 Síntesis, caracterización y eficacia farmacológica de un bioconjugado de PCs de CdS-Dex/Doxorrubicina

Los PCs funcionalizados son de gran utilidad en biomedicina porque puede modificarse con una variedad de biomoléculas y pequeños polímeros biológicos, además de mejorar su bioactividad, con lo que se pueden disminuir sus efectos secundarios. Debido a estas características, los PCs pueden unirse de manera efectiva a las membranas celulares, lo que permite usarlas como excelentes sondas para la detección, diagnóstico, obtención de imágenes de células y administración de agentes terapéuticos. Los PCs preparados en solución acuosa pueden acoplarse covalentemente a varias biomoléculas para usarse como herramientas sensibles para objetivos biológicos (Gutiérrez-Sancha, Reyes-Esparza, Rodríguez-Fragoso, García-Vázquez & Rodríguez-Fragoso, 2015). Esto se puede lograr mediante los procedimientos de bioconjugación aceptados (Hermanson, 2008; Biju, Mundayor, Omkumar, Anas & Ishikawa, 2010). En particular, se requiere la conjugación de biomoléculas para utilizarlas en técnicas de imagen durante el monitoreo de la enfermedad y para la terapia fotodinámica de enfermedades, como el cáncer (Cai, Luo, Zhang, Du & Lin, 2016). De estas biomoléculas, la doxorrubicina se ha utilizado como agente de orientación contra células cancerosas en la terapia contra el cáncer. Sin embargo, las limitaciones de la doxorrubicina en la aplicación clínica están restringidas porque a menudo causan daños graves a células normales y tejidos sanos durante el tratamiento y, finalmente, la inmunidad sistémica. Para superar este problema, se han diseñado varios sistemas de administración de doxorrubicina para mejorar la eficacia del control de liberación de fármacos y una reducción significativa de la toxicidad en comparación con doxorrubicina libre. Entre los diferentes materiales, los PCs se han convertido en posibles portadores de fármacos para el tratamiento de muchos cánceres humanos. Existen diversas nanopartículas a base de doxorrubicina que se reportan en la literatura para su uso como sistemas de administración de fármacos (Chen et al., 2013; Meng, Zhong, Cheng & Guo, 2014).

La síntesis de PCs CdS-Dex se preparó en solución acuosa como previamente se reportó (Reyes-Esparza, 2015). La conjugación de PCs con biomoléculas se puede llevar a cabo mediante una unión electrostática, unión directa covalente unida a la superficie de los PCs de CdS-Dex. El proceso de bioconjugación implica la reacción de un grupo funcional con otro, dando como resultado la formación de un enlace covalente. La conjugación covalente de PCs CdS-Dex, es una de las estrategias de activación más utilizadas para las partículas de hidroxilo y se realiza bajo condiciones no acuosas y 1,1-carbonildiimidazol (CDI). Los intermedios activos se forman en excelente rendimiento debido a la fuerza impulsora creada por la liberación de dióxido de carbono e imidazol. El agente activador crea carbamato de imidazolilo en la superficie de la partícula, que luego es espontáneamente reactivo hacia las aminas. La conjugación posterior con un compuesto que contiene amina produce un enlace carbamato.

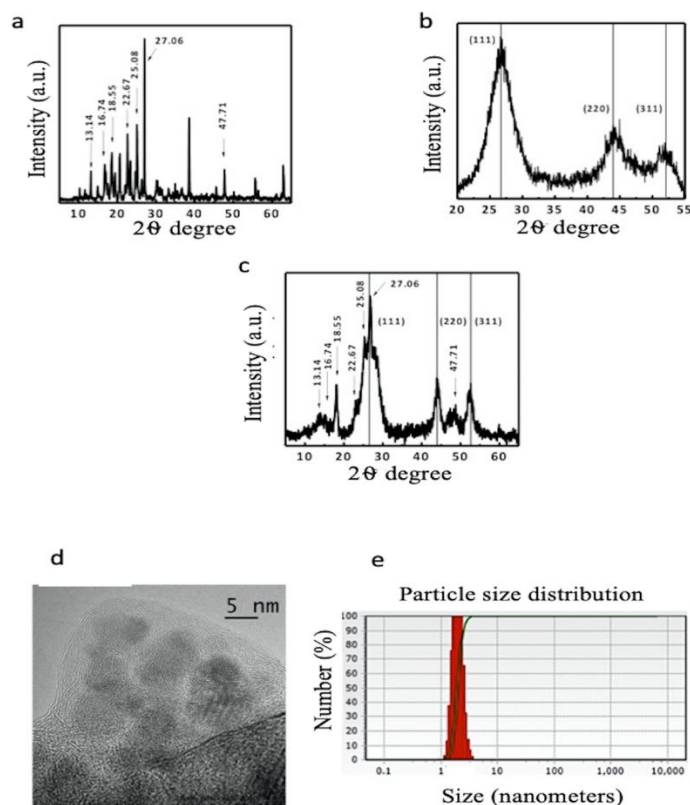
La formación de los PCs bioconjugados (CdS-Dex/Dox) se llevó a cabo mediante dispersión. Se suspendieron 1 mg de PCs de CdS-Dex recién preparados en 10 % de tetrahidrofurano (THF) que contiene CDI a una concentración de 0.1 M y se mezclaron durante varios minutos. Posteriormente, la doxorubicina (0.1 μ M) y los QDs fueron incubadas durante 4 horas; la solución rojiza se centrifugó a 9900 g durante 30 minutos. Los sedimentos se lavaron y los PCs bioconjugados (CdS-Dex/Dox) se secaron a 37 ° C durante 12 h.

La estructura y fase de los PCs bioconjugados se determinaron mediante difracción de rayos X en polvo usando el difractómetro de rayos X modelo Siemens D5000 (radiación de Cu $K\alpha$). El tamaño de partícula y la morfología se caracterizaron utilizando el modelo HRTEM JEM-ARM200CF de energía de haz de electrones de 80-200 KeV equipado con un módulo de pares de pistola de emisión en campo frío. La distribución de diámetro hidrodinámico de los PCs de CdS-Dex bioconjugados con doxorubicina se realizaron mediante un nanotracer (Microtra Inc EE. UU.). FTIR es una técnica apropiada para establecer la unión de la molécula de doxorubicina en los PCs de CdS-Dex en el proceso de bioconjugación. El espectro se registró con un espectrómetro (Thermo-Scientific Nicolet 6700) en bandas de absorción en el rango de 400-4000 cm^{-1} de longitud de onda con un tiempo de exploración de 180 segundos. El espectro de XRD de doxorubicina puro (Figura 1.7a) se caracterizó por picos de difracción agudos a diferentes valores de 2θ , que podrían indizarse a la dispersión desde diferentes planos asociados con la naturaleza cristalina de la doxorubicina. Nuestros resultados obtenidos a partir de los experimentos XRD son similares a los previamente reportados (Abdullahi-Kamba et al. 2013). El espectro XRD de los PCs de CdS-Dex, como se muestra en la Figura 7b, exhibe picos anchos prominentes a valores 2θ de 26.50, 44.0 y 52.130, que son consistentes con los picos de difracción de los planos de CdS en fase cúbica. Los mismos picos característicos también se pueden encontrar en el espectro de los PCs CdS-Dex/Dox (Figura 7c). El tamaño de los PCs se puede evaluar cuantitativamente a partir de los datos de XRD usando la ecuación de Debye-Scherrer, donde λ es la longitud de onda de la radiación de rayos X, β es el ancho y medio máximos (FWHM) en radianes del pico de XRD y χ el ángulo de difracción. Se encontró que el tamaño medio de partícula de los PCs de CdS-Dex/Dox del pico de difracción (220) es de aproximadamente 5 nm. Esto sugiere que la estructura cristalina de los PCs de CdS-Dex no se altera después de la bioconjugación con doxorubicina. Los picos correspondientes al plano de reflexión alrededor de $2\theta = 13.14^\circ, 16.74^\circ, 18.55^\circ, 22.67^\circ, 25.08^\circ, 27.06^\circ$ y 47.71° se atribuyen predominantemente a la presencia de la molécula Dox. Nuestros resultados de XRD proporcionan evidencia de la presencia de doxorubicina en los PCs de CdS-Dex después de la conjugación.

Para identificar la localización intracelular de las nanopartículas

En la Figura 1.7d se muestra una imagen de HRTEM típica de los PCs de CdS-Dex/Dox. La imagen muestra claramente que las nanopartículas presentan una buena uniformidad en tamaño y forma, además revela que los PCs conjugados con doxorubicina presentan buena dispersión, morfología esférica y su diámetro promedio puede estimarse en el rango de 5 nm. La Figura 7e muestra las distribuciones de diámetro hidrodinámico de los PCs de CdS-Dex/Dox medido por DLS, y representa un diámetro promedio de 5 nm con una distribución relativamente estrecha, que es consistente con los resultados de XRD y HRTEM.

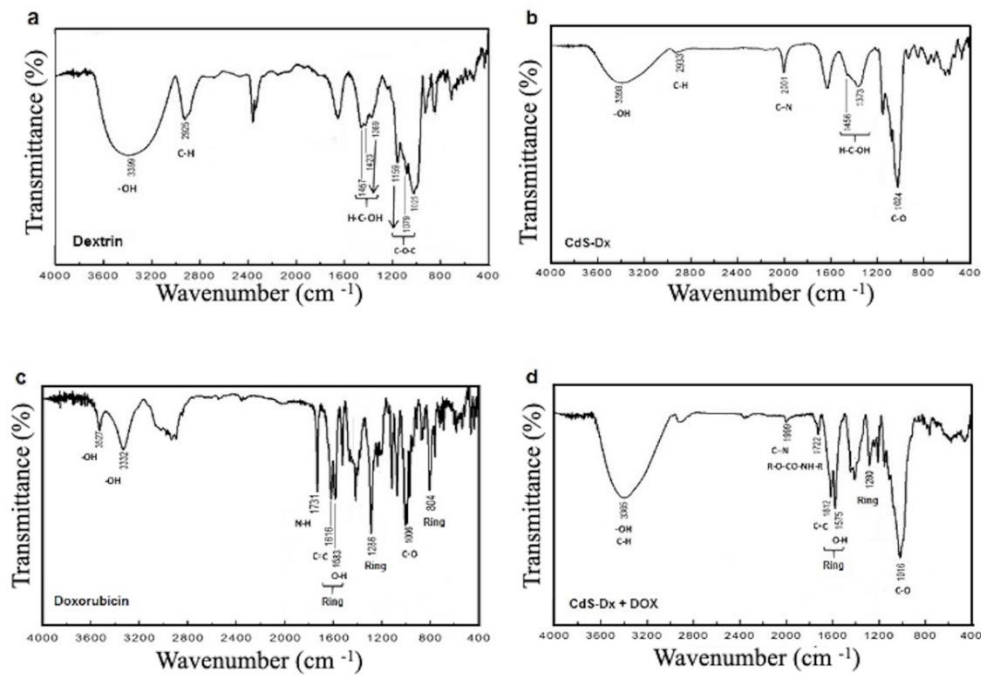
Figura 1.7 Los patrones de XRD muestran la estructura cristalina de Dox puro (a), planos típicos de fase cúbica de CdS (b) y de los PCs CdS-Dex bioconjugados con Dox (c). Imagen HRTEM de los PCs de CdS-Dex bioconjugados con Dox. (b) DLS muestra la distribución del tamaño de partícula de los PCs de CdS-Dex bioconjugados con Dox



El espectro FTIR de la dextrina con los picos principales identificados por las flechas se representa en la Figura 8. Para la dextrina pura, el pico a 3399 cm^{-1} se debe a las vibraciones de estiramiento de O-H, un pequeño pico a 2925 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones de estiramiento C-H. Los picos a 1457 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} y 1369 cm^{-1} están asociados a vibraciones HC-OH δ , y las bandas a 1159 cm^{-1} , 1079 cm^{-1} y 1025 cm^{-1} están asignadas a vibraciones de estiramiento de COC, resultados similares han sido reportados (Predoi, 2007). El espectro FTIR de los PCs de CdS recubiertos con dextrina (Figura 7b) presenta las mismas posiciones de línea que en la Figura 7a, excepto que hay un pico adicional en comparación con dextrina pura a 2001 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento de CN como una consecuencia de la tiourea utilizada en la síntesis de las nanopartículas CdS. El espectro FTIR de Dox puro (Figura 7c) muestra picos a 3527 cm^{-1} y 3332 cm^{-1} debido a las vibraciones de estiramiento O-H. La banda de absorción a 1731 cm^{-1} se asigna a las vibraciones de flexión NH para la estructura de amina primaria, las bandas a 1616 cm^{-1} y 1583 cm^{-1} están diseñadas para las vibraciones de estiramiento de dos grupos carbonilo del anillo de antraceno, bandas en 1286 cm^{-1} y 804 cm^{-1} debido a la vibración esquelética de la molécula de doxorubicina (Das, G., et al., 2010). El espectro FTIR de los PCs de CdS-Dex/Dox (Figura 8d) muestra un pico ancho a 3365 cm^{-1} como resultado de las vibraciones de estiramiento superpuestas O-H y C-H. La banda de absorción se observó a 1722 cm^{-1} , mostrando evidencia de modificación de los PCs de CdS-Dex durante el proceso de bioconjugación con doxorubicina, como se explica en la sección de síntesis; el pico a 2001 cm^{-1} en los PCs de CdS-Dex disminuye en intensidad en comparación con el espectro del FTIR del bioconjugado. A partir de estos resultados de FTIR, se puede sugerir que la unión de doxorubicina a los PCs de CdS-Dex ocurre a través de la interacción de grupos amino de doxorubicina con la carbonilimidazolida derivada de la amina primaria que reacciona *in situ* con un nucleófilo como grupos OH de PCs CdS-Dex, proporcionando el carbamato correspondiente.

A partir de estos resultados FTIR, se puede sugerir que la unión de doxorubicina a los PCs de CdS-Dex se produce a través de la interacción de los grupos amina de la doxorubicina con el carbonilimidazolido derivado de la amina primaria que reacciona *in situ* con un nucleófilo como los grupos OH de los PCs de CdS-Dex, proporcionando el carbamato correspondiente.

Figura 1.8 Espectros FT-IR experimentales, bandas IR de (a) molécula de dextrina pura, (b) PCs de CdS-Dex, (c) molécula Dox pura, y (d) PCs de CdS-Dex bioconjugados con Dox.



1.5 Evaluación del efecto farmacológico de los bioconjugados CdS-Dex/Dox en células HeLa

En este trabajo, se realizó la bioconjugación de estos PCs con doxorubicina para usarlo como nanotransportador para la entrega de fármaco en células HeLa, aprovechando sus propiedades ópticas y la ausencia de citotoxicidad a bajas concentraciones que producen estos PCs. La doxorubicina es una antraciclina compuesta por un anillo tetracíclico plano (anillos a, b, c y d) y por cadenas laterales variables que incluyen un aminoazúcar (Meng, Zhong, Cheng & Guo, 2014). La doxorubicina es uno de los medicamentos más comunes utilizados como herramienta de investigación para la mayoría de los tipos de cáncer. Por esta razón, ha sido y continúa siendo uno de los fármacos más utilizados para preparar conjugados con nanomateriales. Además, debido a que tiene la ventaja de ser fácilmente monitoreado en las células, sus efectos farmacológicos pueden evaluarse rápidamente en modelos *in vitro* (Zhang & Kong, 2015). Es bien sabido que la doxorubicina inhibe la multiplicación de células tumorales a través de varios efectos celulares, entre los más importantes están la intercalación entre bases de ADN debido a la estructura plana de antraciclina, lo que lleva a cambios topológicos que implican la inhibición del ADN, ARN y síntesis de proteína, produciendo estrés oxidativo y muerte celular (Carvalho et al., 2009). Para el estudio se utilizaron células HeLa (adenocarcinoma de cuello uterino) (ATCC, EE. UU.). Las células se cultivaron en medio DMEM (GIBCO, EE. UU.) con 10% de SFB (GIBCO, EE. UU.) y 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina (GIBCO, EE. UU.), en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ a 37 °C. Las células HeLa se usaron para verificar la captación selectiva de los PCs de CdS-Dex solos y bioconjugados con doxorubicina. Las células (1×10^5) se sembraron en cubreobjetos estériles de 12 mm en una placa de 6 pozos. Las células se cultivaron durante 24 h, se lavaron con PBS y luego se incubaron con las PCs CdS-Dx (0.01 y 1 µg/ml) durante 24 h. Después de lavar las células se fijaron durante 20 minutos con paraformaldehído al 4%. Posteriormente, las células se lavaron nuevamente con PBS. Las células ya fijadas se cubrieron con un portaobjetos de vidrio con una gota de 10 µL de glicerol al 50%/PBS (v/v) y se colocó sobre el objetivo en un microscopio confocal (Nikon A1, Nikon, Japón). Los PCs de CdS-Dex se excitaron con un láser de 488 nm, y sus señales se recogieron a 515 y 680 nm. Con el fin de medir la captación celular de los bioconjugados CdS-Dex/Dox, se observó el cubreobjetos con células fijadas bajo un microscopio de fluorescencia. Para evaluar el efecto farmacológico de los PCs bioconjugados se realizó un ensayo de viabilidad celular utilizando células HeLa. La viabilidad celular se determinó usando un ensayo MTT (metiltetrazolio, Sigma Aldrich, EE. UU.). Para el ensayo de viabilidad celular, las células HeLa se sembraron en una placa de 96 pozos (10,000/pozo) y se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo fue reemplazado por uno nuevo suplementado con diferentes concentraciones de PCs de CdS-Dex y el bioconjugado (0.01, 0.1, 1 y 10 µg/mL) y se incubó durante 24 h.

Después del tratamiento, el medio se retiró suavemente y se reemplazó con solución MTT (5 mg/mL). Se determinó la densidad óptica en un lector de microplacas (Bio-Rad) a una longitud de onda de 590 nm. Las células no tratadas sirvieron como control de viabilidad celular no tratada. Los resultados representaron un porcentaje de la viabilidad relativa de las células frente al control no tratado. Los resultados de MTT se presentan como valores relativos a los valores de control, expresados como porcentajes. Células fijadas se observaron bajo un microscopio confocal (Nikon A1, Nikon, Japón). Los PCs se excitaron con un láser de 488 nm, y sus señales se recogieron a 515 nm. Para evaluar también el efecto farmacológico de los PCs bioconjugados, se midió el tamaño del núcleo y de las células usando el software Image-Pro Insight 9 (Media Cybernetics Inc.).

El análisis de la viabilidad celular mostró que las células tratadas con los PCs de CdS-Dex/Dox mostraron una mayor mortalidad (Figura 9). Se encontró que las células tratadas con 1 $\mu\text{g/mL}$ de PCs CdS-Dex/Dox redujeron la viabilidad en 38% ($p < 0.05$), mientras que las células tratadas con 10 $\mu\text{g/mL}$, la viabilidad se redujo hasta 55% ($p < 0.05$). Las células tratadas con PCs no bioconjugadas también mostraron una viabilidad más baja (17%) con una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con las células control, pero no fue estadísticamente significativa.

Las propiedades fluorescentes de los PCs de CdS-Dex nos permiten monitorear la captación y distribución de los PCs de CdS-Dex/Dox directamente en las células HeLa. Los experimentos de captación y bioimagen de PCs de CdS-Dex se realizaron con un microscopio confocal de fluorescencia. Para esto, las células se incubaron con 1 $\mu\text{g/mL}$ de PCs de CdS-Dex, 1 $\mu\text{g/mL}$ de Dox y 1 $\mu\text{g/mL}$ de los PCs CdS-Dex/Dox durante 24 horas; luego se lavaron para eliminar cualquier QD libre. Como se puede observar en la Figura 10, la señal de fluorescencia se observó principalmente en el núcleo de las células tratadas con PCs de CdS-Dex (flecha amarilla). Sin embargo, en el caso de las células HeLa tratadas con doxorubicina no se observó en ninguna célula. En células tratadas con los PCs de CdS-Dx/Dox, se observó fluorescencia tanto en el citoplasma como en el núcleo. Fue evidente el cambio en la morfología celular de las células tratadas con PCs de CdS-Dex/Dox. No se observó una reducción obvia en el brillo de la fluorescencia bajo excitación continua durante 20 minutos, lo que indica la alta fotoestabilidad de los PCs CdS-Dex solos y del bioconjugado. Estábamos interesados en saber qué sucedía a las células HeLa si aumentábamos la cantidad de PCs bioconjugados, por lo que tratamos células también con 10 $\mu\text{g/mL}$ de PCs CdS-Dex/Dox. En la Figura 10, podemos observar que las células tratadas con 1 $\mu\text{g/mL}$ de Dox y PCs de CdS-Dx/Dox aumentaron en tamaño, tanto el citoplasma y el núcleo (ver flechas amarillas), además de eso, también se observaron presencia de células binucleadas. Sin embargo, las células tratadas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de PCs de CdS-Dx/Dox mostraron células con un tamaño mayor (célula y núcleo), y además, había múltiples células que mostraban la aparición de formación de ampollas en la membrana; la fluorescencia fue más intensa en estos que aquellos tratados con 1 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 1.9 Efecto de PCs de CdS-Dex bioconjugado con dox sobre la viabilidad de células Hela.

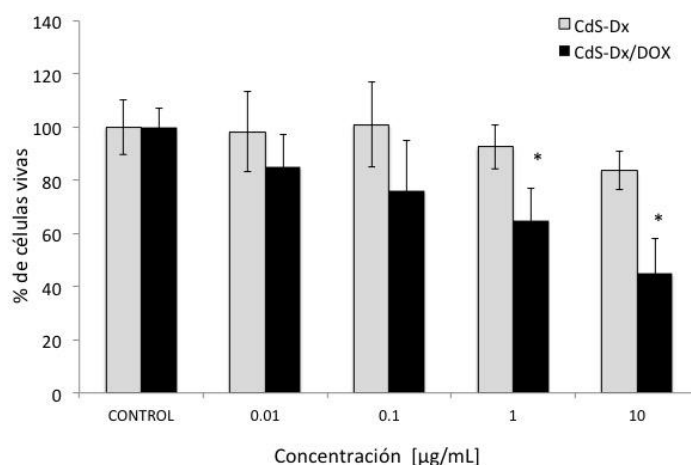
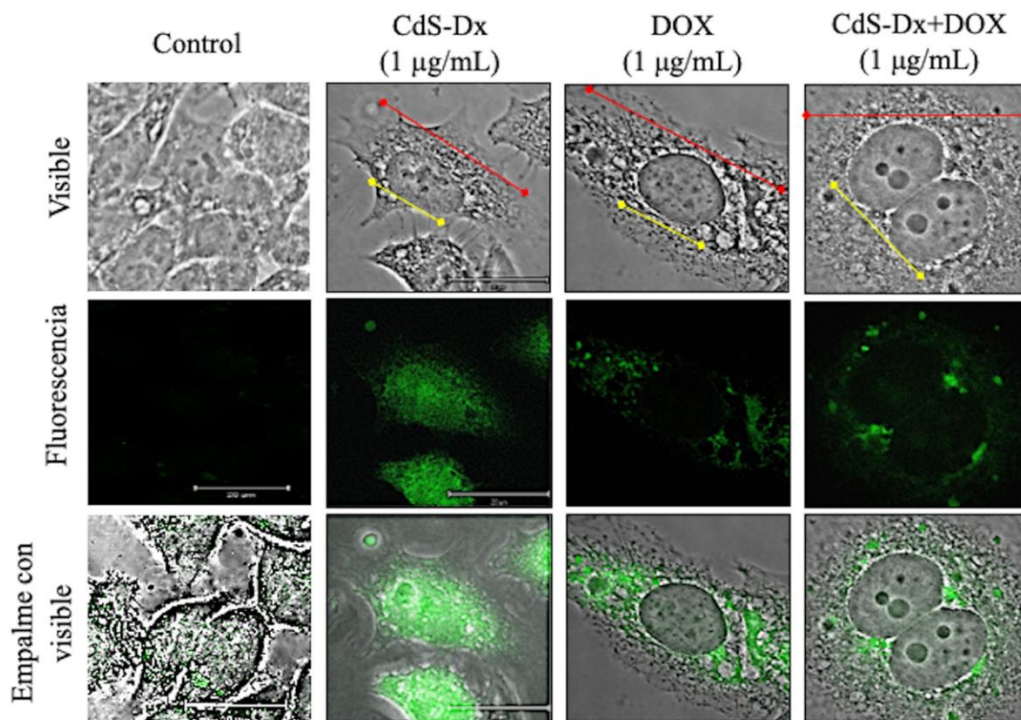


Figura 1.10 Imágenes microscópicas de fluorescencia que muestran la localización intracelular de los PCs de CdS-Dex bioconjugados con dox en células HeLa.



Los presentes resultados mostraron que las células tratadas con PCs de CdS-Dx bioconjugados con doxorubicina tenían un mayor tamaño, tanto en la célula como en el núcleo, y también se encontraron células binucleadas. Uno de los mecanismos de acción de doxorubicina es la inducción de la expresión de la proteína p53, que a su vez detiene el ciclo celular en la fase G1 o G2 / M. La detención en esas fases induce un aumento en el tamaño de las células porque las células se detienen en las fases de las células de crecimiento, y este efecto se ha encontrado con nanopartículas conjugadas con doxorubicina (Augustin et al., 2016; Rudnick-Glick, Corem-Salkmon, Grinberg & Margel, 2016). Mostramos que las células tratadas con PCs de CdS-Dx/dox eran más grandes en comparación con las células control. Eso significa que doxorubicina probablemente indujo la detención del ciclo celular. Pero curiosamente, esas células tratadas con PCs de CdS-Dx/doxorubicina mostraron características típicas de aparición de apoptosis. Estudios previos realizados por otros grupos que utilizan nanopartículas conjugadas con doxorubicina han demostrado que el efecto citotóxico de doxorubicina se conserva y es capaz de inducir apoptosis y necrosis en diferentes líneas celulares (Zhang et al., 2016; Sangtani et al., 2018; Ma et al., 2015). Por otro lado, otros estudios han explicado que la distribución de DOX basada en QD permitió su expansión celular y, como consecuencia, produjo mejores resultados farmacológicos (Vyas D., (2015)). Nuestros resultados coincidieron con eso, la presencia de alta fluorescencia en aquellas células tratadas con CdS-Dx / QDs bioconjugados con DOX mostró una mayor acumulación de fármaco intranuclear que fue responsable de los cambios morfológicos, probablemente debido a la detención del ciclo celular, y una mayor presencia de apoptosis versus doxorubicina libre.

1.6 Agradecimiento

Indicar si fueron financiados por alguna Institución, Universidad o Empresa.

1.7 Conclusiones

En el presente trabajo se muestra evidencias de la buena distribución, biocompatibilidad y hemocompatibilidad de los PCs de CdS-Dex en rata y en células en dosis única, así como su tolerabilidad y biocompatibilidad a largo plazo. Además, mostramos evidencias de efectividad como nanotransportadores de fármacos. Los presentes resultados mostraron que los PCs de CdS-Dex conjugados con doxorubicina produjeron los típicos cambios morfológicos que produce la doxorubicina, aunque los PCs conjugados mostraron mayores efectos farmacológicos. Los PCs de CdS-Dex tienen el potencial de usarse en bioimagen y como nanovehículos para el transporte de fármacos, teniendo la ventaja de que puede ser distribuido a cualquier tejido, atravesar barreras fisiológicas, ser bien tolerados, y biocompatibles.

1.8 Referencias

- Albus U. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edn). Laboratory Animals. 2012;46(3):267-268.
- Ali, A., Ansari, V.A., Ahmad, U., Akhtar, J. & Jahan A. (2017). Nanoemulsion: An Advanced Vehicle For Efficient Drug Delivery. *Drug research (Stuttgart)*, 67(11):617-631.
- Arami, H., Khandhar, A., Liggitt, D. & Krishnan, K.M. (2015). In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chemical Society Reviews*. 44(23): 8576–8607. <http://dx.doi.org/10.1039/C5CS00541H>.
- Aseichev, A., Sergienko, V.I. (2014). Effects of Gold Nanoparticles on Erythrocyte Hemolysis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 156:495–498.
- Augustin, E., Czubek, B., Nowicka, A.M., Kowalczyk, A., Stojek, Z. & Mazerska, Z. (2016). Improved cytotoxicity and preserved level of cell death induced in colon cancer cells by doxorubicin after its conjugation with iron-oxide magnetic nanoparticles. *Toxicology In Vitro*, 33:45-53. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.009>.
- Barrios-Gumiela, A., Gómez, R. & De la Mata, J. (2020). Effect of PEGylation on the biological properties of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 573:118867. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118867>.
- Barshtein, G., Livshits, L., Shvartsman, L.D. & Arbell, D. (2016). Polystyrene Nanoparticles Activate Erythrocyte Aggregation and Adhesion to Endothelial Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 74:19–27.
- Biju, V., Mundayor, S., Omkumar, R.V., Anas, A. & Ishikawa M (2010) Bioconjugated quantum dots for cancer research: Present status, prospects and remaining issues. *Biotechnology Advances*, 28(2):199-213. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.11.007>.
- Cai, X., Luo, Y., Zhang, W., Du, D. & Lin, Y. (2016). pH-sensitive ZnO quantum dots-doxorubicin nanoparticles for lung cancer targeted drug delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8:22442-22450. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b04933>.
- Carvalho, C., Santos, R.X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P.J., Santos, M.S. & Moreira, P.I. (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current Medicinal Chemistry*, 16(25):3267-85.
- Cenni, E. & Baldini, N. (2008). Biocompatibility of poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles conjugated with alendronate. *Biomaterials*. 29:1400-1411. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.022>.
- Chen, H., Moore, T., Qi, B., Colvin, D.C., Helen, E.K., Hitchcock, D.A., He, J., Mefford, O.T., Gore, J.C., Alexis, F. & Anker, F.N. (2013). Monitoring pH-triggered drug release from radioluminescent nanocapsules with X-ray excited optical luminescence. *ACS Nano*, 7:1178-1187. <https://doi.org/10.1021/nn304369m>.
- Chen, L.Q., Fang, L., Ling, J., Ding, C.Z., Kang, B. & Huang, C.Z. (2015). Nanotoxicity of Silver Nanoparticles to Red Blood Cells: Size Dependent Adsorption, Uptake, and Hemolytic Activity. *Chemical Research in Toxicology*. 28(3):501-509. <https://doi.org/10.1021/tx500479m>.
- Das, G., Nicastrì, A., Coluccio, M.A., Gentile, F., Candeloro, P., Cojoc, G., Liberale, C., De Angelis, F. & Di Fabrizio, E. (2010). FTIR, Raman, RRS measurements and DFT calculation for doxorubicin. *Microscopy Research and Technique*, 73:991-995. <https://doi.org/10.1002/jemt.20849>.
- Ding, C. & Li, Z. (2017). A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 1;76:1440-1453. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.130>.

- Ďurišová MA. (2014). Physiological view and structures of mean residence times. *General Physiology and Biophysics*. 3(1):75-80. http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2013060.
- Fang, M., Chen, M., Liu, L. & Li, Y. (2017). Applications of Quantum Dots in Cancer Detection and Diagnosis: A Review. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 13(1):1-16. <https://doi.org/10.1166/jbn.2017.2334>
- Fard, J.K., Jafari, S. & Eghbal, M.A. (2015). A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 5(4):447-454. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.061>.
- Ferdous, Z., Beegam, S., Tariq, S., Ali, B.H. & Nemmar, A. (2018). The in Vitro Effect of Polyvinylpyrrolidone and Citrate Coated Silver Nanoparticles on Erythrocytic Oxidative Damage and Eryptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 49(4):1577-1588. <https://doi.org/10.1159/000493460>.
- Gutiérrez-Sancha, I., Reyes-Esparza J., Rodríguez-Fragoso, P., García-Vázquez, F. & Rodríguez-Fragoso, L. (2015). Bright Green Emitting Maltodextrin Coated Cadmium Sulfide Quantum Dots as Contrast Agents for Bioimaging: A Biocompatibility Study. *International Journal of Nanomedicine and Nanosurgery*, 1(2):1-10. <http://dx.doi.org/10.16966/2470-3206.107>.
- Hara, E., Makino, A., Kurihara, K., Yamamoto, F., Ozeki, E. & Kimura, S. (2012). Pharmacokinetic change of nanoparticulate formulation "Lactosome" on multiple administrations. *International Immunopharmacology*, 14(3):261-266. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2012.07.011>.
- Hassan, S. & Singh, A.V. (2014). Biophysicochemical perspective of nanoparticle compatibility: a critically ignored parameter in nanomedicine. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 14(1):402-414. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8747>
- Hermanson, T.G. (2008). *Bioconjugate Techniques*. Illinois, Chicago; EE.UU. Elsevier.
- Jurj, A., Braicu, C., Pop, L.A., Tomuleasa, C., Gherman, C.D. & Berindan-Neagoe, I. The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment. *Drug Design, Development and Therapy*, 11:2871-2890.
- Kettiger, H., Schipanski, A., Wick, P. & Huwyler, J. (2013). Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism. *International Journal of Nanomedicine*. 8: 3255–3269. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S49770>.
- Kim, J., Heo, Y.J. & Shin, S. (2016). Haemocompatibility evaluation of silica nanomaterials using hemorheological measurements. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 62(2):99-107. <https://doi.org/10.3233/CH-151953>.
- Lang, E. & Lang, F. (2015). Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 39:35-42. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.01.009>
- Ley Estatal de Fauna, Capítulo V, Art. 32, 2001
- Li, S., Guo, Z., Zhang, Y., Xue, W. & Liu, Z. (2015). Blood Compatibility Evaluations of Fluorescent Carbon Dots. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 7(34):19153-19162. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b04866>.
- Ma, H., Liu, Y., Shi, M., Shao, X., Zhong, W., Liao, W. & Xing, M.M. (2015). Theranostic, pH-responsive, doxorubicin-loaded nanoparticles inducing active targeting and apoptosis for advanced gastric cancer. *Biomacromolecules* 16:4022-4031. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01039>.
- Meng, F., Zhong, Y., Cheng, R. & Guo, T. (2014). pH-sensitive polymeric nanoparticles for tumor targeting doxorubicin delivery: Concept and recent advances. *Nanomedicine* 9:487-499. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.212>.

- Meng, F., Zhong, Y., Cheng, R. & Guo, T. (2014). pH-sensitive polymeric nanoparticles for tumor targeting doxorubicin delivery: Concept and recent advances. *Nanomedicine* 9:487-499. <https://doi.org/10.2217/nmm.13.212>.
- Mir, M., Ishtiaq, S., Rabia, S., Khatoon, M., Zeb, A., Khan, G.M., Ur Rehman, A. & Ud Din, F. (2017). Nanotechnology: from In Vivo Imaging System to Controlled Drug Delivery. *Nanoscale Research Letters*, 12(1):500.
- Mitragotri, S., Anderson, D.G., Chen, X., Chow, E.K., Ho, D., Kabanov, A.V., Karp, J.M., Kataoka, K., Mirkin, C.A., Petrosko, S.H., Shi, J., Stevens, M.M., Sun, S., Teoh, S., Venkatraman, S.S., Xia, Y., Wang, S., Gu, Z. & Xu, C. (2015). Accelerating the Translation of Nanomaterials in Biomedicine. *ACS Nano*, 9(7):6644-6654.
- Nemmar, A., Zia, S., Subramaniyan, D., Al-Amri, I. & Ali, B.H. (2012). Interaction of diesel exhaust particles with human, rat and mouse erythrocytes in vitro. *Cell Physiol. Biochem.* 29(1-2):163-70. <http://doi.org/10.1159/000337597>.
- Neun, B. & Dobrovolskaia, M.A. (2011). Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. 697, 215-24.
- Predoi, D. (2007). A study in iron oxide nanoparticles coated with dextrin obtained by coprecipitation. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2:169-173.
- Quesada-González, D., & Merkoçi, A. (2018). Nanomaterial-based devices for point-of-care diagnostic applications. *Chemical Society Reviews*, 47(13):4697.
- Reyes-Esparza, J., Martínez-Mena, A., Gutierrez-Sancha, I., Rodriguez-Fragoso, P., Gonzalez de la Cruz, G., Mondragón, R. & Rodriguez-Fragoso, L. (2015). Synthesis, characterization and biocompatibility of cadmium sulfide nanoparticles capped with dextrin for in vivo and in vitro imaging application. *Journal of Nanobiotechnology*, 13: 2-14 <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-015-0145-x>.
- Rodallec, A., Benzekry, S., Lacarelle, B., Ciccolini, J. & Fanciullino, R. (2018). Pharmacokinetics variability: Why nanoparticles are not just magic-bullets in oncology. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 129:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.06.008>.
- Rodríguez-Fragoso, P., Reyes-Esparza, J., León-Buitimea A. & Rodríguez-Fragoso L. (2012). Synthesis, characterization and toxicological evaluation of maltodextrin capped cadmium sulfide nanoparticles in human cell lines and chicken embryos. *Journal of Nanobiotechnology*, 47:1-11.
- Rudnick-Glick, S., Corem-Salkmon, E., Grinberg, I. & Margel, S. (2016). Targeted drug delivery of near IR fluorescent doxorubicin-conjugated poly (ethylene glycol) bisphosphonate nanoparticles for diagnosis and therapy of primary and metastatic bone cancer in a mouse model. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1):80.
- Sangtani, A., Petryayeva, E., Wu, M., Susumu, K., Oh, E., Huston, A.L., Lasarte-Aragones, G., Medintz, I.L., Russ Algar, W. & Delehanty, J.B. (2018). Intracellularly actuated quantum dot-peptide-Doxorubicin nanobioconjugates for controlled drug delivery via the endocytic pathway. *Bioconjugate Chemistry*, 29(1):136-148. <http://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00658>.
- Shang, W., Zhang, X., Zhang, M., Fan, Z., Sun, Y., Han, M. & Fan, L. (2014). “The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells”, *Nanoscale*, 6:5799-5806. <https://doi.org/10.1039/C3NR06433F>.
- Singh, P.K., Jairath, G. & Ahlawat, S.S. (2016). Nanotechnology: a future tool to improve quality and safety in meat industry. *Journal of Food Science and Technology*. 53:1739-1749. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2090-y>.

- Thasneem, Y.M., Sajeesh, S. & Sharma, C.P. (2011). Effect of thiol functionalization on the hemocompatibility of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research*. 99,607-617. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33220>.
- Vyas, D., Lopez-Hisijos, N., Gandhi, S., El-Dakdouki, M., Basson, M.D., Walsh, M.F., Huang, X., Vyas, A.K. & Chaturvedi, L.S. (2015). Doxorubicin-Hyaluronan Conjugated Super-Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (DOX-HA-SPION) Enhanced Cytoplasmic Uptake of Doxorubicin and Modulated Apoptosis, IL-6 Release and NF-kappaB Activity in Human MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(9):6413-6422.
- Yoo, J.W., Chambers, E. & Mitragotri, S. (2010). "Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: challenges, solutions and future prospects", *Current Pharmacology Design*, 16(21):2298-307. <https://doi.org/10.2174/138161210791920496>.
- Yoshikawa, T., Nabeshi, H. & Yoshioka, Y. (2008). Evaluation of biological influence of nanomaterials using toxicokinetic and toxicoproteomic approach. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 128:1715-25. <http://dx.doi.org/10.1248/yakushi.128.1715>.
- Zeng, H., Changjian, L., Zhang, X., Zhong, R., Wang, H., Liu, J. & Du L. (2018). The effects of gold nanoparticles on the human blood functions. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(2):720-726. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1468769>.
- Zhang, H. (2016). Erythrocytes in nanomedicine: an optimal blend of natural and synthetic materials. *Biomaterials Science*. 4:1024-103. <https://doi.org/10.1039/C6BM00072J>.
- Zhang, M., Xiao, B., Wang, H., Han, M.K., Zhang, Z., Viennois, E., Xu, C. & Merlin, D. (2016). Edible Ginger-derived Nano-lipids Loaded with Doxorubicin as a Novel Drug-delivery Approach for Colon Cancer Therapy. *Molecular Therapy*, 24(10):1783-1796. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.159>.
- Zhang, P, Kong, J. (2015). Doxorubicin-tethered fluorescent silica nanoparticles for pH-responsive anticancer drug delivery. *Talanta* 134:501-507. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.041>.
- Zhang, Y. & Clapp, A. (2011). "Overview of Stabilizing Ligands for Biocompatible Quantum Dot Nanocrystals", *Sensors*, 11(12):11036-11055. <https://doi.org/10.3390/s111211036>.
- Zhang, Y., Zhang, Y., Hong, G. & He, W. (2013). Biodistribution, pharmacokinetics and toxicology of Ag₂S near-infrared quantum dots in mice. *Biomaterials*, 34(14):3629-3646. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.089>.
- Zhou, L., Gao, C., Xu, W., Wang, X. & Xum, Y. (2009). "Enhanced biocompatibility and biostability of CdTe quantum dots by facile surface-initiated dendritic polymerization", *Biomacromolecules*, 10(7):1865-1874. <https://doi.org/10.1021/bm9002877>