

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Trabajo Fin de Máster

**Aplicación biológica de QDs de ZnS dopados
con Mn^{2+} : Evaluación en células NIH3T3**

Henar Muñoz Cimadevilla

Julio 2012, Oviedo

A. INTRODUCCIÓN	3
A.1 Quantum dots	4
A.1.1 Definición y propiedades	4
A.1.2 Solubilización de quantum dots en medios acuosos	7
A.1.3 Aplicaciones analíticas y bioanalíticas de los QDs	8
A.1.4 QDs fosforescente	11
A.2 QDs y biología celular	13
A.2.1 Bioconjugación	13
A.2.2 Internalización de los QDs	14
A.3 Toxicidad de los QDs	16
A.3.1 Toxicidad ambiental	16
A.3.2 Toxicidad celular (citotoxicidad)	17
B. OBJETIVO	20
C. MATERIAL Y MÉTODOS	22
C.1 Reactivos	23
C.1.1 Síntesis de QDs fosforescentes	23
C.1.2 Cultivos celulares	23
C.1.3 Extracción de proteínas y Western-Blot	25
C.1.4 Citometría de flujo	25
C.1.5 Microscopía confocal	25
C.1.6 Medida del volumen celular	25
C.1.7 Preparación de disoluciones	25
C.2 Síntesis de QDs fosforescentes	26
C.3 Cultivos celulares	26
C.4 Estudio de la viabilidad celular (azul de tripán)	27
C.5 Citometría de flujo	28
C.5.1 Análisis del ciclo celular	28
C.5.2 Contaje celular	29
C.6 Microscopía de fluorescencia confocal	29
C.7 Extracción de proteínas y Western-Blot	30
C.8 Medidas de fosforescencia	31
C.9 Medidas de volumen celular	31
C.10 Técnicas adicionales	32
C.10.1 Método Bradford para cuantificación de proteínas	32
C.10.2 Contaje celular mediante cámara de Neubauer	33
D. RESULTADOS	34
D.1 Localización subcelular de los QDs	35
D.2 Proliferación celular	36
D.3 Cuantificación de la concentración intracelular de QDs mediante medidas de fosforescencia	37
D.4 Cálculo de la concentración intracelular de QDs mediante medidas de volumen	40

<i>D.5 Estudio de la viabilidad celular</i>	41
<i>D.6 Estudio del efecto de los QDs sobre el ciclo celular en células NIH3T3</i>	44
<i>D.7 Expresión de proteínas apoptóticas y de proliferación en células NIH3T3 incubadas con QDs</i>	45
E. DISCUSIÓN	47
F. CONCLUSIONES	52
G. BIBLIOGRAFÍA	54

A. INTRODUCCIÓN

A.1 QUANTUM DOTS

A.1.1 Definición y propiedades

Los quantum dots (QDs) también conocidos como puntos cuánticos, son nanopartículas semiconductoras de forma esférica cuyas dimensiones están comprendidas entre los dos y los ocho nanómetros de diámetro. El núcleo de estas nanopartículas está constituido por átomos de elementos entre los grupos II y VI de la tabla periódica¹. Debido a su reducido tamaño, las propiedades del semiconductor están dominadas por efectos de confinamiento cuántico (los electrones no se pueden mover libremente por el material debido a su tamaño), que son los responsables de sus interesantes propiedades optoelectrónicas. Este tipo de materiales inorgánicos a escala macroscópica no muestran propiedades luminiscentes, sin embargo, al sintetizarse en dimensiones reducidas presentan una intensa emisión luminiscente con una gran fotoestabilidad².

De manera general, los semiconductores convencionales se caracterizan por tener un “salto de banda” o “bandgap”¹ que determina la energía mínima que es requerida por un electrón para pasar de una banda a otra. En un semiconductor convencional, esta energía es fija y diferente para cada tipo de material. Sin embargo, cuando se reduce el tamaño del semiconductor hasta la escala nanométrica (tamaños del orden de excitación de Bohr), los niveles de energía pasan a ser discretos, finitos y pasan a estar cuantizados (Figura 1) y este salto de energía se relaciona directamente con el tamaño de la nanopartícula conductora, de manera que cuando el tamaño de nanopartícula disminuye, el salto de banda aumenta y viceversa (Figura 2).

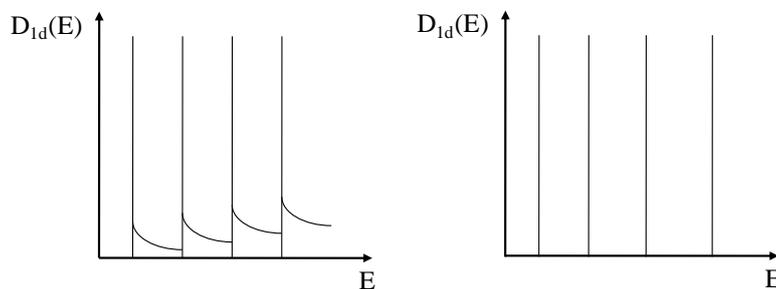


Figura 1. Representación niveles energéticos en semiconductor tradicional (izquierda) y de los niveles energéticos discretos y finitos de los quantum dots (derecha).

¹ Se denomina salto de banda a la diferencia de energía entre la banda de conducción y la banda de valencia.

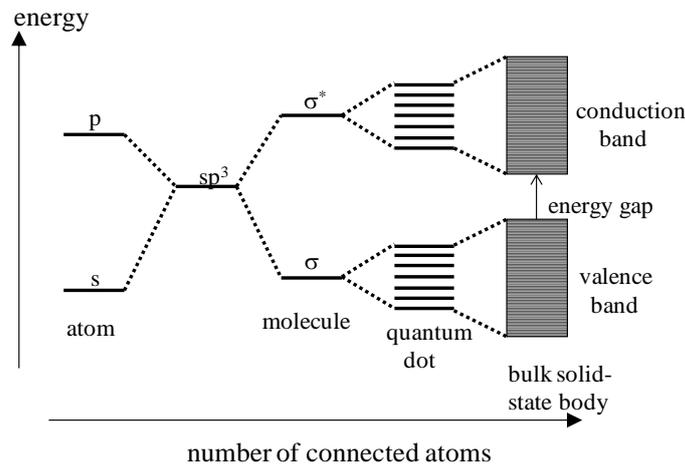


Figura 2. Niveles de energía en función del número de átomos unidos. A medida que aumenta el número de átomos, los niveles discretos típicos de los orbitales atómicos se convierten en bandas de energía (semiconductor convencional).

La absorción de un fotón con una energía superior a la del salto de banda de la nanopartícula da lugar a la creación de un par hueco/electrón (excitón o plasmón). Esta absorción tiene una mayor probabilidad a mayores energías (menores longitudes de onda) lo que genera un ancho espectro de absorción (Figura 3).

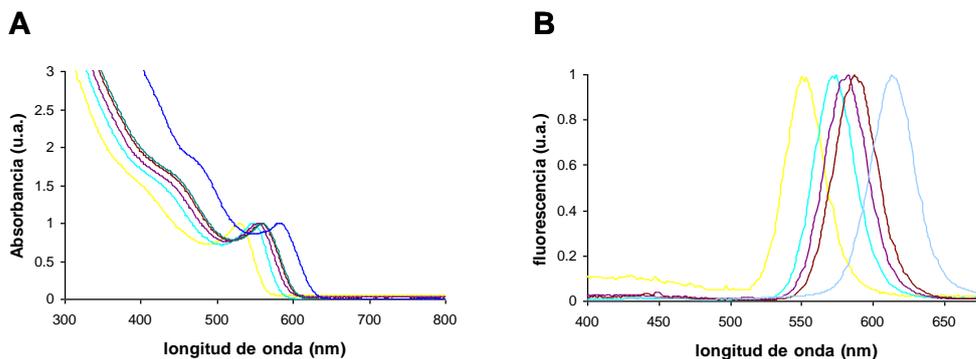


Figura 3. Espectros de absorción (A) y emisión (B) de quantum dots de CdSe/ZnS de diferentes tamaños.

La recombinación de la radiación procedente del par hueco/electrón está caracterizada por una vida media larga (mayor de 10 ns) y da lugar a la emisión de un fotón con una banda de energía estrecha y simétrica. Esto supone una gran ventaja frente a los fluoróforos orgánicos convencionales que poseen bandas de emisión anchas y una vida media menor. La amplia vida media de los quantum dot, desde ns hasta ms, permiten separar su emisión de otras emisiones con menor vida media (como por ejemplo la fluorescencia de otras posibles moléculas coexistentes en la muestra³).

Los quantum dots presentan una fotoluminiscencia que puede ser modificada de acuerdo a nuestras necesidades mediante el control de su tamaño. Variando simplemente el

tamaño y la naturaleza de las nanopartículas es posible obtener quantum dots con emisiones fotoluminiscentes que van desde el ultravioleta hasta el infrarrojo. Dichas propiedades nos permiten llevar a cabo la excitación simultánea de nanopartículas de distintos tamaños (emiten a diferente longitud de onda) con una misma fuente de radiación a una misma longitud de onda de excitación⁴, lo que posibilita su aplicación para el análisis multiparamétrico.

A pesar de las grandes ventajas que presentan estos semiconductores como nuevos fluoróforos, también presentan algunos inconvenientes. Los defectos que existen en la superficie de la estructura del nanocrystal pueden actuar como trampas para el par hueco / electrón, de manera que la recombinación de la radiación se puede ver desfavorecida. Por otro lado, una sucesión de “atrapamiento” y “desatrapamiento” da lugar a una fluorescencia intermitente conocida como “blinking”, visible a nivel molecular, que se traduce en una disminución del rendimiento cuántico. Una solución a este problema y también con el fin de proteger los átomos de la superficie de la oxidación o de otras reacciones químicas, consiste en hacer crecer una capa de otro semiconductor con un salto de banda mayor sobre la superficie del nanocrystal. Este proceso además, también mejora la fotoestabilidad de los quantum dots en varios órdenes de magnitud con respecto a los fluoróforos convencionales.

Debido a las extraordinarias características luminiscentes demostradas por los quantum dots, estas nanopartículas han irrumpido rápidamente como una nueva clase de fluoróforos para diversas aplicaciones. Entre ellas cabe destacar su empleo como marcadores luminiscentes para la monitorización de distintas especies de interés biomédico en muestras biológicas ya que minimizan los inconvenientes que se encuentran cuando se trabaja con fluoróforos tradicionales⁵.

Sin embargo, es importante mencionar que las aplicaciones de mayor interés necesitan que los QDs sean compatibles con medios acuosos o biológicos⁶. Además es necesario tener en cuenta la posible toxicidad que pueden presentar estos nanomateriales tanto a nivel ambiental como biológico⁷.

A.1.2 Solubilización de quantum dots en medios acuosos

Generalmente los quantum dots son sintetizados a partir de precursores organometálicos en medio orgánico, por lo que poseen el inconveniente de ser solubles únicamente en disolventes orgánicos no polares, como el tolueno o el cloroformo, limitando así su empleo en aplicaciones tanto biológicas como analíticas. Por ello surge la necesidad de transferirlos a un medio acuoso. El diseño de recubrimientos de la superficie de los quantum dots persigue la solubilidad y estabilidad de las nanopartículas en medios acuosos, manteniendo su tamaño y propiedades fotofísicas originales y permitiendo modificaciones para posteriores bioconjugaciones.

Hasta la fecha se han descrito tres métodos para la solubilización de quantum dots en medios acuosos:

- i. **Intercambio de ligandos:** las moléculas hidrofóbicas que rodean a los nanocristales son reemplazadas por moléculas bifuncionales que generalmente contienen un grupo tiol (-SH) en uno de los extremos, el cual se une a la superficie por afinidad, y un grupo funcional polar en el otro extremo que queda orientado hacia la parte externa del QD, otorgándole así la solubilidad en medios polares. Este tipo de modificación da lugar a dispersiones coloidales con baja estabilidad, ya que la desorción de este tipo de ligandos bifuncionales de la superficie de la nanopartícula da lugar a la agregación de las mismas y a una posterior precipitación de dichos agregados^{8,9}.
- ii. **Silanización:** Este método consiste en la formación de una capa de sílice sobre la superficie del nanocrystal empleando mercapto-propil-trimetoxisilano como precursor¹⁰. Del mismo modo que con el método anterior se produce una sustitución de los ligandos hidrofóbicos de la superficie del nanocrystal. Este método es bastante tedioso y no se obtienen recubrimientos homogéneos¹¹.
- iii. **Interacción hidrofóbica con polímeros anfifílicos:** Se basa en una interacción hidrofóbica entre las cadenas carbonadas de un polímero anfifílico y las cadenas carbonadas de los ligandos que recubren la superficie de las nanopartículas. Los grupos hidrofílicos del polímero, quedan orientados hacia el exterior y confieren solubilidad a los quantum dots en medios polares¹². Los nanocristales obtenidos mediante este método poseen un mayor rendimiento cuántico de la fluorescencia y son más estables que los generados mediante un intercambio de ligandos de la superficie. Otra ventaja de esta estrategia de solubilización es que permite modificaciones posteriores de la nanopartícula con (bio)moléculas o con determinados grupos funcionales de interés (Figura 4).

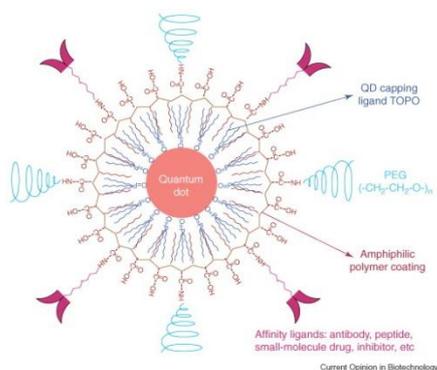


Figura 4. Estructura de un QD tras la modificación con un polímero anfifílico.

A.1.3 Aplicaciones analíticas y bioanalíticas de los QDs

La posibilidad de sintetizar quantum dots altamente luminiscentes y biocompatibles mediante la modificación adecuada de su superficie convierte a este tipo de semiconductores en una herramienta atractiva para una amplia variedad de aplicaciones. Por todo ello, se considera de elevado interés el empleo de QDs como marcadores para el desarrollo de novedosas aplicaciones analíticas y bioanalíticas (Figura 5).

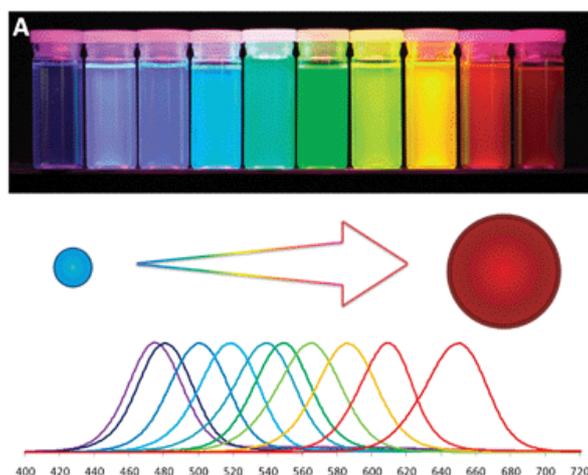


Figura 5. Variación de la longitud de onda de emisión de los QDs en función de su tamaño.

A continuación se muestra un resumen de estas aplicaciones analíticas y bioanalíticas:

- i. **Sensor directo:** se basa en el empleo de quantum dots como fases sensoras en las que se observa un cambio en su luminiscencia al producirse la interacción del quantum dot con el analito. Esto se debe a que la emisión luminiscente del QD es muy sensible a los cambios que se produzcan en su superficie, por lo que cualquier interacción física y química entre una especie y el entorno que rodea a la nanopartícula afectará a la desactivación

radiacional de la nanopartícula. Siguiendo esta estrategia ha sido posible monitorizar pequeñas moléculas e iones¹³ así como gases¹⁴.

ii. Biosensores: Su empleo se consigue tras la conjugación de la superficie del QD con las biomoléculas de interés, obteniéndose una herramienta con especificidad y funcionalidad biológica y con las características ópticas de los QDs. El reconocimiento selectivo se consigue con moléculas como anticuerpos, sondas de DNA, biotina-estreptavidina o enzimas¹⁵. Existen diferentes formatos de ensayo, pero los más empleados son:

Inmunoensayos: Se puede llevar a cabo la conjugación del QD tanto con el anticuerpo como con el antígeno. Los QDs se han empleado como marcas para estudios de bioreconocimiento o para la cuantificación de diferentes especies bioquímicas como proteínas o ácidos nucleicos¹⁶.

Transferencia de energía (FRET): El FRET es un proceso no radiativo de transferencia de energía de excitación que tiene lugar a través de un donador (D) en su estado excitado (normalmente un fluoróforo) al estado fundamental de un aceptor (A) cercano a través de interacciones dipolo-dipolo¹⁷. Generalmente, los quantum dots son empleados como donadores¹⁸, aunque existen trabajos en la bibliografía donde actúan como aceptores¹⁹. Algunos desarrollos incluyen la detección de oligonucleótidos mediante hibridación, reconocimiento de la molécula de interés mediante el empleo de aptámeros, medida pH, detección de moléculas de pequeño y gran tamaño (nutrientes, explosivos, proteínas), y detección de proteólisis¹⁵.

iii. Marcaje celular: Uno de los usos más habituales de los fluoróforos convencionales en biología es el marcaje de estructuras celulares. Para esto, se emplean fluoróforos que emiten en diferentes regiones del espectro visible consiguiendo visualizar simultáneamente la mayoría de las estructuras y orgánulos subcelulares, así como seguir procesos que tienen lugar en el interior de las mismas. Los QDs son marcadores fluorescentes adecuados para esta aplicación ya que se minimizan los problemas de photobleaching. Además, gracias a los anchos perfiles que presentan sus espectros de absorción, se pueden excitar los QDs (de diferente tamaño) presentes en la muestra a una misma longitud de onda, obteniendo emisiones diferenciadas y minimizando así el empleo de filtros para excitar y recoger de una manera específica las emisiones de los fluoróforos y permitiendo el empleo de una única fuente de excitación.

iv. Imaging: El imaging de especies biológicas, tanto *“in vitro”* como *“in vivo”* es una técnica muy empleada en microscopía óptica. Actualmente, ha recibido gran interés como potente herramienta analítica para estudios de genómica y proteómica¹⁵.

Imagen en célula viva: El marcaje de células vivas es mucho más complicado que en las células fijadas o en los tejidos debido a que se debe mantener la integridad de las mismas. El número de sondas disponibles para monitorizar sistemas *in vivo* es muy escaso y es por ello que los QDs están ganando una gran importancia en este campo. Entre las ventajas que estos presentan en *“imaging”* de células vivas cabe destacar su gran potencial como marcadores en tiempo real debido a su bajo *“photobleaching”* y su sensibilidad para marcar moléculas sencillas (Figura 5A). Como se muestra en el estudio de *Dahan y colaboradores*²⁰, se emplea un anticuerpo primario marcado con QDs para detectar el receptor de glicina de la membrana plasmática en células neuronales²⁰.

Imagen *“in vivo”*: En términos generales, para el marcaje de macromoléculas en animales vivos se utilizan proteínas fluorescentes y pequeños marcadores orgánicos (DAPI, yoduro de propidio). Sin embargo, en la actualidad el uso de QDs para este tipo de marcajes se ha incrementado (Figura 5B); esto se debe al gran área superficial de los mismos que permite la bioconjugación a gran cantidad de sondas permitiendo una unión muy específica. Su pequeño tamaño (desde 4-20 nm) a la vez que una ventaja también es un inconveniente debido a que es demasiado grande (puede alcanzar tamaños elevados tras la bioconjugación) para penetrar en el endotelio vascular y para ser excretado por la orina. Otra desventaja es que las nanopartículas son incorporadas inespecíficamente en células fagocíticas. Esta inespecificidad puede ser reducida mediante un recubrimiento de las nanopartículas con polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol (PEG) que permite una mejor circulación de los mismos, aunque este efecto no se puede eliminar completamente²¹. Otro ejemplo de esta metodología, es el empleo de QDs para el marcaje de capilares en ratón usando para la excitación de la muestra una fuente de dos fotones²². Este tipo de excitación es una variante de la microscopía de fluorescencia multifotónica y permite una mayor penetrancia en el tejido debida al empleo de excitación en el rango del infrarrojo (IR) cercano (>650 nm). El UV cercano y el visible, solo consiguen penetrar en los tejidos biológicos hasta 1 cm de profundidad. Esta atenuación es debida a la dispersión y a la absorción del agua y de cromóforos de tipo biológico como la hemoglobina. Sin embargo el IR cercano puede penetrar en los tejidos hasta una mayor profundidad y por tanto será una herramienta muy eficaz para técnicas de imagen fluorescente ya que permite excitar y visualizar moléculas que se encuentran en zonas *“invisibles”* para el VIS-UV.

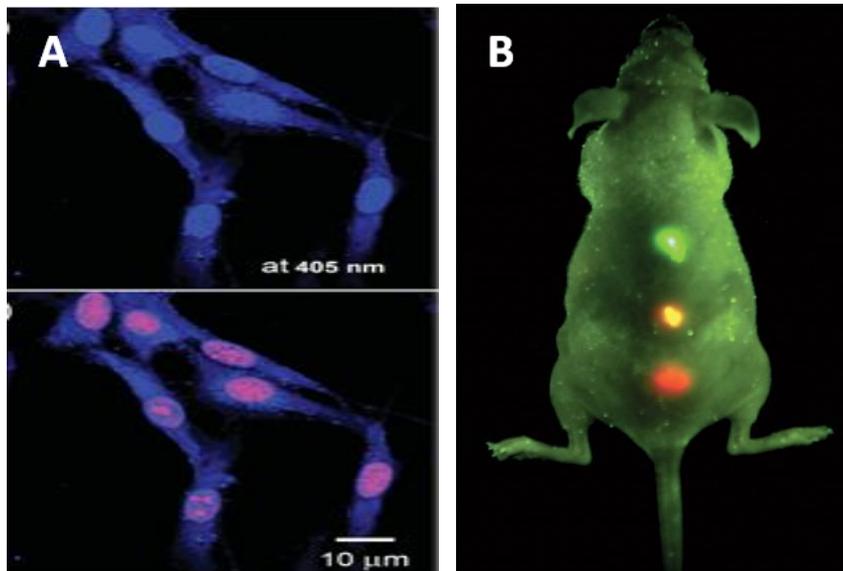


Figura 6. A) Imagen de células vivas marcadas con QDs²¹ B) Imagen de ratón desnudo marcado con QDs²³

Cabe destacar que una de las aplicaciones más novedosas es el empleo de QDs fluorescentes para imagen “*in vivo*” implicado en el análisis de proteínas para el diagnóstico de cáncer y para la detección de estados tempranos en tumores primarios tales como cáncer de próstata²³, páncreas²⁴ o hígado²⁵.

A.1.4 QDs fosforescentes

El empleo de medidas de fosforescencia a temperatura ambiente, presentan ciertas ventajas frente a las medidas de fluorescencia. Entre ellas cabe destacar²⁶:

- i. La longitud de onda de emisión es mayor en la fosforescencia, por lo que hay mayor separación entre la longitud de onda de excitación y de emisión.
- ii. La elevada vida media del estado triplete excitado permite utilizar una instrumentación analítica más sencilla para aquellas aplicaciones en donde se utilicen medidas de vida media del fenómeno luminiscente como señal analítica.
- iii. Cuando se mide la fosforescencia se obtienen ruidos de fondo muy bajos, ya que la medida se realiza después de que hayan cesado posibles dispersiones de la luz de excitación.
- iv. La fosforescencia goza de una elevada sensibilidad y de un amplio intervalo de respuesta lineal por lo que esta técnica es útil para el desarrollo de nuevas metodologías analíticas.

Con el fin de combinar las excelentes características que presentan los QDs con las ventajas que ofrece la emisión fosforescente, desde hace años se está trabajando en el dopaje

de QDs con impurezas metálicas, con objeto de obtener una emisión luminiscente con propiedades similares a la fosforescencia²⁷.

Durante el proceso de dopaje, podemos encontrar situaciones diferentes de acuerdo a la naturaleza del estado excitado más bajo de la nanopartícula (nivel basal excitado) que determinará sus propiedades fotofísicas y magneto-ópticas²⁸. A pesar de que el dopaje puede realizarse con metales como cobalto, cobre o terbio^{29, 30}, la mayoría de las investigaciones emplean manganeso como agente dopante por ello nos referiremos a esta impureza para exponer las diferentes situaciones que se pueden encontrar.

i. Escenario I: Los estados excitados del metal (Mn^{2+}) son los más bajos en energía y se encuentran dentro del salto de energía del semiconductor. Esta es la transición más común descrita en el estudio de dopaje de quantum dots con manganeso cuya naturaleza es ZnS, ZnSe y CdS. Esto es debido a que los niveles energéticos del metal se encuentran en el salto de banda de la nanopartícula de manera que la desactivación radiacional del quantum dot permite la transferencia rápida de energía desde el QD al manganeso (Figura 7) obteniendo emisiones con altos rendimientos cuánticos y vidas medias largas en torno a los milisegundos, ideales para aplicaciones foto o electro-luminiscentes³⁰.

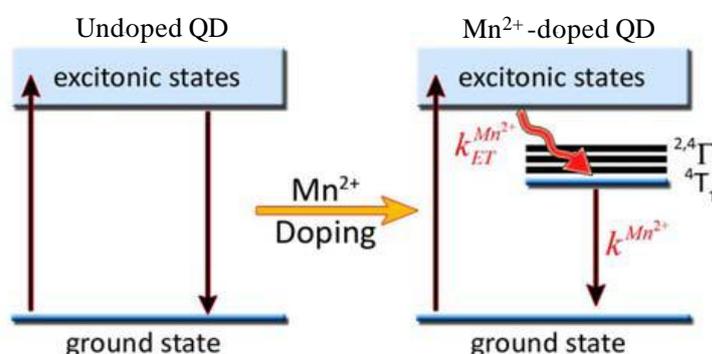


Figura 7. Esquema de la transferencia de energía que se produce en el QD cuando se introducen impurezas de Mn^{2+} en su estructura²⁷

ii. Escenario II: Los estados excitados del quantum dot son los más bajos en energía. En este caso los estados energéticos del metal no se encuentran dentro del salto de banda del semiconductor^{28,30}. En muchos aspectos, ésta situación es la más interesante e importante ya que la emisión del quantum dot será sintonizable en función del tamaño de la nanopartícula debido a que modifica la energía del salto de banda y por tanto la posición de los estados energéticos del dopante (Figura 8). Los QDs de núcleo de CdSe y dopados, son los únicos que

permiten sintonizar su emisión, simplemente modificando el diámetro del nanocrystal. Los cambios se encuentran en torno a diámetros de 3,3 nm.

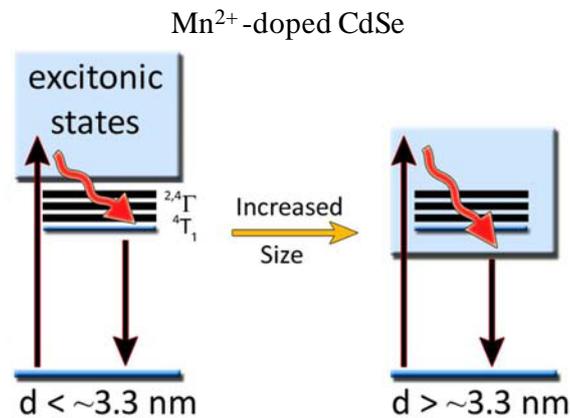


Figura 8. Diferentes emisiones que podemos encontrar en función del diámetro de la nanopartícula²⁷.

A.2. QDs Y BIOLOGÍA CELULAR

Como se ha remarcado a lo largo del presente trabajo, gracias a las excelentes propiedades ópticas y electrónicas que presentan los QDs, éstos están siendo estudiados como nuevas sondas a escala nanométrica para técnicas de imagen en modelos celulares y animales²³.

A.2.1 Bioconjugación

Los QDs solubles en medios acuosos necesitan unirse a biomoléculas como anticuerpos, oligonucleótidos o pequeñas moléculas para que estas nanopartículas puedan unirse de forma específica a ciertas dianas biológicas. Para conseguir esta unión entre la nanopartícula y las biomoléculas se usan protocolos estándar de bioconjugación como el complejo formado entre QDs activados con maleimida y los tioles de anticuerpos reducidos³¹. Se ha demostrado que la mayoría de las biomoléculas mantienen su función después de su conjugación a la superficie de la nanopartícula aunque quizás se produzca una disminución de la fuerza de enlace entre ambas. La superficie de los QDs puede ser también modificada con moléculas hidrofílicas biológicamente inertes como el polietilenglicol para eliminar posibles uniones no específicas.

Los QDs solubles en agua pueden conjugarse con estreptavidina para unirse de manera específica a un gran número de moléculas biotiniladas³²; los QDs conjugados a

anticuerpos se pueden unir a antígenos con gran especificidad y se preparan de manera general mediante la reacción entre los QDs activados con maleimida-PEG³³.

Los QDs unidos a pequeñas moléculas como inhibidores, péptidos o aptámeros, pueden unirse con gran selectividad a diferentes receptores celulares³⁴. Se ha observado que los QDs conjugados con péptidos catiónicos, como el péptido HIV Tat, pueden asociarse rápidamente con células e internalizarse mediante endocitosis³⁵ (Figura 9).

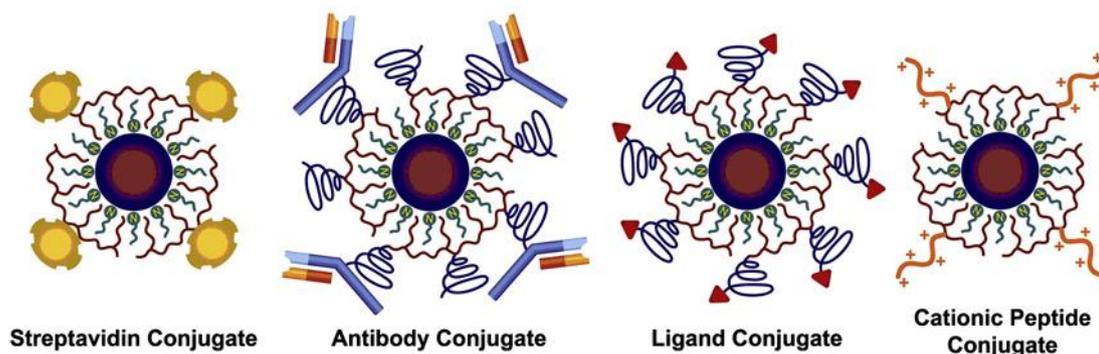


Figura 9. Diagrama de QDs biofuncionalizados²⁷

A.2.2 Internalización de los QDs

La entrada de nanopartículas en el interior de la célula viene determinado por tres factores: tamaño, forma y carga en la superficie de la nanopartícula. Las propiedades de superficie en la escala nanométrica influyen de una manera considerable no sólo en los modos específicos de internalización y localización en el interior de la célula, sino también como afectan éstos a procesos biológicos de división y diferenciación celular³⁶. También cabe destacar que la internalización de los QDs sólo ocurre si la concentración de los mismos en la membrana plasmática es suficiente. El contacto inicial de los QDs con las células (interacción con la membrana lipídica y los proteoglicanos de superficie) está controlado por la carga y la concentración de los mismos³⁷. Los proteoglicanos son moléculas cargadas negativamente, por lo que los QDs que posean carga positiva, serán atraídos hacia la membrana celular mediante interacciones electrostáticas siendo posteriormente acumulados en la membrana plasmática e internalizados. En cambio, los QDs que tengan carga negativa o neutra van a unirse de manera mucho más débil a la bicapa lipídica y por lo tanto su internalización será menos eficaz³⁸.

En la actualidad se conocen tres mecanismos por los cuales un gran número de nanopartículas incluyendo los QDs pueden internalizarse en las células:

i. Transporte pasivo: Este tipo de transporte está relacionado con las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas (superficie y carga). Las interacciones electrostáticas entre el quantum dot y la superficie celular son las encargadas de la internalización de las nanopartículas en este tipo de transporte.

ii. Transporte facilitado: El QD se recubre con moléculas con función biológica, como péptidos o proteínas, o con sustancias químicas como polímeros o drogas.

El transporte facilitado se puede dividir en fagocitosis y pinocitosis. A su vez la pinocitosis incluye a) la macropinocitosis, con entrada de partículas de tamaño menor de 1 μm , b) la endocitosis mediada por clatrina/claveolas y c) la endocitosis independiente de clatrina. La macropinocitosis es una forma de endocitosis relacionada con la rugosidad de la superficie celular y genera una ruta de endocitosis no selectiva para la entrada de macromoléculas. Los macropinosomas son mayores de 0.2 μm y pueden llegar a alcanzar los 5 μm de diámetro. Las claveolas son invaginaciones de la membrana plasmática con un tamaño de 50-80 nm que contienen colesterol, esfingolípidos, receptores de membrana y caveolinas³⁹. La endocitosis no solo depende del tamaño de la nanopartícula, sino también de la carga y el recubrimiento que ésta tenga a lo largo de toda su superficie. Este hecho se demostró en un estudio con nanopartículas paramagnéticas de óxido de hierro recubiertas con carboxidestrano (SPION) en células mesenquimales. La eficiencia de la entrada de dichas nanopartículas en las células estaba relacionada directamente con la cantidad de grupos carboxilo en la superficie de la nanopartícula⁴⁰.

La longitud de los recubrimientos que lleva la nanopartícula o el tipo celular⁴¹, también son variables a tener en cuenta en la internalización de los QDs en las células. Sin embargo, el mecanismo de endocitosis por el cual las células introducen las nanopartículas y en particular los QDs sigue estudiándose en la actualidad.

iii. Transporte inducido: En comparación con el transporte facilitado, el transporte inducido se basa en una manipulación física que se lleva a cabo directamente en la célula para facilitar la entrada de las nanopartículas. Las técnicas que se utilizan son la microinyección y la electroporación.

En la electroporación se emplea un pulso eléctrico para permeabilizar temporalmente la bicapa lipídica de la membrana plasmática. Esta técnica se evaluó con QDs de CdSe/ZnS modificados con PEG en células HeLa⁴².

La microinyección permite la internalización de volúmenes muy pequeños de muestra (fentolitros) directamente en el citoplasma de células de manera individualizada. Se utiliza un microcapilar de vidrio y un microscopio de fluorescencia para dirigir nuestra nanopartícula hacia un lugar concreto en el interior de la célula.

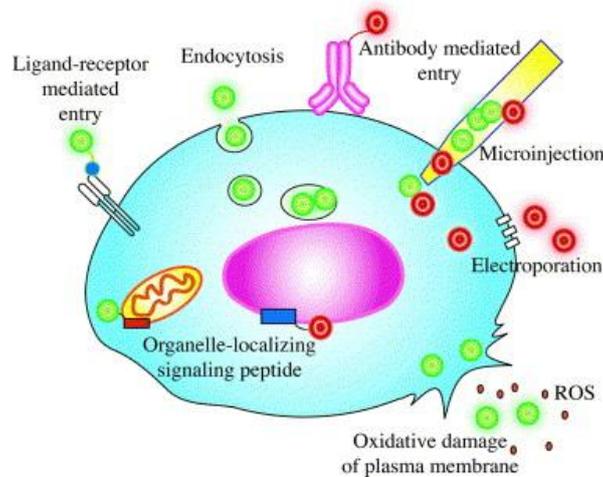


Figura 10. Esquema de los distintos mecanismos de entrada de nanopartículas en las células: transporte facilitado, transporte activo y transporte pasivo.

A.3. TOXICIDAD DE LOS QDs

Hoy en día, la nanotecnología es una industria en constante crecimiento que genera un gran número de materiales y procesos en la escala nanométrica (nanotubos de carbono, derivados del fureno, quantum dots). Sin embargo, este incremento de la industria nanotecnológica tiene aún muchas áreas que o bien no están exploradas o que se están empezando a explorar en la actualidad como por ejemplo los efectos adversos de estos nanomateriales en la salud humana y en el medioambiente.

Los QDs, de manera particular, ofrecen grandes beneficios como dianas terapéuticas y/o como marcadores biomédicos *in vivo*^{3, 23, 43}, sin embargo, pueden ser a su vez un riesgo para la salud humana y para el medioambiente en determinadas condiciones. En este contexto cabe destacar que no todos los QDs son iguales y por tanto la toxicidad de los mismos depende de múltiples factores ambientales y fisicoquímicos. En general existen ciertas discrepancias sobre los factores que influyen en la toxicidad de los QDs: tamaño, carga, concentración, estabilidad mecánica, fotolítica y oxidativa, actividad biológica de los recubrimientos y un largo etcétera.

A.3.1 Toxicidad ambiental

Se puede decir que los QDs generan contaminación medioambiental debido a su núcleo metálico. Muchos de esos metales son tóxicos a bajas concentraciones (ppm). Sin embargo, es muy complicado entender los riesgos reales que ofrecen los QDs en el

medioambiente ya que la toxicidad varía dependiendo del estado químico de los metales y serán las transformaciones/degradaciones medioambientales las que determinen el daño real o potencial sobre la salud humana.

La liberación de QDs al medioambiente es debida a los materiales de desecho que generan las industrias y laboratorios que sintetizan y usan quantum dots y a los residuos generados en las investigaciones y aplicaciones clínicas. Se considera que esta liberación al medioambiente es una fuente de contaminación por varias razones:

- i. La concentración medioambiental de sustancias antropogénicas se incrementa de manera proporcional a su uso en la sociedad y la gran aplicabilidad que presentan los QDs hacen que su uso sea elevado.
- ii. La gran vida media que presentan estos materiales (de meses a años).
- iii. La exposición medioambiental depende del punto inicial del que surgen los QDs (aire, agua, aceites).

Una vez en el medioambiente, las nanopartículas tienden a formar agregados que pueden ser atrapados o eliminados mediante sedimentación. Las nanopartículas, una vez agregadas o adsorbidas, son menos móviles pero pueden ser engullidas por animales filtradores como los bivalvos (almejas y mejillones) lo que causaría una biomagnificación en la cadena alimentaria. Se ha demostrado que la estabilidad de las nanopartículas es inversamente proporcional a su tendencia a la agregación⁴⁴.

A.3.2 Toxicidad celular (citotoxicidad)

El uso de cualquier tipo de nanopartícula (Au, Ag, QDs) en organismos vivos presenta cierta controversia debido principalmente a tres aspectos:

- **Tamaño:** Las nanopartículas pueden llegar a compartimentos subcelulares donde otras partículas no pueden, como por ejemplo al núcleo celular. La gran relación área/volumen de las nanopartículas aumenta la superficie disponible para interactuar con componentes celulares⁴⁵. Además, las nanopartículas pueden acumularse a una concentración muy elevada en estructuras subcelulares como los endosomas, pudiendo superar el LD₅₀². El tamaño y las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas determinan la cantidad de interacciones celulares, su ruta endocítica y la eficiencia de entrada en la célula^{46,47}.

² LD50 de las siglas en ingles "Letal Dose": dosis de una sustancia necesaria para causar el 50% de muerte celular.

- **Composición del núcleo:** La toxicidad de metales como Cd y Se es muy conocida^{48, 49}. En concreto, el núcleo de los QDs puede estar formado por átomos de iones metálicos pesados como Cd, Pb e In. Si se produce la liberación de los mismos, estos metales pesados pueden incluso atravesar la barrera hematoencefálica causando daños neurológicos. Además pueden acumularse en algunos tejidos, como el adiposo, donde pueden acumularse hasta 10 años antes de ser excretados. Son principalmente tóxicos para el hígado o los riñones y son considerados posibles carcinógenos o teratógenos⁵⁰. Normalmente los núcleos están recubiertos de un segundo material semiconductor menos tóxico y posteriormente alcanzan su funcionalidad gracias a una gran variedad de ligandos sobre su superficie⁵¹.

- **Entorno de las nanopartículas:** Cuando las células se exponen a estrés ambiental como son los patógenos o el calor, éstas pueden generar moléculas activas que contienen oxígeno (EROs³). Las nanopartículas, que pueden ser considerados elementos extraños para la célula, generan EROs en las mismas^{49,52}. Estos radicales se pueden clasificar en dos grupos: a) radicales EROs (óxido nítrico o radicales hidróxido) y b) EROs no radicales como el peróxido de hidrógeno. La mayoría de las células poseen mecanismos de defensa frente a los EROs tales como el glutatión (tripéptido implicado en la defensa antioxidante y en el control del sistema redox celular) que es capaz de amortiguar un gran número de EROs. Cuando el incremento de EROs es muy elevado, las células sufren varios efectos negativos. La relación entre los niveles de EROs y la aparición de efectos tóxicos depende del tipo celular, de los niveles de defensas antioxidantes endógenas y de múltiples factores⁵³. En general, pequeñas cantidades de EROs pueden ser toleradas por la mayoría de las células, mientras que concentraciones elevadas de estas especies durante largos periodos de tiempo, pueden ocasionar daños celulares.

Los EROs generados por las nanopartículas pueden producirse por diversos mecanismos: i. Generación directa de EROs como resultado de la exposición a un ambiente ácido como los lisosomas (Figura 11, parte a). ii. La interacción de las nanopartículas con orgánulos celulares como la mitocondria pueden afectar a las funciones celulares⁵⁴ (Figura 11, parte b) iii. La interacción de las nanopartículas con proteínas redox como la NADPH oxidasa (Figura 11, parte c) iv. La interacción de las nanopartículas con receptores de la superficie celular y posterior activación de las cascadas de señalización intracelulares (Figura 11, parte d).

³ EROs : Especies Reactivas de Oxígeno

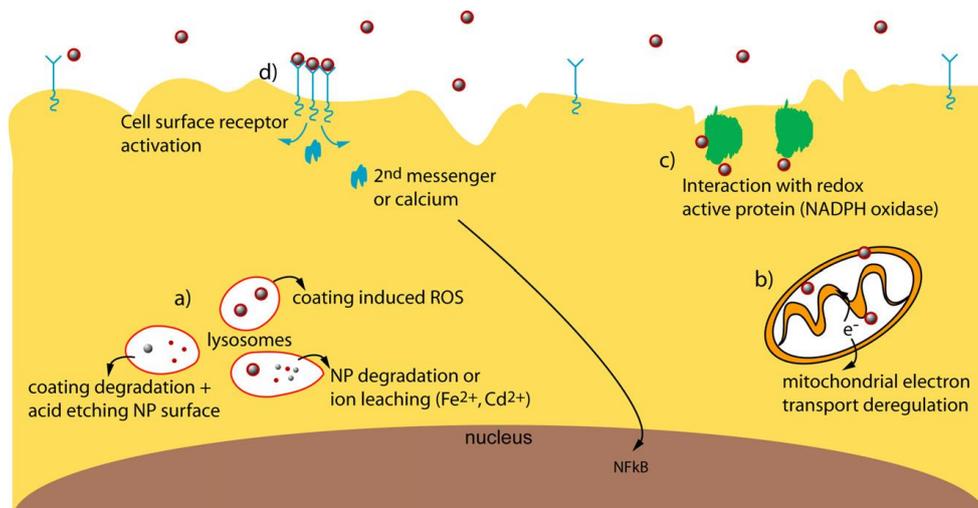


Figura 11. Vista esquemática de los diferentes mecanismos de las nanopartículas para inducir estrés oxidativo

En el caso particular de los QDs, las especies reactivas de oxígeno pueden generarse por diversas causas tales como: reacción de los metales de transición que se encuentran en la superficie celular, liberación de iones del núcleo (Cd^{2+})⁵⁵ o mediante interacción directa de los QDs con la mitocondria⁵⁶. Aunque la liberación de iones del núcleo es la causa más probable de la citotoxicidad de las nanopartículas, también se está estudiando como influyen los recubrimientos de los QDs.

El grupo del profesor P. Liu⁵⁷, ha demostrado mediante medidas de ICP-MS que tras la administración intravenosa de QDs cuyo núcleo contiene Cd(II), la concentración de este metal en hígado y riñones se incrementa gradualmente en el curso de 28 días. Mediante microscopía de fluorescencia se determinó que el Cd se encontraba formando parte del nanocrystal y no en forma iónica. Además, también se han llevado a cabo experimentos en los que se compara el efecto tóxico de los QDs sobre células con la administración de disoluciones que contienen los átomos del núcleo en forma iónica⁵⁸.

Los QDs también pueden ser activados mediante su exposición a la luz y con ello generar ERO_s . Esto puede causar citotoxicidad debido a procesos foto-oxidativos involucrando a oxígenos singletes o provocando una transferencia electrónica desde los QDs excitados hacia el oxígeno. Debido a que los ERO_s son la mayor fuente de citotoxicidad, es de elevada importancia su posible evaluación. Generalmente se suelen emplear reactivos fluorescentes como la diclorodihidrofluoresceína (DHF) y sus derivados para evaluar sus niveles en las células.

[ENREF 21](#)

B. OBJETIVOS

En los últimos años los QDs están siendo explorados como marcadores de nueva generación en biología celular debido a sus excelentes propiedades luminiscentes. Este interés viene dado sobre todo por las ventajas que ofrecen frente a marcadores orgánicos convencionales como por ejemplo su resistencia al “photobleaching”.

En el presente trabajo de investigación nos hemos centrado en el estudio de QDs con núcleo de ZnS dopado con Mn^{2+} que presentan una característica específica: la capacidad de producir una emisión fosforescente. Este tipo de emisión podría ser una alternativa muy útil a la hora de trabajar *in vitro* e *in vivo* ya que principalmente se utilizan marcadores fluorescentes. Estos marcadores presentan algunos problemas como la emisión fluorescente de ciertas moléculas del organismo que pueden solaparse con la mostrada por los fluoróforos utilizados. Por tanto es de gran interés muy el desarrollo de marcajes alternativos utilizando propiedades fosforescentes que presentan estos QDs. Además cabe esperar que la naturaleza de estas nanopartículas, constituidas por un núcleo de ZnS conteniendo Mn(II), sea de una menor toxicidad, tanto medioambiental como para su uso en organismos vivos, que los QDs de CdSe y CdS (más empleados hasta la fecha).

Así pues, en este contexto el objetivo general de este trabajo ha sido realizar un estudio de la aplicabilidad de estos QDs fosforescentes para futuros usos como marcadores biológicos. Este objetivo se ha abordado a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la capacidad de los fibroblastos murinos para incorporar los QDs de ZnS dopados con Mn^{2+} y el efecto que éstos podrían causar en la morfología celular a lo largo del tiempo.
2. Estudiar la distribución intracelular de los QDs de ZnS dopados con Mn^{2+} en fibroblastos murinos (NIH3T3).
3. Evaluar la toxicidad de los QDs de ZnS dopados con Mn^{2+} en fibroblastos murinos (NIH3T3).

C. MATERIAL Y MÉTODOS

C.1 REACTIVOS

C.1.1 Síntesis de QDs fosforescentes

- Cloruro de L-cisteína → Merck (Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de zinc → Merck (Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de manganeso tetrahidratado → Merck (Darmstadt, Alemania)
- Hidróxido de sodio → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Sulfuro de sodio nohidratado → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Etanol → VWR International (Pennsylvania, EE.UU.)
- Filtros PVDF 0.2 µm → Millipore (Irlanda)
- Argón → Airl Liquide (Madrid, España)

C.1.2 Cultivos celulares

- Células NIH3T3 → American Type Culture Collection, MA, EE.UU. (Catálogo CRL-1658)
- Tripsina → Gibco-BRL (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.)
- Antibiótico → Gibco-BRL (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.)
- DMEM → Lonza (Basilea, Suiza)
- FBS (foetal bovine serum) → Gibco-BRL (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.)
- HEPES → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Paraformaldehído → Panreac Quimica S.L.U (Barcelona, España)
- Trypan Blue → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Cloruro de sodio → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Glutamina → Lonza (Basilea, Suiza)
- Placas Petri 250 mm → Falcon BD (NJ, EE.UU.)
- Placas 24 pocillos → Falcon BD (NJ, EE.UU.)
- Flask T-75 → Falcon BD (NJ, EE.UU.)
- Tubos cónicos de polipropileno → Falcon BD (NJ, EE.UU.)
- Cámara de Neubauer → Brand GMBH (Wertheim, Alemania)
- Contador de células → Tanaco industrial Co (Taiwan, China)

C.1.3 Extracción de proteínas y Western-Blot

- Dodecil sulfato sódico (SDS) → Merck (Darmstadt, Alemania)
- Igepal C → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Cloruro potásico → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Fosfato de sodio monobásico → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)

- Fosfato de sodio dibasico → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Tritón X-100 → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Fluoruro de sodio → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Acrilamida/Bisacrilamida → BioRad Laboratories (Hercules, California)
- Trizma → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Deoxicolato de sodio → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Reactivo de Bradford → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Pepstatina → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Leupeptina → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Ortovanadato → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Aproteinina A → Roche (España)
- β-mercaptoetanol → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Ditiotreitól (DTT) → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Glicerol → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Azul de bromofenol → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Sustrato quimioluminiscente (ECL) → GE Healthcare (Reino Unido)
- Leche en polvo → Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, California, EE.UU.)
- Tween 20 → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Membranas transferencia de fluoruro de polivinilideno (PVDF) → Millipore (Billerica, Massachusetts, EE.UU.)
- Placas fotográficas → Hiperfilm, GE, Healthcare (Reino Unido)
- Anti-PCNA → BD Bioscience (Nueva Jersey)
- Anti-mouse → Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, California, EE.UU.)
- Anti-BC12 → Calbiochem (Darmstadt, Alemania)
- Anti-BAX → Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, California, EE.UU.)
- Anti-Rabbit IgG → Calbiochem (Darmstadt, Alemania)
- Reactivo de Bradford → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Albumina de suero bovino (BSA) → Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, California, EE.UU.)

C 1.4. Citometría de flujo

- RNasa → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Ioduro de propidio → Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.)
- Tubos contaje (Truocount tubes) → Becton Dickinson and company, BD Bioscience (San Jose, EE.UU.)

- Tubos base redonda → Becton Dickinson and company, BD Bioscience(San Jose, EE.UU.)

C 1.5. Microscopía confocal

- Portaobjetos para adhesión celular Thermanox → (Nunc, Rochester, EE.UU.)
- Aceite de inmersión → Merck (Darmstadt, Alemania)
- Portaobjetos → Línea Lab (Badalona, España)
- Cubreobjetos →Menzel –Gläser ([Brunswick, Alemania](#))

C 1.6. Medida del volumen celular

- Placas 6 pocillos → Falcon BD (NJ, EE.UU.)
- Naranja de acridina → Calbiochem, Merck (Darmstadt, Alemania)

C 1.7. Preparación de disoluciones

- PBS → 0,2 g/L de KCl, 0,2 g/L KH_2PO_4 , 8 g/L NaCl, 1,15 g/L Na_2HPO_4 y H_2O mili Q a pH 7,4.
- RIPA → 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X100, 0,5% deoxicolato de sodio.
- DTT + inhibidores de proteasas → 0,1 mM de DTT con 0,2 mM ortovanadato sódico, 100 mM NaF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatina.
- TBS-T → 200 mM trizma base, 80 g/L NaCl, 0,5% Tween 20 a pH 7,4.
- Tris HCl 0,5 M a pH 6,8.
- Tris HCl 1.5 M a pH 8,8.

C.2 SÍNTESIS DE QUANTUM DOTS FOSFORESCENTES

El proceso de síntesis de nanopartículas de $\text{Mn}^{2+}:\text{ZnS}$ se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por He y cols^{59,60} en varias etapas que se describen a continuación:

En primer lugar se prepararon disoluciones acuosas de los reactivos necesarios para la síntesis. Se mezcló en un vaso de precipitados 50 mL de L-cisteína 0,02 M, 5 mL de ZnCl_2 0,1 M, 0,15 mL de MnCl_2 0,1 M y 1,35 mL de agua Milli-Q. El pH de la mezcla se llevó a 11 con NaOH 1 M y se vertió el contenido en un matraz de tres bocas, colocado sobre una manta calefactora (J. P. Selecta) equipada con un termopar y un controlador de temperatura necesario en la etapa final de la síntesis. Bajo agitación constante y un flujo de argón, la mezcla se desoxigenó durante 30 minutos, tiempo tras el cual, se inyectaron rápidamente 5 mL de Na_2S 0,1 M, y durante 20 minutos se mantuvo la agitación y el flujo de argón. A continuación, la temperatura

de la disolución se elevó a 50°C, al aire y bajo agitación continua durante dos horas, para someter a las nanopartículas a un proceso de envejecimiento, con el que se consigue incrementar su cristalinidad⁶¹. Por último, las nanopartículas se sometieron a un proceso de purificación que consiste en la precipitación de los quantum dots con etanol, siendo posteriormente separados mediante sucesivas centrifugaciones. A continuación, mediante el empleo de una línea de vacío, se obtuvieron los quantum dots solubles en agua en forma de un polvo de color pardo.

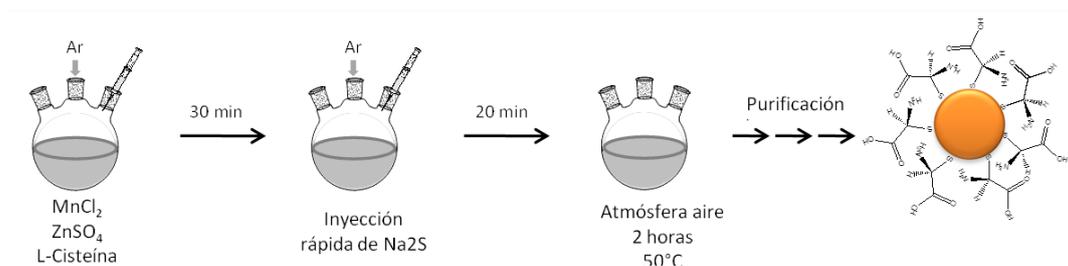


Figura 12. Esquema de la síntesis de QDs de ZnS dopados con Mn^{2+} y con recubrimiento de cisteínas.

La síntesis de QDs se llevó a cabo en colaboración con el grupo de Espectrometría Analítica en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo.

C.3 CULTIVOS CELULARES

Los experimentos de actividad biológica se realizaron empleando una línea celular de fibroblastos embrionarios murinos de ratón, NIH3T3. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 2 mM de glutamina, 10% FBS y 15 mM de Hepes y un 1% de cóctel antimicótico-antibiótico que contiene penicilina (100 U), estreptomina (10 µg/ml) y anfotericina B (25 µg/ml).

Las células se cultivaron a 37°C en un incubador (Heraeus, Hanau, Alemania) en un entorno humidificado con una atmósfera enriquecida en CO_2 hasta un 5%. El medio de cultivo se cambió cada dos días y previamente al inicio de todos los ensayos. Las células fueron sembradas 24 horas antes del inicio del experimento, permitiendo su adhesión a la placa durante toda la noche.

Para los experimentos con las nanopartículas, las células fueron cultivadas en placas Petri de 250 mm de diámetro a una densidad de 40.000 células/ml con 20 ml de medio de cultivo. Tras 24 horas, se cambió el medio de cultivo por medio fresco con una concentración de 300 ppm de QDs (previamente filtrados con un filtro de 0.22 µm) para células tratadas y a

las células empleadas como controles se les cambió el medio por medio fresco. Se sembraron tres réplicas para cada grupo experimental.

Tras el tiempo adecuado de incubación de las células con los QDs, se eliminó el medio, las células se lavaron con 10 ml de PBS y se recogieron mediante raspado. Una vez en tubos Eppendorf, éstas fueron centrifugadas a 400xg a 4°C durante 5 minutos dejando así la muestra preparada para los siguientes estudios.

C.4 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR (AZUL DE TRIPÁN)

El azul de tripán es un colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas⁶². Las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no son coloreados debido a que las células son muy selectivas a los compuestos que dejan pasar a través de la membrana. En las células viables, el azul de tripán no es absorbido; sin embargo, atraviesa la membrana de las células muertas. Por lo tanto, las células muertas se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio o bajo una cámara Neubauer. Debido a que las células vivas son excluidas de la tinción, este método también es llamado método de tinción por exclusión.

Para este ensayo, las células se sembraron a una densidad inicial de 30.000 células/ml en placas de 24 pocillos con 500 µl de medio completo por pocillo. A las 24h, una vez que las células se encuentran adheridas al sustrato, se sustituyó el medio original por medio completo con QDs a la concentración de 300 ppm o por medio completo en el caso de las células control. Tras 24, 48 y 72 h del inicio del tratamiento con los QDs, se retiró el medio de cada uno de los pocillos, se lavaron las células con 500 µl de PBS y posteriormente se añadieron 500 µl de azul de tripán diluido 1:1 con PBS y se dejó actuar durante 7 minutos exactamente. Pasado este tiempo se retiró el azul de tripán y se volvió a lavar dos veces con PBS para eliminar los restos de azul de tripán. Después se tomaron alícuotas de las células y se contaron bajo el microscopio tanto aquellas teñidas de azul (no viables) como las células no teñidas (viables). El porcentaje de viabilidad fue calculado como el número de células viables dividido por el número de células totales.

C.5. CITOMETRÍA DE FLUJO

C.5.1 Análisis del ciclo celular

La citometría de flujo (CMF) es una técnica que gracias a su gran especificidad es capaz de distinguir entre varias poblaciones celulares diferentes y detectar una población celular en una muestra en la que predominan otras poblaciones celulares mayoritarias. Pero la principal característica de la CMF es que puede ofrecer información simultánea de varios parámetros de cada una de las células analizadas y la relación entre los parámetros de una célula y los de otra célula también analizada.

En la CMF, las células (previamente marcadas con el fluoróforo adecuado) entran en la cámara de flujo (Figura 13) de una en una y al pasar por delante de un haz de luz de láser, emiten una luz fluorescente y dispersada, que es separada de acuerdo a su longitud de onda por apropiados filtros y espejos. Estas señales luminosas son recogidas por detectores y la información se integra y analiza adecuadamente por un sistema informático⁶³.

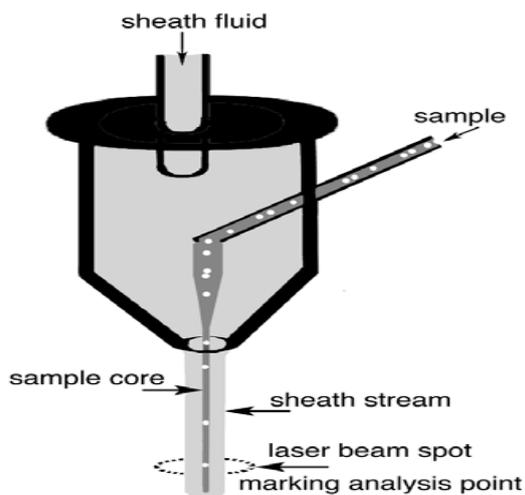


Figura 13. Esquema de la cámara de flujo de un citómetro de flujo. Este sistema consta de dos fluidos, uno que contiene en suspensión a la muestra y otro que lo envuelve a fin de darle estabilidad (sheath fluid). Las células deben pasar una a una por delante del haz del láser. Ambos fluidos (Solución fisiológica, PBS, aire) no se mezclan porque circulan a diferente presión.

Para evaluar las fases del ciclo celular, las células una vez centrifugadas (ver apartado C.3) se lavaron tres veces con PBS y se pasaron a un tubo Eppendorf donde se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se tomaron 120 μ l de cada una de las tres réplicas a un único tubo y las fijamos en 500 μ l de etanol al 70% en agua. Se cuantificó la cantidad de células por ml mediante recuento en una cámara de Neubauer y se realizaron las diluciones adecuadas en una mezcla de PBS, glucosa (1 g/L) y RNasa (100 U/ml) hasta obtener 500 μ l con una densidad final de 500.000 cel/ml. Durante 30 minutos se mantuvieron las muestras a 37°C en estufa tras lo cual

se añadió a cada tubo 50 µl de ioduro de propidio (IP) preparado previamente para tener una concentración final de 100 µg/ml en PBS. Tras la adición de IP a las muestras, éstas permanecieron en oscuridad durante 30 minutos para su posterior análisis.

El análisis de la distribución de las fases del ciclo celular se realizó en el servicio de citometría de los Servicios Comunes de la Universidad de Oviedo, usando un citómetro modelo CYTOMICS FC₅₀₀ (Beckman Coulter Inc, Miami, FL, USA). La integración de los datos y el análisis se realizó por medio del programa Modfit LT 3.0 de “Verity Software House” (Topsham, ME, USA).

C.5.2 Contaje celular

Las células se trataron tal y como se indica en la sección C.3. Tras resuspender las células en 1 ml de PBS, se tomaron 10 µl de cada una de las réplicas de los distintos grupos experimentales y se fijaron en 200 µl de etanol al 70% en agua. Estas muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Para dicho análisis, se centrifugaron las células a 100xg durante 10 min, se retiró el etanol y se resuspendieron en 500 µl de PBS. Las células se pasaron a unos tubos de contaje compuestos por un pellet liofilizado de bolas de sefarosa. El pellet se disuelve al añadirle la suspensión de células y libera una cantidad conocida de bolas fluorescentes (51175 bolas/tubo). A continuación, a cada tubo se le añadieron 50 µl de IP para tener una concentración final de 100 µg/ml en PBS tras lo que se dejaron 10 minutos en oscuridad.

Durante el análisis por citometría de flujo, el número de células total fue determinado por comparación con el número de bolas fluorescentes.

C.6 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CONFOCAL

Un microscopio de fluorescencia confocal es un tipo de microscopio que permite obtener imágenes de fluorescencia en un único plano focal. Se basa en eliminar la luz procedente de los planos fuera del foco (ventaja frente al microscopio de fluorescencia). El microscopio confocal trabaja en epiluminación, es decir, con muestras que reflejan la luz o emiten fluorescencia.

Las células se cultivaron sobre portaobjetos aptos para adhesión celular que se depositaron sobre las placas de cultivo previamente al momento de la siembra de las células. Los portaobjetos se recogieron tras los tratamientos y fueron fijados con paraformaldehído al

3% toda la noche a 4°C. Siempre en oscuridad, las muestras se observaron en el microscopio confocal ultra-espectral (Leica TCS-SP2-AOBS) del Servicio de Microscopía Confocal de la Universidad de Oviedo. Los QDs fueron excitados con un laser de diodo a una longitud de onda de 405 nm y su emisión fue recogida empleando un filtro de 525 nm.

C.7 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y “WESTERN BLOT”

Para evaluar las fases del ciclo celular, las células una vez centrifugadas (ver sección C.3) se lavaron tres veces con PBS y se pasaron a un tubo Eppendorf donde se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se alicuotaron 200 µl de la suspensión celular de cada una de las réplicas y se centrifugaron a 500xg durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante completamente y se congelaron a -80°C hasta su uso.

En el momento del ensayo, las células se resuspendieron en tampón de lisis “Tri-detergent lisis buffer” (RIPA) (ver apartado disoluciones). Las células se lisaron durante 30 minutos en hielo, posteriormente el homogeneizado se purificó por centrifugación a 16.000xg y el sobrenadante se recogió a un tubo limpio. La concentración de proteínas del extracto se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford⁶⁴ (ver apartado otras técnicas). Se tomaron 30 µg de proteínas de cada muestra que se separaron mediante electroforesis en un gel al 12% de acrilamida/bis-acrilamida 37.5:1 según el método de Laemmli⁶⁵. Las proteínas se transfirieron a una membrana permeabilizada de PVDF Inmobilon-P. La electroforesis y transferencia fueron realizados en un equipo Mini-PROTEAN[®] 3 (BioRad, CA, EE.UU.).

Las membranas se incubaron durante una hora en una solución de TBS-T (ver disoluciones) y agente de bloqueo y posteriormente se las hizo reaccionar con anti-PCNA, anti-Bcl2 y anti-BAX respectivamente toda la noche a 4°C, a las diluciones expresadas en la Figura 14 en TBS-T. Posteriormente tras lavados con TBS-T se hibridó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HRP) diluido en agente de bloqueo al 3%.

La cantidad estimada de proteína unida al anticuerpo marcado se valoró mediante quimioluminiscencia al añadir un sustrato de alta afinidad, dejándose impresionar durante un tiempo nunca inferior a 30 segundos en una placa de autorradiografía. Los resultados obtenidos se estandarizaron utilizando como control de carga la β-actina, gen de expresión constitutiva, y se estimaron las diferencias en los distintos grupos experimentales frente al control.

Proteína	Anticuerpo primario		Anticuerpo secundario	
	Huesped	Condiciones	Características	Condiciones
PCNA	Policlonal, ratón	1:5000	Anti-IgG	1:10000
BCL2	Policlonal, ratón	1:500	Anti-IgG	1:5000
BAX	Policlonal, conejo	1:100	Anti-IgG	1:1500
β -Actina	Policlonal, ratón	1:1000	Anti-IgG	1:3000

Figura 14. Anticuerpos utilizados en el análisis por western-Blot

C.8 MEDIDAS DE FOSFORESCENCIA

Las células se trataron tal y como se indica en la sección C.3. Tras resuspender las células en 1 ml de PBS, éstas se centrifugaron a 400xg a 4°C durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, y el pellet obtenido se resuspendió en 200 μ l de agua.

Para conseguir una ruptura total de las células, éstas fueron sometidas a 2 ciclos de congelación (-80°C)/descongelación (35°C) comprobando al microscopio que las células estaban rotas y la disolución era homogénea.

Las medidas fosforescentes se llevaron a cabo en discontinuo empleando una celda de luminiscencia de cuarzo convencional.

Estas medidas se realizaron con el espectrométero de luminiscencia Varian Cary Eclipse (Varian Ibérica) equipado con lámpara de Xenón (potencia de pico equivalente a 75 KW), monocromadores Czerny-Turner y detección mediante tubo fotomultiplicador modelo R-298. Las variables instrumentales, incluyendo los anchos de las rendijas de excitación y emisión, los tiempos de demora y apertura, voltaje del detector, etc., fueron debidamente optimizados con el fin de obtener la mayor sensibilidad en la detección de la luminiscencia de los quantum dots evaluados (ver resultados).

C.9 MEDIDA DE VOLUMEN CELULAR

Las células se cultivaron sobre portaobjetos aptos para adhesión celular que se depositaron sobre las placas de cultivo previamente al momento de la siembra de las células. Tras 24 h de incubación se procedió al tratamiento de las células como describen *Hevia y colaboradores*⁶⁶: De forma resumida, los portaobjetos con las células adheridas a su superficie se lavaron tres veces con PBS-glucosa y posteriormente fueron teñidos con una disolución de naranja de acridina a una concentración de 0,4 μ g/ml en DMEM a partir de un stock de 40

$\mu\text{g/ml}$ en PBS. Los portaobjetos se mantuvieron durante 10 minutos en la solución de naranja de acridina a temperatura ambiente.

Una vez teñidas las células, se pasaron a un portaobjetos apto para microscopía previamente mojado con medio completo. Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal ultra-espectral (Leica TCS-SP2-AOBS) usando un láser de argón/kriptón que opera a 496 nm. Las señales del naranja de acridina se detectaron a 506-590 nm y para cada célula se tomaron 20 secciones ópticas en el plano Z en intervalos de 1 μm . Las imágenes se trataron con el software "Imaris" como se describe en el artículo citado previamente.

Tanto la captura de imágenes como el tratamiento informático de las mismas se realizaron en el Servicio de Microscopía Confocal de la Universidad de Oviedo.

C.10 TÉCNICAS ADICIONALES

C.10.1 Método Bradford para cuantificación de proteínas

El método Bradford es un método de determinación de proteínas en el que el azul de Coomassie (Figura 15) se une a las mismas a través de aminoácidos básicos (principalmente arginina) y aromáticos. Esta unión, da lugar a un cambio en la longitud de onda de dicho colorante desde 450 hasta 595 nm debido a la pérdida de protones, y es a esa longitud de onda a la que se mide la absorbancia que es proporcional a la cantidad de aminoácidos y por tanto de proteína presente en la muestra.

Para la cuantificación de proteínas, una vez tratadas las células con RIPA y centrifugadas a 16.000xg (apartado C.7), se recogieron 2 μl del sobrenadante a los que se añadieron 500 μl de reactivo de Bradford y se llevó hasta 1 ml con agua milli-Q. Se dejó actuar el colorante durante diez minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrómetro Cary 50 (Agilent). Previamente se realizó un calibrado empleando concentraciones crecientes de albúmina (0 - 20 $\mu\text{g/ml}$).

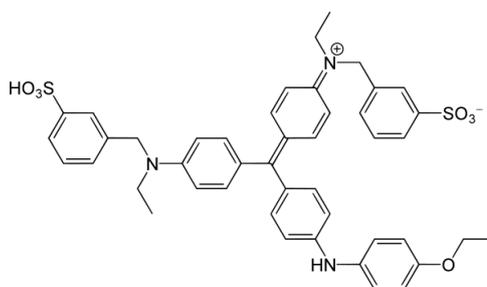


Figura 15. Estructura química del azul de Coomassie utilizado en la cuantificación de proteínas.

C.10.2 Contaje celular mediante cámara de Neubauer

El dispositivo utilizado para determinar el número de células por unidad de volumen en una suspensión se denomina cámara de contaje. El tipo de cámara más usada es el hemocitómetro o cámara de Neubauer denominado así ya que fue diseñada para el contaje de células sanguíneas.

Para el contaje celular, se dispensaron 10 μl de suspensión celular en cada una de las dos zonas en forma de V que se representan en la figura 16A. La cámara una vez cargada se llevó al microscopio donde se observó una distribución igual a la mostrada en la figura 16B. Se contaron las células localizadas en la superficie limitada por los cinco cuadrados principales. Se repitió la misma operación con la zona inferior de la cámara. Para cada contaje se repitió este mismo proceso tres veces obteniendo un valor medio que tras aplicar la fórmula matemática expuesta en la figura 16 C nos da el número total de células.

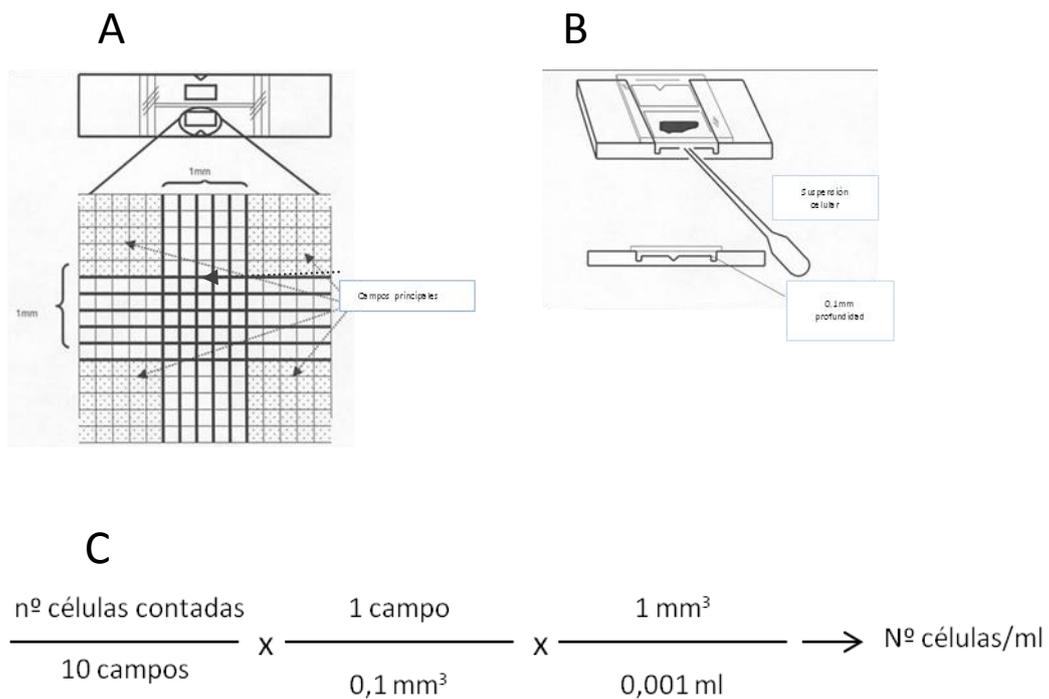


Figura 16. A) Cámara de Neubauer y mecanismo de llenado de la misma. B) Vista bajo el microscopio de la cámara de Neubauer con los campos principales señalados. C) fórmula para el cálculo del número de células por mililitro.

D. RESULTADOS

D.1 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS QDs

Los QDs de ZnS dopados con Mn^{2+} presentan características fisicoquímicas propias de la fosforescencia. Sin embargo, también presentan fluorescencia que puede ser visualizada bajo condiciones adecuadas. Con objeto de comprobar la internalización de los QDs y observar la distribución subcelular, se incubaron las células NIH3T3 con 300 ppm de QDs durante 24, 48 y 72 h. Posteriormente haciendo uso de la fluorescencia de los QDs, se utilizó un microscopio confocal (λ excitación 405 nm y λ emisión 525 nm) para visualizarlos en el interior de las células (Figura 17).

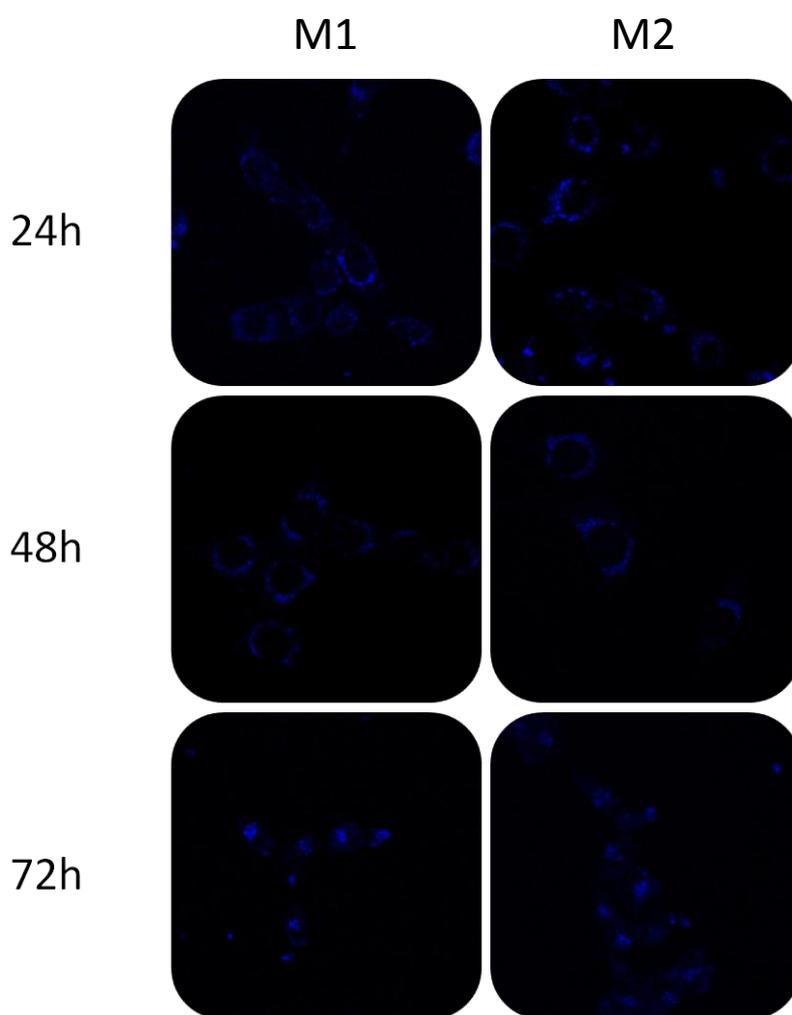


Figura 17. Imágenes de microscopía confocal de QDs de ZnS dopados con Mn^{2+} en células NIH3T3. λ excitación 405 nm y λ emisión 525 nm.

Tal y como se muestra en la figura 17, la localización subcelular de los QDs depende del tiempo de incubación. Así, tras 24 h con los QDs se observa una distribución dispersa alrededor del núcleo; no obstante en algunas células las nanopartículas forman un semicírculo

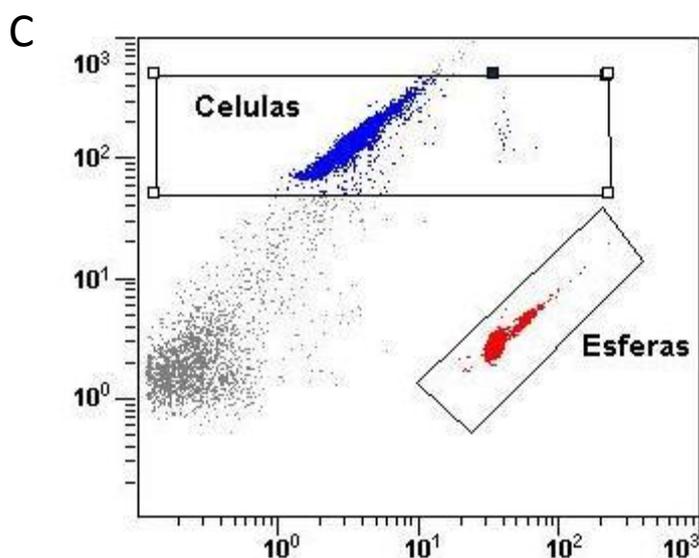
alrededor del núcleo. Tras 48 h de incubación, se observa como los QDs se encuentran alrededor del núcleo definiéndolo claramente sin ningún tipo de luminiscencia en otras partes del citoplasma tal y como ocurría a las 24 h, quedando por tanto patente la total exclusión del núcleo por parte de las nanopartículas. Por el contrario, en las imágenes tomadas tras 72 h de incubación, los QDs parecen encontrarse en el interior del núcleo, lo que podría ser una causa o una consecuencia de la baja viabilidad celular a ese tiempo de incubación con los QDs.

D.2 PROLIFERACIÓN CELULAR

Con el objetivo de evaluar la proliferación celular cuando las células NIH3T3 se incubaron a distintos tiempos con 300 ppm de QDs, se decidió realizar un conteo celular mediante citometría de flujo (ver material y métodos). Para ello, una alícuota de cada muestra (24, 48 y 72 h de incubación con QDs) se adiciona a un tubo de citometría con un número conocido de esferas fluorescentes (51.193). Posteriormente el citómetro analiza una determinada cantidad de muestra hasta llegar a 10.000 esferas.

Tabla 1. A) Tabla con las variables utilizadas en el conteo por citometría de flujo. B) Número de células contadas en los distintos grupos experimentales. C) Esquema del conteo células vs esferas

A		B		
Número de esferas /tubo	51193	CÉLULAS CONTADAS		
Volumen tubo (μl)	500	Tiempo(h)	CONTROLES	QDs
Número esferas contadas	10000	24	5901	3027
Volumen muestra (μl)	20	48	11738	7796
		72	12064	1143



Así, el citómetro nos indica el número de células presentes en el mismo volumen en el que se encuentran 10.000 esferas. Por tanto tras realizar sencillos cálculos matemáticos podemos calcular el número de células en cada una de las placas que dan lugar a la siguiente gráfica de proliferación (Figura 18).

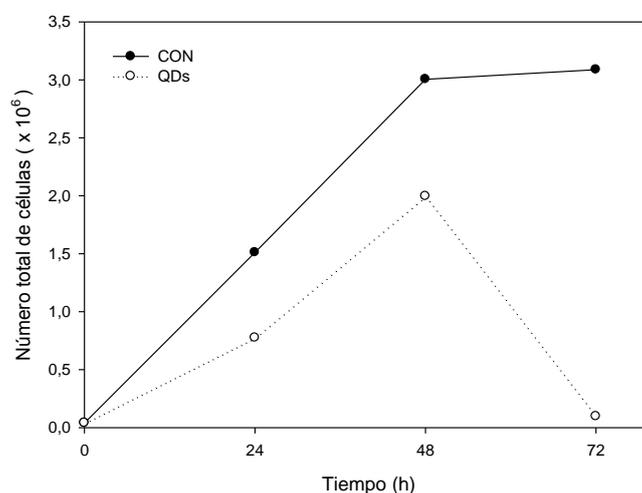


Figura 18. Proliferación celular de fibroblastos murinos tratados con QDs.

En la figura 18 se observa como existe una proliferación de forma exponencial a las 24 y a las 48 h tras el inicio del tratamiento. En el caso de las células tratadas a las 72 h cae la proliferación celular hasta valores cercanos a cero. En las células control no aparece un aumento de manera exponencial entre las 48 y las 72 h. Esto es debido a que a las 48 h las células llegaron a un nivel cercano a la confluencia lo que detuvo su crecimiento.

D.3 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE QDs MEDIANTE MEDIDAS DE FOSFORESCENCIA.

Una vez demostrado que los QDs eran capaces de internalizarse en el tipo celular NIH3T3, decidimos calcular la intensidad de fosforescencia en el interior de éstas y así poder obtener la concentración intracelular de QDs. Para ello se llevaron a cabo medidas de fosforescencia. Los parámetros optimizados para obtener una relación señal/ruido adecuada fueron: longitud de onda de excitación y de emisión; tiempo de retardo (t_d de las siglas en inglés *Delay Time*); tiempo de apertura (t_g de las siglas en inglés *Gate Time*); anchos de las rendijas de excitación y de emisión y la potencia del fotomultiplicador.

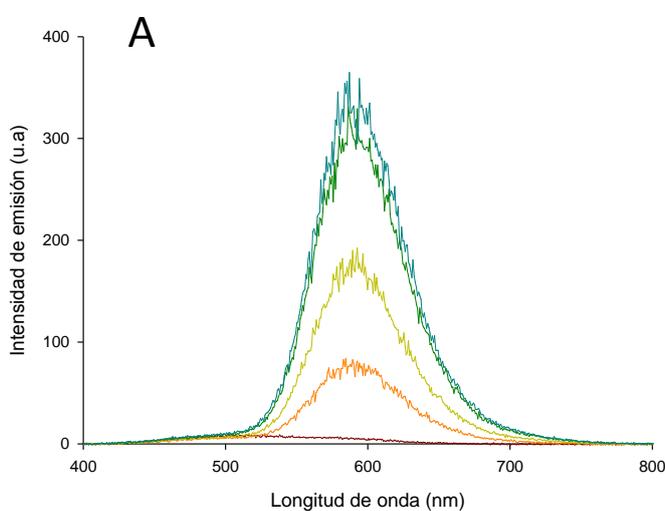
El tiempo de retardo se define como el tiempo tras el cual se comienza a registrar la emisión y el tiempo de apertura es el tiempo durante el cual se registra la señal.

Tabla 2. Parámetros optimizados para la medida de la fosforescencia.

Parámetro	Valor
t_d (ms)	0,1
t_g (ms)	2
λ excitación (nm)	300
λ emisión (nm)	590
Rendija excitación (nm)	20
Rendija emisión (nm)	20
Fotomultiplicador (V)	600

Para optimizar la longitud de onda de emisión, se mantuvo la excitación constante (300 nm) y se realizó un barrido desde 400 hasta 800 nm. La longitud de onda de emisión máxima para este tipo de nanopartículas se encontró a 590 nm.

Previamente a la medida de la fosforescencia en las células NIH3T3, se realizó un calibrado de los QDs a distintas concentraciones. Para obtener la misma matriz de la muestra, se disolvieron los QDs en un pellet de células en medio acuoso. Las concentraciones utilizadas para el calibrado fueron las siguientes: 0, 25, 50, 75 y 100 ppm. Para cada concentración se tomaron los valores de cinco puntos por arriba y cinco puntos por debajo del máximo de emisión (de 580 a 590 nm) y se realizó la media de estas diez medidas.



[QDs] ppm	I (u.a)
0	6,02
25	77,24
50	172,51
75	303,65
100	334,79

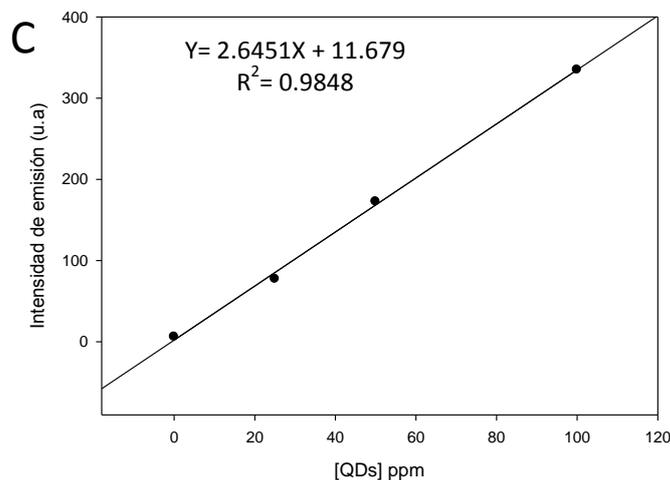


Figura 19. A) Representación gráfica de la intensidad de emisión fosforescente a las distintas longitudes de onda. B) Tabla de concentraciones e intensidades. C) Gráfica de dispersión de la intensidad de fosforescencia frente a la concentración de QDs.

Tras la medida de las disoluciones patrón de distintas concentraciones de QDs se llevó a cabo la medida de la fosforescencia en cada uno de los grupos experimentales, así como en el control. Las condiciones empleadas para estas medidas fueron las mismas que las utilizadas en el caso del calibrado. Las medidas se realizaron por triplicado.

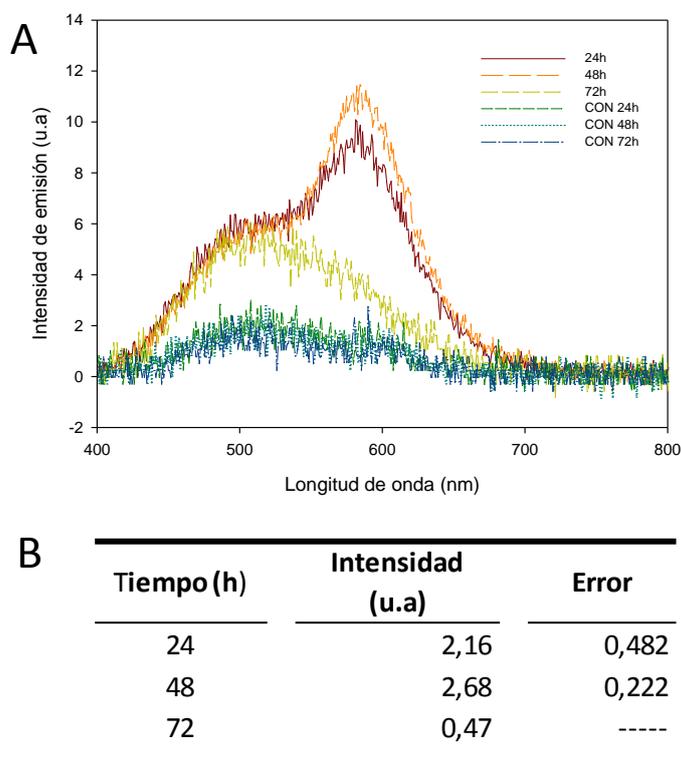


Figura 20. A) Representación gráfica de las medidas de fosforescencia en los grupos experimentales y en los grupos controles. B) Tabla con la relación de los valores y el error obtenido en la medida de fosforescencia.

Una vez medida la fosforescencia, su valor se sustituye en la recta de calibrado, dándonos la concentración de QDs en el interior de las células.

Según estos cálculos, la cantidad de QDs es mayor a las 72 h del inicio del tratamiento con las nanopartículas y estos datos coinciden con lo observado en el microscopio confocal donde aparecían acúmulos en el interior del núcleo lo que daba lugar a una mayor intensidad de fluorescencia (Tabla 3).

Tabla 3. Tabla con la relación de concentraciones de QDs y el error obtenido a los distintos tiempos tras el tratamiento.

Tiempo (h)	[QDs] (ppt)/cel	Error
24	0,364	0,482
48	0,116	0,222
72	4,909	-----

D.4 CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE QDs MEDIANTE MEDIDAS DE VOLUMEN

Una vez conocida la concentración de QDs de ZnS dopados con Mn^{2+} en las células, se decidió estudiar la cantidad de estas nanopartículas por unidad de volumen mediante el cálculo del volumen celular. Para ello se llevó a cabo el procedimiento descrito por *Hevia y colaboradores* en el que se analizan varios tipos celulares. Para nuestro estudio se realizaron 4 experimentos diferentes con una media de 30 células por experimento.

	Nº células	V medio (μm^3)	Error
R1	30	2943,11	256,47
R2	32	2741,34	122,84
R3	30	2731,70	174,52
R4	28	3211,17	228,76

El volumen obtenido para este tipo celular fue de $2906.83 \pm 99.52 \mu\text{m}^3$. A partir de este volumen pudimos concluir la masa de QDs por célula a cada uno de los tiempos estudiados (tabla 4).

Tabla 4. Cantidad de QDs expresada como unidades de concentración y de masa para 0, 24, 48 y 72 h.

Tiempo (h)	[QDs] (ng/L)/cel	[QDs] (zg)
24	0,364	1,05809
48	0,116	0,33719
72	4,909	14,269

D.5 ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para llevar a cabo el último de los objetivos propuestos en este trabajo de investigación, se comenzó evaluando la viabilidad celular que presentaban los fibroblastos murinos, NIH3T3, tras ser incubados con los QDs de ZnS dopados con Mn^{2+} , usando para ello la técnica de viabilidad de azul de tripán bajo observación al microscopio óptico de contraste de fases. En la figura 21 se muestran las imágenes obtenidas mediante un microscopio de contraste de fases (ver apartado de Material y Métodos).

Para el cálculo de la viabilidad celular, se evaluaron tres zonas distintas de cada uno de los pocillos, se contaron las células cuyo núcleo estaba teñido de azul y se compararon con las células totales obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 5.

A las 24 h la viabilidad es de un 92%; esta viabilidad se mantiene constante a las 48 h. Sin embargo a las 72 h se observa una caída importante de la misma. Así mismo la morfología de las células no parece verse afectada por el tratamiento de las mismas con las nanopartículas a las 24 y a las 48 h tal y como se muestra en la figura 22. Sin embargo a las 72 h se ve una disminución del número de células así como un gran número de cuerpos apoptóticos (viabilidad celular cercana al 0%).

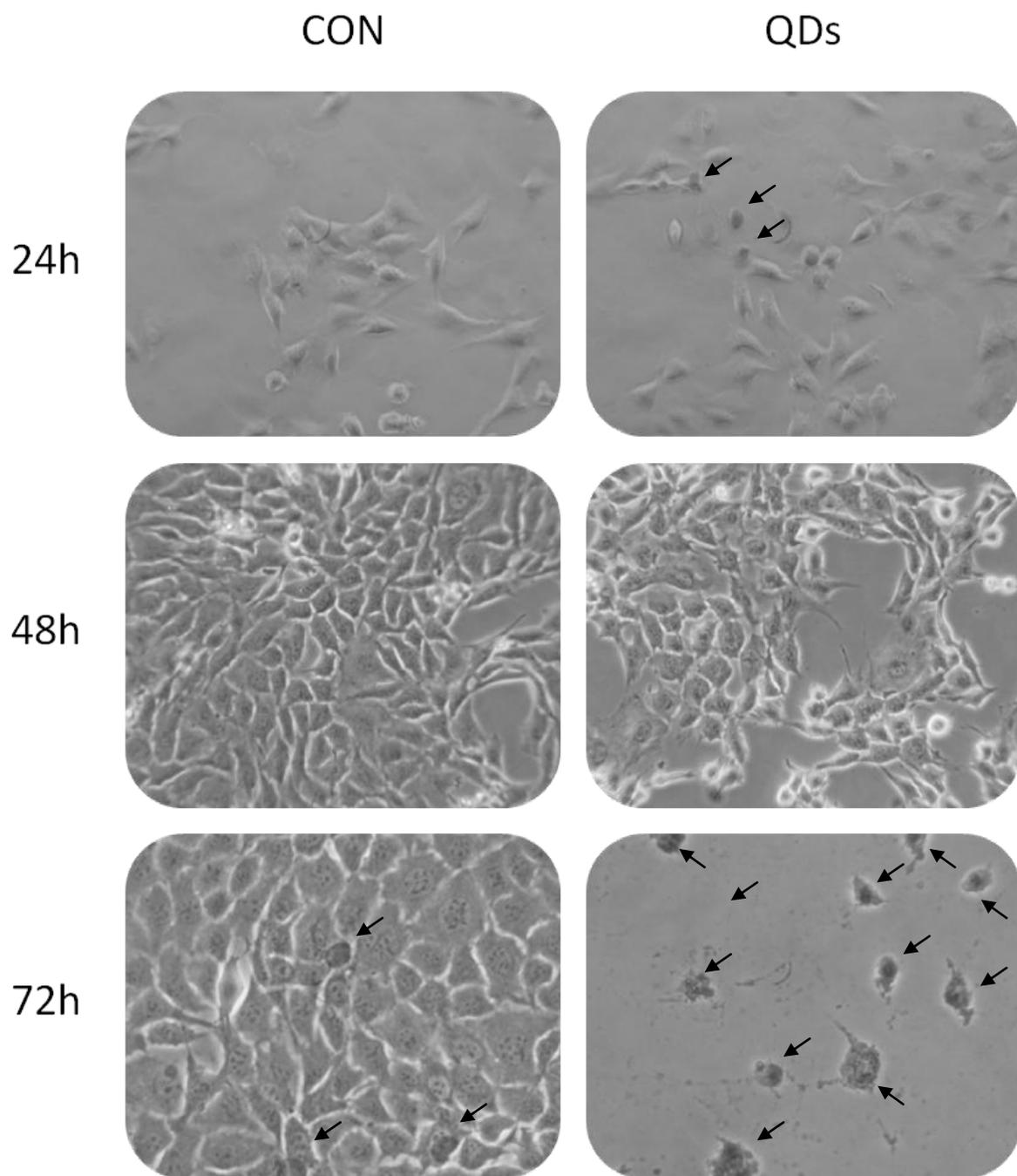


Figura 21. Micrografía de fibroblastos murinos (NIH3T3) teñidos con azul de tripán (100X). Las flechas indican las células teñidas con dicho colorante.

Tabla 5. Viabilidad celular de fibroblastos murinos tratados con QDs mediante la técnica del azul de tripán.

Tiempo (h)	Muestras	Número de células		% Viabilidad
		No viables	Totales	
24	CON	4	46	91,30
	A	6	53	88,68
	B	1	41	97,56
	C	4	39	89,74
48	CON	1	163	99,39
	A	4	63	93,65
	B	4	94	95,74
	C	1	102	99,02
72	CON	0	94	100,00
	A	2	14	85,71
	B	4	4	0,00
	C	10	10	0,00

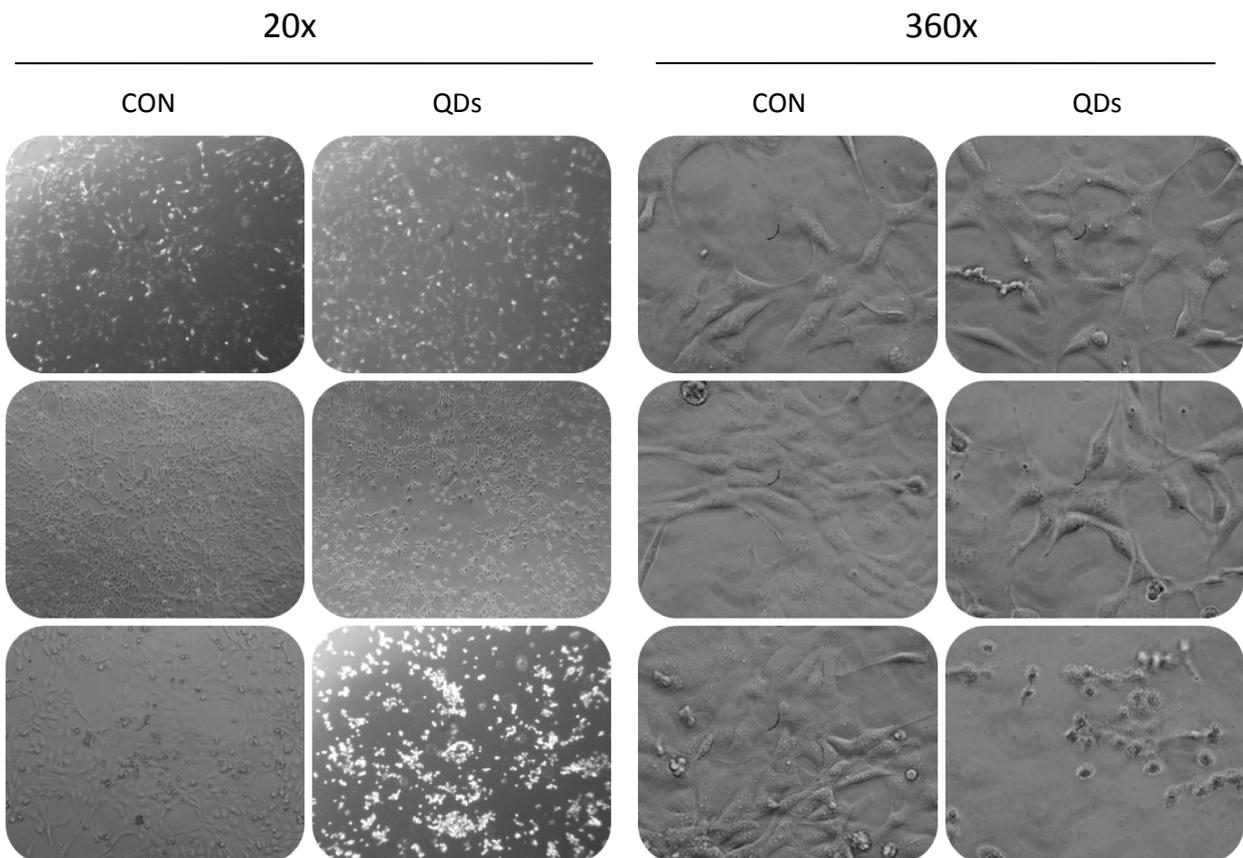


Figura 22. Micrografía de contraste de fases de fibroblastos murinos tratados con QDs de ZnS dopados con Mn^{2+} a las 24, 48 y 72 h tras la adición de las nanopartículas observados a 20X (izquierda) y a 360X (derecha).

D.6 ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS QDs SOBRE EL CICLO CELULAR EN CÉLULAS NIH3T3

Los cambios observados en el número y morfología de las células tras 72 h de incubación con los QDs, nos llevaron a plantearnos el estudio del efecto de los mismos sobre el ciclo celular empleando para ello la citometría de flujo.

El ciclo celular es una serie de eventos ordenados que conducen al crecimiento y división en 2 células hijas. Cada tipo celular en cultivo distribuye sus células a lo largo de las distintas fases del ciclo celular. G₀/G₁ es la fase de reposo o crecimiento celular, S es la fase de duplicación del ADN o fase de síntesis y G₂/M es la fase de mitosis o división celular. Estas distintas fases pueden ser cuantificadas mediante la citometría de flujo. Así, se procedió al estudio del ciclo celular de las células NIH3T3 mediante esta técnica para observar si existe una parada en alguna de las fases del ciclo celular en las mismas al tratarlas con las nanopartículas. Para este propósito, se utilizó la concentración de 300 ppm de los QDs y se comparó con la distribución de las células controles a lo largo de todo el ciclo.

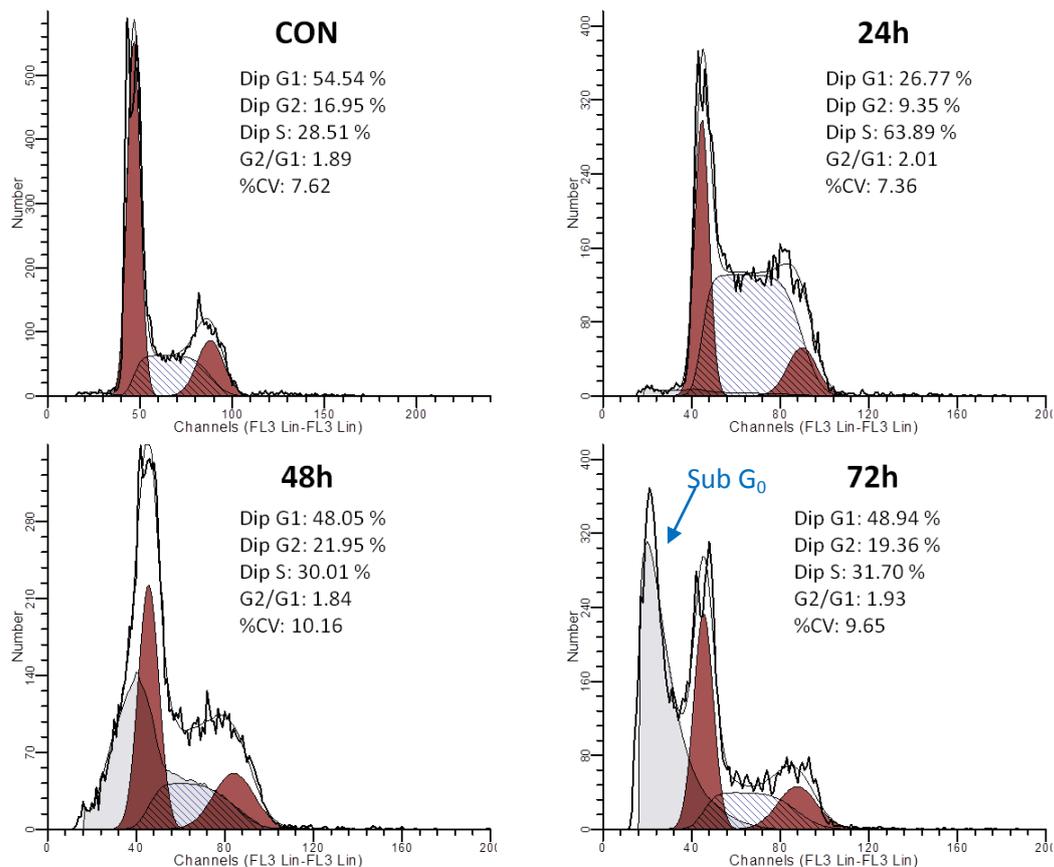


Figura 23. Estudio de la distribución de las fases del ciclo celular en células NIH3T3 tras su tratamiento con QDs a una concentración de 300 ppm.

Si comparamos cada uno de los grupos experimentales con el grupo control, se observa una disminución de la fase G1 y un aumento muy significativo de la fase S. Este aumento es más acusado a las 24 h donde el valor de la fase S alcanza prácticamente 2/3 del total de células. La fase S es la fase de síntesis del ADN, corresponde al tiempo durante el cual se replica el ADN. Esto indica un aumento de la proliferación celular tras 24 h del tratamiento de las células con las nanopartículas. Así mismo a las 72 h se observa como la fase sub G₀ (indicadora de apoptosis) se desplaza hacia la derecha de manera muy acusada. Esto corrobora lo observado bajo el microscopio donde la aparición de cuerpos apoptóticos ocurría de manera evidente.

D.7 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS APOPTÓTICAS Y DE PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS NIH3T3 INCUBADAS CON QDs.

Para corroborar la acumulación de las células en la fase S del ciclo celular, se decidió estudiar los niveles de la proteína PCNA⁴ por Western Blot (ver material y métodos). El PCNA es una proteína que participa en el ciclo celular sobreexpresándose en la fase S y que no se expresa en otras fases del ciclo celular lo que la convierte en un marcador muy específico para dicha fase.

Así mismo, con el fin de determinar si los QDs actuaban sobre las proteínas que controlan la muerte celular valoramos los niveles de dos proteínas claves en la apoptosis. Para ello se estudian dos proteínas: una pro-apoptótica (BAX) y otra anti-apoptótica (Bcl2). El uso de una cuarta proteína, β -actina, tiene como objetivo la corrección de pequeñas variaciones que pueden surgir en los niveles de carga de las proteínas. La β -actina, se utiliza ya que es una proteína que se encuentra presente de manera constitutiva en todas las células.

En el caso de la proteína PCNA (figura 24), los resultados corroboran los obtenidos en el apartado D6. Esta proteína presenta unos niveles más elevados a las 24 y a las 48 h respecto al control lo que indica una acumulación de las células en la fase S, ya que el PCNA solo se expresa en esta fase del ciclo. Además, la expresión de PCNA a 24 h es muy alta y tal como se observa en la Figura 24 B está totalmente en sintonía con los datos obtenidos de % de fase S en el citómetro de flujo (para más detalle ver figura 23).

⁴ PCNA de las siglas en inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*.

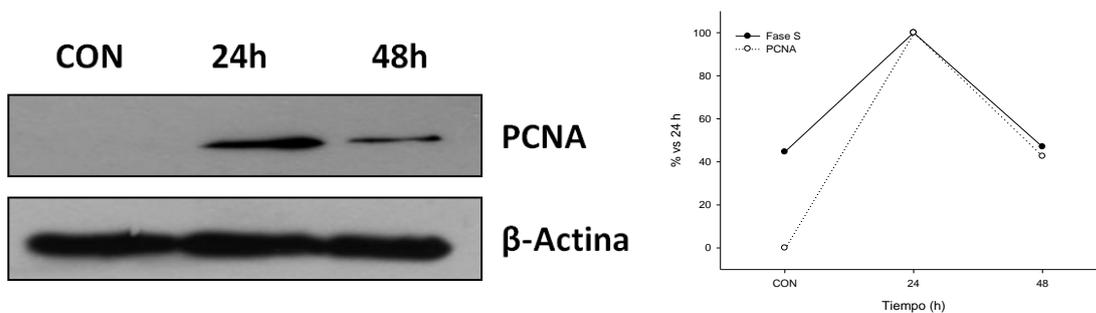


Figura 24. A) Análisis Western Blot de los niveles de proteína PCNA en células NIH3T3 B) Relación entre los niveles de proteína PCNA y el porcentaje de células en fase S a las 24 y a las 48 h.

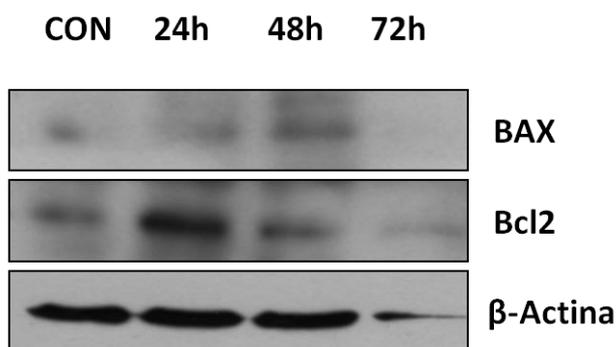


Figura 25. Análisis Western Blot de los niveles de proteína BAX y Bcl2 en células NIH3T3

En el inmunoblot de la figura 25 se observa un aumento de la proteína proapoptótica BAX, así como una clara disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl2 entre las 24 y las 48 h. A las 48 h del tratamiento con los QDs, el ratio BAX/Bcl2 (figura 26) presenta un claro desbalance hacia la primera, lo que indica un aumento de los mecanismos celulares de la muerte celular. El incremento de esta relación a las 48 h explica el hecho de que tras 72 h de tratamiento con los QDs la viabilidad celular sea prácticamente cero, ya que a las 48 h las células ya estaban expresando de manera aberrante la proteína indicadora de muerte celular.

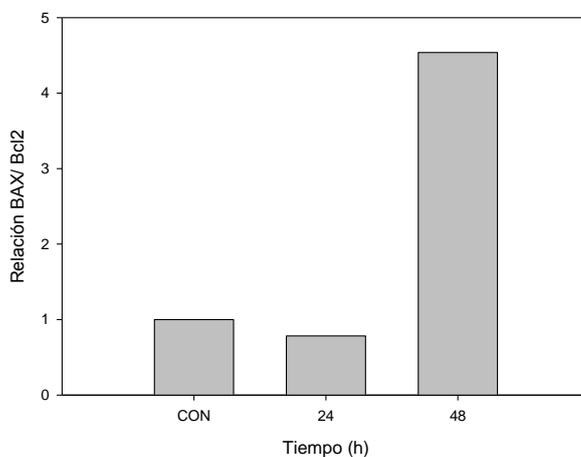


Figura 26. Relación entre las proteínas BAX y Bcl2 analizadas por Western-Blot.

E. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha evaluado la internalización de los QDs con núcleo de ZnS dopado con Mn^{2+} y con recubrimiento de cisteína en fibroblastos murinos. Investigaciones anteriores han demostrado como QDs de diversa naturaleza son capaces de localizarse en el interior de la célula^{67, 68}. En nuestra investigación, dadas las características fluorescentes de los QDs éstos pudieron ser localizados en el interior de la célula mediante el uso de la microscopía de fluorescencia confocal. Así, se evaluaron distintos tiempos (24, 48 y 72 h) observando una distribución variable dependiendo del tiempo de incubación. En un estudio de *Zhang y colaboradores*⁶⁹ queda demostrado como un tipo de QDs (CdTe recubiertos con grupos tiol) se localizaban en los lisosomas de células de carcinoma hepatocelular a los 55 minutos, mientras que un tiempo después llegaban a zonas como el aparato de Golgi. En nuestro caso, tras 24 h de incubación los QDs parece que se encuentran alrededor del núcleo de una forma dispersa, si bien se observa en algunas células que las nanopartículas parecen formar un "semicírculo" alrededor del núcleo. Esto podría indicar una localización específica en el aparato de Golgi, en cisternas del retículo endoplásmico rugoso (RER) o en lisosomas tal y como se ha demostrado en un estudio reciente en el que se observó la colocalización de QDs recubiertos con grupos carboxilo en los lisosomas de macrófagos mediante un marcador específico de dicho orgánulo⁷⁰ (Lysotracker). Sin embargo, al observar las imágenes obtenidas a las 48h, los QDs parecen presentar otra disposición, apareciendo como un punteado exclusivamente alrededor del núcleo.

La localización de los QDs y otros tipos de nanopartículas así como sus mecanismos de entrada en las células dependen de múltiples parámetros destacando entre ellos el tamaño de la nanopartícula, la carga de su superficie, el tipo celular y la concentración de nanopartículas en el medio. En referencia a la carga de la superficie del QD, hay múltiples estudios sobre su entrada en la célula. Algunos de estos estudios, demuestran que los QDs cargados negativamente entran de manera más eficaz en la célula^{71,72}, sin embargo otras investigaciones afirman que los QDs cargados positivamente se internalizan más eficazmente mediante endocitosis⁷³ o que la carga no tiene ningún efecto en la internalización de las mismas⁷⁴. Las nanopartículas utilizadas en este trabajo poseen un recubrimiento de cisteína (Figura 27 A). El enlace entre la nanopartícula y el QD se produce a través del grupo tiol como queda demostrado en el trabajo de *Sotelo-Gonzalez y colaboradores*⁶¹ mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier. Por ello, los grupos que quedan libres son el grupo amino y el grupo carboxilo. Los pKa de estos grupos son 10,7 y 1,9 respectivamente en el caso de la cisteína. Dependiendo del pH en el interior de la célula, la molécula de cisteína tendrá una u otra carga (Figura 27 B).

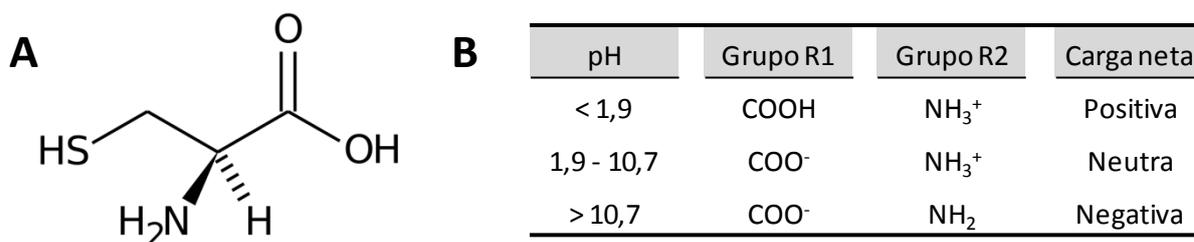


Figura 27. A) Estructura química de la L-Cisteína. B) Comportamiento de los grupos funcionales de la cisteína a distinto pH.

El pH de los medios de cultivo es 7,4, mientras que en el interior del citoplasma es variable. De manera general el pH tiene un valor cercano a 7, pero en los lisosomas y en los endosomas el pH disminuye hasta valores cercanos a 5. Los QDs recubiertos por cisteínas tendrían por tanto una carga neta de cero en cualquiera de esos orgánulos, por lo que la carga no sería ni una ventaja ni un inconveniente en este caso.

Otra variable a tener en cuenta tanto en la internalización como en la posible toxicidad provocada en las células por las nanopartículas, es el tamaño de éstas últimas. Hay varios estudios que indican las diferencias en la distribución subcelular y su relación con la toxicidad⁷⁵ o bien muestran distintos mecanismos de muerte dependiente del tamaño de las nanopartículas⁶⁷. De manera general, las nanopartículas con diámetros menores de 5 nm son las más dañinas para la célula, debido a la posible entrada en el núcleo. Los QDs utilizados en este estudio tienen un núcleo de aproximadamente 4 nm⁶¹ lo que podía hacerlos muy tóxicos para la célula, sin embargo tienen un recubrimiento de cisteínas que consiguen aumentar su tamaño hasta valores alrededor de los 20 nm que los hacen adecuados para este tipo de estudios. Los tamaños adecuados para el trabajo con células son los que se encuentran entre los 10–30 nm de diámetro⁷⁶, ya que partículas con tamaños menores a los 10 nm podrían penetrar fácilmente en el núcleo de las células y con diámetros mayores de 30 nm sería muy difícil su internalización en las células.

La toxicidad de las nanopartículas también está relacionada con la concentración, donde un gran número de las mismas aumentará lógicamente el riesgo de toxicidad celular. Uno de los problemas que surgen al hablar de concentración es la falta de consenso entre los distintos estudios de este tipo. En algunos casos se refieren a ella como masa y otros como número de partículas por unidad de volumen. En la actualidad, muchos estudios relacionan la toxicidad con la concentración de nanopartículas con las que incuban las células, sin embargo

esto no sería del todo cierto, ya que el tamaño, el número y el área de las partículas deberían ser parámetros a tener en cuenta ya que pueden ser muy variables⁷⁷. Aunque la mayoría de toxicidad celular se debe a la entrada de las nanopartículas en las células también hay que considerar los efectos que pueden producir en las células las partículas antes de internalizarse como su posible agregación, lo que aumenta su tamaño, o la pérdida de los recubrimientos con la correspondiente liberación de metales tóxicos de su núcleo. En conclusión, es importante relacionar la toxicidad con la cantidad de nanopartículas añadidas al medio, así como con el número de partículas internalizadas por las células. En nuestro caso, la concentración de QDs añadidos al medio fue de 300 ppm y la encontrada en las células fue del orden de las ppt. Mediante las medidas de fosforescencia observamos que la mayor concentración de nanopartículas se encontraba a las 72 h, lo que coincidía con una mayor tasa de muerte celular. Sin embargo estos datos no son concluyentes ya que una de las variables que afectan a la fosforescencia es el pH. Para este tipo de nanopartículas se ha observado que a pH 12 presentan una mayor intensidad fosforescente. Esta situación no tiene que ver con la nanopartícula en sí, sino a la cisteína que la recubre ya que a pH 12 su grupo amonio se encuentra protonado⁶¹. En nuestro estudio, cuando medimos la fosforescencia en las células, éstas han sufrido varios procesos de congelación /descongelación por lo que se rompe su membrana celular y el pH es inferior al fisiológico. Esto puede ser también una explicación a la baja intensidad de fosforescencia encontrada en las células y a la dispersión que aparece a longitudes de onda menores a las de la emisión de los QDs.

Hay muchos estímulos, como daños físicos y químicos, que inducen una parada del ciclo en distintas fases⁷⁸. Los distintos agentes que pueden causar daño en el ADN, suelen provocar apoptosis o paradas en el ciclo celular que normalmente ocurren entre las fases G1/S o G2/M. Por ello las paradas en estas fases son las más estudiadas en células. Sin embargo, se sabe muy poco de los mecanismos que controlan la progresión en esa fase S. La replicación del ADN eucariota está estrictamente controlada de manera que cada secuencia de ADN se replica una única vez durante esa fase. La parada en esta fase del ciclo, se ha observado en fibroblastos murinos tratados con cis-platino o etopósido⁷⁹. En el caso del estudio del ciclo celular, se observa un incremento acusado de la fase S a las 24 h que vuelve a los niveles del grupo control a las 48 h y se mantiene más o menos constante a las 72 h.

En este trabajo se consiguió la visualización de los QDs de ZnS dopados con Mn²⁺ en el interior de fibroblastos murinos. La localización de estas nanopartículas varía con el tiempo de incubación, este hecho lo consideramos de vital importancia y por tanto nos planteamos como un objetivo futuro evaluar la posible colocalización con orgánulos citoplasmáticos. El

análisis de proteínas implicadas en la muerte celular, así como el análisis del ciclo celular y de la proliferación celular nos indican una disminución de la viabilidad celular con el tiempo, siendo esta mínima a las 72 h. Todos los resultados obtenidos en esta investigación son aplicables a este tipo específico de QDs, y algunos datos como la viabilidad celular es específica de la concentración utilizada (300 ppm) y del tipo celular (NIH3T3). Por ello, para poder catalogar a este tipo de QDs como tóxicos o inertes harían falta estudios más exhaustivos, con un amplio rango de concentraciones, en distintas líneas celulares y sobretodo realizar experimentación *in vivo*.

F. CONCLUSIONES

1. Los QDs con núcleo de ZnS dopados con Mn^{2+} son capaces de internalizarse en fibroblastos murinos (NIH3T3).
2. La localización de los QDs con núcleo de ZnS dopados con Mn^{2+} en el interior de las células NIH3T3 varía con el tiempo.
3. Los QDs con núcleo de ZnS dopados con Mn^{2+} a la concentración de 300 ppm inducen muerte celular en fibroblastos murinos a las 72 h.
4. Los QDs con núcleo de ZnS dopados con Mn^{2+} provocan una parada del ciclo celular en fase S en las células NIH3T3.

G. BIBLIOGRAFÍA

1. Bruchez, M., Jr.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P., **Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels**. *Science* 1998, 281 (5385), 2013-6.
2. Murphy, C. J., **Optical sensing with Quantum Dots**. *Anal. Chem.* 74.
3. Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S., **Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics**. *Science* 2005, 307 (5709), 538-44.
4. Goldman, E. R.; Balighian, E. D.; Mattoussi, H.; Kuno, M. K.; Mauro, J. M.; Tran, P. T.; Anderson, G. P., **Avidin: a natural bridge for quantum dot-antibody conjugates**. *J Am Chem Soc* 2002, 124 (22), 6378-82.
5. Penn, S. G.; He, L.; Natan, M. J., **Nanoparticles for bioanalysis**. *Curr Opin Chem Biol* 2003, 7 (5), 609-15.
6. Pinaud, F.; Michalet, X.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Iyer, G.; Weiss, S., **Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes**. *Biomaterials* 2006, 27 (9), 1679-87.
7. Hardman, R., **A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors**. *Environ Health Perspect* 2006, 114 (2), 165-72.
8. Andrey L. Rogach, T. F., Thomas A. Klar, Jochen Feldmann, Nikolai Gaponik, Vladimir Lesnyak, Alexey Shavel, Alexander Eychmüller, Yuri P. Rakovich, and John F. Donegan. **Aqueous Synthesis of Thiol-Capped CdTe Nanocrystals: State-of-the-Art**. *J. Phys. Chem. C* 2007, 40, 14628–14637.
9. Jose Aldana, Y. A. W., and Xiaogang Peng, **Photochemical Instability of CdSe Nanocrystals Coated by Hydrophilic Thiols**. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 8844–8850.
10. Miguel A Correa-Duarte, M. G. Luis M Liz-Marzán, **Stabilization of CdS semiconductor nanoparticles against photodegradation by a silica coating procedure**. *Chemical Physics Letters* 1998, 286 (5-6), 497–501.
11. Daniele Gerion, F. P., Shara C. Williams, Wolfgang J. Parak, Daniela Zanchet, Shimon Weiss, and A. Paul Alivisatos, **Synthesis and Properties of Biocompatible Water-Soluble Silica-Coated CdSe/ZnS Semiconductor Quantum Dots**. *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 8861–8871.
12. Teresa Pellegrino, L. M., Stefan Kudera, Tim Liedl, Dmitry Koktysh, Andrey L. Rogach, Simon Keller, Joachim Rädler, Giovanni Natile, and Wolfgang J. Parak, **Hydrophobic Nanocrystals Coated with an Amphiphilic Polymer Shell: A General Route to Water Soluble Nanocrystals**. *Nano Lett* 2004, 4, 703–707.
13. G. Pallechi, F. V., **Nanomaterials and Analytical Chemistry**. *Analytical Letters* 2008, 41 (4), 479-520.
14. Amjad Y. Nazzal, L. Q., Xiaogang Peng, and Min Xiao, **Photoactivated CdSe Nanocrystals as Nanosensors for Gases**. *Nano Letters* 2003, 3, 819-822.
15. Ana María Coto-García, E. S.-G., María Teresa Fernández-Argüelles, Rosario Pereiro, José M. Costa-Fernández and Alfredo Sanz-Medel, **Nanoparticles as fluorescent labels for optical imaging and sensing in genomics and proteomics**. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2011, 399, 29-42.
16. Gill, R.; Zayats, M.; Willner, I., **Semiconductor quantum dots for bioanalysis**. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008, 47 (40), 7602-25.
17. Lakowicz, J. R., **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 2006.
18. Mattoussi, I. L. M. a. H., **Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology**. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009, 11, 17-45.
19. Geissler, D.; Charbonniere, L. J.; Ziesel, R. F.; Butlin, N. G.; Lohmannsroben, H. G.; Hildebrandt, N., **Quantum dot biosensors for ultrasensitive multiplexed diagnostics**. *Angew Chem Int Ed Engl* 2010, 49 (8), 1396-401.
20. Dahan, M.; Levi, S.; Luccardini, C.; Rostaing, P.; Riveau, B.; Triller, A., **Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking**. *Science* 2003, 302 (5644), 442-5.

21. Ballou, B.; Lagerholm, B. C.; Ernst, L. A.; Bruchez, M. P.; Waggoner, A. S., **Noninvasive imaging of quantum dots in mice.** *Bioconjug Chem* 2004, 15 (1), 79-86.
22. Larson, D. R.; Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Clark, S. W.; Bruchez, M. P.; Wise, F. W.; Webb, W. W., **Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo.** *Science* 2003, 300 (5624), 1434-6.
23. Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W.; Nie, S., **In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots.** *Nat Biotechnol* 2004, 22 (8), 969-76.
24. Yang, L.; Mao, H.; Wang, Y. A.; Cao, Z.; Peng, X.; Wang, X.; Duan, H.; Ni, C.; Yuan, Q.; Adams, G.; Smith, M. Q.; Wood, W. C.; Gao, X.; Nie, S., **Single chain epidermal growth factor receptor antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor targeting and imaging.** *Small* 2009, 5 (2), 235-43.
25. Yu, X.; Chen, L.; Deng, Y.; Li, K.; Wang, Q.; Li, Y.; Xiao, S.; Zhou, L.; Luo, X.; Liu, J.; Pang, D., **Fluorescence analysis with quantum dot probes for hepatoma under one- and two-photon excitation.** *J Fluoresc* 2007, 17 (2), 243-7.
26. I. Sánchez-Barragán, J. M. C.-F., A. Sanz-Medel, M. Valledor, J.C. Campo, **Room-temperature phosphorescence (RTP) for optical sensing.** *Trends in Analytical Chemistry* 2006, 25, 958-967.
27. Rahul Thakar, Y. C., and Preston T. Snee, **Efficient Emission from Core/(Doped) Shell Nanoparticles: Applications for Chemical Sensing.** *Nano Lett.* 2007, 7, 3429.
28. Rémi Beaulac, P. I. A., Daniel R. Gamelin, **Luminescence in colloidal Mn²⁺-doped semiconductor nanocrystals.** *Journal of Solid State Chemistry* 2008, 181 (7), 1582–1589.
29. Niu Jing-hua, H. R.-n., Li Wen-lian, Li Ming-tao and Yu Tian-zhi, **Electroluminescent properties of a device based on terbium-doped ZnS nanocrystals.** *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2006.
30. Beaulac, R.; Archer, P. I.; Liu, X.; Lee, S.; Salley, G. M.; Dobrowolska, M.; Furdyna, J. K.; Gamelin, D. R., **Spin-polarizable excitonic luminescence in colloidal Mn²⁺-doped CdSe quantum dots.** *Nano Lett* 2008, 8 (4), 1197-201.
31. Xing, Y.; Chaudry, Q.; Shen, C.; Kong, K. Y.; Zhau, H. E.; Chung, L. W.; Petros, J. A.; O'Regan, R. M.; Yezhelyev, M. V.; Simons, J. W.; Wang, M. D.; Nie, S., **Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry.** *Nat Protoc* 2007, 2 (5), 1152-65.
32. Wu, X.; Liu, H.; Liu, J.; Haley, K. N.; Treadway, J. A.; Larson, J. P.; Ge, N.; Peale, F.; Bruchez, M. P., **Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots.** *Nat Biotechnol* 2003, 21 (1), 41-6.
33. Xiaohu Gao, S. N., **Molecular profiling of single cells and tissue specimens with quantum dots.** 2003, 21 (9), 371–373.
34. Diane S Lidke, P. N., Rainer Heintzmann, Donna J Arndt-Jovin, Janine N Post, Hernan E Grecco, Elizabeth A Jares-Erijman & Thomas M Jovin, **Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction.** *Nature Biotechnology* 2004, 22, 198-203.
35. Gerion, F. C. a. D., **Fluorescent CdSe/ZnS Nanocrystal-Peptide Conjugates for Long-term, Nontoxic Imaging and Nuclear Targeting in Living Cells.** *Nano Letters* 2004, 1827-1832.
36. Asati, A.; Santra, S.; Kaittanis, C.; Perez, J. M., **Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles.** *ACS Nano* 2010, 4 (9), 5321-31.
37. Andre E. Nel, L. M., Darrell Velegol, Tian Xia, Eric M. V. Hoek, Ponisseril Somasundaran, Fred Klaessig, Vince Castranova & Mike Thompson, **Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface.** *Nature Materials* 2009, 8, 543 - 557.
38. Yan Xiao, S. P. F., Xiugong Gao, R David Holbrook, William G Telford and Alessandro Tona, **Dynamics and mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake.** *Journal of Nanobiotechnology* 2010.
39. Lajoie, P.; Nabi, I. R., **Regulation of raft-dependent endocytosis.** *J Cell Mol Med* 2007, 11 (4), 644-53.

40. Volker Mailänder, M. R. L., Verena Holzapfel, Anna Musyanovych, Karin Fuchs, Markus Wiesneth, Paul Walther, Katharina Landfester and Hubert Schrezenmeier, **Carboxylated Superparamagnetic Iron Oxide Particles Label Cells Intracellularly Without Transfection Agents**. *Molecular imaging and biology* 2008, 10 (3), 138-146.
41. Xia, T.; Kovichich, M.; Liong, M.; Madler, L.; Gilbert, B.; Shi, H.; Yeh, J. I.; Zink, J. I.; Nel, A. E., **Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties**. *ACS Nano* 2008, 2 (10), 2121-34.
42. A. M. Derfus, W. C. W. C., S. N. Bhatia, **Intracellular Delivery of Quantum Dots for Live Cell Labeling and Organelle Tracking**. *Advanced Materials* 2004, 16 (12), 961-966.
43. (a) Alivisatos, P., **The use of nanocrystals in biological detection**. *Nat Biotechnol* 2004, 22 (1), 47-52; (b) Roco, M. C., **Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine**. *Curr Opin Biotechnol* 2003, 14 (3), 337-46.
44. (a) Mackay, C. E.; Johns, M.; Salatas, J. H.; Bessinger, B.; Perri, M., **Stochastic probability modeling to predict the environmental stability of nanoparticles in aqueous suspension**. *Integr Environ Assess Manag* 2006, 2 (3), 293-8; (b) Kumazawa, I. N. S. a. H., **Aggregation and Disruption Mechanisms of Nanoparticulate Aggregates. 1. Kinetics of Simultaneous Aggregation and Disruption**. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2008, 47, 2391-2400.
45. Pisanic, T. R., Blackwell, J. D.; Shubayev, V. I.; Finones, R. R.; Jin, S., **Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons**. *Biomaterials* 2007, 28 (16), 2572-81.
46. Chompoosor, A.; Saha, K.; Ghosh, P. S.; Macarthy, D. J.; Miranda, O. R.; Zhu, Z. J.; Arcaro, K. F.; Rotello, V. M., **The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles**. *Small* 2010, 6 (20), 2246-9.
47. Andrew F. Adler, K. W. L., **Emerging links between surface nanotechnology and endocytosis: Impact on nonviral gene delivery**. *Nanotoday* 2010, 5 (6), 553-569.
48. Colvin, V. L., **The potential environmental impact of engineered nanomaterials**. *Nature Biotechnology* 2003, 21 (10).
49. Andre Nel, T. X., Lutz Mädler and Ning Li, **Toxic Potential of Materials at the Nanolevel**. *Science* 2006, 311 (5761), 622-627.
50. Hoet, P. H.; Bruske-Hohlfeld, I.; Salata, O. V., **Nanoparticles - known and unknown health risks**. *J Nanobiotechnology* 2004, 2 (1), 12.
51. Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H., **Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing**. *Nat Mater* 2005, 4 (6), 435-46.
52. Xia, T.; Li, N.; Nel, A. E., **Potential health impact of nanoparticles**. *Annu Rev Public Health* 2009, 30, 137-50.
53. Diaz, B.; Sanchez-Espinel, C.; Arruebo, M.; Faro, J.; de Miguel, E.; Magadan, S.; Yague, C.; Fernandez-Pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Santamaria, J.; Gonzalez-Fernandez, A., **Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates**. *Small* 2008, 4 (11), 2025-34.
54. Soto, K.; Garza, K. M.; Murr, L. E., **Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials**. *Acta Biomater* 2007, 3 (3), 351-8.
55. Beverly A. Rzigalinski, Jeannine S. Strobl **Cadmium-containing nanoparticles: Perspectives on pharmacology and toxicology of quantumdots**. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009, 238 (3), 280-288.
56. Wen-Hsiung Chana, N.-H. S., Pin-Zhen Lua, **CdSe quantum dots induce apoptosis in human neuroblastoma cells via mitochondrial-dependent pathways and inhibition of survival signals**. *Toxicology Letters* 2006, 167 (3), 191-200.
57. Yang, R. S.; Chang, L. W.; Wu, J. P.; Tsai, M. H.; Wang, H. J.; Kuo, Y. C.; Yeh, T. K.; Yang, C. S.; Lin, P., **Persistent tissue kinetics and redistribution of nanoparticles, quantum dot 705, in mice: ICP-MS quantitative assessment**. *Environ Health Perspect* 2007, 115 (9), 1339-43.
58. Parak, W. J.; Pellegrino, T.; Plank, C., **Labelling of cells with quantum dots**. *Nanotechnology* 2005, 16 (2), R9-R25.

59. Yu He, H.-F. W., and Xiu-Ping Yan, **Exploring Mn-Doped ZnS Quantum Dots for the Room-Temperature Phosphorescence Detection of Enoxacin in Biological Fluids**. *Anal. Chem* 2008, 80, 3832–3837.
60. Jiaqi Zhuang , X. Z., Gang Wang , Dongmei Li , Wensheng Yang and Tiejin Li, **Synthesis of water-soluble ZnS : Mn²⁺ nanocrystals by using mercaptopropionic acid as stabilizer**. *J. Mater. Chem.* 2003, 13, 1853-1857.
61. Emma Sotelo-Gonzalez , M. T. F.-A., Jose M. Costa-Fernandez, Alfredo Sanz-Medel, **Mn-doped ZnS quantum dots for the determination of acetone by phosphorescence attenuation**. *Analytical Chimica Acta* 2012, 712, 120-126.
62. Strober, W., **Trypan blue exclusion test of cell viability**. *Curr Protoc Immunol* 2001, Appendix 3, Appendix 3B.
63. Hawley, T. S. H., Robert G. , **Flow Cytometry Protocols**. *Methods in Molecular Biology* 2011, 699.
64. Bradford, M. M., **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. *Analytical Biochemistry* 1976, 72, 248-254.
65. Laemmli, U. K., **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature* 1970, 227 (5259), 680-5.
66. David Hevia, A. R.-G., Marta Alonso-Gervós, Isabel Quirós-González, Henar M Cimadevilla, Carmen Gómez-Cordovés, Rosa M Sainz & Juan C Mayo, **Cell volume and geometric parameters determination in living cells using confocal microscopy and 3D reconstruction**. <http://www.nature.com/protocolexchange/>
67. Clift, M. J.; Rothen-Rutishauser, B.; Brown, D. M.; Duffin, R.; Donaldson, K.; Proudfoot, L.; Guy, K.; Stone, V., **The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line**. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008, 232 (3), 418-27.
68. Jaiswal, J. K.; Mattoussi, H.; Mauro, J. M.; Simon, S. M., **Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates**. *Nat Biotechnol* 2003, 21 (1), 47-51.
69. Duan, H.; Nie, S., **Cell-penetrating quantum dots based on multivalent and endosome-disrupting surface coatings**. *J Am Chem Soc* 2007, 129 (11), 3333-8.
70. Ryman-Rasmussen, J. P.; Riviere, J. E.; Monteiro-Riviere, N. A., **Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes**. *J Invest Dermatol* 2007, 127 (1), 143-53.
71. Pan, Y.; Neuss, S.; Leifert, A.; Fischler, M.; Wen, F.; Simon, U.; Schmid, G.; Brandau, W.; Jahn-Dechent, W., **Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles**. *Small* 2007, 3 (11), 1941-9.
72. Lovric, J.; Bazzi, H. S.; Cuie, Y.; Fortin, G. R.; Winnik, F. M.; Maysinger, D., **Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots**. *J Mol Med (Berl)* 2005, 83 (5), 377-85.
73. Teeguarden, J. G.; Hinderliter, P. M.; Orr, G.; Thrall, B. D.; Pounds, J. G., **Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments**. *Toxicol Sci* 2007, 95 (2), 300-12.
74. Malumbres, M.; Barbacid, M., **To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer**. *Nat Rev Cancer* 2001, 1 (3), 222-31.
75. Knudsen, K. E.; Booth, D.; Naderi, S.; Sever-Chroneos, Z.; Fribourg, A. F.; Hunton, I. C.; Feramisco, J. R.; Wang, J. Y.; Knudsen, E. S., **RB-dependent S-phase response to DNA damage**. *Mol Cell Biol* 2000, 20 (20), 7751-63.

