

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Desarrollo de una herramienta para el
seguimiento de metástasis temprana *in vivo* en
ratones C57BL/6 usando células B16F10
marcadas con QDs-GSH biomimético de CdTe**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en
Bioquímica por:

Víctor Manuel Díaz García

Directores de Tesis

Dr. Andrew Quest M.

Dr. José Manuel Pérez Donoso

**Santiago – Chile
2018**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Víctor Manuel Díaz García

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendida el día.....

Directores de Tesis:

Dr. Andrew Quest M. _____

Dr. José Manuel Pérez Donoso _____

Comisión Informante de Tesis:

Dra. María Inés Becker. (Presidenta) _____

Dr. Marcelo Kogan. _____

Dra. María del Carmen Molina. _____

Dra. Margarita Montoya. _____

AGRADECIMIENTOS.

Comenzar por agradecer a mi familia, que siempre me apoya en cada aventura que emprendo, dándome la fuerza moral y mental para superar cada dificultad que la vida presenta.

A mis tutores, Dr. Andrew Quest y Dr. José Manuel Pérez, que me templaron y ayudaron a crecer en este difícil mundo de la ciencia.

A mi comisión de tesis, que siempre estuvieron dispuestos a ayudar y a cooperar en mi formación. En especial al Dr. Kogan, que fue nuestro nano-traductor en las Bío-reuniones.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de comunicaciones celulares, laboratorio de BioNanotecnología y Microbiología y el laboratorio de Nanomedicina y Nanoteranóstica por su ayuda y entusiasmo. Por simplemente, ser familia....

A todos.... Gracias totales.

*“Caminante, son tus huellas el camino y nada más;
Caminante, no hay camino, se hace camino al andar...”*

Antonio Machado.

Esta tesis de Doctorado se realizó en el Laboratorio de Comunicaciones Celulares del Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), el Centro de Estudios Moleculares de la Célula (CEMC) del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile y en el Laboratorio de Bionanotecnología y Microbiología del Centro de Bioinformática y Biología Integrativa (CBBI) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello, gracias a los siguientes financiamientos:

Financiamientos Otorgados al Dr. Andrew Quest.

- CONICYT-FONDAP 15130011.
- FONDECYT 1130250, 1170925.
- Anillo ACT 1111.

Financiamientos Otorgados al Dr. José Manuel Pérez Donoso.

- FONDECYT 1151255.
- INACH RT-25-16.
- AFOSR FA9550-15-1-0140.
- Anillo ACT 1111.

Financiamientos Otorgados a Victor Díaz García

- Beca Conicyt para estudios de Doctorado Nacional N° 21120816.

- Beca de Gastos Operacionales para la realización de Tesis Doctoral N° 21120816, periodo 2016.
- Beca de Extensión de Tesis N° 21120816.
- Beca ayuda financiera para estadía en Cali para la asistencia a la Sexta escuela Internacional Nanoandes de Nanociencias. Noviembre 2016.
- Beca Conicyt para la asistencia a eventos y cursos cortos nacionales para alumnos de Doctorado, convocatoria 2014.

PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS.

TRABAJOS ENVIADOS A PUBLICACIÓN

Gold nanoparticles as tracking devices to shed light on the role of Caveolin-1 in early stages of melanoma metastasis. S. Guerrero, V. Díaz-García, P. Contreras-Orellana, P. Lara, S. Palma, F. Guzmán, L. Lobos-González, A. Cárdenas, X. Rojas-Silva, L. Leyton. M.J. Kogan and A.F.G. Quest. (Aceptado en Nanomedicine. Identificación NNM-2017-0390).

Biomimetic Quantum dot labeled B16F10 murine melanoma cells as a tool to monitor early steps of lung metastasis *in vivo*. Díaz-García V.M., Guerrero S., Díaz-Valdivia N., Lobos-González L., Kogan M.J., Pérez-Donoso J.M. and Quest A.F.G. (resubmitted International J. of Nanomedicine)

A Single Dose of a Curcumin-Loaded Nanoemulsion Prevents Cancer Reincidence and Metastasis After Removal of Highly Metastatic Tumors.

Guerrero S., Contreras-Orellana P., Díaz-García V.M., Lara P., Vivanco-Palma A., Inostroza-Riquelme M. Cárdenas A., Miranda V. Leyton L., Kogan M.J. Quest A.F.G. and Oyarzun-Ampuero F. (in preparation)

PRESENTACIÓN DE PATENTES

Oyarzun F., Guerrero S., Diaz V., Lara P., Vivanco A. Cardenas A., Miranda V., Orellana P., Leyton L., Kogan M., y Quest A. No. Solicitud: PCT/IB2017/001606.

Solicitante: UNIVERSIDAD DE CHILE Fecha Presentación: 28 Diciembre 2017. Prioridad:

US 62/440,476

PRESENTACIONES A CONGRESOS

INTERNACIONALES

- **Díaz V. M**, Guerrero S., Kogan M.J., Quest A.F.G. Pérez-Donoso J.M. Evaluation of a novel tool for the study of early metastasis based in B16F10 murine melanoma cells labeled with Cd-Te Quantum Dots. Applied Nanotechnology and Nanoscience International Conference (ANNIC 2016). 9 al 11 de Noviembre de 2016. Barcelona, España.

- **Díaz V.**, Guerrero S., Kogan M., Quest A.F.G. y Pérez-Donoso J.M. “Quantum Dot induced alterations in the metastasis of B16F10 murine

melanoma cells. Sexta Escuela Internacional NANOANDES de Nanociencias. Universidad del Valle, del 7 al 12 de Noviembre 2016. Cali, Colombia,

- S. Guerrero, **V. Díaz**, P. Lara, F. Guzmán, X. Rojas-Silva, M.J. Kogan, A.F.G. Quest. "Gold nanoparticle functionalized with cell penetrating peptide for labeling of B16F10 melanoma cells as a potential tool for cell tracking in metastasis." 32° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2016 y XXXI Jornadas Chilenas de Química, del 19 al 22 de Enero de 2016. Concepción Chile.

- Guerrero S.¹, **Díaz V.**¹, Hassan N.², Guzmán F.³, Kogan M. J.² y Quest, A.F.G.¹. "Estudio de estrategias para la internalización de Nanopartículas a células Tumorales B16F10 sin modificar características celulares. Una posible alternativa para el marcaje de células para ser trazadas in vivo.". Congreso Venezolano de Nanociencia y Nanotecnología, nanoVenezuela 2014, del 27 al 31 de Octubre de 2014. Caracas, Venezuela,

NACIONALES

- **Díaz V.**, Guerrero S., Kogan M., Quest A.F.G. y Pérez-Donoso J.M. "B16F10 murine melanoma cells labeled with Cd-Te Quantum Dots as a novel tool to study early steps in metastasis" ACCDiS Cancer Spring Symposium, del 7 al 9 de Septiembre 2016. Olmue, Chile.

- S. Guerrero, **V. Díaz**, P. Lara, F. Guzmán, X. Rojas-Silva, M.J. Kogan, A.F.G. Quest. "Gold nanoparticles and cell-penetrating peptides. A nano tool to study

metastasis in short time scale.”. ACCDiS Cancer Spring Symposium, del 7 al 9 de Septiembre 2016. Olmue, Chile.

- **Díaz V.**, Guerrero S., Kogan M., Quest A.F.G. y Pérez-Donoso J.M. “Evaluation of a novel tool for early metastasis studies based on CdTe-GSH Quantum Dots and B16F10 murine melanoma cells” IV Congreso Nacional de Nanotecnología 2016, del 5 al 7 de septiembre de 2016. Olmue, Chile.

- S. Guerrero, **V. Díaz**, P. Lara, F. Guzmán, X. Rojas-Silva, M.J. Kogan, A.F.G. Quest. “Seguimiento temprano de células metastásicas marcadas con nanopartículas de oro. Una herramienta de estudio de metástasis.”. IV Congreso Nacional de Nanotecnología 2016, del 5 al 7 de septiembre de 2016. Olmue, Chile.

- S. Guerrero, **V. Díaz**, N. Hassan, F. Guzmán, M.J. Kogan, A.F.G. Quest. “Caveolin-1 enhanced internalization of gold nanoparticles in B16F10 melanoma cells as an approach to permit cell tracking in vivo”. Primer Encuentro ACCDiS, Chile. Año 2015.

- S. Guerrero, **V. Díaz**, P. Lara, F. Guzmán, M.J. Kogan, A.F.G. Quest. “Gold nanoparticle labeling of B16F10 melanomas for cell tracking in metastasis”. XXIX Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile, del 25 al 29 de Octubre de 2015. Puerto Varas, Chile.

- S. Guerrero, **V. Díaz**, N. Hassan, F. Guzmán, M.J. Kogan, A.F.G. Quest. “Caveolin-1 enhanced internalization of gold nanoparticles in B16F10 melanoma cells as an approach to permit cell tracking in vivo”. XXXVII Reunión Anual

Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, Puerto Varas, Chile, del 22 al 25 de Septiembre del 2015.

- **Díaz V.**, Guerrero S., Pérez-Donoso J.M. y Bravo D. “Tratamientos con n-acetilcisteína permiten obtener células B16F10 marcadas con QDs. Desarrollo de un nuevo método de marcaje celular para estudios en cáncer.”. III Congreso Nacional de Nanotecnología 2014. Programa interdisciplinario de nano ciencia, Puerto Varas, Chile, del 12 al 14 de septiembre de 2014.

ÍNDICE

ABREVIACIONES.....	15
RESUMEN.....	18
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1 CÁNCER.....	23
1.2 METÁSTASIS.....	24
1.3 ESTUDIOS DE METÁSTASIS EN MODELOS DE RATÓN.....	26
1.4 USO DE NANOPARTÍCULAS EN IMAGENOLOGÍA	28
1.5 QUANTUM DOTS E IMAGENOLOGÍA EN CÁNCER.....	30
1.6 TOXICIDAD DE QDs	35
1.7 MANEJO DE LA TOXICIDAD DE QDs MODIFICANDO LA COBERTURA	39
1.8 MANEJO DE LA TOXICIDAD DE LOS QDs-GSH Y SU EFECTO PROTECTOR EN LA CÉLULA	44
RESUMEN DE ANTECEDENTES	47
HIPÓTESIS.....	49
OBJETIVO GENERAL.....	49
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
2. METODOLOGÍA	50
2.1. LÍNEAS CELULARES.....	50
2.2 SÍNTESIS QUÍMICA DE QDs-GSH.....	51
2.2 FUNCIONALIZACIÓN DE LOS QDs-GSH CON PEG	51
2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS QDs.....	52
2.4 CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTOS CON LOS DISTINTOS QDs	52
2.5 TRATAMIENTOS CON NAC	53
2.6 DETERMINACIÓN DE TIOLES REDUCIDOS EN CÉLULAS B16F10	53
2.7 PROMOCIÓN DE LA INCORPORACIÓN QDs-GSH.....	54
2.8 CITOMETRÍA DE FLUJO: DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD, MARCAJE Y NIVELES ROS.....	54
2.9 MICROSCOPIA CONFOCAL	56

2.10	ENSAYOS DE MIGRACIÓN	57
2.11	MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA	57
2.12	ENSAYOS DE INVASIÓN	58
2.13	ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y PERSISTENCIA DE MARCA ASOCIADA A QDs-GSH	59
2.14	ENSAYO DE METÁSTASIS <i>IN VIVO</i>	59
2.15	IMÁGENES OBTENIDAS POR IVIS DE RATONES Y PULMONES.....	60
2.16	IMÁGENES <i>EX VIVO</i> POR IVIS	60
2.17	ENSAYO DE INMUNOHISTOQUIMICA.....	61
2.18	PRUEBA DE CONCEPTO.....	62
2.19	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
3.1	OBJETIVO ESPECIFICO 1.....	64
3.1.1	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DISTINTOS QDs-GSH VERDES O ROJOS, Y FUNCIONALIZACIÓN DE QDs-GSH VERDES CON SH-PEGs.....	64
3.2	OBJETIVO ESPECIFICO 2.....	74
3.2.1	DETERMINACIÓN DEL EFECTO EN LA VIABILIDAD E INCORPORACIÓN DE QDS-GSH _v EN CÉLULAS B16F10 Y CÉLULAS MKN45.....	76
3.2.2	DETERMINACIÓN DEL EFECTO EN LA VIABILIDAD E INCORPORACIÓN DE QDS-GSH ₁₀ , QDS-PEG-COOH, QDS-PEG-MET Y QDS-PEG-NH ₂ EN CÉLULAS B16F10	82
3.2.3	INCORPORACIÓN DE QDs-GSH ₁₀ , QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET Y QDs-PEG-NH ₂ EN CÉLULAS B16F10 TRATADAS CON NAC Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE ESTA INCORPORACIÓN EN LA VIABILIDAD DE CÉLULAS B16F10.....	86
3.2.4	INCORPORACIÓN DE QDs-GSH _v Y QDs-GSH _r EN CÉLULAS B16F10 Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE ESTA INCORPORACIÓN EN LA VIABILIDAD DE CÉLULAS B16F10.....	91
3.2.5	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS CON NAC DURANTE EL PROCESO DE MARCAJE DE CÉLULAS B16F10 UTILIZANDO QDs-GSH _r Y LIPOFECTAMINA. MEDICIÓN DEL EFECTO EN LA VIABILIDAD, INCORPORACIÓN DE QDs-GSH _r Y NIVELES DE ROS	96
3.3	OBJETIVO ESPECIFICO 3.....	100
3.3.1	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS CON NAC, QDs-GSH _r Y LIPOFECTAMINA EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS B16F10.....	100

3.3.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON NAC, QDs-GSHr Y LIPOFECTAMINA EN LA CAPACIDAD INVASIVA DE CÉLULAS B16F10	104
3.3.3. DETERMINACIÓN DE LA PERSEVERANCIA DE LA MARCA DE QDs-GSHr EN CÉLULAS B16F10 _{QDS-GSH-10NAC} Y LA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN DE ESTAS.....	108
3.3.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD METASTÁSICA <i>IN VIVO</i> DE CÉLULAS B16F10 _{QDS-GSH-10NAC} EN RATONES C57BL/6.....	112
3.4 OBJETIVO ESPECIFICO 4.....	115
3.4.1. SEGUIMIENTO DE LA FLUORESCENCIA ASOCIADA A QDs-GSHv Y QDs-GSHr PRESENTES EN CÉLULAS B16F10, RATONES C57BL/6 Y PULMONES DE RATONES C57BL/6.	115
3.4.2. SEGUIMIENTO DE FLUORESCENCIA ASOCIADA A CÉLULAS B16F10 _{QDS-GSH-10NAC} EN ÓRGANOS COLECTADOS DESDE RATONES C57BL/6 A DISTINTOS TIEMPOS POST-INYECCIÓN.....	118
3.4.3. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CÉLULAS B16F10 _{QDS-GSH-10NAC} EN LOS PULMONES DE RATONES C57BL/6.....	123
3.4.4. DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS B16F10 _{CALCEINA} Y CÉLULAS B16F10 _{QDS-GSH-10NAC} EN PULMONES DE RATONES C57BL/6.....	124
3.4.5 PRUEBA DE CONCEPTO.....	130
4. DISCUSIÓN.....	135
4.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DISTINTOS QDs-GSH VERDES O ROJOS.....	136
4.2 FUNCIONALIZACIÓN DE QDs-GSH CON SH-PEGs. IMPORTANCIA DE LA COBERTURA DE GSH PRESENTES EN QDs.	137
4.3 TRATAMIENTOS DE CÉLULAS B16F10 CON QDs-GSH10 Y QDs-PEGs Y SU EFECTO EN EL PROCESO DE MARCAJE CELULAR. EFECTO DE LA COBERTURA.	138
4.4 EFECTO EN LA VIABILIDAD Y MARCACIÓN DE CÉLULAS B16F10 Y MKN45 CON QDs-GSHv. ROL DE LOS TIOLES INTRACELULARES.....	140
4.5 EFECTO EN LA VIABILIDAD E INCORPORACIÓN DE QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET Y QDs-PEG-NH ₂ EN CÉLULAS B16F10 TRATADAS CON NAC	142
4.6 DETERMINACIÓN DEL EFECTO EN LA VIABILIDAD E INCORPORACIÓN DE QDs-GSHv Y QDs-GSHr EN CÉLULAS B16F10.....	143

4.7	MODULACIÓN DEL EFECTO DE ROS. EFECTO EN EL MARCAJE Y LA CAPACIDAD METASTÁSICA DE CÉLULAS B16F10 VIABLES MARCADAS CON QDs-GSHr	146
4.8	PERSEVERANCIA DE LA MARCA DE QDs-GSHr EN CÉLULAS B16F10 _{QDS-GSH-10NAC} Y LA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN DE ESTAS.....	149
4.9	ENSAYOS DE METÁSTASIS <i>IN VIVO</i> UTILIZANDO CÉLULAS B16F10 _{QDS-GSH-10NAC} EN RATONES C57BL/6.....	151
4.10	SEGUIMIENTO DE LA FLUORESCENCIA ASOCIADA A QDs-GSHv Y QDs-GSHr PRESENTES EN CÉLULAS B16F10, RATONES C57BL/6 Y PULMONES DE RATONES C57BL/6	153
4.11	SEGUIMIENTO DE FLUORESCENCIA ASOCIADA A CÉLULAS B16F10 _{QDS-GSH-10NAC} EN ÓRGANOS COLECTADOS DESDE RATONES C57BL/6 A DISTINTOS TIEMPOS POST-INYECCIÓN.....	154
4.12	DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS B16F10 _{CALCEINA} Y CÉLULAS B16F10 _{QDS-GSH-10NAC} EN PULMONES DE RATONES C57BL/6.....	158
4.13	PRUEBA DE CONCEPTO	160
5.	CONCLUSIÓN.....	162
6.	REFERENCIAS	164

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Propiedades espectroscópicas de QDs, su capacidad de conjugación y el auge en su estudio.....	31
Figura 2: Determinación de tamaño y potencial Z de QDs-GSH, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH ₂	68
Figura 3: Tamaño y potencial Z de QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH ₂	73
Figura 4: Efecto en la viabilidad de la incorporación de QDs-GSH verdes en células B16F10 y MKN45.....	79
Figura 5: Determinación de tioles reducidos intracelulares en células MKN45 y B16F10 tratadas y sin tratar con NAC.	81
Figura 6: Efecto en viabilidad celular e incorporación de distintos QDs verdes en células B16F10.....	85
Figura 7: Efecto sobre viabilidad celular e incorporación de distintos QDs verdes en células B16F10 de tratamientos con 4mM de NAC.....	89
Figura 8: Incorporación de QDs-GSHv y QDs-GSHr en células B16F10 y determinación del efecto de la incorporación en la viabilidad de células B16F10.....	95
Figura 9: Efecto de tratamientos con NAC sobre los niveles de ROS, viabilidad e incorporación de QDs-GSHr en células B16F10.	99
Figura 10: Migración de células B16F10 marcadas con QDs-GSHr y el efecto modulador de NAC.	103
Figura 11: Invasión de células B16F10 marcadas con QDs-GSHr y el efecto modulador de NAC.	107
Figura 12: Efecto de la internalización de QDs-GSHr sobre la proliferación de células B16F10 y persistencia de la marca asociada a QDs-GSHr.	111
Figura 13: Ensayos de metástasis <i>in vivo</i> utilizando células B16F10 y células B16F10 _{QDs-GSH-10NAC}	114
Figura 14: Ensayos preliminares de imagenología utilizando células B16F10 marcadas con QDs-GSHv o QDs-GSHr.	117
Figura 15: Seguimiento <i>in vivo</i> de células B16F10 _{QDs-GSH-10NAC}	122
Figura 16: Controles ensayos inmunohistoquímicos de cortes histológicos.	126
Figura 17: Presencia y distribución de células B16F10 y B16F10 _{QDs-GSH-10NAC} en pulmones de ratones C57BL/6 a 6 y 24 horas post-inyección.....	128
Figura 18: Intensidad de Fluorescencia Total (IFT) de células B16F10 _{CALCEINA} y células B16F10 _{QDs-GSH-10NAC} a las 6 y 24 horas post-inyección.....	129
Figura 19: Prueba de concepto utilizando el protocolo de marcaje desarrollado en células B16F10(Mock), B16F10(CAV-1) y ratones C57BL/6.....	133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Comparación de las características y aplicaciones entre fluoróforos orgánicos tradicionales y Quantum Dots.	34
Tabla 2: Tamaño, potencial Z y propiedades espectroscópicas de QDs-GSH10 verdes y QDs-GSH Rojos.	65
Tabla 3: Tamaño, potencial Z y propiedades espectroscópicas de QDs-GSH, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH ₂	66
Tabla 4: Tamaño, potencial Z y propiedades espectroscópicas de QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH ₂	72
Tabla 5: Experimentos inconclusos (n<3) realizados durante este trabajo de tesis. Resultados y referencia.	75

ABREVIACIONES

CAV1: Caveolina-1

CdTe: Cadmio-Teluro

CR7: Péptido compuesto por repetición de 7 argininas y una cisteína.

CTAT: Péptido de penetración celular (TAT) modificado con cisteína terminal.

DACO: 1, 5-diazacyclooctanato.

DAKO: Medio de montaje para fluorescencia.

DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol.

DEPC: Dietilpirocarbonato.

DLS: Dispersion dinámica de la Luz.

ECM: Matriz extracelular.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

FDA: Agencia gubernamental de administración de medicamentos y alimentos (U.S.A).

GSH: Glutación reducido.

GSSG: Glutación oxidado.

IFM: Intensidad de fluorescencia media.

IFT: Intensidad de fluorescencia total.

IVIS: Sistema de Imagenología *in Vivo*.

MMP: Metaloproteinasa 1.

MRI: Resonancia magnética de imagen

MSA: Ácido mercaptosuccinico.

MUA: Ácido mercaptoundecanoico.

NAC: n-acetilcisteína.

NPs: Nanopartículas

OI: Imagen óptica

PAT: Tomografía foto acústica

PBS: Tampón fosfato salino.

PEG: Polietilenglicol

PEGs: Plural de Polietilenglicol

QDs: Nanopartículas semiconductoras fluorescentes o Quantum Dots.

QDs-GSH: Quantum Dots sintetizados utilizando 15mM de GSH.

QDs-GSH10: Quantum Dots sintetizados utilizando 10mM de GSH.

QDs-GSHr: QDs-GSH que emiten fluorescencia roja.

QDs-GSHv: QDs-GSH que emiten fluorescencia verde.

QDs-NAC: Quantum Dots capeados con n-acetilcisteína reducida.

QDs-GSH-PEG: QDs-GSH recubiertos con PEG.

RES: Sistema retículo endotelial.

ROI: Intensidad óptica relativa.

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RSH: Tioles reducidos.

SEM: Desviación estándar de la muestra.

SH-PEG: Polietilenglicol modificados con grupo tiol reducido terminal.

SH-PEGs: Plural de polietilenglicol modificados con grupo tiol reducido

terminal.

TIMP-1: Inhibidor tisular de metaloproteinasa-1.

RESUMEN

Actualmente, la metástasis es la principal causa de muerte de pacientes con cáncer. Su estudio sigue siendo en gran medida una "caja negra" debido a la incapacidad para rastrear células malignas a medida que colonizan los órganos diana. Por lo tanto, el conocimiento sobre los primeros pasos durante la metástasis *in vivo* sigue siendo limitado

Muchos estudios han propuesto el uso de nanopartículas semiconductoras fluorescentes o puntos cuánticos (QDs) como un nuevo medio para marcar células y tumores. Sin embargo, las aplicaciones de los QDs están limitadas por su toxicidad en sistemas biológicos y lo poco que se sabe sobre su capacidad de afectar la metástasis de las células cancerosas.

Previamente, describimos la síntesis "biomimética" de QDs de Cadmio-Teluro hidrófilos (QDs-GSH) con una mayor biocompatibilidad en comparación a otros QDs de cadmio producidos por distintos medios. Además, esta metodología nos permitió obtener células de cáncer gástrico MKN45 marcadas con estos QDs-GSH. Sin embargo, aún se desconoce como la presencia de los QDs-GSH en el interior de las células podrían afectar la capacidad metastásicas de células tumorales.

Por estos motivos, este estudio planteó generar una metodología que permita obtener células de melanoma murino B16F10 marcadas con QDs-GSH en su interior, con el propósito de ser utilizadas en estudios de metástasis temprana. Se evaluó diferentes metodologías para incorporar QDs-GSH en células de melanoma murino B16F10 y que además permitieran disminuir los efectos tóxicos después de dicha incorporación en las células. Luego, se caracterizó el efecto sobre la capacidad metastásica *in vitro* e *in vivo* de la incorporación de QDs-GSH en células B16F10. Más tarde, se desarrolló una metodología para obtener células B16F10 marcadas con QDs-GSH (células marcadas casi 100% viables), las cuales migran de forma similar a las células control y permanecen viables por al menos cinco días. Sin embargo, la proliferación, la invasión y la capacidad de formar nódulos metastásicos en los pulmones se atenuaron severamente por la incorporación de QDs.

Los resultados mostraron que las células B16F10 marcadas con QDs-GSH pueden usarse para rastrear la distribución/acumulación temprana de estas células en diferentes órganos de ratones C57BL/6 usando el sistema de imágenes *in vivo* (IVIS). Además, revelaron que estas células se distribuyen en, corazón, pulmones, riñones e hígado de ratones C57BL/6 a los cinco minutos de la inyección intravenosa, para posteriormente acumularse en los pulmones.

Adicionalmente, en este estudio se realizó una prueba de concepto (utilizando células B16F10 marcadas con QDs que sobreexpresan Cavelolina-1), que

permitió evaluar el potencial de utilizar esta metodología de marcaje celular como una herramienta útil para caracterizar la acumulación/distribución temprana de células B16F10 en ratones C57BL/6. Esto, permitiría evaluar los efectos de fármacos y/o diferentes factores biológicos sobre el proceso de acumulación/distribución temprana de células metastásicas. En conjunto, esto permitiría mejorar la comprensión de estos eventos tempranos en la metástasis y posiblemente actuar sobre ellos.

SUMMARY

Currently, metastasis is the leading cause of death in cancer patients. Our understanding of this process remains limited largely due to the inability to track malignant cells as they colonize the target organs. Therefore, an improved understanding of the first steps during *in vivo* metastasis is highly desirable.

Many studies have proposed the use of fluorescent semiconductor nanoparticles or quantum dots (QDs) as a new tool for labeling cells and tumors. However, the applications of QDs in this field are limited by their toxicity in biological systems along with the lack of knowledge of the effects that QDs might have on the metastatic capacity of cancer cells.

Previously, we described the "biomimetic" synthesis of hydrophilic CdTe-QDs (QDs-GSH) with increased biocompatibility compared to the cadmium QDs that

had been evaluated until then, together with a methodology that allowed us to obtain MKN45 gastric cancer cells labeled with QDs-GSH. However, it remained unclear how the presence of the QDs-GSH inside the cells could affect the metastatic capacity of tumor cells.

For these reasons, we sought to develop here a methodology that permitted obtaining B16F10 murine melanoma cells labeled in their interior with QDs-GSH, which have the potential to be used in studies of early metastasis. To that end, this study evaluated different methodologies to incorporate QDs-GSH in murine melanoma B16F10 cells and to diminish the toxic effects following such incorporation into cells. Then, the effect on metastatic capacity *in vitro* and *in vivo* of the incorporation of QDs-GSH in B16F10 cells was characterized. Subsequently, a methodology was developed that allowed us to obtain QDs-GSH-labeled B16F10 cells (nearly 100% viable labeled cells), which remained viable for at least five days and migrated similarly to control cells.

The results showed that QDs-GSH-labeled B16F10 cells can be used to track the early distribution / accumulation of these cells in different organs of C57BL / 6 mice using *in vivo* imaging system (IVIS) and revealed that these cells were detected as soon as five minutes after intravenous injection in the heart, lungs, kidneys and liver, and subsequently accumulated in the lungs of C57BL / 6 mice. However, proliferation, invasion and the capacity to form metastatic

nodules in the lungs of such QDs-GSH-labeled B16F10 cells were severely attenuated.

Also, in this study a proof of concept experiment was included using B16F10 cells labeled with QDs that overexpress Caveolin-1. These experiments showed that Caveolin-1 expression favors very early accumulation of B16F10 cells in the lung and in doing so revealed the potential of this cell labeling approach as a useful tool to characterize the early accumulation / distribution of B16F10 cells in C57BL/6 mice. Also, similar experiments should allow us in the future to evaluate the effects of drugs and / or different biological factors on the process of early accumulation / distribution of metastatic cells. These experiments will allow us to improve our understanding of the early events leading to metastasis and possibly modulate the outcome.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

En la actualidad, el cáncer es una de las enfermedades más importantes y una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Su incidencia va en aumento en los países en vías de desarrollo económico. Se estima que en el año 2012 hubo 14,1 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes por cáncer a nivel mundial. Más aún, para el 2025 se cree habrá 20 millones de nuevos casos a nivel mundial (Ferlay et al., 2015).

El cáncer es una enfermedad progresiva que es consecuencia de un proceso multifactorial. Involucra la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos que llevan a la pérdida de la adecuada comunicación entre las células y su microambiente y a la transformación progresiva de células normales en células altamente malignas (Hanahan and Weinberg, 2000). En esta transformación las células adquieren características distintas, como la capacidad de escapar de la regulación de mecanismos encargados de controlar la proliferación celular, generar angiogénesis sostenida, reprogramar su metabolismo energético, evitar la acción del sistema inmune, inestabilidad genómica y una capacidad proliferativa ilimitada, favoreciendo la formación de tumores (Hanahan and Weinberg, 2011).

A pesar de que la eliminación y el tratamiento del tumor primario es a menudo exitoso y que cada vez más pacientes de cáncer pueden ser diagnosticados y tratados precozmente gracias a los programas de control y los avances en detección, la supervivencia de la mayoría de los pacientes sigue siendo baja (Chen et al., 2012). Esto principalmente debido al complejo proceso denominado metástasis, el cual consiste en la propagación de células tumorales a órganos distantes (McClatchey, 1999). La metástasis es la mayor responsable de las muertes por cáncer (sobre el 80%) y a su vez uno de los procesos más enigmáticos asociados a esta enfermedad (Chaffer and Weinberg, 2011). En este sentido, es importante entender mejor los procesos que favorecen el desarrollo de la metástasis (Sahai, 2007).

1.2 METÁSTASIS

La metástasis es el proceso por el cual las células neoplásicas se diseminan a distintos órganos distantes a partir del tumor primario (McClatchey, 1999). Mientras que el inicio de la tumorigénesis implica una serie de cambios genéticos y epigenéticos que llevan a una hiperproliferación celular, la metástasis como proceso está relacionado con cambios en la manera en como la célula se relaciona con su medioambiente, lo cual incluye varias etapas: 1) La invasión de su medio circundante mediante la degradación y el paso a través de una membrana basal o la matriz de colágeno fibrilar de tejido conjuntivo. 2) La

llegada al torrente sanguíneo y/o linfático de las células metastásicas, donde deben sobrevivir en estado de suspensión a los rigores planteados por el transporte a través del sistema circulatorio. Esto implica una dificultad mayor para las células epiteliales ya que normalmente sufren de apoptosis cuando no se encuentran ancladas a la matriz extracelular (anoikis). 3) Detención en el sitio de colonización y la extravasación del sistema circulatorio al parénquima de los tejidos a colonizar. 4) Formación de micrometástasis seguida de la angiogénesis y el crecimiento de tumores secundarios en órganos distantes (Khan and Mukhtar, 2010; Sahai, 2007; Valastyan and Weinberg, 2011).

La metástasis es un proceso muy difícil de estudiar debido a distintas razones, dentro de las que destacan: 1) El número limitado de células implicadas en el proceso metastásico. Se estima que <0,01% de las células tumorales que entran en la circulación sistémica son capaces de desarrollar metástasis macroscópicas clínicamente detectables. 2) Las células tumorales poco después de llegar a los sitios de colonización sufren de apoptosis o entran en dormancia. 3) Actualmente los estudios de metástasis *in vivo*, en su gran mayoría implican la inyección de células tumorales en un sitio determinado del animal modelo y posteriormente la determinación del número de focos de metástasis producidas post mortem (Sahai E. 2007). Este tipo de estudio no permite determinar lo que ocurre entre la inyección y los estudios post mortem, ya que el proceso de metástasis no puede ser observado directamente *in vivo*. Debido a esto, los estudios de metástasis pueden ser descritos como estudios

de “caja negra”, lo que genera mucha especulación de lo que ocurre en las etapas de metástasis (Sahai, 2007; Valastyan and Weinberg, 2011). 4) Por último, un factor importante a considerar es que la velocidad y la forma de la motilidad celular *in vivo* es muy diferente de la observada normalmente en modelos *in vitro* de dos dimensiones. Además, las células cancerosas *in vivo* se mueven a altas velocidades (hasta 15 $\mu\text{m}/\text{minuto}$) y pueden cambiar su morfología rápidamente y la dirección de una manera similar a algunos de los leucocitos (Sahai, 2007). Por estas razones, lo observado *in vitro* no puede relacionarse directamente con lo que ocurre con las células metastásicas en estudios *in vivo*, manteniendo la metástasis como un proceso poco entendido y difícil de estudiar en detalle, especialmente en sus etapas iniciales.

1.3 ESTUDIOS DE METÁSTASIS EN MODELOS DE RATÓN

Para estudiar el proceso de metástasis *in vivo*, se utilizan modelos animales dependientes del tipo de células tumorales empleadas. Dentro de estos, destaca el ratón como un organismo modelo, dado que proporciona un ajuste fisiológico más relevante para estudiar este proceso (Talmadge et al., 2007). Uno de los modelos más populares y versátiles es el de células de melanoma murino B16 y ratones C57BL/6 (ratones inmunocompetentes) (Danciu et al., 2013). Este modelo destaca debido a que las células B16 son singénicas con los ratones C57BL/6, por lo cual no existe rechazo inmunológico. Esta

característica facilita el trabajo con este modelo, ya que permite incorporar el efecto del sistema inmune sobre el estudio de la metástasis, en comparación a modelos que utilizan ratones inmunodeprimidos (Danciu et al., 2013; Fidler, 1975).

Dentro de este modelo, las células B16F10 destacan por ser la línea celular más proliferativa e invasiva, poseen un alto potencial metastásico y son capaces de formar tumores sólidos al ser inyectadas subcutáneamente en ratones C57BL/6, o generar focos de metástasis en el pulmón de los ratones al ser inyectadas por vía intravenosa (visibles después de 7 días) (Danciu et al., 2013; Fidler, 1975). Esto permite realizar estudios comparativos que buscan caracterizar el efecto de mutaciones, cambios de expresión y/o fármacos sobre la metástasis (Diaz-Valdivia et al., 2015; Fidler, 1975; Lobos-González et al., 2013).

Si bien, utilizando este modelo es posible detectar la formación de metástasis en estadios tempranos en el pulmón (detectable a los 7 días y cuantificable a los 15 días), es imposible por medio de esta metodología determinar lo que ocurre con las células tras su inyección a tiempos menores a 14 días (Fidler, 1975; Lobos-González et al., 2013). Esto deja patente la necesidad de obtener herramientas que ayuden a dilucidar lo que ocurre en etapas tempranas post inyección.

En este sentido, los avances en imagenología hoy en día permiten seguir el proceso de metástasis *in vivo*, donde la resolución puede variar desde la observación de tejidos en su conjunto, hasta la observación de estructuras subcelulares, dependiendo del tipo de metodología utilizada para la obtención de imágenes (Sahai, 2007). A pesar de estos avances, aún no es posible seguir los procesos tempranos de la metastasis, dejando patente la necesidad de profundizar estos estudios y desarrollar nuevas y mejores técnicas de obtención de imágenes *in vivo* (Chen et al., 2012; Gao et al., 2004; Sahai, 2007). Esto favorecerá el descubrimiento de los mecanismos de motilidad celular *in vivo*, la interacción entre los diferentes tipos de células en los tumores primarios y en los sitios de metástasis, junto con los factores que afectan la probabilidad y ubicación de las metástasis *in vivo* (Sahai, 2007). Por estos motivos, el desarrollo de metodologías o herramientas que permitan seguir las células al interior de un ser vivo constituyen un gran adelanto en materia de estudios de procesos metastásicos.

1.4 USO DE NANOPARTÍCULAS EN IMAGENOLOGÍA

Un área de estudio que ha tenido un gran auge en estos últimos años es la nanomedicina, la cual consiste en la utilización de nanopartículas (NPs) para el diagnóstico y terapia de distintas enfermedades (Rzizgalinski and Strobl, 2009). Las NPs son pequeñas estructuras de tamaños que varían entre 1 a 100 nm en

alguna de sus 3 dimensiones o en todas estas. Generalmente presentan propiedades muy características y específicas dependiendo de su naturaleza, composición química y estructura, la cuales no se observan en los mismos materiales a tamaño micrométrico. Esto permite su utilización en una gran gama de aplicaciones en investigación y medicina (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009; Sanvicens and Marco, 2008; Yildirimer et al., 2011).

Se ha demostrado que las NPs pueden inducir un efecto sinérgico en la absorción de fármacos ya que favorecen el transporte y almacenamiento de moléculas de interés farmacológicas, así como la acumulación de estas en tejidos específicos (Slowing et al., 2008; Zhang et al., 2006). Además, algunas NPs se utilizan como medio de contraste para imagenología por sus capacidades de fluorescencia, siendo usadas en diagnóstico o como biosensores (Jain, 2006; Yildirimer et al., 2011).

En cáncer, el uso de NPs tiene tres objetivos generales muy importantes. 1) Aumentar la eficacia por dosis de cualquier formulación terapéutica, aumentando la selectividad de los tratamientos. 2) La generación de tratamientos más específicos y menos tóxicos para el ser humano. 3) La generación de nuevas y mejores herramientas en imagenología para la detección precoz de tumores o que permitan estudiar de mejor manera los fenómenos de la carcinogénesis (Heath and Davis, 2008; Rosenblum et al., 2010; Sahai, 2007; Smith et al., 2008).

Con respecto a este último punto, el uso de NPs para imagenología ha permitido mejorar la resolución de imágenes, aumentando el contraste y la sensibilidad de detección de técnicas como tomografía de emisión de positrones (PET), resonancia magnética de imagen (MRI), imagenología óptica (OI), tomografía fotoacústica (PAT) y microscopia, entre otras (Bargheer et al., 2015; Frangioni and Hajjar, 2004; Iversen et al., 2011; Schipper et al., 2007).

De las distintas NPs utilizadas en biomedicina e imagenología, destacan las nanopartículas semiconductoras fluorescentes o QDs, cuyo desarrollo ha permitido un gran avance en el campo de la imagenología por fluorescencia (Chen et al., 2012; Pérez-Donoso et al., 2012; Pericleous et al., 2012; Rzigalinski and Strobl, 2009; Smith et al., 2008). Esto principalmente debido a sus características espectroscópicas únicas que permiten aumentar la sensibilidad, resolución y la multiplexación en imágenes (Heath and Davis, 2008).

1.5 QUANTUM DOTS E IMAGENOLOGÍA EN CÁNCER

Los QDs son nanocristales inorgánicos semiconductores fluorescentes con diámetro entre 1- 20 nm aproximadamente y están formados por un núcleo central constituido por combinaciones de elementos de los grupos II-VI de la tabla periódica (CdSe, CdTe, CdS, PbSe, ZnS y ZnSe) o III-V (GaAs, GaN, InP y InAs). El ancho de banda (band gap) de los QDs depende del tamaño de

estos, por lo cual, el tamaño de la nanopartícula determina la longitud de onda de emisión de fluorescencia, las cuales varían entre los 450 (azul-verde) y 1400 nm (Infrarrojo cercano) (Figura 1A) (Chen et al., 2012; Pérez-Donoso et al., 2012; Smith et al., 2008a).

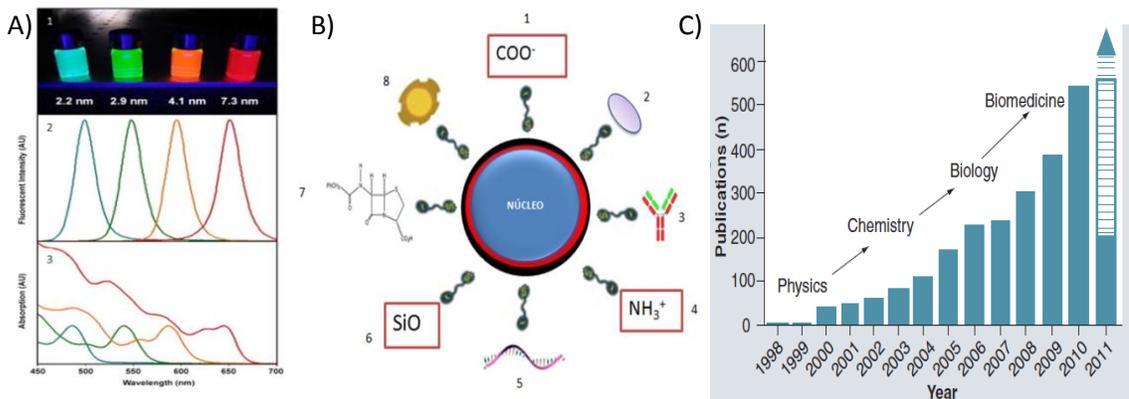


Figura 1: Propiedades espectroscópicas de QDs, su capacidad de conjugación y el auge en su estudio.

A) Las propiedades espectroscópicas de los QDs dependen de su tamaño 1.- Imagen de fluorescencia de QDs de distintos tamaños expuestos a luz U.V. 2.- Espectros de fluorescencia de los QDs. 3.- Espectros de absorción de los QDs. Cabe destacar que los espectros de absorción son amplios y los espectros de emisión son estrechos y muy definidos (Smith et al., 2008a). B) Diagrama esquemático de QDs conjugados con distintas moléculas. En azul se muestra el núcleo de la nanopartícula. En rojo la segunda capa o cobertura que presentan algunas NPs. En negro la 3° capa variable, utilizada dependiendo de las necesidades de funcionalización de la nanopartícula y que puede ser; 1) grupos carboxilos, 2) polietilenglicol u oligosacáridos, 3) anticuerpos, 4) grupos amino, 5) oligonucleótidos, 6) silica, 7) antibióticos o 8) péptidos o proteínas, entre otros (Chen et al., 2012; Smith et al., 2008a; Zheng et al., 2007). C) Con los avances en la síntesis y bioconjugación de QDs, se ha producido un aumento de 100 veces en las publicaciones relativas a QDs en campos que van desde la física a la medicina (Chen et al., 2012).

Los QDs presentan una alta resistencia a la degradación química y a la fotodegradación, poseen un amplio espectro de absorción de luz y picos de fluorescencia estrechos y casi simétricos (Figura 1A). Estas características permiten un ajuste fino para la formación de imágenes ópticas y para la formación de imágenes multispectrales de varios objetivos simultáneamente (Chen et al., 2012; Rosenblum et al., 2010; Zheng et al., 2007). Se ha reportado que las imágenes moleculares basadas en QDs pueden ser de 2 a 3 órdenes de magnitud superior a fluoróforos orgánicos, aumentando la sensibilidad en comparación a estos. Además, la fluorescencia en el infrarrojo cercano de los QDs puede ser detectada en tejidos profundos, haciéndolos excelentes herramientas para la generación de imágenes *in vivo* con una alta diferencia entre la señal y el background (Fang et al., 2012). Todas estas características demuestran lo ventajoso de usar QDs a diferencia de fluoróforos orgánicos (Tabla 1).

En base a esto, en un estudio previo se reportó el uso de QDs para obtener imágenes de tumores *in vivo*, las cuales no podrían lograrse utilizando la proteína fluorescente verde (Gao et al., 2004). En este trabajo se reportó la observación de células metastásicas generadas por células MDA-MB-231 (cáncer de mama) y células C4-2 PSMA positivas (células de cáncer de próstata que contienen el antígeno prostático de membrana), mediante fluorescencia *in vivo* utilizando el sistema Macro-illumination (Lighttools Research) (Gao et al., 2004). Para esto, se inyectaron directamente

nanopartículas semiconductoras fluorescentes o Quantum dots (QDs) de distintos colores (verdes, amarillas y rojas) multifuncionalizados con polietilenglicol (PEG), oxido de tri-(n-octil) fosfina (TOPO) y con o sin anticuerpos anti-PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), en ratones inmunocomprometidos Balb/c desnudos. Este estudio demostró la acumulación pasiva de QDs en tumores y una acumulación selectiva de QDs-antiPSMA en células C4-2PSMA. Además, se logró seguir la marca presente en células MDA-MB-231 y células C4-2 PSMA positivas marcadas con los QDs al ser inyectadas de manera subcutánea en ratones inmunocomprometidos Balb/c desnudos. De esta manera, este estudio ejemplifica un importante avance al mostrar un método de obtención de imágenes de fluorescencia multicolor y sensible de células cancerosas *in vivo* (Gao et al., 2004), revelando las ventajas que poseen los QDs en comparación con los fluoróforos tradicionales, al momento de obtener imágenes de fluorescencia *in vivo*.

Tabla 1: Comparación de las características y aplicaciones entre fluoróforos orgánicos tradicionales y Quantum Dots.

Propiedad	Fluoróforo orgánico tradicional	Quantum Dots
Química	Baja resistencia química	Resistencia a degradación química, y sensible al pH. Dependiente de la cobertura
Espectro emisión	Amplio, con emisión débil en rojo.	Estrechas y simétricas.
Espectro de absorción	Bandas discretas.	Fuerte y amplio.
Tiempo vida fluorescencia	Corto, <5ns, decaimiento monoexponencial	Largo. >10ns, decaimiento multiexponencial.
Estabilidad térmica	Dependiente del color, crítico para colores cercanos al infrarrojo.	Alta, dependiente de la envoltura y ligandos.
Foto estabilidad	Usualmente pobre.	Excelente resistencia al photobleaching - tiempo de observación por minutos u horas
Análisis multiespectral	Posible	Ideal para experimentos multicolor. Más de 5 colores demostrados.

En el año 2014 fue publicado un estudio que buscaba determinar los fenómenos de hipercoagulación y trombosis tempranas que ocurren durante la colonización del pulmón por células tumorales. En este estudio se utilizó el modelo de melanoma murino de células B16-BL6 (línea derivada de células B16F10) (Nakamura et al., 2002) y ratones C57BL/6J, junto con la utilización de

QDs capeados con glutatión, como medio de contraste para determinar el comportamiento del torrente sanguíneo en los pulmones. Gracias a estas herramientas, este estudio logró determinar que las células B16-BL6 eran capaces de obstruir el paso de la sangre en el pulmón, mediante la formación de trombos a los 5 minutos post inoculación en el torrente sanguíneo (Saitoh et al., 2014). Esto evidencia que el uso de QDs como herramienta de contraste, permite importantes avances en estudios de cáncer y metástasis.

1.6 TOXICIDAD DE QDs

Un problema importante en la implementación de los QDs en biomedicina e imagenología es su toxicidad, la cual se relaciona al fenómeno de fototoxicidad y a los metales pesados presentes en su núcleo. Los QDs al ser activados por un fotón, generan un electrón excitado el cual puede ser transferido al oxígeno molecular produciendo oxígeno singlete, el cual inicia una cascada de formación de radicales libres involucrando al agua u otras moléculas biológicas (Rzigalinski and Strobl, 2009; Schneider et al., 2009). Por otro lado, los QDs al sufrir oxidación de su superficie pueden liberar metales pesados presentes en su núcleo, como el Cd^{+2} , el cual es un factor importante en su toxicidad (Derfus et al., 2004). El cadmio es un potente carcinógeno humano, considerado como carcinógeno de 1° categoría por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), cuya acumulación produce toxicidad en el hígado, riñones,

pulmones, cerebro, testículos, corazón y sistema nervioso central (Valko et al., 2005). Los mecanismos de toxicidad por cadmio implican la interacción con grupos tioles presentes en la célula, generando depleción de glutatión, afectando la homeostasis redox al interior de la célula, así como también la depleción de tioles en las proteínas, aumento de la lipoperoxidación de lípidos de membrana, la generación de manera indirecta de radicales superóxido, radicales hidroxilos y especies reactivas de nitrógeno (NOS) (Valko et al., 2005).

La toxicidad de los QDs se ha estudiado en distintos modelos biológicos, donde se ha reportado que QDs de CdTe tienen una gran capacidad de interacción con DNA de doble hebra, produciendo “nicks” en el DNA, tanto en ausencia como en presencia de activación por luz (Xu et al., 2008). En procariontes, se reportó que QDs de CdTe interaccionan con la membrana de *E. coli*, produciendo cambios en la morfología de superficie congruentes con daños por ROS, junto con el aumento de ROS intracelular y la expresión de genes involucrados en respuestas antioxidantes (Lu et al., 2008). Posteriormente, se reportó que la toxicidad de QDs de CdTe se relacionaría mayoritariamente a la liberación de Cd^{+2} , generando los daños antes descritos, donde QDs que poseen mayor contenido de Cd^{+2} generan mayor toxicidad en *E. coli* (Monrás et al., 2014). En modelos vegetales, se ha reportado que tratamientos con QDs de CdSe/ZnS reducen los niveles de glutatión reducido (GSH), con respecto a glutatión oxidado (GSSG) (Navarro et al., 2012). En células animales, ha sido

descrito que los QDs de CdTe presentan diferente distribución al interior de las células, dependiendo de su tamaño y carga, y que por lo tanto presentarían distintos niveles de toxicidad (Lovrić et al., 2005), lo cual estaría mayoritariamente asociada a apoptosis generada por un aumento en los niveles de ROS intracelular (Zhang et al., 2015). En estudios *in vivo* en modelos animales, ha sido reportado que los QDs se distribuyen mayoritariamente en hígado, riñones, pulmones, bazo, nódulos linfáticos y medula ósea (Hardman, 2006; Su and Sun, 2013; Sukhanova et al., 2018). A pesar de esto, sorprendentemente no presentan toxicidad, probablemente debido a que estos se unirían rápidamente a proteínas presentes en el suero, tales como albumina, inmunoglobulinas G, fibrinógeno y apolipoproteínas, entre otras (Sukhanova et al., 2018).

La toxicidad de los QDs depende de la interacción de estos con las células. Y esta interacción depende de múltiples parámetros, como el tamaño de los QDs, su concentración, su carga de superficie, el revestimiento de su superficie, su estabilidad mecánica y/o la actividad redox celular, entre otras (Bradburne et al., 2013; Chen et al., 2012; Rzigalinski and Strobl, 2009; Yildirimer et al., 2011).

Debido a lo anterior, para el desarrollo e implementación de los QDs como herramientas en imagenología orientada a estudios metastásicos tempranos, es importante evaluar la toxicidad e internalización de estos en células (Yildirimer et al., 2011). Así, es relevante determinar los parámetros que permitan obtener

células que al internalizar QDs no pierdan viabilidad ni se afecten sus características metastásicas, dado que el medioambiente redox de las células cancerígenas regula sus características de proliferación, transición epitelio-mesénquima migración, invasión y angiogénesis (Loo, 2003; Wu, 2006).

Por estos motivos, este estudio pretende desarrollar una metodología que permita internalizar QDs en células metastásicas, y al mismo tiempo, disminuir los efectos que dicha internalización pueda provocar, tanto en la viabilidad como en las capacidades metastásicas de estas células. Con la finalidad de utilizar estas células metastásicas marcadas en futuros estudios de metástasis temprana *in vivo*.

Para esto, se han planteado dos metodologías distintas, las cuales han demostrado proteger a las células ante el daño producido por la presencia de QDs y que serán desarrolladas más adelante.

1) La modificación de la capa externa de QDs, la cual disminuiría la interacción de los QDs con el medio intracelular (Lovrić et al. 2005), inhibiendo la producción de ROS y la liberación de Cd^{+2} desde el núcleo de los QDs (Schneider et al. 2009; Cho et al. 2007 y Derfus 2004).

2) El aumentar la capacidad de la célula de tolerar el daño por ROS y/o por la presencia de Cd^{+2} . En este sentido, el GSH intracelular juega un rol primordial, ya que es el principal actor en la detoxificación de ROS y daños asociados a metales pesados (Anderson, 1998; Valko et al., 2005). Esto dado que

tratamientos con NAC protegen a células tumorales ante el daño provocado por la presencia de QDs a diferencia de tratamientos con trolox (antioxidante no tiolado) (Lovrić et al., 2005).

1.7 MANEJO DE LA TOXICIDAD DE QDs MODIFICANDO LA COBERTURA

Los QDs pueden ser recubiertos y/o multifuncionalizados con distintas moléculas orgánicas como ácidos nucleicos, aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, péptidos, polietilenglicol (PEG) y proteínas. También pueden ser recubiertos con moléculas inorgánicas como grupos amonio, carboxilos o metales, entre otros (Figura 1B) (Zheng et al. 2007; Smith et al. 2008; Rzigalinski et al. 2009 y Chen et al 2012).

Esto, permite regular la toxicidad de los QDs (Schneider et al. 2009), favorece la internalización de QDs a nivel celular y permite direccionar los QDs a distintos tipos de células y órganos (Zheng et al. 2007; Smith et al. 2008 y Walling et al. 2009),

Existen muchos ejemplos de moléculas utilizadas como coberturas de los QDs, entre las cuales destacan GSH, ácido mercaptosuccínico (MSA), cisteína (Cys) (Díaz et al., 2012; Pérez-Donoso et al., 2012), óxido de tri-(n-octil)fosfina (TOPO), ZnS, ácido mercaptoacético (MAA)(Derfus et al., 2004), conjugados

con albumina sérica, ácido mercaptoundecanoico (MUA), polietilenglicol (PEG) y PEG modificados, entre muchos otros (Hardman, 2006).

En este sentido, el uso de PEG como cobertura de distintas NPs ha sido muy estudiado dado que disminuye la agregación de las NPs, disminuye la interacción de NPs con las proteínas del suero y proteínas de distintos tejidos, reduce la acumulación de NPs en el sistema retículo endotelial (RES), reduce la interacción con moléculas pequeñas y protege a las NPs de la acción del sistema inmune, entre otras (Jokerst et al., 2011). El PEG es un polímero en espiral hidrófilo no aniónico, compuesto por unidades repetidas de etilen-éter, el cual es de bajo costo, cuyo uso es aprobado por la FDA y es utilizado normalmente en preparados farmacéuticos (Jokerst et al., 2011). Como cobertura de QDs, PEG ha demostrado modificar la distribución de los QDs en los tejidos, permite el “escape” de QDs del RES, disminuye la carga de superficie, aumenta la estabilidad coloidal de los QDs, aumenta la acumulación de nanopartículas al interior de las células en vesículas y disminuye de manera importante su toxicidad (Chen et al., 2012; Rzigalinski and Strobl, 2009; Yildirimer et al., 2011). Por ejemplo, QDs cubiertos con PEG y ácido fólico son capaces de atravesar la membrana celular, aumentando la cantidad de QDs al interior de la célula, a diferencia de QDs cubiertos solamente con PEG los cuales se encuentran solo en la periferia de la célula (Rzigalinski and Strobl, 2009). Otra posibilidad que permite la utilización de PEG como cubierta de QDs, es la modificación de la carga externa de QDs (Smith et al., 2008), permitiendo

manipular la internalización celular (Lovrić et al., 2005; Smith et al., 2008). En este sentido, se destaca que QDs cubiertos con PEG conjugado con polietileno amida (QDs catiónicos) atraviesan la membrana celular y disrumpen organelos endosomales en células vivas, liberando los QDs en el citoplasma (Smith et al., 2008). Estas características hacen del PEG un excelente candidato a ser utilizado como envoltura de QDs, enfocado a modificaciones que busquen aumentar la biocompatibilidad de estos, manipulando la carga de superficie de los QDs y permitiendo la internalización de estos en células.

Con el propósito de generar QDs menos tóxicos, el año 2012 fue publicado y patentado un nuevo método que permite sintetizar de manera fácil y en medio acuoso QDs de CdTe con cobertura de glutatión (QDs-GSH). Este nuevo método de síntesis es de bajo costo, no genera desechos peligrosos y es más conveniente que otros métodos publicados, ya que no involucra la utilización de reactivos peligrosos como el H_2Te (gas tóxico e inflamable), fuertes agentes reductores o atmósferas inertes, etc. (Pérez-Donoso et al., 2012). La ventaja principal de este método es el uso de GSH tanto como agente reductor y estabilizador de los QDs, hecho que lo diferencia de los QDs-GSH sintetizados normalmente, que utilizan el glutatión para estabilizarlo solamente posterior a la síntesis orgánica de los QDs (Chomoucka et al., 2012). De este modo, este método permite realizar la síntesis de QDs con distintos tioles como GSH, MSA y cisteína, junto con adosarles distintas moléculas a los QDs, como proteínas, anticuerpos, PEG, ADN, entre otras, en fase acuosa, de manera rápida, fácil y

económica en comparación a los métodos descritos a la fecha (Díaz et al., 2012; Gautier et al., 2013; Pérez-Donoso et al., 2012).

Los QDs obtenidos por este método han demostrado poseer una mayor biocompatibilidad en comparación a otros QDs existentes. Un estudio realizado por nuestro laboratorio, en conjunto con el grupo del Dr. Pérez-Donoso, demostró que en células MKN45 tratadas con QDs-GSH verdes (3,3 nm) por 24 horas, no se observa muerte celular significativa, incluso a concentraciones de 200 o 400 µg/mL. Resultados que difiere de lo reportado en estudios realizados con QDs de Cd, donde, dependiendo de la cobertura y el modelo celular utilizado, se observa citotoxicidad a concentraciones ≤ 100 µg/mL (Hardman, 2006). En este estudio se determinó que los QDs-GSH no son capaces de ingresar a la célula por si solos y que la internalización de los QDs-GSH solo es posible al utilizar lipofectamina (Life Technologies).

Este estudio también se determinó que la muerte celular producida en células MKN45 varió entre un 10 y un 20% al utilizar lipofectamina más 50 o 100 µg/mL de QDs-GSH, respectivamente. Además, al caracterizar el tipo de muerte generado por los tratamientos con los QDs-GSH, se observó que si bien el grado de apoptosis generado por los tratamientos con QDs-GSH no varió con respecto a los controles, si los tratamientos con 100 µg/mL de QDs-GSH y lipofectamina produjeron un aumento del 9% en la necrosis (Pérez-Donoso et al., 2012). Estudios posteriores demostraron que la internalización de QDs-GSH no genera fragmentación del ADN en células MKN45, confirmando su alta

biocompatibilidad (Díaz et al., 2012). En el año 2013 se reportó que células MKN45 que internalizaron QDs-GSH, gracias a tratamientos con lipofectamina, presentaban una distribución homogénea y mayoritariamente en el citoplasma, junto con el hecho de que los QDs-GSH internalizados mantenían su intensidad de fluorescencia. Además se reportó que la internalización de QDs-GSH utilizando lipofectamina no afectaban la morfología de estas células (Gautier et al., 2013), sugiriendo que no existen efectos tóxicos aparentes consecuencia de la internalización de estos QDs-GSH.

Estos estudios demuestran que es posible obtener células cancerosas marcadas con QDs-GSH en su interior y que si bien la internalización de los QDs-GSH genera un aumento en la muerte celular (Pérez-Donoso et al. 2012), las células marcadas no presentan cambios asociados a toxicidad por QDs-GSH (Díaz et al., 2012; Gautier et al., 2013).

De esta manera, los QDs-GSH demostraron una mayor biocompatibilidad en comparación con otros tipos de QDs, como por ejemplo con QDs cubiertos con otros tioles como ácido mercaptopropionico (MPA), que producen citotoxicidad a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en células de feocromocitomas de ratas (PC12) (Hardman, 2006; Pérez-Donoso et al., 2012), o QDs cubiertos con ácido mercaptoundecanoico (MUA), los cuales demostraron ser citotóxicos a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para células HeLa y en cultivos primarios de hepatocitos (Hardman, 2006; Pérez-Donoso et al., 2012).

En resumen, si bien esta novedosa metodología permite obtener QDs-GSH con propiedades de biocompatibilidad mejoradas, estos QDs-GSH no son capaces de entrar por sí solos a células MKN45, además su internalización produce cierto grado de toxicidad y se desconoce como la internalización podría afectar las capacidades metastásicas de células tumorales. Esto plantea la necesidad de buscar nuevas estrategias que permitan internalizar QDs-GSH en células metastásicas, sin generar un mayor daño a estas, buscando que mantengan sus capacidades metastásicas.

1.8 MANEJO DE LA TOXICIDAD DE LOS QDs-GSH Y SU EFECTO PROTECTOR EN LA CÉLULA

Si bien hasta hoy una de las formas de resolver el problema que presenta la toxicidad de los QDs en sistemas biológicos es la modificación en su envoltura, otra estrategia interesante a abordar es la búsqueda de metodologías que permitan a la célula resistir las formas de toxicidad que presentan los QDs. Una estrategia importante a evaluar, es aumentar la capacidad de la célula de tolerar el daño por ROS y/o por la presencia de Cd^{+2} , donde el GSH intracelular juega un rol primordial (Anderson, 1998; Valko et al., 2005). Por ejemplo, el GSH junto a las metalotioneínas, han demostrado proteger a la célula contra el efecto tóxico del Cd^{+2} , ya sea interaccionando con Cd^{+2} o protegiendo a la célula

contra el ROS producido por los metales en contacto con el medio (Ochi et al., 1988).

El GSH es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina, el cual contiene un enlace γ -peptídico inusual entre el glutamato y la cisteína, que evita que sea hidrolizado por la mayoría de las peptidasas. GSH es el tiol que se encuentra en mayor concentración al interior de la célula (0,2 – 10 mM) y su concentración varía en los distintos órganos (Githens, 1991). El GSH no atraviesa fácilmente la membrana celular, por lo que no es absorbido por las células de manera significativa, además de ser degradado de manera extracelular. Intracelularmente, el GSH es sintetizado por la gamma-glutamylcisteina sintetasa y la GSH sintetasa, siendo usualmente la cisteína el sustrato limitante para su biosíntesis (Anderson, 1998). El GSH está involucrado directamente en la protección de la célula contra el daño por ROS, el transporte de aminoácidos, la regulación de la síntesis de proteínas y ADN, detoxificación de xenobióticos, entre otros (Anderson, 1998). Además se encuentra involucrado directamente en la resistencia a la toxicidad producida por metales al interactuar con ellos, quelándolos (Valko et al., 2005).

Con respecto al efecto protector de GSH a la exposición de NPs, se demostró que tratamientos con N-acetilcisteína (NAC), precursor de la biosíntesis intracelular de GSH (Anderson, 1998), posee un efecto protector al daño celular producido por ROS en células A549 tratadas con NPs de dióxido de titanio o

nanotubos de carbono de pared múltiple. Además, este estudio demostró que el efecto protector relacionado a NAC, aumenta a tiempos prolongados de tratamiento (24 h) en comparación a tiempos cortos de tratamiento (3 h) (Srivastava et al., 2011). Continuando con la línea del efecto protector de NAC, Lovric y colaboradores reportaron que tratamientos con 2mM NAC, previos a la exposición de células tumorales PC12 a 50µg/mL de QDs de CdTe por 24 horas, permiten proteger a células tumorales del daño provocado por la presencia de QDs de CdTe, a diferencia de tratamientos previos utilizando 1mM de Trolox o 38 µM de BSA (Lovrić et al., 2005). Esto sustenta la afirmación de que antioxidantes tiolados tienen una mayor importancia a la hora de elegir un tratamiento para proteger a la célula ante el daño provocado por QDs, en comparación a otros tratamientos.

El NAC es utilizado para aumentar la cantidad de GSH y como antioxidante. El mecanismo de aumento de GSH intracelular por parte de NAC radica en la acetilación presente en la cisteína, la que permite que esta ingrese a la célula aumentando sus niveles y de este modo promoviendo la síntesis intracelular de GSH (Anderson, 1998).

Basado en estos datos, aumentar la cantidad de glutatión intracelular presente en las células mediante el aumento de su biosíntesis mediante tratamientos con NAC, permitiría proteger a las células del daño producido por la internalización de los QDs-GSH, aumentando aún más las posibilidades de obtener células

marcadas con QDs en su interior y poder usarlas en ensayos de metástasis, y posiblemente en un futuro cercano, poder observarlas en ensayos de metástasis temprana *in vivo*.

En resumen, la necesidad de estudiar y desarrollar mejores técnicas para la obtención de imágenes *in vivo*, que permitan realizar estudios de motilidad celular y metástasis, implicaría un gran salto y un importante adelanto en materia de estudios de procesos metastásicos. En este sentido, el uso de QDs ha demostrado ser una excelente herramienta para la obtención de imágenes *in vivo*, debido a sus características únicas de fluorescencia y estabilidad. Sin embargo, el uso de QDs se ve limitado por la toxicidad que estos presentan en sistemas biológicos. Para lograr esto, resulta necesario desarrollar metodologías que permitan obtener células metastásicas con QDs en su interior sin afectar las características metastásicas de las células marcadas.

RESUMEN DE ANTECEDENTES

1.- Existe la necesidad de generar herramientas para seguir células metastásicas que permitan realizar estudios tempranos de metástasis.

2.- Durante años se ha propuesto el uso de QDs como herramientas para marcar tumores y/o células cancerosas. Sin embargo, su uso se ve limitado por la toxicidad que estos presentan, relacionada principalmente con la generación de ROS y/o presencia de Cd⁺² en su núcleo.

3.- La toxicidad que presentan los QDs en sistemas biológicos puede ser disminuida mediante modificaciones en su cobertura, o con tratamientos que permitan a la célula soportar el daño producido por estos. En este sentido, se ha reportado que el uso de PEGs disminuye de manera importante la toxicidad de QDs y que tratamientos con NAC protege a la célula del daño provocado por QDs de CdTe.

4.- La incorporación de nanopartículas al interior de células animales puede ser potenciada modificando la carga de las NPs (NPs catiónicas son mayoritariamente internalizadas), o utilizando vehículos lipídicos como lipofectamina.

5.- Nuestro grupo desarrolló un método de síntesis de QDs de CdTe-GSH, los cuales presentan mayor biocompatibilidad y pueden ser utilizados para marcar células cancerosas sin alterar su morfología.

6.- Se desconoce el efecto que la internalización de QDs de CdTe-GSH pueda producir en las capacidades de migración o invasión de células metastásicas.

De esta manera y basado en los antecedentes mencionados, se propone la siguiente hipótesis de trabajo.

HIPÓTESIS

Tratamientos con N-acetilcisteína y/o modificaciones con PEGs en la cobertura de QDs-GSH favorecen el marcaje de células de melanoma murino B16F10 con QDs-GSH, permitiendo su uso en ensayos de metástasis temprana.

OBJETIVO GENERAL

Generar una metodología que permita obtener células de melanoma murino B16F10 marcadas con QDs-GSH en su interior, que posean el potencial de ser utilizadas en estudios de metástasis temprana utilizando ratones de la cepa singénica C57BL/6.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Sintetizar y caracterizar QDs-GSH (verdes o rojas) con distintas modificaciones en su cobertura (SH-PEG, SH-PEG-COOH o SH-PEG-NH₂).
- 2.- Determinar la metodología que permita obtener el mayor porcentaje de células B16F10 viables marcadas, buscando modular el aumento de ROS intracelular relacionado a la incorporación de QDs-GSH.
- 3.- Estudiar el efecto de la incorporación de QDs-GSH mediante la metodología seleccionada, en la migración, invasión, proliferación y la capacidad de generar metástasis *in vivo* de las células B16F10 marcadas.

4.- Determinar las condiciones necesarias para utilizar células B16F10 marcadas con QDs-GSH en ensayos de metástasis *in vivo* en ratones C57BL/6.

2. METODOLOGÍA

2.1. LÍNEAS CELULARES

B16F10: Línea celular de melanoma murino singénica con ratones C57BL/6, generada a partir de 10 ciclos de inoculación y recuperación en el pulmón de células B16F0 en ratones C57BL/6. Se caracteriza por ser una línea tumoral adherente y altamente metastásica. Esta línea celular no expresa caveolina-1 por lo que fueron transfectadas establemente con los vectores pLacIOP (Mock) y pLacIOP-caveolina-1 (CAV1), para expresar caveolina-1 de manera inducible por IPTG. Estas líneas son de uso habitual en estudios de nuestro laboratorio, donde para generar líneas establemente transfectadas se seleccionó las células con 750 μ g/ml de higromicina por 3 semanas y las líneas celulares fueron caracterizadas mediante Western blot.

MKN45: Línea celular humana derivada de cáncer gástrico. Se caracteriza por ser una línea tumoral derivada de cultivo primario y adherente. Obtenidas directamente de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI (GIBCO) suplementado con 10% suero fetal bovino (bioind) y antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomomicina 100 μ g/mL) a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de

CO₂. Las células fueron subcultivadas cada 2 o 3 días. Para ambas líneas celulares, los experimentos fueron realizados entre los pasajes 10 y 20 de cultivo.

2.2 SÍNTESIS QUÍMICA DE QDs-GSH

QDs-GSH fueron sintetizados utilizando el protocolo descrito por Pérez-Donoso y colaboradores (Pérez-Donoso et al., 2012). Utilizando tampón bórax citrato 15mM a pH 9,4, se preparó la solución de síntesis, que contiene CdCl₂ (40μM) K₂TeO₃ (10 μM) y 10 o 15mM de glutatión, dependiendo del experimento. La solución de síntesis fue calentada a 90°C durante aproximadamente 2 horas, para obtener QDs-GSH verdes, o 6 horas para obtener QDs-GSH rojos. La reacción de síntesis fue detenida al guardar la solución de síntesis a 4°C. Las distintas soluciones de síntesis fueron dializadas en tampón bórax citrato 15mM a pH 9,4 durante 2 horas. Las soluciones de QDs-GSH dializadas fueron liofilizadas y posteriormente se cuantificó su masa. Finalmente, los QDs-GSH fueron disueltos en agua nanopura (resistencia de 18,2 MΩ) pH 8,0, hasta llegar a una concentración de 10mg/mL.

2.2 FUNCIONALIZACIÓN DE LOS QDs-GSH CON PEG

La modificación de superficie de los QDs-GSH (funcionalización) se realizó utilizando polietilenglicol (PEG) 5000MW que posee un grupo tiol terminal (Tiol-

PEG), Tiol-PEG-carboxilato (SH-PEG-COOH), Tiol-PEG-amino (SH-PEG-NH₂) o Tiol-PEG-Metilo (Tiol-PEG-Met). Para el proceso de funcionalización se utilizaron 1 ml de solución de QDs-GSH o QDs-GSH10 verdes (1mg/ml) y 600 µl de solución 5mM (pH 8) de los distintos SH-PEG (SH-PEG-COOH, SH-PEG-NH₂ y SH-PEG-Met). Las soluciones fueron incubadas por 1 semana a 4°C. Posteriormente se lavó y se concentró las soluciones utilizando agua nanopura y un dispositivo Amicon Ultra de 10kDa (Milipore). Finalmente, el concentrado de QDs-GSH-PEGs se llevó a un volumen de 1ml.

2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS QDs

La caracterización espectroscópica de los distintos QDs utilizados se realizó utilizando un lector multimodal (fluorescencia y absorbancia) de microplacas Sinergy-H1M (Biotek) y soluciones de 1mg/mL de los distintos QDs. La caracterización de tamaño y carga de los distintos QDs utilizados se realizó utilizando el sistema Zetasizer nano S90 light (Malvern Instruments Limited, UK), que permite determinar el diámetro de la nanopartícula por dispersión dinámica de la luz (DLS) y el potencial Zeta por electroforesis Doppler con láser.

2.4 CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTOS CON LOS DISTINTOS QDs

Para los ensayos de viabilidad, las células fueron tratadas con 0, 50 100, 200 y 400 µg/mL de los distintos QDs, en medio de cultivo suplementado con lipofectamina (4µL/mL) o sin lipofectamina (invitrogen). Estas células fueron

sembradas en placas de 24 pocillos 24 horas previas a la exposición a los QDs-GSH y posteriormente fueron expuestas a las distintas concentraciones de QDs durante 24 horas. Finalmente, la viabilidad y el marcaje de células B16F10 fueron determinados mediante citometría de flujo.

2.5 TRATAMIENTOS CON NAC

Células B16F10 fueron tratadas con 0, 2, 4, 8 y 10 mM de NAC durante 24 horas previas a los tratamientos con QDs-GSH y con 0, 2, 4, 8 y 10 mM de NAC durante los tratamientos con QDs-GSH, dependiendo del experimento realizado. Para todos los casos, tratamientos y pre-tratamientos fueron realizados utilizando la misma concentración de NAC.

2.6 DETERMINACIÓN DE TIOLES REDUCIDOS EN CÉLULAS B16F10

Células B16F10 y células MKN45 fueron cultivadas en placas de 60 mm con medio RPMI 10% suero fetal bovino y 0, 2, 4, 8 y 10 mM de NAC, dependiendo del experimento, hasta una confluencia cercana al 90%. Posteriormente fueron colectadas y lavadas con PBS y resuspendidas en 200µL de solución de ácidosulfosalicílico (SSA) al 5%. Las muestras fueron divididas en dos porciones equivalentes, una para determinar el total de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) y la otra para la determinación de tioles intracelulares mediante ensayo de Ellmans (Ellman, 1959; Riddles et al., 1979; Riener et al., 2014). Las suspensiones de células fueron lisadas mediante 20

ciclos de congelación /descongelación y luego centrifugadas a 24000 x g por 20 minutos. Sobrenadantes fueron colectados y usados en la determinación de tioles utilizando reactivo de Ellman y dejando reaccionar durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se determinó la absorbancia del sobrenadante a 412 nm (Ellman, 1959; Riener et al., 2014). La curva de calibración para la determinación de tioles reducidos se realizó utilizando como patrón, soluciones de GSH de concentraciones conocidas. Los niveles intracelulares de tioles reducidos (RSH) se presentan normalizados por cantidad de proteína presentes en la célula.

2.7 PROMOCIÓN DE LA INCORPORACIÓN QDs-GSH

La incorporación de los distintos QDs-GSH a las células fue promovida utilizando Lipofectamina 2000 (invitrogen) 4 µl/mL en medio de cultivo, durante tratamientos con los distintos QDs por 24 h, tal como se describió previamente (Pérez-Donoso et al., 2012).

2.8 CITOMETRÍA DE FLUJO: DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD, MARCAJE Y NIVELES ROS

La viabilidad celular, el porcentaje de células viables marcadas, la intensidad media de fluorescencia (IFM) y los niveles de ROS, fueron determinadas mediante citometría de flujo. Las células B16F10 tratadas con los distintos QDs fueron lavadas dos veces con PBS, soltadas con Tripsina-EDTA 0,5% y centrifugadas a 150 x g por 5 minutos. A continuación, el pellet celular fue

lavado con Flow Buffer (BD, USA), y centrifugado como se describió anteriormente. Células tratadas con los distintos QDs verdes fueron incubadas durante 10 minutos con Ioduro de Propidio (PI) 10 µg/ml (Invitrogen), para medir muerte celular. Por otro lado, células B16F10 tratadas con QDs-GSH rojos fueron marcadas con Calceina AM (marcador verde fluorescente para células viables) usando el LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit para células de mamíferos (Invitrogen) 1:100000 para determinar viabilidad y con dihidrodiclorofluoresceína (H2DCFDA) 1:10000 para determinar niveles de ROS. Los resultados para todos los tipos de marcajes fueron resueltos mediante citometría de flujo (Becton Dickinson, USA). Para todas las muestras se analizaron cinco mil eventos para determinar el tamaño (Forward Scatter - FSC) y parámetros de granulosidad (Side Scatter - SSC), excluyendo debris celular. Células marcadas con los distintos QDs verdes, Calceina (B16F10_{Calceina}) y con H2DCFDA, fueron determinadas a través del canal FITC (fluorescencia verde); células marcadas con QDs-GSH rojo y PI fueron determinadas a través de canal PerCP-Cy5 (fluorescencia roja). Ambas emisiones fueron obtenidas median excitación a 488 nm. Porcentaje de células viables marcadas con QDs verdes o rojos, fueron determinados mediante la siguiente ecuación: $\frac{\text{Células viables marcadas con QDs}}{\text{Total celulas viables}} \times 100$.

El I.M.F. fue determinada mediante citometría de flujo para células B16F10 viables marcadas con QDs y B16F10 control. Los datos fueron analizados con

el software *FCS Express 4 plus research edition* (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

2.9 MICROSCOPIA CONFOCAL

Todas las secciones obtenidas para estudios de internalización de QDs-GSH y co-localización fueron realizadas utilizando una suspensión de células obtenidas mediante el protocolo descrito para la realización de citometría de flujo e incubación con Calceina AM tal como se describió previamente. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Zeiss modelo LSM 700. Se utilizó el láser de excitación a 488 nm. La fluorescencia verde (Calceina AM) y roja (QDs-GSHr) fueron seguidas a 510 y 600 nm respectivamente.

Para ensayos de invasión, células B16F10 o B16F10QDs-GSH-10NAC presentes en la parte inferior de membranas de pocillos de matrigel, fueron marcadas utilizando DAPI 1:1000 por 5 minutos. Posteriormente estas membranas fueron lavadas dos veces y fijadas en DACO solución fluorescente. La visualización de células fue realizada con un microscopio Zeiss modelo LSM 700. Se utilizó el láser de excitación a 405 nm. La fluorescencia asociada a DAPI y QDs-GSHr fueron seguidas a 460 y 600 nm, respectivamente.

Estudios de co-localización y procesamiento de imágenes fueron realizados utilizando el software ImageJ 1,47v (National Institutes of Health, USA).

2.10 ENSAYOS DE MIGRACIÓN

Los ensayos fueron realizados utilizando pocillos transwells con membranas de policarbonato con poros de 8 μm (diámetro 6,5 mm) (Corning, NY, USA). Las membranas fueron cubiertas con 100 μL de solución de fibronectina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 12 horas previas a la realización de los ensayos de migración. Posteriormente, los pocillos transwells fueron lavados con PBS y depositados en placas de 24 pocillos que contenían medio de cultivo 500 μL RPMI suplementado con 10% suero fetal bovino, descrito anteriormente. La suspensión de $1,5 \times 10^5$ células marcadas y sin marcar con QDs-GSHv y QDs-GSHr (en medio RPMI sin suplementar), fueron depositados al interior de pocillos transwells. Los insertos fueron colectados posteriores a las 2 horas de ensayo y el exceso de células fue removido (interior del pocillo). Las células migratorias fueron fijadas a las membranas de transwells y teñidas utilizando solución de cristal violeta 0,1% en metanol al 20%, durante 2 horas a 37°C. Finalmente, fue determinado el número de células migrantes mediante conteo por microscopia óptica. Al menos 7 campos visuales fueron evaluados para determinar el número de células migratorias. Se presentan datos normalizados por el número de células migrantes presentes en el control.

2.11 MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Imágenes de células migratorias, marcadas o sin marcar con QDs-GSHr, fueron visualizadas desde membranas de transwells preparadas como se describe

anteriormente, utilizando un microscopio invertido CKX41 con fuente de luz fluorescente U-LH100HG (Olympus, Japan). Los imágenes fueron procesadas utilizando el software ImageJ 1,47v (National Institutes of Health, USA).

2.12 ENSAYOS DE INVASIÓN

Los ensayos fueron realizados utilizando cámara de invasión con poros de 8 μm y matrigel (Corning, NY, USA), las cuales fueron hidratadas con medio RPMI, 10% SFB, antes descrito, durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, las cámaras de invasión fueron depositadas en placas de 24 pocillos que contenían 500 μL de RPMI 10% SFB y el exceso de medio presente en su interior fue gentilmente removido. Subsecuentemente, las suspensiones de $1,5 \times 10^5$ células marcadas y sin marcar con los distintos QDs (en medio RPMI sin suplementar), fueron depositados al interior de pocillos y se dejaron por 24 horas a 37°C. Los insertos fueron colectados y el exceso de células fue removido (interior del pocillo). Las células invasoras fueron fijadas a las membranas con etanol frío durante 2 minutos y teñidas con azul de toluidina al 1% durante 2 horas a 37°C. Finalmente, fue determinado el número de células migrantes mediante conteo por microscopía óptica. Al menos 7 campos visuales fueron evaluados para determinar el número de células migratorias. Se presentan datos normalizados por el número de células migrantes presentes en el control.

2.13 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y PERSISTENCIA DE MARCA ASOCIADA A QDs-GSH

Los ensayos fueron realizados utilizando 1×10^5 células viables B16F10 y células B16F10 marcadas con QDs-GSHr en presencia de 10 mM de NAC (B16F10_{QDs-GSH-10NAC}). Las células fueron sembradas en placas de 60 mm y cultivadas con el medio RPMI, 10% SFB previamente descrito, y cultivadas por 1 a 5 días. Posteriormente, las células fueron soltadas con Tripsina-EDTA 0,5% y centrifugadas a 150 x g durante 5 minutos. El pellet celular fue lavado con PBS y resuspendido en 200 μ L de PBS. El número total de células fue cuantificado en una cámara de Neubauer (Mariendfeld, Germany) utilizando una alícuota de 20 μ l de suspensión celular teñido con 20 μ l de azul de tripan 0,5% (Biological industries). El porcentaje de viabilidad, de células viables marcadas y el I.M.F. fueron determinados por citometría de flujo utilizando el volumen restante de suspensión de células (180 μ l) y la metodología previamente descrita.

2.14 ENSAYO DE METÁSTASIS *IN VIVO*

Ratones C57BL/6 de 8-12 semanas de edad, fueron inyectados a través de la vena de la cola con 2×10^5 células B16F10_{CONTROL} o células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, en 500 μ L de suero fisiológico. Luego, fue evaluada la sobrevivencia de los animales durante 21 días, al final de los cuales los ratones fueron sacrificados. Los pulmones fueron colectados y guardados en solución Fekete (etanol 70%, formaldehído 37% y ácido acético glacial en proporción 20:2:1) (Wexler, 1966)

durante una semana. Posteriormente, la masa tumoral (negra) fue separada del resto de los pulmones y su masa fue determinada. El porcentaje de metástasis se expresa como : $\frac{\text{Masa tejido negro}}{\text{Masa total del pulmon}} \times 100$.

2.15 IMÁGENES OBTENIDAS POR IVIS DE RATONES Y PULMONES

Los ratones C57BL/6 fueron inyectados a través de la vena de la cola con 2×10^5 células B16F10 o células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, en 500 μL de suero fisiológico. Posteriormente, los ratones fueron observados durante 6 horas en un sistema de imagenología *in vivo* (In Vivo Imaging System o IVIS) *In-Vivo FX PRO* (Bruker, Massachusetts, USA). Se utilizó una longitud de onda de excitación de 410 nm y de lectura de emisión a 600 nm. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados y colectados sus pulmones, los cuales fueron guardados en solución Fekete (Wexler, 1966) por al menos una semana antes de obtener imágenes nuevamente en IVIS.

2.16 IMÁGENES EX VIVO POR IVIS

Ratones C57BL/6 fueron inyectados a través de la vena de la cola con 2×10^5 células B16F10 o células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, en 500 μL de suero fisiológico. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados a los 5 minutos, 30 minutos, 2 horas, 6 h y 24 horas post inyección. Los pulmones, corazón, bazo, timo, riñones e hígado fueron colectados post eutanasia y conservados en solución fekete durante por lo menos una semana antes de ser observados en IVIS y

cuantificada su fluorescencia (R.O.I. promedio). El porcentaje de fluorescencia se expresa como : $\frac{R.O.I.organo}{R.O.I. organo control} \times 100$.

2.17 ENSAYO DE INMUNOHISTOQUIMICA

Los pulmones de ratones C57BL/6 fueron colectados a las 6 y 24 horas post inyección de células B16F10 control, B16F10_{QDs-GSH-10NAC} y B16F10_{Calcein}. Luego fueron fijados en solución PBS con 10% formalina, pH 7,0 por al menos una semana y posteriormente embebidos en parafina. Para muestras de tejido, se colectaron series de cortes de 5 µm de grosor en placas salinas (DAKO), para luego ser desparafinadas con dos lavados consecutivos de xileno durante 5 minutos. Secciones intercaladas fueron teñidas con hematoxilina eosina (H&E). El resto de las secciones fueron lavadas y rehidratadas con inversiones de 3 minutos en soluciones de 98% y 90% de etanol, y una vez en agua destilada tratada con DEPC durante 5 minutos. Luego las secciones fueron incubadas con 2,5 µg/mL de proteinasa K (Invitrogen) a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se lavaron dos veces durante 3 minutos en agua destilada tratada con DEPC. El núcleo fue teñido con DAPI 1:1000 durante 5 minutos y fue teñido utilizando Faloidina 1:1500 durante 10 minutos. Luego las secciones fueron lavadas 2 veces con agua destilada tratada con DEPC y finalmente fueron embebidas con medio de montaje de fluorescencia (DAKO). Las imágenes fueron capturadas en 100X usando un filtro para fluorescente en microscopio Olympus (Olimpus, Tokio, Japón).

2.18 PRUEBA DE CONCEPTO

Una suspensión de 500 μ L de suero fisiológico que contenía 2×10^5 células viables B16F10_{QDs-GSH-10NAC} establemente transfectadas con el vector vacío pLacIOP [B16F20(Mock)] o 2×10^5 células viables B16F10_{QDs-GSH-10NAC} establemente transfectadas con el vector pLacIOP-CAV-1, para la sobreexpresión estable de caveolina-1 [B16F10(CAV-1)], fueron inyectadas a través de la vena de la cola en ratones C57BL/6. Posteriormente los ratones fueron sacrificados a las 6 horas post-inyección y colectados sus pulmones, los cuales fueron guardados en solución fekete por una semana antes de obtener imágenes en un sistema de imagenología *in vivo* (In Vivo Imaging System o IVIS) *In-Vivo FX PRO* (Bruker, Massachusetts, USA). Para la obtención de imágenes se utilizó una longitud de onda de excitación de 410 nm y de lectura de emisión a 600 nm.

2.19 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos fueron realizados al menos 3 veces por separado. Los datos se presentan como promedio \pm S.E.M. La significancia estadística se analizó con el test no-paramétrico de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos dados y el test no-paramétrico de Kruskal-Wallis para múltiples comparaciones entre distintos grupos, con un post test de Dunn. Para el análisis de los datos, un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

Todos los ensayos *in vivo* fueron realizados como estudios ciego simple (ensayo metástasis *in vivo* y ensayo imagenología *in vivo*) o estudios de doble ciego (imagenología de ratones C57BL/6 y sus pulmones, ensayos de inmunohistoquímica y prueba de concepto).

3. RESULTADOS

3.1 OBJETIVO ESPECIFICO 1

Sintetizar y caracterizar QDs-GSH (verdes o rojas) con distintas modificaciones en su cobertura (SH-PEG, SH-PEG-COOH, SH-PEG-NH₂).

3.1.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DISTINTOS QDs-GSH VERDES O ROJOS, Y FUNCIONALIZACIÓN DE QDs-GSH VERDES CON SH-PEGs

Se sintetizaron QDs-GSH verdes (QDs-GSHv) y rojos (QDs-GSHr) utilizando 15 mM de GSH, tal como se describió en materiales y métodos (método de síntesis biomimético de QDs-GSH). Los análisis de las características físicas y espectroscópicas de los QDs indicaron que los QDs-GSHv sintetizados poseen un diámetro de $1,4 \pm 0,8$ nm, potencial Z promedio de -68 mV, y un pico de emisión entre los 490-495 nm. Por su parte, los QDs-GSHr poseen un diámetro de $5,1 \pm 1,1$ nm, potencial Z promedio de -13,6 mV y un pico de emisión de 610 nm (Tabla 2).

Antecedentes previos publicados por nuestro laboratorio indican que QDs-GSHv son capaces de internalizarse de mejor manera en células MKN45 que QDs-GSHr (Díaz et al., 2012). Estos antecedentes presentan a QDs-GSHv, como mejores candidatos para ser utilizados en la internalización de QDs-GSH en células B16F10 y por consiguiente, fueron seleccionados para los

posteriores ensayos de funcionalización utilizando SH-PEG-COOH, SH-PEG-MET y SH-PEG-NH₂.

Tabla 2: Tamaño, potencial Z y propiedades espectroscópicas de QDs-GSH10 verdes y QDs-GSH Rojos.

Característica	QDs-GSHv	QDs-GSHr
Diámetro (nm)	1,4 ± 0,8	5,1 ± 1,1
Potencial Z (mV)	-68,6 ± 9	-13,6 ± 2,2
Pico Emisión (nm)	490-495	610

Para la determinación del diámetro hidrodinámico y el potencial Z se tomaron los valores de por lo menos 3 determinaciones distintas de la misma solución de QDs.

La funcionalización de los QDs-GSHv fue realizada utilizando un método que fue denominado “recambio de tioles”, en el cual los QDs-GSH son incubados con los distintos SH-PEGs a una concentración de 5 mM durante una semana a 4°C. Estos SH-PEGs poseen en su estructura el grupo tiol que les permite interactuar con el núcleo de cadmio del QDs-GSH. El tamaño, el potencial Z, y las características espectroscópicas de los distintos QDs-GSH funcionalizados con los distintos PEGs (QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂) fueron analizadas utilizando las metodologías antes descritas y sus resultados se muestran en Tabla 3.

Tabla 3: Tamaño, potencial Z y propiedades espectroscópicas de QDs-GSH, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂.

Característica	QDs-GSHv	QDs-PEG-COOH	QDs-PEG-MET	QDs-PEG-NH ₂
Diámetro _(nm)	1,4 ± 0,8	2,6 ± 0,6 4,5 ± 1,3	2,7 ± 0,9	2,6 ± 2,5 5,4 ± 1,5
Potencial Z _(mV)	-68,6 ± 9	-20,2 ± 2,4	-12,3 ± 2	-11,4 ± 2,5
Pico Emisión _(nm)	490-495	490-495	490-495	490-495

Se muestran los resultados obtenidos en la caracterización del diámetro hidrodinámico, potencial Z y caracterización espectroscópica de los distintos QDs sintetizados. Para la determinación de diámetro hidrodinámico y el potencial Z se tomaron los valores de al menos 3 determinaciones distintas de la misma solución.

Los resultados de la caracterización de QDs-GSHv funcionalizados con SH-PEG-COOH, SH-PEG-MET y SH-PEG-NH₂ (QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂, respectivamente), mostraron que estos QDs-PEGs mantienen el mismo pico de emisión que QDs-GSHv precursores. Sin embargo, se observaron cambios en el diámetro hidrodinámico y potencial Z de los QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂, en comparación a los QDs-GSHv precursores. Se determinó una disminución en el potencial Z de los QDs-PEG-COOH (-20 mV promedio), QDs-PEG-MET (-12 mV promedio) y QDs-PEG-NH₂ (-11mV promedio) en comparación a QDs-GSHv precursores (-68 mV promedio). Además, se observó un aumento en el diámetro hidrodinámico en QDs-PEGs en comparación con QDs-GSHv precursores de entre 1,2 nm a 4

nm aproximado, dependiendo del SH-PEG utilizado para la funcionalización (Tabla 3). Estos resultados sugieren una modificación en la cobertura de los QDs-GSHv, ya que solo se observaron cambios en el tamaño y potencial Z, manteniéndose las propiedades espectroscopias de los QDs funcionalizados.

Al analizar los histogramas obtenidos por DLS (Figura 2), se observó una dispersión de tamaños mayor en los QDs-PEGs en comparación con los QDs-GSHv precursores, evidenciado por una variación de 1,5 y 10 nm, dependiendo del tipo de QDs-PEGs. Además, se observó la presencia de 2 picos de tamaños en soluciones que contienen QDs-PEG-COOH y QDs-PEG-NH₂, indicando la presencia de 2 poblaciones de distinto tamaño presentes en la solución. Estos resultados sugieren que las soluciones de QDs-PEGs están compuestas de QDs con distinto contenido de PEGs en su superficie.

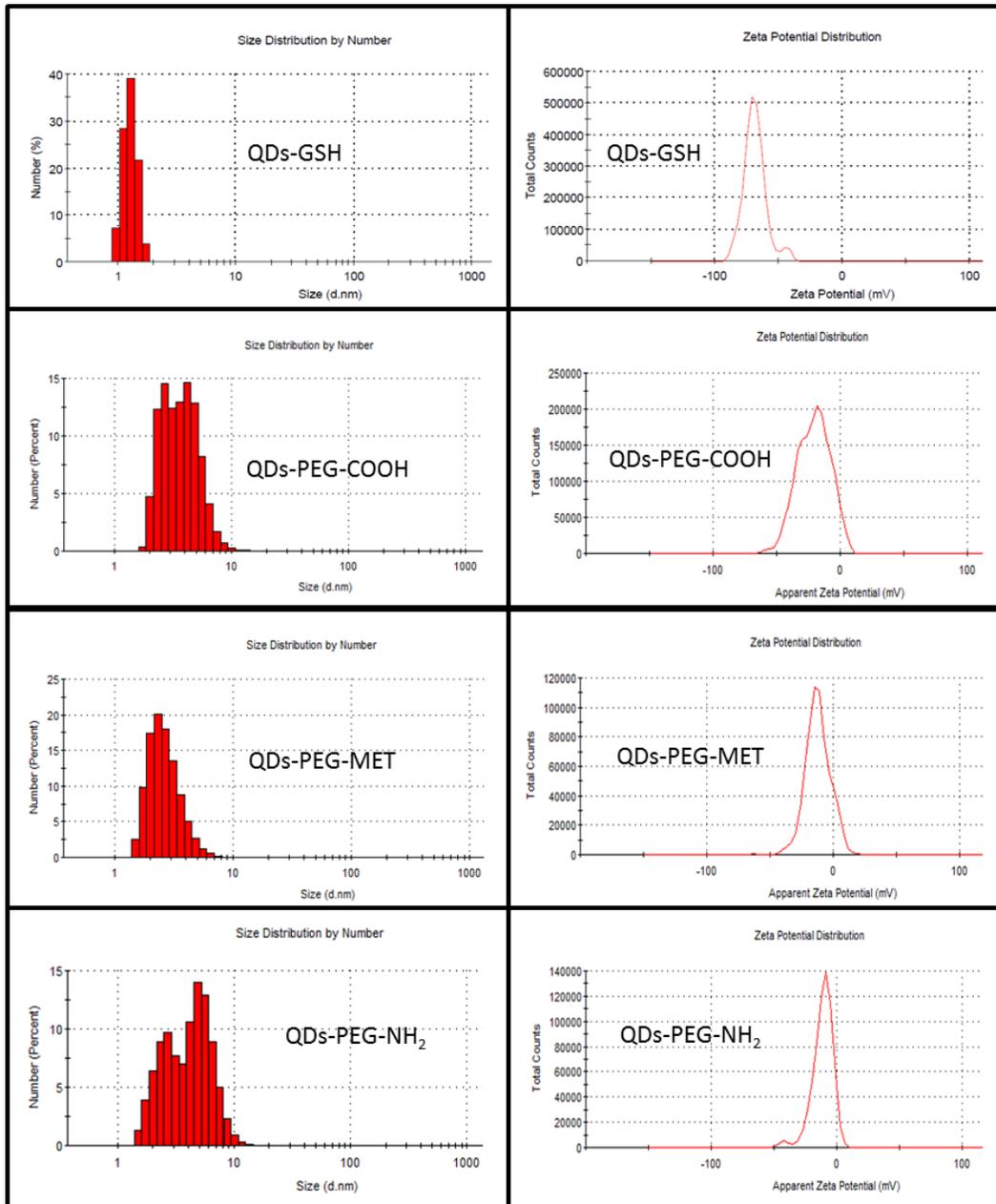


Figura 2: Determinación de tamaño y potencial Z de QDs-GSH, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂.

En el panel izquierdo se muestra el histograma de tamaños obtenidos por DLS (diámetro hidrodinámico) de QDs-GSH, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂ (de arriba hacia abajo respectivamente). En el panel derecho se muestra el análisis de potencial Z de QDs-GSH, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂ QDs-PEG-NH₂ (de arriba hacia abajo respectivamente). Se muestra el promedio de al menos 3 caracterizaciones realizadas en la misma solución de QDs.

En resumen, los resultados obtenidos en la caracterización de los QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂ sintetizados, sugiere que el protocolo para la síntesis y funcionalización utilizados permiten obtener QDs con PEGs en su capa externa, evidenciado por el aumento en el diámetro de los QDs funcionalizados y la disminución en la carga externa de estos. Sin embargo, la población de QDs funcionalizados no es homogénea en su tamaño, sugiriendo la presencia de QDs-GSH con distintos niveles de PEGs en su superficie en la solución.

Antecedentes no publicados de nuestro laboratorio indican que la cantidad de GSH presente en la capa externa de los QDs-GSH de tamaños cercanos a los 2 nm, formaría una densa cobertura que no permitiría una buena interacción de otros tioles con el núcleo del QDs-GSH, dificultando la funcionalización por la metodología utilizada. Además, el método de síntesis biomimético de QDs-GSH permite sintetizar QDs utilizando distintos tipos de tioles (Díaz et al., 2012), junto con la posibilidad de sintetizar QDs-GSH utilizando una menor concentración de GSH, agregando un agente reductor en la solución (datos no publicados).

Tomando en cuenta estos antecedentes y buscando producir una población más homogénea de QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂, se realizó la síntesis de QDs-GSHv utilizando 10 mM de GSH (QDs-GSH10). Posteriormente se realizó la funcionalización mediante el protocolo de “recambio de tioles” utilizando QDs-GSH10 para favorecer la interacción de los

SH-PEGs con el núcleo de los QDs, y así saturar la superficie de los QDs con los distintos PEGs.

QDs-GSH10 fueron sintetizados mediante el método biomimético, con las modificaciones descritas en materiales y métodos que implican utilizar 10mM de GSH y 0,1 mg/mL del reductor Borohidruro de Sodio (NaBH_4) en la solución de síntesis. Los resultados indican que QDs-GSH10 poseen un diámetro de $1,8 \pm 0,2$ nm, con potencial Z de $-43,5 \pm 0,8$, y un pico de emisión a 490 nm.

Posteriormente se determinaron las características espectroscópicas, diámetro hidrodinámico y potencial Z de los distintos QDs funcionalizados con los distintos PEGs (QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂) (Tabla 4). Para la caracterización espectroscópica de los distintos QDs se utilizaron soluciones de una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

La caracterización de los QDs-GSH10 mostró que estos poseen un diámetro hidrodinámico de $1,8 \pm 0,2$ nm, un potencial Z promedio de $-43,5 \pm 0,8$ mV, y un pico máximo de emisión de 490 nm (Tabla 4).

Además, los resultados indicaron que los distintos QDs-PEGs poseen similares características espectroscópicas que los QDs-GSH10 precursores. La caracterización física de los QDs-PEG muestra un aumento en el diámetro hidrodinámico de los QDs-PEGs en comparación a los $1,8 \pm 0,2$ nm de diámetro hidrodinámico de los QDs-GSH10 precursores, donde se determinó un diámetro de $2,7 \pm 0,7$ nm para QDs-PEG-COOH, $3,7 \pm 0,9$ nm para QDs-PEG-MET y $3,5 \pm 0,9$ nm para QDs-PEG-NH₂.

Los histogramas obtenidos por DLS (Figura 3, panel izquierdo), muestran poblaciones homogéneas en comparación a las obtenidas previamente (Figura 2, panel izquierdo), para QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂. Resultados de la caracterización de carga de superficie de los distintos QDs mostraron una disminución en el potencial Z de QDs-PEG-COOH ($-11,4 \pm 4,5$ mV), QDs-PEG-MET ($-28,9 \pm 0,5$ mV) y QDs-PEG-NH₂ ($-5 \pm 0,5$ mV) en comparación a QDs-GSH10 precursores ($-43,5 \pm 0,8$ mV) (Tabla 4).

De esta manera, los resultados obtenidos indican la exitosa modificación de la capa externa de los QDs-GSH10 utilizando los distintos PEGs, evidenciado por los cambios reportados en el diámetro y potencial Z de QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂, en comparación a QDs-GSH10 precursores. Finalmente, los resultados obtenidos muestran que los QDs-PEGs sintetizados utilizando como precursor QDs-GSH10, presentan soluciones con poblaciones homogéneas (Figura 3) en comparación a QDs-PEGs sintetizados usando como precursor QDs-GSHv (Figura 2). En base a estos resultados, se decidió utilizar estos QDs-PEGs para continuar con los experimentos propuestos en este estudio.

Tabla 4: Tamaño, potencial Z y propiedades espectroscópicas de QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂.

Para la determinación de diámetro hidrodinámico y potencial Z se tomaron los valores de al menos 3 determinaciones distintas de la misma solución de QDs.

Característica	QDs-GSH10	QDs-PEG-COOH	QDs-PEG-MET	QDs-PEG-NH₂
Diámetro _(nm)	1,8 ± 0,2	2,7 ± 0,7	3,7 ± 0,9	3,5 ± 0,9
Potencial Z _(mV)	-43,5 ± 0,8	-11,4 ± 4,5	-28,9 ± 0,5	-5 ± 0,5
Peak Emisión _(nm)	490	490	490	610

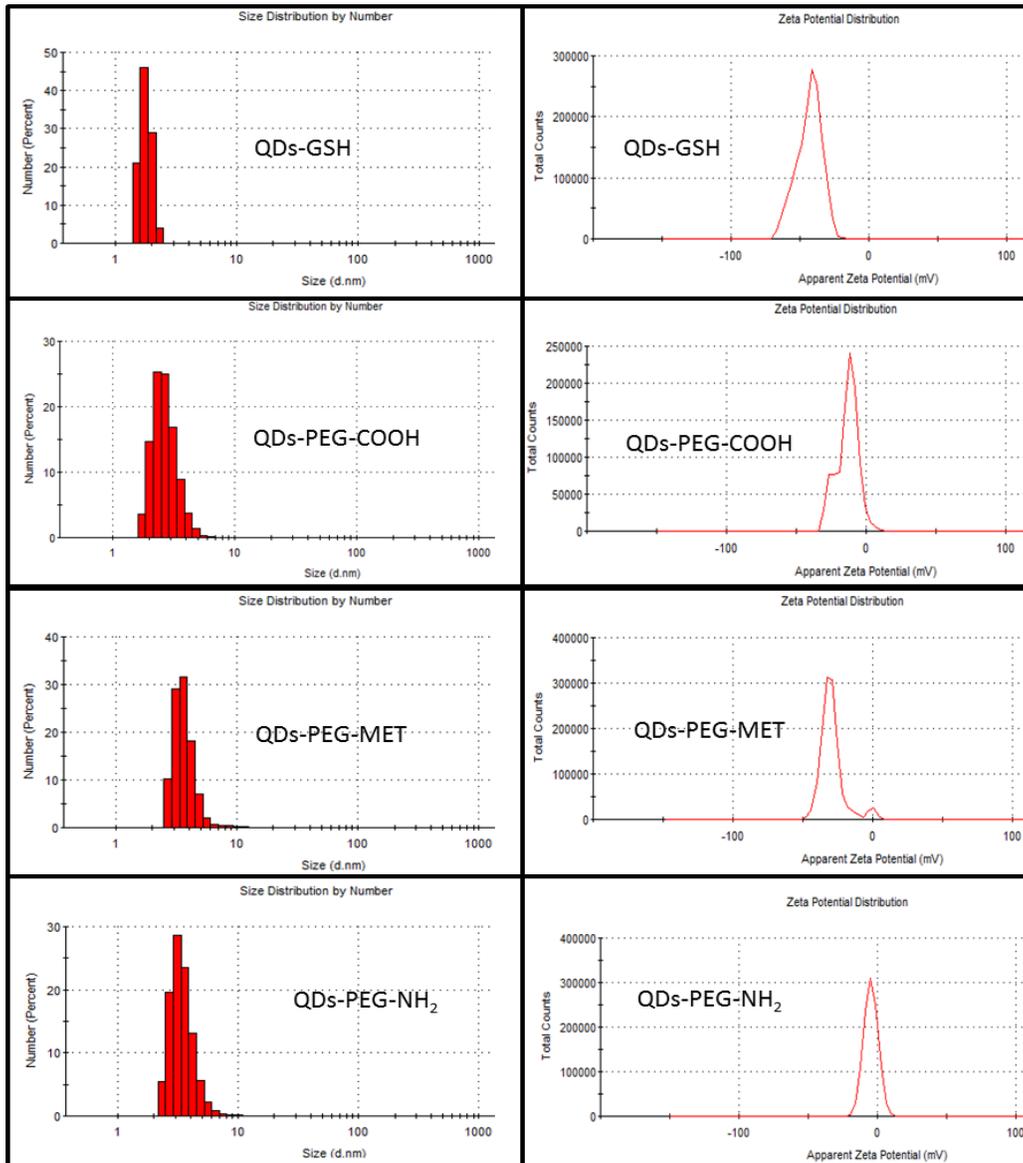


Figura 3: Tamaño y potencial Z de QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂.

En el panel izquierdo se muestra el histograma de tamaños obtenidos por DLS (diámetro hidrodinámico) de QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂ (de arriba hacia abajo respectivamente). En el panel derecho se muestra el análisis de potencial Z de QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂ (de arriba hacia abajo respectivamente). Se muestra el promedio de al menos 3 caracterizaciones realizadas en la misma solución de QDs.

3.2 OBJETIVO ESPECIFICO 2

Determinar la metodología que permita obtener el mayor porcentaje de células B16F10 viables marcadas, buscando modular el aumento de ROS intracelular asociado a la incorporación de QDs-GSH.

Para la utilización de QDs como marcaje celular es importante la evaluación de diversos parámetros, que incluyen 1) la naturaleza del ligando de recubrimiento utilizado, para promover la estabilidad coloidal y la biocompatibilidad, 2) la forma de internalizar los QDs al interior de las células a marcar, 3) la dosis necesaria, y 4) el tipo de línea celular (Bradburne et al., 2013). En este estudio, se evaluaron distintas metodologías para marcar células B16F10 utilizando QDs-GSH, las cuales implicaron modificaciones en la cobertura de los QDs y la utilización de diversas metodologías para la internalización de estos, de los cuales se muestran los más relevantes. Otros parámetros y modificaciones realizadas en este trabajo que no fueron abordadas en profundidad, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Experimentos inconclusos (n<3) realizados durante este trabajo de tesis. Resultados y referencia.

Experimento	Resultado	Referencia
Funcionalización de QDs-GSH utilizando péptidos de entrada (CR7 y CTAT) (Velasco-Aguirre et al., 2015)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Inestabilidad de QDs-GSH ➤ Muerte celular masiva (solo se observaron restos celulares) (n=2) 	Registro electrónico Laboratorio Comunicaciones Celulares
Utilización de Dendrimeros (Geraldo et al., 2011) para la internalización de QDs-GSH	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dendrimeros afectan viabilidad de células B16F10. ➤ Aumento muerte celular en comparación a uso de lipofectamina (n=2). ➤ Menor porcentaje de células marcadas en comparación a tratamientos con lipofectamina. 	Registro electrónico Laboratorio Comunicaciones Celulares
Síntesis de QDs-NAC y utilización de estos para marcaje de células B16F10	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dificultad para lograr QDs-NAC que emitan en rojo. ➤ Similar marcaje de células B16F10 en comparación a QDs-GSHr (n=2). 	Registro electrónico Laboratorio Comunicaciones Celulares
Ensayos de migración de células B16F10 marcadas con QDs-GSH10 en presencia de 4 mM de NAC	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Células B16F10 migran conservando la marca de QDs-GSH10. ➤ Aproximadamente 70% de células migrantes poseen la marca (población no homogénea) (n=2) 	Registro electrónico Laboratorio Comunicaciones Celulares

3.2.1 DETERMINACIÓN DEL EFECTO EN LA VIABILIDAD E INCORPORACIÓN DE QDS-GSHv EN CÉLULAS B16F10 Y CÉLULAS MKN45

Células B16F10 fueron incubadas con QDs-GSHv en concentraciones de 0, 50, 100, 200 y 400 µg/mL durante 24 horas en presencia o ausencia de lipofectamina. Posteriormente, la viabilidad y porcentaje de células viables marcadas fueron determinadas mediante citometría de flujo (Figura 4 A, B y C). Los resultados muestran que los tratamientos con QDs-GSHv afectan significativamente la viabilidad de células B16F10 a partir de tratamientos con 50 µg/mL de QDs-GSHv tanto en presencia como ausencia de lipofectamina. Además, estos tratamientos no generaron un aumento significativo en el porcentaje de células viables marcadas, incluso en presencia de lipofectamina. También, los resultados muestran que tratamientos con lipofectamina en conjunto con tratamientos con QDs-GSHv, disminuyen la viabilidad de células B16F10. Se determinó que la utilización de lipofectamina produce una disminución de 26,2%, 24,5%, 3,1% y 3,4% promedio en la viabilidad de células B16F10, para tratamientos con 50, 100, 200 y 400 µg/mL de QDs-GSHv, respectivamente.

Los resultados obtenidos no se condicen con los resultados publicados en estudios anteriores utilizando QDs-GSHv en células MKN45 (Pérez-Donoso et al., 2012), donde se reportó que tratamientos con 100ug/mL de QDs-GSHv y lipofectamina permiten obtener células MKN45 con una viabilidad cercana al

75% y donde cerca del 100% de las células viables son marcadas. Esta situación planteó la siguiente pregunta: ¿Qué diferencia presentan las células MKN45 con respecto a células B16F10 que les permite sobrevivir de mejor manera a la internalización de QDs-GSHv?

Para responder a esta pregunta células MKN45 fueron incubadas con QDs-GSHv en concentraciones de 0, 50, 100, 200 y 400 µg/mL durante 24 horas en presencia o ausencia de lipofectamina, buscando reproducir el experimento publicado por Pérez-Donoso y colaboradores (Pérez-Donoso et al., 2012) y comparar estos con los resultados obtenidos utilizando células B16F10. Posteriormente, la viabilidad y porcentaje de células MKN45 viables marcadas fueron determinadas mediante citometría de flujo (Figura 4 A, D y E). Los resultados muestran que los tratamientos con QDs-GSHv afectan significativamente la viabilidad de células MKN45 a partir de tratamientos con 100 µg/mL de QDs-GSHv tanto en presencia como ausencia de lipofectamina. Además, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células marcadas a partir de tratamientos con 50 µg/mL de QDs-GSHv y lipofectamina, a diferencia del tratamiento con distintas concentraciones de QDs-GSH en ausencia de lipofectamina. También, los resultados muestran que tratamientos con lipofectamina, en conjunto con tratamientos con QDs-GSHv, afectan de menor manera la viabilidad de células MKN45 en comparación a células B16F10 tratadas con QDs-GSHv, donde se observó una disminución de 6,7% para tratamiento con 50 µg/mL; 2,4% para tratamientos con 100 µg/mL; 4,2%

para tratamientos con 200 $\mu\text{g/mL}$ y 3,2% para tratamientos con 400 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados confirman que la internalización de QDs-GSHv afecta de mayor manera la viabilidad de células B16F10 en comparación a células MKN45.

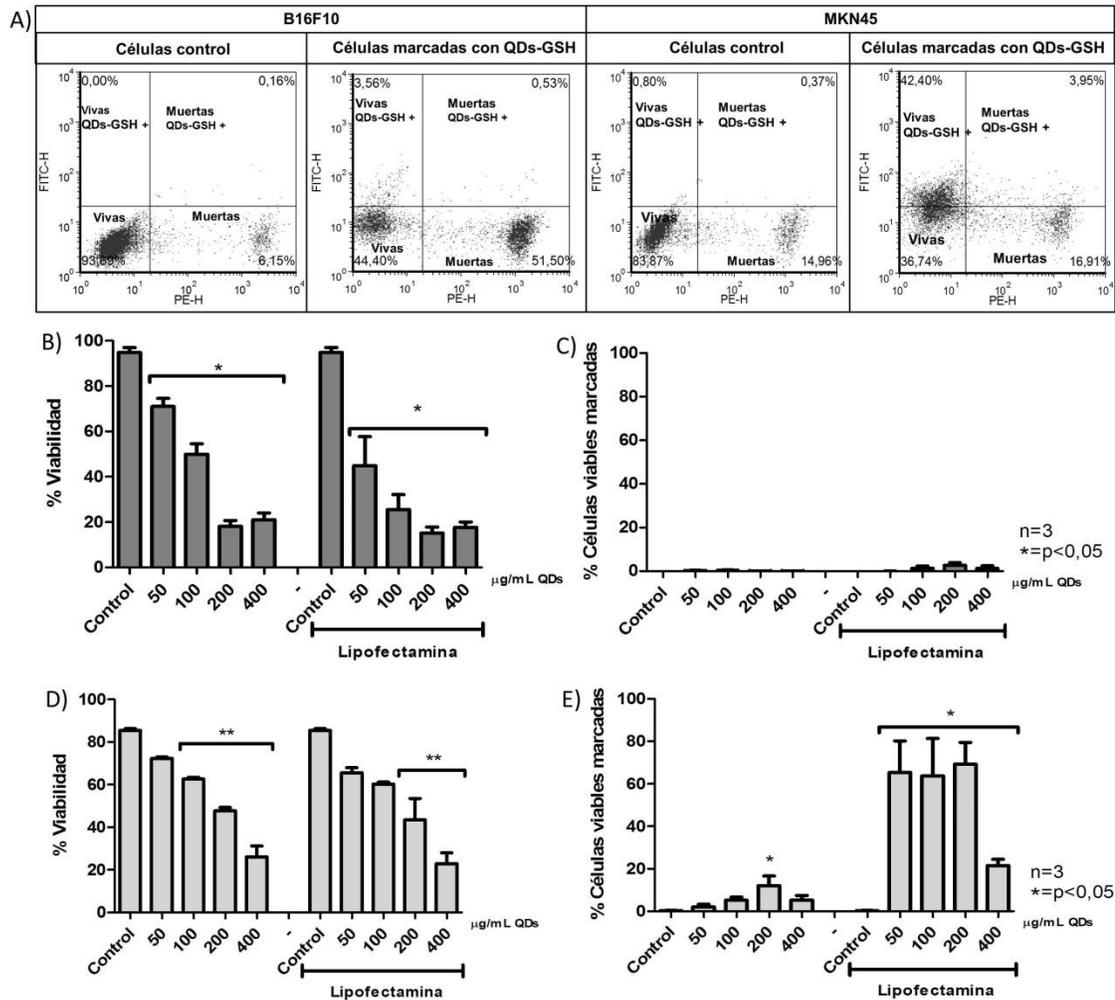


Figura 4: Efecto en la viabilidad de la incorporación de QDs-GSH verdes en células B16F10 y MKN45.

Células B16F10 (paneles B y C) y células MKN45 (Paneles D y E) fueron tratadas durante 24 h con distintas concentraciones de QDs-GSHv, en presencia o ausencia de lipofectamina. A) Dot-plot de células B16F10 y células MKN45 obtenidos por citometría de flujo. De izquierda a derecha, células tratadas con ioduro de Propidio y células tratadas con 100 µg/mL de QDs-GSHv y 4 µg/mL de lipofectamina (células marcadas con QDs-GSH). B) Efecto sobre la viabilidad de células B16F10 de tratamientos con QDs-GSHv en presencia o ausencia de lipofectamina. C) Porcentaje de células B16F10 viables que incorporaron QDs-GSHv después de los distintos tratamientos ya descritos. D) Efecto sobre la viabilidad de células MKN45 de tratamientos con QDs-GSHv en presencia o ausencia de lipofectamina. E) Porcentaje de células MKN45 viables que incorporaron QDs-GSHv después de los distintos tratamientos ya descritos. Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes (n=3).

Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Las diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control son indicadas (* = $p < 0,05$).

Tomando en cuenta que el daño por QDs se asocia principalmente a un aumento en los niveles de ROS y al cadmio presente en su núcleo (Rzagalinski and Strobl, 2009; Schneider et al., 2009), junto con el hecho que los tioles reducidos intracelulares, como GSH y metalotioneínas, juegan un rol importante en la detoxificación de daño por cadmio y ROS (Anderson, 1998; Ochi et al., 1988), se planteó que la diferencia observada entre estas líneas celulares expuestas a QDs podría deberse a una diferencia en los niveles de tioles reducidos intracelulares. Para corroborar esta hipótesis se cuantificaron los niveles de tioles reducidos intracelulares en células MKN45 y células B16F10 (Figura 5A). Los resultados obtenidos mostraron que las células MKN45 poseen niveles de tioles reducidos aproximadamente 2,4 veces mayores a células B16F10. Siguiendo esta línea y basado en reportes que indican que tratamientos con NAC permiten proteger a células ante el daño generado por QDs, junto con el hecho de que los tratamientos con NAC permiten aumentar los niveles de GSH, principal tiol intracelular, se incubaron células B16F10 con concentraciones de 0, 2, 4 y 8 mM de NAC, buscando de esta manera determinar concentraciones que permitan aumentar los niveles de tioles reducidos intracelulares en células B16F10 (Figura 5B). Los resultados indican

que a partir de tratamientos con 2 mM de NAC aumentan de manera significativa los niveles intracelulares de tioles reducidos en células B16F10.

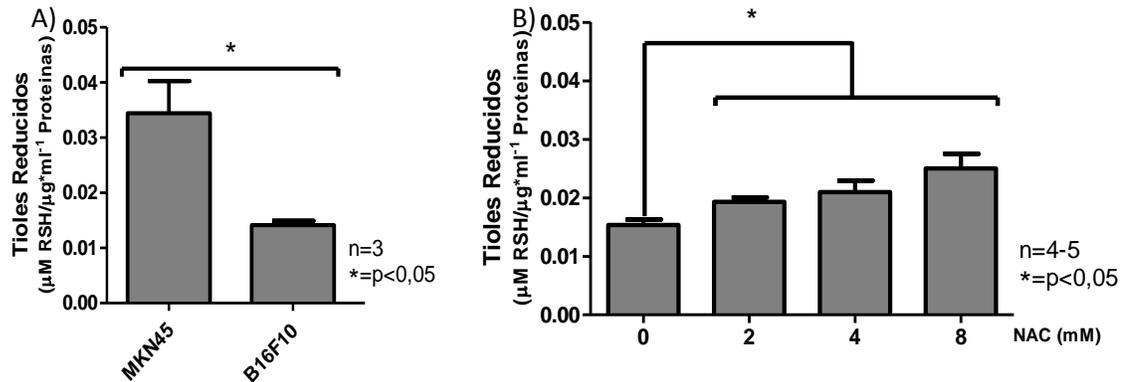


Figura 5: Determinación de tioles reducidos intracelulares en células MKN45 y B16F10 tratadas y sin tratar con NAC.

Niveles de tioles reducidos (RSH) intracelulares fueron medidos mediante el ensayo de Ellmans, para células MKN45 y B16F10 tratadas y sin tratar con distintas concentraciones de NAC durante 24 h. A) Comparación de los niveles de tioles reducidos presentes en células MKN45 y B16F10. B) Comparación de los niveles de tioles reducidos presentes en células B16F10 tratadas con distintas concentraciones de NAC durante 24 h. Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes (n=3) (Panel A) y 4 a 5 experimentos independientes (n=4-5) (Panel B). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control son indicadas (* = p < 0,05).

Basado en estos datos, se propuso que tratamientos con NAC permitirían proteger a células B16F10 ante el daño producido por tratamientos con QDs-GSH permitiendo obtener células B16F10 viables marcadas con QDs-GSH.

Para esto se propuso evaluar el efecto en la viabilidad y marcaje de células B16F10 tratadas con QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-MET o QDs-PEG-

NH₂ y/o tratamientos con NAC, buscando determinar una metodología que permita aumentar el porcentaje de células viables marcadas con QDs-GSH.

3.2.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO EN LA VIABILIDAD E INCORPORACIÓN DE QDS-GSH10, QDS-PEG-COOH, QDS-PEG-MET Y QDS-PEG-NH₂ EN CÉLULAS B16F10

Buscando determinar que tratamiento permite obtener el mayor porcentaje de células B16F10 viables marcadas, células B16F10 fueron incubadas durante 24 h con medios suplementados con 0 o 4 mM de NAC. Posteriormente se cambió el medio de cultivo y se incubó durante 24 h con medios suplementados con 0 o 4 mM de NAC, en presencia de 0, 50 o 100 µg/mL de QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET o QDs-PEG-NH₂, con y sin lipofectamina (4 µL/mL). Finalmente, se determinó la viabilidad y el porcentaje de células viables marcadas mediante citometría de flujo.

Los resultados obtenidos indicaron que tratamientos con QDs-GSH10 no afectan de manera significativa la viabilidad de células B16F10 ni muestran un aumento en el porcentaje de células viables marcadas, tanto con tratamientos con 50 µg/mL, como con tratamientos con 100 µg/mL (Figura 6B y D). Sin embargo, cuando estos tratamientos fueron realizados en presencia de lipofectamina se observó una disminución significativa de la viabilidad de células B16F10 de 24,8% para tratamientos con 50 µg/mL de QDs-GSH10 y

lipofectamina y 51,9% para tratamientos con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QDs-GSH10 y lipofectamina. Además, los resultados indicaron que los tratamientos con QDs-GSH10 aumentan de manera significativa el porcentaje de células viables marcadas. Tratamientos con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QDs-GSH10 y lipofectamina, permiten obtener un 11,7% de las células viables marcadas, y tratamientos con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QDs-GSH10 y lipofectamina permiten obtener un 13,6% de las células viables marcadas (Figura 6C y E).

Con respecto al efecto de la funcionalización de QDs-GSH10 utilizando distintos PEGs sobre la viabilidad e incorporación de QDs en células B16F10, los resultados obtenidos indican que tratamientos con 50 o 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QDs-PEG-MET o QDs-PEG-NH₂, no afectan de manera significativa la viabilidad de células B16F10, incluso en presencia de lipofectamina (Figura 6B y D). Además, estos tratamientos no generan un aumento significativo de células B16F10 viables marcadas en comparación a células control no marcadas, incluso en presencia de lipofectamina (Figura 6C y E). Los tratamientos con 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QDs-PEG-COOH no afectaron significativamente la viabilidad de células B16F10. Sin embargo, en presencia de lipofectamina se observó una disminución significativa en la viabilidad de células B16F10 del 25,9% para tratamientos con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QDs-GSH-COOH y lipofectamina y del 44,8% para tratamientos con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QDs-GSH-COOH y lipofectamina (Figura 6A y C). No se observó un aumento significativo de células B16F10 viables marcadas con QDs-PEG-COOH incluso en presencia de lipofectamina (Figura

6C y E). Estos resultados sugieren que las modificaciones en la capa externa de los QDs-GSH10, usando distintos PEGs, desfavorecen la internalización de QDs-GSH10, incluso en presencia de lipofectamina.

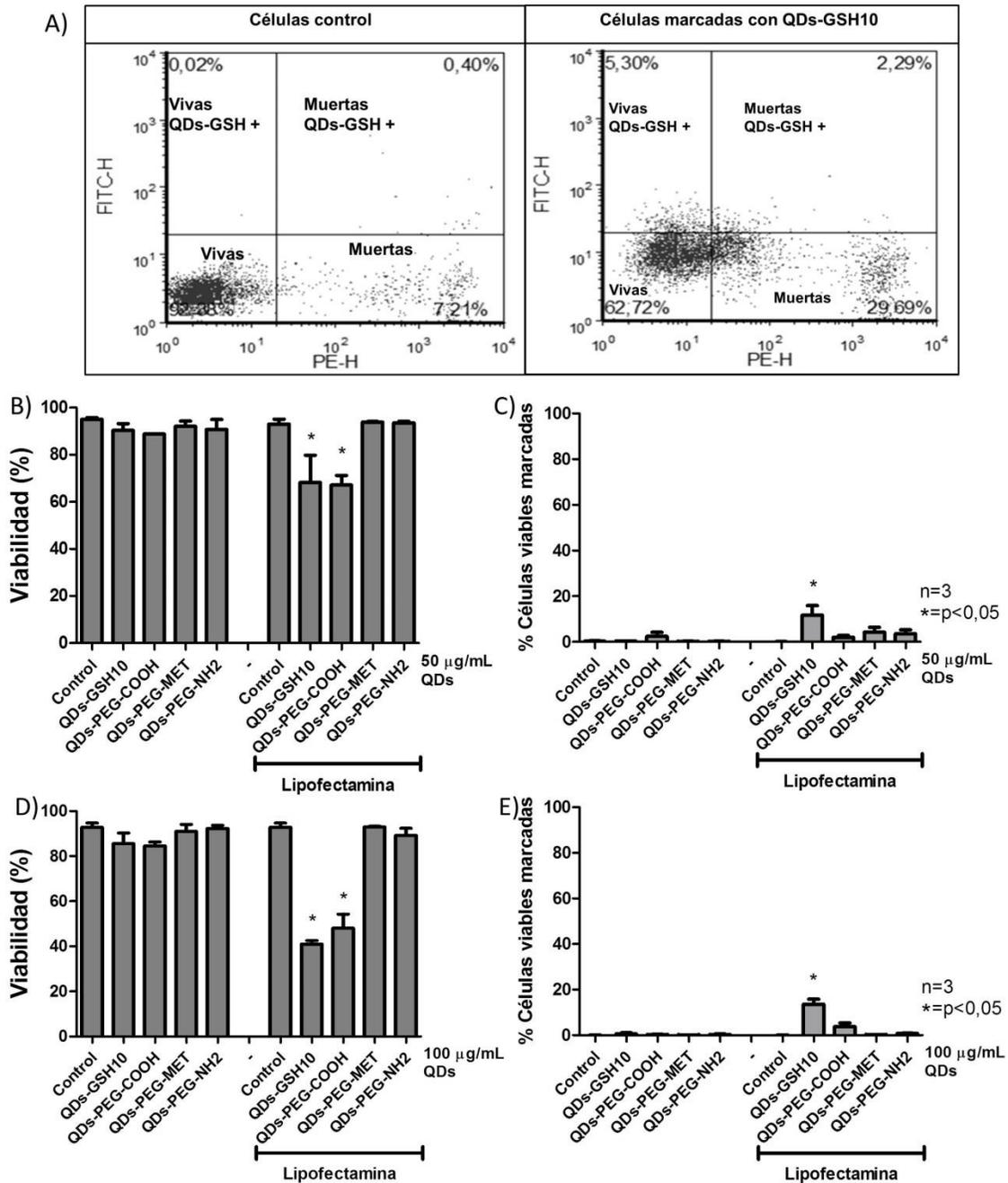


Figura 6: Efecto en viabilidad celular e incorporación de distintos QDs verdes en células B16F10.

Células B16F10 fueron cultivadas durante 24 horas y posteriormente tratadas con 0, 50 y 100 µg/mL de QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET o QDs-PEG-NH₂, en presencia o ausencia de lipofectamina por 24 horas. La

viabilidad e incorporación de los distintos QDs fue determinada mediante citometría de flujo. A) Dot-plot obtenido por citometría de flujo, de células B16F10 control y marcadas con QDs-GSH10. B) Efecto sobre la viabilidad de células B16F10 de tratamientos con 50 µg/mL de los distintos QDs en presencia o ausencia de lipofectamina. C) Porcentaje de células B16F10 viables que incorporaron QDs, con tratamientos de 50 µg/mL de los distintos QDs en presencia o ausencia de lipofectamina. D) Efecto sobre la viabilidad de células B16F10 de tratamientos con 100 µg/mL de los distintos QDs en presencia o ausencia de lipofectamina. E) Porcentaje de células B16F10 viables que incorporaron QDs, con tratamientos de 100 µg/mL de los distintos QDs en presencia o ausencia de lipofectamina. Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes (n=3). Datos fueron analizados utilizando test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control son indicadas (* = $p < 0,05$).

3.2.3. INCORPORACIÓN DE QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET Y QDs-PEG-NH₂ EN CÉLULAS B16F10 TRATADAS CON NAC Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE ESTA INCORPORACIÓN EN LA VIABILIDAD DE CÉLULAS B16F10

Buscando determinar si tratamientos con NAC permiten obtener células B16F10 viables marcadas con QDs-GSH10 o los distintos QDs-PEGs, se incubó células B16F10 con 4 mM de NAC durante 24 horas. Posteriormente se cambió el medio de cultivo y las células B16F10 fueron tratadas con 4 mM NAC, 50 o 100 µg/mL de QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH QDs-PEG-MET o QDs-PEG-NH₂, en presencia o ausencia de lipofectamina durante 24 h (Figura 7).

Los resultados obtenidos mostraron que tratamientos con QDs-GSH10 en presencia de 4 mM de NAC no afectan de manera significativa la viabilidad de células B16F10 ni muestran un aumento en el porcentaje de células viables

marcadas, tanto con tratamientos con 50 µg/mL, como con tratamientos con 100 µg/mL (Figura 7A y C). Sin embargo, cuando estos tratamientos fueron realizados en presencia de lipofectamina, se observó una disminución significativa de la viabilidad de células B16F10 del 30,6 % para tratamientos con 50 µg/mL de QDs-GSH10, 4 mM de NAC y lipofectamina, y del 37,1 % para tratamientos con 100 µg/mL de QDs-GSH10, 4 mM de NAC y lipofectamina. Además, los resultados indicaron que tratamientos con QDs-GSH10 aumentan de manera significativa el porcentaje de células viables marcadas, donde se determinó que tratamientos con 50 µg/mL de QDs-GSH10, 4 mM de NAC y lipofectamina, producían un 47 % de células viables marcadas, y que tratamientos con 100 µg/mL de QDs-GSH10 y lipofectamina, generaron un 45,4 % de las células viables marcadas (Figura 7B y D). Estos resultados indican que tratamientos con 4 mM de NAC permiten aumentar la internalización de QDs-GSH10 en presencia de lipofectamina en comparación a los tratamientos realizados anteriormente (Figura 6).

Los resultados obtenidos indican que tratamientos con 50 o 100 µg/mL de QDs-PEG-MET o QDs-PEG-NH₂ y 4 mM de NAC no afectan de manera significativa la viabilidad de células B16F10, incluso en presencia de lipofectamina (Figura 7A y C). Además, estos tratamientos no producen un aumento significativo de células B16F10 viables marcadas en comparación a células no marcadas, incluso en presencia de lipofectamina (Figura 7B y D).

Tratamientos utilizando 50 y 100 µg/mL de QDs-PEG-COOH y 4 mM de NAC, no afectaron significativamente la viabilidad de células B16F10. En presencia de lipofectamina se observó una disminución significativa en la viabilidad de células B16F10 del 33,9% para tratamientos con 50 µg/mL de QDs-GSH-COOH, 4 mM de NAC y lipofectamina; y del 41,4 % para tratamientos con 100 µg/mL de QDs-GSH-COOH, 4 mM de NAC y lipofectamina (Figura 7 A y C). Además, se observó un aumento significativo de células B16F10 viables marcadas con QDs-PEG-COOH, donde tratamientos con 50 µg/mL de QDs-PEG-COOH, 4 mM de NAC y lipofectamina producen un 38,7% de células viables marcadas; y tratamientos con 100 µg/mL de QDs-PEG-COOH, 4 mM de NAC y lipofectamina un 24,3% de células viables marcadas (Figura 7B y D). Estos resultados indican que las modificaciones en la capa externa de los QDs-GSH10, usando SH-PEG-MET y SH-PEG-NH₂, desfavorecen la internalización de QDs-GSH10, incluso en presencia de lipofectamina y tratamientos con 4 mM de NAC. Además, los resultados mostraron que tratamientos con 4 mM de NAC aumentan de manera significativa el porcentaje de células viables marcadas con QDs-PEG-COOH, tanto para tratamientos con 50 o 100 µg/mL de QDs-PEG-COOH.

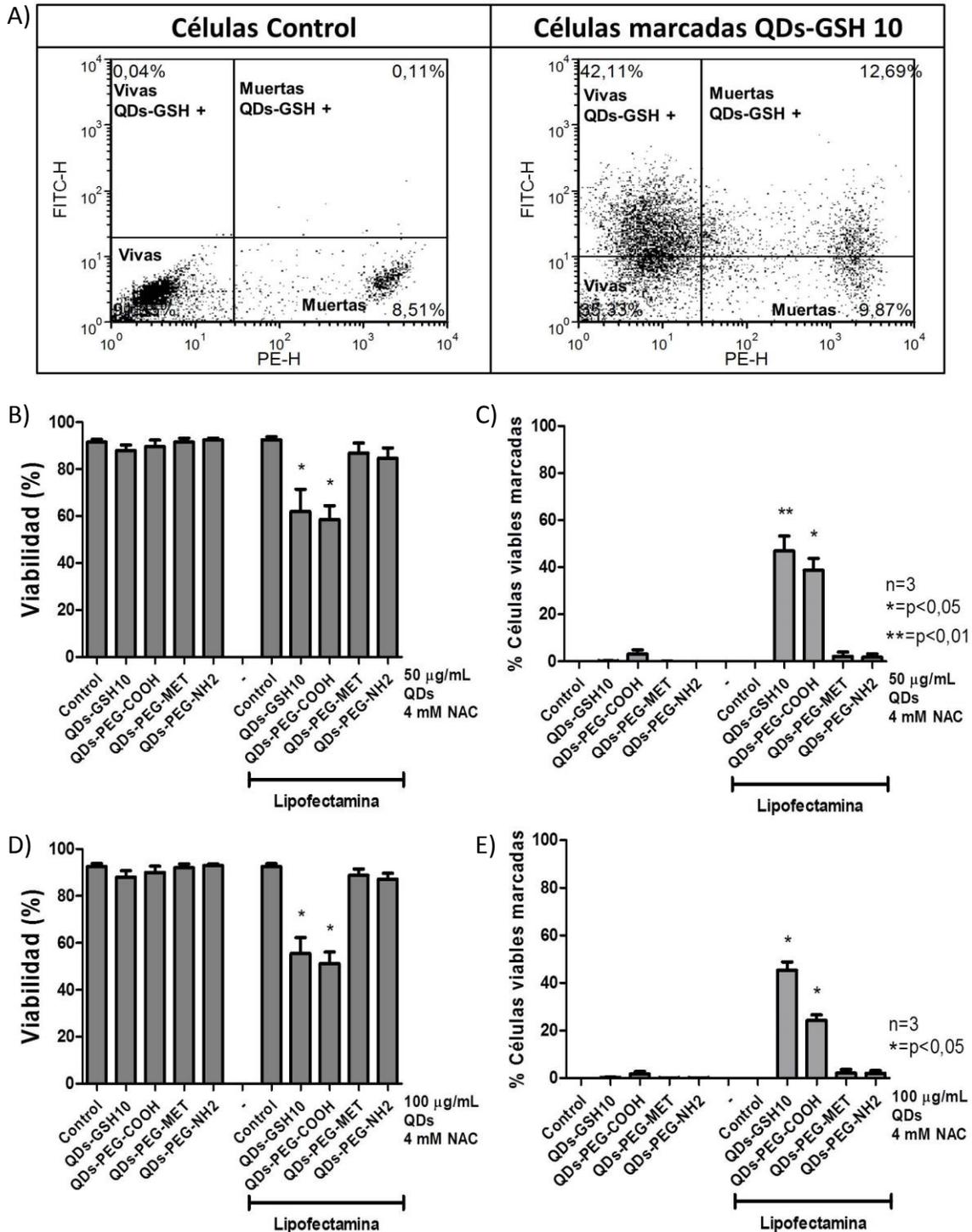


Figura 7: Efecto sobre viabilidad celular e incorporación de distintos QDs verdes en células B16F10 de tratamientos con 4mM de NAC.

Células B16F10 fueron tratadas durante 24 horas con 4 mM de NAC. Posteriormente estas células fueron tratadas con 0, 50 y 100 µg/mL de QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET o QDs-PEG-NH₂ y 4 mM de NAC, en presencia o ausencia de lipofectamina durante 24 horas. La viabilidad e incorporación de QDs fue determinada mediante citometría de flujo. A) Dot-plot de células B16F10 control y marcadas utilizando con 100 µg/mL de QDs-GSH10 el tratamiento previamente descrito. B) Efecto sobre la viabilidad de células B16F10 de tratamientos con 50 µg/mL de los distintos QDs en presencia o ausencia de lipofectamina. C) Porcentaje de células B16F10 viables que incorporaron QDs, con tratamientos de 50 µg/mL de los distintos QDs en presencia o ausencia de lipofectamina. D) Efecto sobre la viabilidad de células B16F10 de tratamientos con 100 µg/mL de los distintos QDs en presencia o ausencia de lipofectamina. E) Porcentaje de células B16F10 viables que incorporaron QDs, con tratamientos de 100 µg/mL de los distintos QDs en presencia o ausencia de lipofectamina. Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes (n=3). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control son indicadas (* = p < 0,05).

En resumen, los resultados obtenidos indican que modificaciones en la capa externa de las NPs usando SH-PEG-COOH, SH-PEG-MET y SH-PEG-NH₂, no favorecen la obtención de células B16F10 viables marcadas con QDs, incluso en presencia de lipofectamina. Además, los resultados indican que tratamientos con 4 mM de NAC aumentan la internalización de QDs-GSH10 y QDs-PEG-COOH, evidenciado por un aumento en la cantidad de células B16F10 viables marcadas. Finalmente, se determinó que los mayores porcentajes de células B16F10 viables marcadas fue logrado con tratamientos con 4 mM de NAC durante 24 horas y posteriores tratamientos con QDs-GSH10 (50 o 100 µg/mL) en presencia de 4 mM de NAC y 4 µL/mL de lipofectamina (Figura 7 B y D).

Al comparar el porcentaje de células viables marcadas utilizando QDs-GSHv (Figura 4 C) y tratamientos con QDs-GSH10, ambos en presencia de lipofectamina (Figura 6 C), se observó que la utilización de QDs-GSH10 generó un aumento significativo de células viables marcadas, a diferencia de tratamientos con QDs-GSHv. Estos QDs-GSH presentan características muy similares en cuanto a su tamaño y características espectroscopias, excepto por el potencial Z de QDs-GSHv y QDs-GSH10 (Tabla 2 y 4, respectivamente), donde se observó que QDs-GSHv posee potencial Z de mayor magnitud ($-68,6 \pm 9$ mV) que QDs-GSH10 ($-43,5 \pm 0,8$). Estos resultados sugieren que el potencial Z de menor magnitud de los QDs-GSH10 favorece la internalización en células B16F10. Basados en estos resultados y buscando generar un protocolo que permita aumentar el porcentaje de células B16F10 viables marcadas, se decidió utilizar QDs-GSHr ($-13,6 \pm 2,2$) dado su menor potencial Z en comparación a QDs-GSHv y QDs-GSH10.

3.2.4. INCORPORACIÓN DE QDs-GSHv Y QDs-GSHr EN CÉLULAS B16F10 Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE ESTA INCORPORACIÓN EN LA VIABILIDAD DE CÉLULAS B16F10

Buscando determinar que tratamiento permitirá obtener el mayor porcentaje de células B16F10 viables marcadas, células B16F10 fueron incubadas durante 24 h y posteriormente tratadas con 0, 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$ de QDs-GSHv o QDs-GSHr en presencia de lipofectamina (4 $\mu\text{L/mL}$) durante 24 horas.

Finalmente, mediante citometría de flujo se determinó la viabilidad y el porcentaje de células viables marcadas además de la intensidad de fluorescencia media presente en células viables marcadas.

Los resultados obtenidos indicaron que tratamientos con QDs-GSHv en presencia de lipofectamina producen una disminución significativa de la viabilidad de células B16F10 a partir de tratamientos con 50 µg/mL de QDs-GSHv y lipofectamina, tal como se observó anteriormente (Figura 8 B). Además, no se observó un aumento significativo del porcentaje de células viables marcadas (Figura 8 C). Al analizar la intensidad de fluorescencia media en células viables marcadas con QDs-GSHv, se observó que esta aumentó de manera significativa a partir de tratamientos con 50 µg/mL de QDs-GSHv en comparación al control. Además, la intensidad de fluorescencia media aumentó de manera significativa a concentraciones superiores de 100 µg/mL de manera dependiente a la concentración de QDs-GSHv utilizados en el tratamiento.

Por su parte, tratamientos realizados con QDs-GSHr y lipofectamina afectaron de manera significativa la viabilidad de células B16F10 solo a 400 µg/mL, donde se observó una disminución en la viabilidad de un 21,6 % promedio (Figura 8 B). Con respecto a la internalización de QDs-GSHr en células B16F10, los resultados indican que un alto porcentaje de células B16F10 viables se encuentran marcadas, con un 80,8% de células viables marcadas con tratamientos de 50 µg/mL de QDs-GSHr y lipofectamina, un 83,8% de células

viabiles marcadas con tratamientos de 100 µg/mL de QDs-GSHr y lipofectamina, un 80,6% de células viabiles marcadas con tratamientos de 200 µg/mL de QDs-GSHr y lipofectamina y un 52,9% de células viabiles marcadas con tratamientos de 400 µg/mL de QDs-GSHr y lipofectamina (Figura 8 C). Al analizar la intensidad de fluorescencia media (IFM) de células viabiles marcadas con QDs-GSHr, se observó que esta aumenta de manera significativa en los tratamientos con 50 µg/mL de QDs-GSHv en comparación al control. Además, la mayor intensidad de fluorescencia media observada (139,8) se logró con tratamientos con 100 µg/mL de QDs-GSHr, para luego disminuir de manera significativa para tratamientos de 200 y 400 µg/mL (107,7 y 102,8, respectivamente). De esta manera, los resultados indican que tratamientos con 100 µg/mL de QDs-GSHr en presencia de lipofectamina, permiten obtener el mayor porcentaje de células viabiles marcadas, con la mayor IFM registrada.

Finalmente, la suspensión de células B16F10 tratadas y sin tratar con 100 µg/mL de QDs-GSHr en presencia de lipofectamina fueron incubadas por 10 min con Calceina AM (marcador verde fluorescente para células viabiles de mamíferos) LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen), para luego ser observadas mediante microscopia confocal (Figura 8 E). Cabe destacar que Calceina emite fluorescencia verde solamente en células vivas, distribuyéndose en el citoplasma de estas células (Weston and Parish, 1990) Las imágenes mostraron células B16F10 viabiles marcadas con QDs-GSHr, marca que no es posible observar

en células B16F10 sin tratar. Además, el procesamiento de imágenes (ImageJ), mostró que la marca asociada a QDs-GSHr co-localizó con la marca asociada a Calceina (Figura 8 E). Esto indica que los QDs-GSHr se encuentran al interior de células B16F10 viables y además sugieren una distribución citoplasmática de estas.

En resumen, los resultados obtenidos indican que tratamientos con concentraciones menores o iguales a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QDs-GSHr en presencia de lipofectamina, no afectan de manera significativa la viabilidad de células B16F10. Además, en los tratamientos con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QDs-GSHr y lipofectamina se observó el mayor porcentaje de células viables marcadas (83,8 %) y la mayor intensidad de fluorescencia media (139,8). Finalmente, el análisis de microscopia de células B16F10 marcadas con QDs-GSHr indica que QDs-GSHr se localizan al interior de células B16F10.

Basado en estos resultados, se decidió utilizar tratamientos con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QDs-GSHr y lipofectamina para los ensayos posteriores.

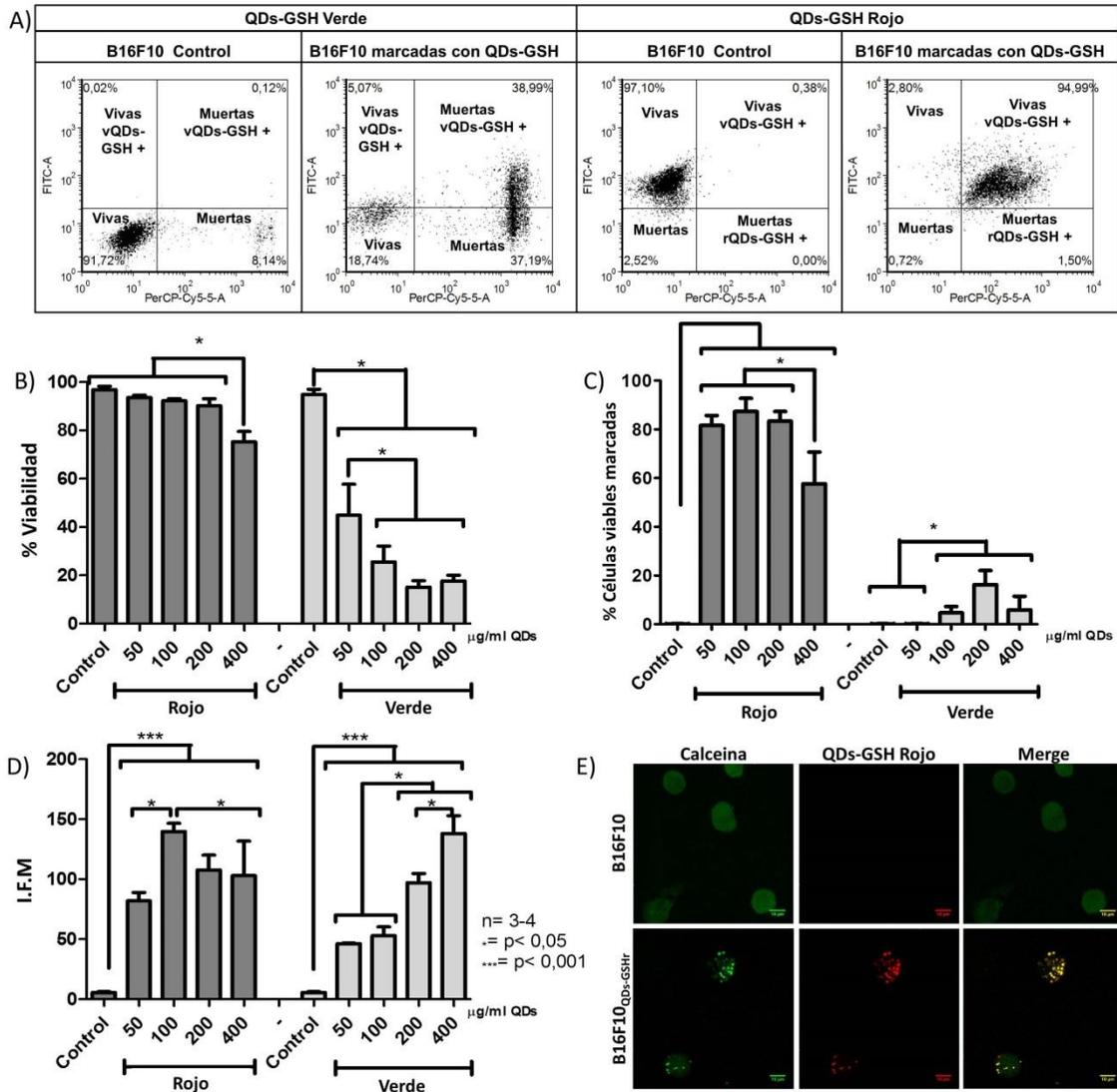


Figura 8: Incorporación de QDs-GSHv y QDs-GSHr en células B16F10 y determinación del efecto de la incorporación en la viabilidad de células B16F10.

Células B16F10 fueron incubadas durante 24 horas y posteriormente fueron tratadas durante 24 horas con 0, 50, 100, 200 y 400 µg/mL de QDs-GSHr (Gris oscuro) o QDs-GSHv (Gris claro), en presencia de lipofectamina. La viabilidad e incorporación de QDs-GSH fue determinada mediante citometría de flujo. A) Dot-plot de células B16F10 controles y marcadas utilizando con 100 µg/mL de QDs-GSHv y QDs-GSHr, con el tratamiento previamente descrito. B) Efecto sobre la viabilidad de células B16F10 de tratamientos con QDs-GSHv o QDs-GSHr en presencia de lipofectamina. C) Porcentaje de células B16F10 viables que incorporaron QDs-GSHv o QDs-GSHr. D) Comparación de la Intensidad de

Fluorescencia Media (I.M.F.) asociada a los distintos QDs-GSH presentes en células viables marcadas. E) Imagen confocal de células B16F10 viables (marcadas con Calceina) marcadas y sin marcar con QDs-GSHr. Se muestra el promedio del resultado de 3 o 4 experimentos independientes (n=3-4). Datos fueron analizados utilizando test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control son indicadas (* = $p < 0,05$ y *** = $p < 0,001$).

3.2.5. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS CON NAC DURANTE EL PROCESO DE MARCAJE DE CÉLULAS B16F10 UTILIZANDO QDs-GSHr Y LIPOFECTAMINA. MEDICIÓN DEL EFECTO EN LA VIABILIDAD, INCORPORACIÓN DE QDs-GSHr Y NIVELES DE ROS

En la actualidad, se sabe que los QDs provocan daño en sistemas biológicos, asociados a un aumento en los niveles de ROS (Rzigalinski and Strobl, 2009; Schneider et al., 2009), y que los niveles de ROS afectan la capacidad metastásica de células tumorales (Loo, 2003; Wu, 2006). Por estos motivos se evaluó el efecto de la incorporación de QDs-GSHr en los niveles de ROS intracelulares, y se determinó el efecto de tratamientos con NAC en los niveles de ROS, la viabilidad y la incorporación de QDs-GSHr en células B16F10 tratadas con QDs-GSHr. Lo anterior con el propósito de desarrollar un protocolo que permita obtener el mayor porcentaje de células B16F10 viables marcadas con QDs-GSHr y con la menor perturbación posible de los niveles ROS de estas células.

Para responder a esta inquietud células B16F10 fueron cultivadas durante 24 horas con 0, 2, 4, 8 y 10 mM de NAC. Posteriormente se cambió el medio de cultivo por medio de cultivo fresco suplementado con 0, 2, 4, 8 o 10 mM de

NAC, 100 µg/mL de QDs-GSHr y 4 µg/mL de lipofectamina durante 24 horas. Finalmente se determinaron los niveles de ROS intracelular, la viabilidad e incorporación de QDs-GSHr mediante citometría de flujo.

La incorporación de QDs-GSHr aumentó los niveles de ROS en células B16F10 en casi 4 veces en comparación a células B16F10 control. Además, tratamientos con 4 y 10 mM de NAC disminuyeron de manera significativa los niveles de ROS en células marcadas con QDs-GSHr en comparación con células marcadas con QDs-GSHr sin tratamientos con NAC. Finalmente, tratamientos con 10 mM de NAC durante el proceso de marcaje con QDs-GSHr permitieron obtener células B16F10 marcadas con QDs-GSHr con niveles de ROS similares a células B16F10 control (Figura 9 B).

Al analizar el efecto de tratamientos con NAC en la viabilidad y el marcaje de células B16F10 se observó que tratamientos realizados con 2, 4, 8 o 10 mM de NAC durante el proceso de marcaje con 100 µg/mL de QDs-GSHr no afectaron de manera significativa la viabilidad de células B16F10 (Figura 9 C). Sin embargo, al analizar el porcentaje de células viables marcadas con QDs-GSHr se observó que los tratamientos realizados con 2, 4, 8 y 10 mM de NAC aumentaron de manera significativa el porcentaje de células viables marcadas. El análisis determinó que un 95,2 % de células viables se encontraban marcadas con QDs-GSHr, con tratamientos con 100 µg/mL de QDs-GSHr sin NAC. Este porcentaje aumentó a un 98,4 % con tratamientos con 100 µg/mL de

QDs-GSH en presencia de 2 mM de NAC; a un 98,8 % con tratamientos con 100 µg/mL de QDs-GSH en presencia de 4 mM de NAC; a un 99,8 % con tratamientos con 100 µg/mL de QDs-GSH en presencia de 8 mM de NAC y a un 99,6% con tratamientos con 100 µg/mL de QDs-GSH en presencia de 10 mM de NAC (Figura 9 D). Al analizar los niveles de IFM presentes en células viables marcadas con QDs-GSHr, se observó que los tratamientos realizados con 2 y 4 mM de NAC no aumentaron de manera significativa la IFM de estas células. Por otro lado, tratamientos con 8 y 10 mM de NAC aumentaron de manera significativa los niveles de IFM en comparación a células marcadas con QDs-GSHr sin tratamientos con NAC (Figura 9 E). Estos resultados indican que tratamientos con 8 y 10 mM de NAC aumentan la incorporación de QDs-GSHr a diferencia de tratamientos con concentraciones menores de NAC.

En resumen, los resultados obtenidos indican que tratamientos con NAC permiten modular el efecto en los niveles de ROS intracelular de células B16F10 que internalizan QDs-GSHr. Además, los tratamientos con NAC durante el proceso de marcaje de células B16F10 aumentaron de manera significativa el porcentaje de células viables que internalizan QDs-GSHr, y generaron un aumento significativo de la IFM al realizar tratamientos con 8 y 10 mM de NAC durante el proceso de marcaje de células B16F10 con 100 µg/mL de QDs-GSHr.

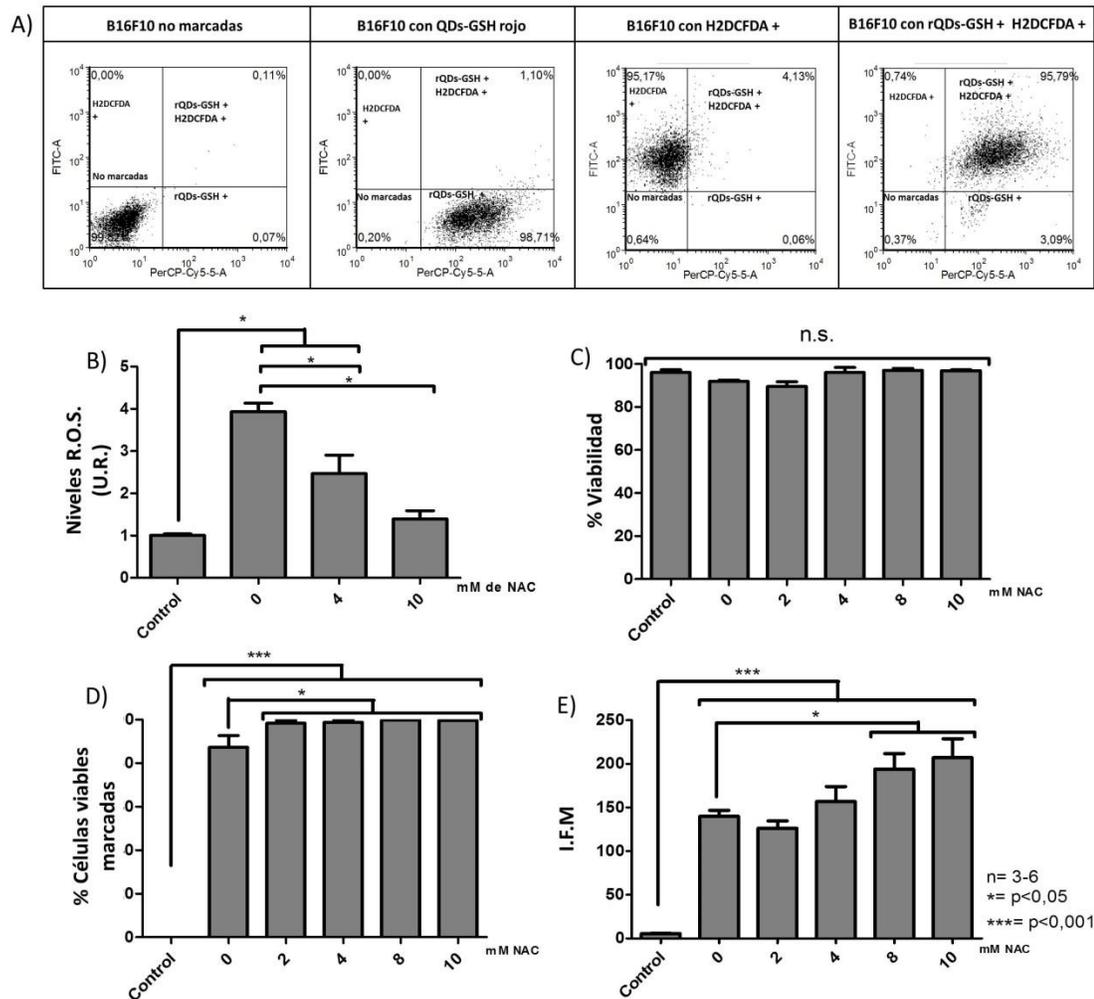


Figura 9: Efecto de tratamientos con NAC sobre los niveles de ROS, viabilidad e incorporación de QDs-GSHr en células B16F10.

Células B16F10 fueron tratadas durante 24 horas con 0, 2, 4, 8 y 10 mM de NAC y posteriormente fueron tratados con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de QDs-GSHr, lipofectamina y 0, 2, 4, 8 o 10 mM de NAC durante 24 horas. Niveles de ROS, viabilidad celular e internalización de QDs-GSH fueron determinados mediante citometría de flujo. A) Dot-plot de células B16F10 analizadas por citometría. De izquierda a derecha, células control, células marcadas utilizando QDs-GSHr y 10 mM de NAC, células incubadas con diclorofluoresceína y células marcadas con QDs-GSHr y 10 mM de NAC incubadas con diclorofluoresceína. B) Niveles de ROS presentes en células B16F10 que incorporaron QDs-GSHr en presencia de 0, 4 o 10 mM de NAC. C) Efecto en la viabilidad de células B16F10 de la incorporación de QDs-GSHr en presencia de los diferentes tratamientos con NAC. D) Porcentaje de células viables marcadas con QDs-

GSHr. E) Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) relacionada a QDs-GSHr presentes en células viables marcadas. Se muestra el promedio del resultado de 3 o 4 experimentos independientes (n=3-4). Los datos fueron analizados utilizando test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control son indicadas (* = $p < 0,05$ y *** = $p < 0,001$).

3.3 OBJETIVO ESPECIFICO 3

Estudiar el efecto de la incorporación de QDs-GSH mediante la metodología seleccionada, en la migración, invasión, proliferación y la capacidad de generar metastasis in vivo de las células B16F10 marcadas.

3.3.1. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS CON NAC, QDs-GSHr Y LIPOFECTAMINA EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS B16F10

La meta principal de este estudio es la generación de un protocolo que permita obtener células B16F10 marcadas con QDs-GSH en su interior, cuyas células puedan ser utilizadas en ensayos de metástasis temprana utilizando ratones C57BL/6. Por este motivo, determinar el efecto de dicho marcaje en las características metastásicas de células B16F10 es primordial. Tomando en cuenta esto, se evaluó el efecto de tratamientos con NAC en la migración *in vitro* de células B16F10 marcadas con QDs-GSHr. Para esto se seleccionaron dos tipos de tratamientos: i) células B16F10 marcadas con QDs-GSHr (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) utilizando tratamientos ya descritos con 10 mM de NAC y lipofectamina, que de ahora en adelante serán denominadas como B16F10_{QDs-GSH-10NAC}.ii) células B16F10 marcadas con QDs-GSHr (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) utilizando tratamientos

ya descritos con 4 mM de NAC y lipofectamina, que de ahora en adelante serán denominadas como B16F10_{QDs-GSH-4NAC}.

El primero de los tratamientos permitió obtener células B16F10 marcadas con QDs-GSHr con un mayor porcentaje de células viables marcadas y mayor M.F.I. que las células B16F10 marcadas en ausencia de NAC; además de que estas células presentaron niveles ROS similares a células B16F10 control. Por otro lado, el segundo tratamiento permitió obtener células B16F10 marcadas con QDs-GSHr con un mayor porcentaje de células viables marcadas y similar M.F.I. que las células B16F10 marcadas en ausencia de NAC; además de presentar niveles de ROS mayores que células B16F10 control. De esta manera, estos tratamientos seleccionados permitirían diferenciar si los posibles cambios observados podrían ser consecuencia de los niveles ROS presentes en las células y/o por la cantidad de QDs-GSHr en el interior de las células B16F10 marcadas.

Las células B16F10_{control} (no marcadas), células B16F10_{QDs-GSH-4NAC} y B16F10_{QDs-GSH-10NAC} viables ($1,5 \times 10^5$ células en 500 μ L de medio RPMI sin suplementar) fueron depositadas en el interior de pocillos transwells (poros de 8 μ m recubiertos con fibronectina) y se dejaron migrar durante 2 horas. Posteriormente las células que migraron fueron fijadas, teñidas y se determinó su fluorescencia y el número de células por microscopia de epifluorescencia.

Los resultados indicaron que células marcadas con QDs-GSHr fueron capaces de migrar manteniendo su marca (Figura 10 A). La cuantificación de la migración evidenció que células B16F10_{QDs-GSH-4NAC} migraron 2,8 veces más que células B16F10_{control}. Por otra parte, no se observó cambios significativos en la migración de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} en comparación a células B16F10_{control} (Figura 10 B). Esto indica que la internalización de QDs-GSHr incrementaría la migración de células B10F10 a tratamientos con concentraciones de 4 mM de NAC y que tratamientos con 10 mM de NAC durante el proceso de marcaje permitirían mantener las características migratorias de células B16F10.

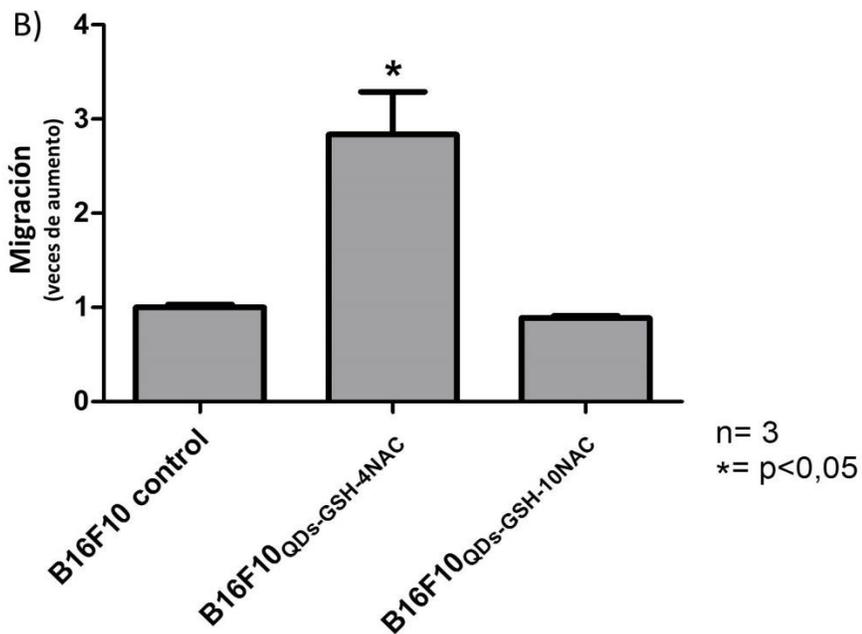
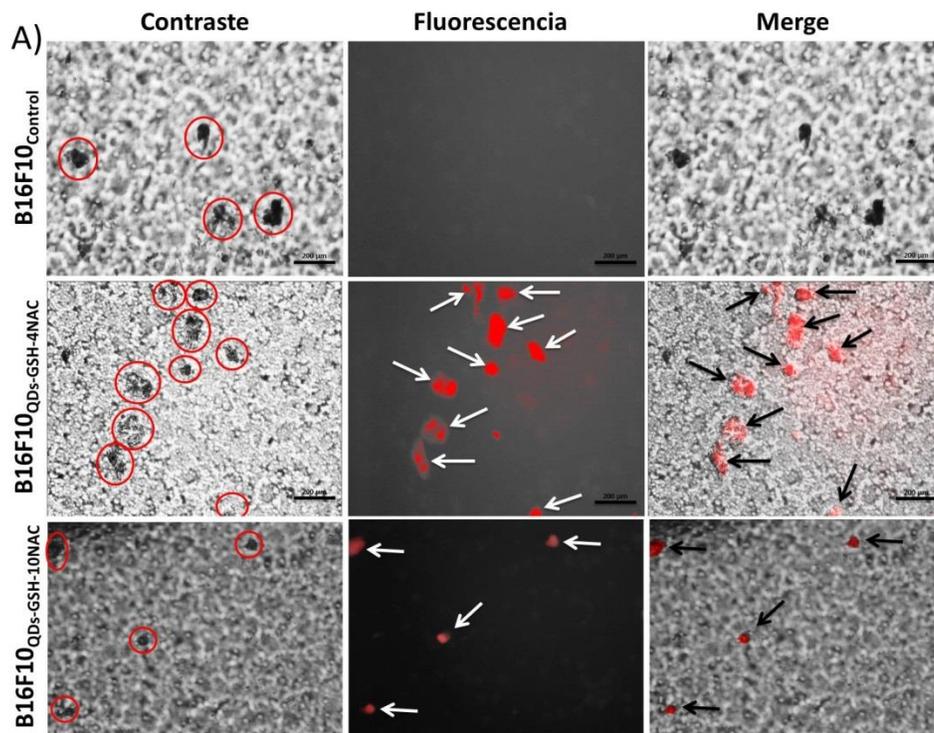


Figura 10: Migración de células B16F10 marcadas con QDs-GSHr y el efecto modulador de NAC.

Células B16F10, B16F10_{QDs-GSH-4NAC} y B16F10_{QDs-GSH-10NAC} fueron dejadas migrar durante 2 horas en transwells que poseen membranas con poros de 8 μm cubiertos con fibronectina. A) Imágenes de microscopía óptica y de fluorescencia de células migratorias B16F10, células B16F10_{QDs-GSH-4NAC} y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} teñidas con cristal violeta. En círculos rojos se muestran células migratorias presentes en las membranas de transwells; flechas blancas muestran células positivas para fluorescencia de QDs-GSHr fluorescentes; flechas negras muestran células migratorias que presentan fluorescencia asociada a QDs-GSHr. B) Cuantificación de la migración de células B16F10_{QDs-GSH-4NAC} y B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. Se muestra el promedio del al menos 3 experimentos independientes (n=3). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Las diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control son indicadas (* = $p < 0,05$).

3.3.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON NAC, QDs-GSHr Y LIPOFECTAMINA EN LA CAPACIDAD INVASIVA DE CÉLULAS B16F10

Con el propósito de comparar el efecto de tratamientos con NAC durante el proceso de marcaje de células B16F10 con QDs-GSHr en la capacidad de invasión *in vitro* de estas, las células B16F10_{control}, B16F10_{QDs-GSH-4NAC} y B16F10_{QDs-GSH-10NAC} fueron utilizadas en ensayos de invasión *in vitro*.

Las células B16F10_{control}, B16F10_{QDs-GSH-4NAC} y B16F10_{QDs-GSH-10NAC} viables ($1,5 \times 10^5$ células en 500 μL de medio RPMI sin suplementar), fueron depositadas en el interior de cámaras de invasión (las cuales poseen poros de 8 μm y se encuentran cubiertos con matrigel) y se dejaron invadir durante 24 h. Posteriormente células invasoras fueron fijadas, teñidas y se determinó su fluorescencia y el número de células.

Los resultados indicaron que células marcadas con QDs-GSHr fueron capaces de invadir manteniendo su marca (Figura 11 A y B). Además, el procesamiento de imágenes realizado utilizando software ImageJ mostró que la marca asociada a QDs-GSHr no co-localiza con la marca asociada a DAPI (Figura 11 B). Esto indica que los QDs-GSHr se encuentran al interior de células B16F10 invasoras, y además sugiere que QDs-GSHr no se localizan en el núcleo de células B16F10 invasoras.

La internalización de QDs-GSHr en células B16F10 disminuyó de manera significativa la invasión (Figura 11 C). Además, los resultados señalaron una disminución del 59% en la invasión de B16F10_{QDs-GSH-4NAC} y una disminución del 94 % en la invasión de B16F10_{QDs-GSH-10NAC} en comparación a células B16F10_{CONTROL}.

En resumen, los resultados obtenidos indican que tratamientos utilizando 100 µg/mL de QDs-GSHr, 4 µl/mL de lipofectamina y 10 mM de NAC durante el proceso de marcaje, no afectaron de manera significativa la viabilidad de células B16F10 y permiten obtener sobre un 99,6 % de B16F10 viables marcadas con la mayor intensidad de fluorescencia media observada. Además, esta metodología de marcaje no afectó de manera significativa la migración de células B16F10 marcadas, aunque si disminuye la invasión de estas células. Basado en estos resultados, se escogió esta metodología como la más

adecuada para obtener células B16F10 marcadas con QDs-GSHr con el potencial de ser utilizadas exitosamente en ensayos de metástasis temprana, utilizando ratones C57BL/6.

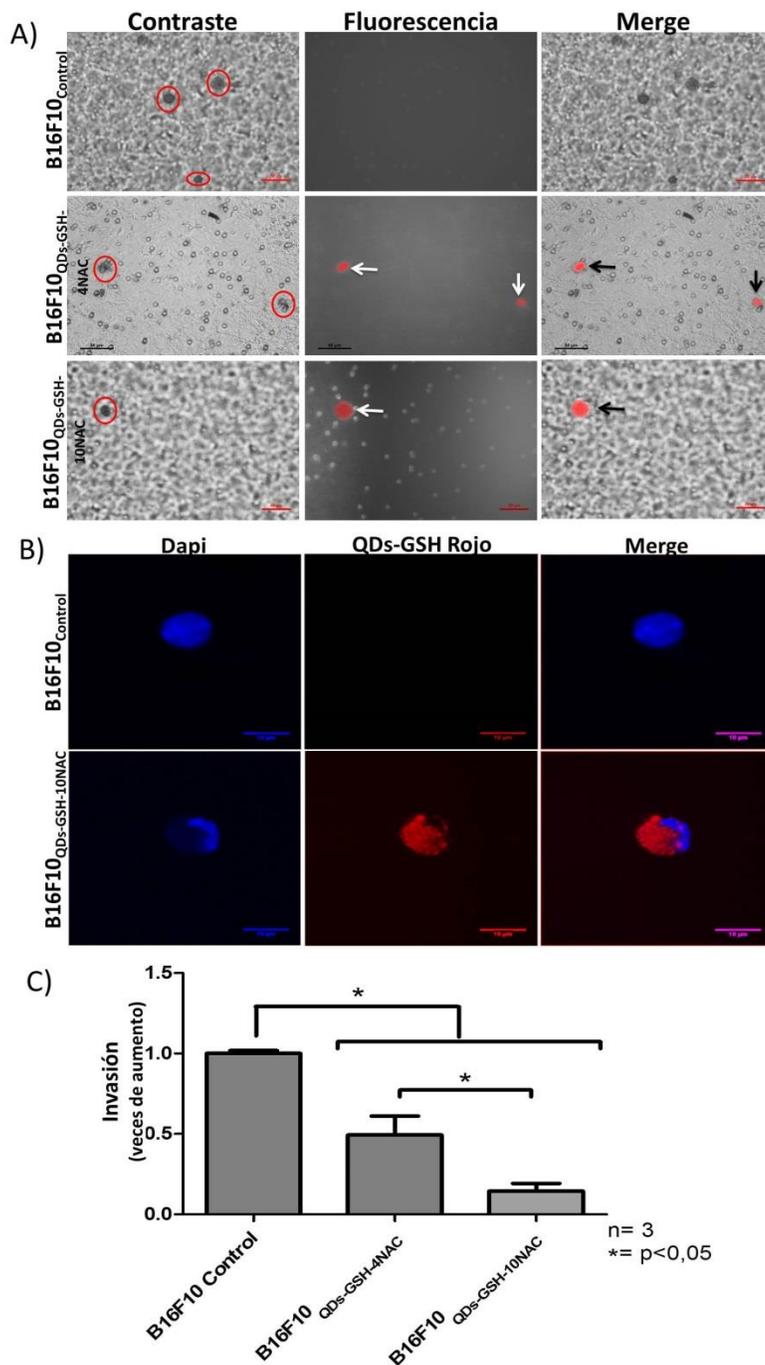


Figura 11: Invasión de células B16F10 marcadas con QDs-GSHr y el efecto modulador de NAC.

Células B16F10, B16F10_{QDs-GSH-4NAC} y B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, fueron dejadas migrar durante 24 horas en caras de invasión que poseen membranas con

poros de 8 μm cubiertos con matrigel. A) Imágenes de microscopía óptica y de fluorescencia de células invasoras B16F10, células B16F10_{QDs-GSH-4NAC} y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} teñidas con cristal violeta. En círculos rojos se muestran células migratorias presentes en las membranas de transwells; flechas blancas muestran células positivas para fluorescencia de QDs-GSHr fluorescentes; flechas negras muestran células migratorias que presentan fluorescencia asociada a QDs-GSHr. B) Imágenes de microscopía confocal de células invasoras B16F10 y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} teñidas con DAPI. Se muestra células positivas para fluorescencia de DAPI y células positivas para fluorescencia de QDs-GSHr. C) Cuantificación de la invasión de células B16F10, B16F10_{QDs-GSH-4NAC} y B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. Se muestra el promedio del resultado de 3 experimentos independientes (n=3). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control son indicadas (* = p < 0,05).

3.3.3. DETERMINACIÓN DE LA PERSEVERANCIA DE LA MARCA DE QDs-GSHr EN CÉLULAS B16F10_{QDs-GSH-10NAC} Y LA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN DE ESTAS

La metástasis como proceso implica diversos fenómenos que incluyen la capacidad de proliferación de las células metastásicas (Sahai, 2007; Valastyan and Weinberg, 2011). Por otra parte, se ha reportado que el contenido intracelular de nanopartículas puede verse reducido por diversos procesos, como la muerte celular, proliferación celular, difusión de las nanopartículas, degradación lisosomal y/o transcitosis y exocitosis (Fröhlich, 2016). Basados en estos antecedentes, resultó esencial determinar la persistencia de la marca de QDs-GSHr en células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, y si la presencia de QDs-GSHr afectaba la proliferación de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, buscando así determinar la ventana temporal de utilización de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} en ensayos de metástasis temprana.

Buscando responder esta interrogante, células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} y células B16F10_{CONTROL} fueron sembradas (1×10^5 células viables) en placas de 60 mm y cultivadas por 1, 2, 3, 4 o 5 días. Para cada día, se determinó el número total de células presentes, el porcentaje de viabilidad, el porcentaje de células viables marcadas y la IFM. Es importante destacar que los parámetros utilizados en la caracterización de la viabilidad y fluorescencia para B16F10_{QDs-GSH-10NAC} y células B16F10_{control} fueron determinados el día 0 (comienzo de incubación) para cada medición y no fueron modificados durante el transcurso de los 5 días analizados.

Los resultados indican que la viabilidad de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} no es afectada de manera significativa durante los 5 días analizados (Figura 12 A y B). Sin embargo, se observó que el porcentaje de células viables marcadas disminuyó de manera significativa después del tercer día, donde se determinó que al cuarto día post-marcaje, aproximadamente un 83 % de las células viables se encontraban marcadas con QDs-GSHr y que para el quinto día post marcaje, aproximadamente un 79 % de las células viables se encontraban marcadas con QDs-GSHr (Figura 12 C).

Los resultados indican que la IFM de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} disminuyó de manera significativa a partir del segundo día post marcaje. Además, los resultados mostraron que la fluorescencia continuó disminuyendo durante el

transcurso de los días, observándose un IFM promedio de 98% al día tres, 81,5 % al día cuatro y 90 % al quinto día (Figura 12 D).

Con respecto a la capacidad de proliferación de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, los resultados mostraron que las células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} no aumentaron su número durante los cinco días analizados, a diferencia de células B16F10_{control}, las cuales aumentaron su número de manera significativa día tras día.

En resumen, los resultados indican que las células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} no sufrieron cambios significativos en la viabilidad durante los cinco días analizados ni en el número total de células presentes, lo que sugiere que la metodología seleccionada para la internalización de QDs-GSHr inhibiría la capacidad de proliferar de células B16F10, aunque no afectaría la viabilidad de estas.

Además, se observó que la marca de QDs-GSHr en células B16F10 disminuyó con el paso del tiempo, comenzando con una disminución significativa en la IFM a partir del segundo día, seguido de una disminución significativa del porcentaje de células viables marcadas a partir del cuarto día. Estos resultados sugieren que es posible la utilización de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} en ensayos tempranos de metástasis enfocados a tiempos menores a los 2 días.

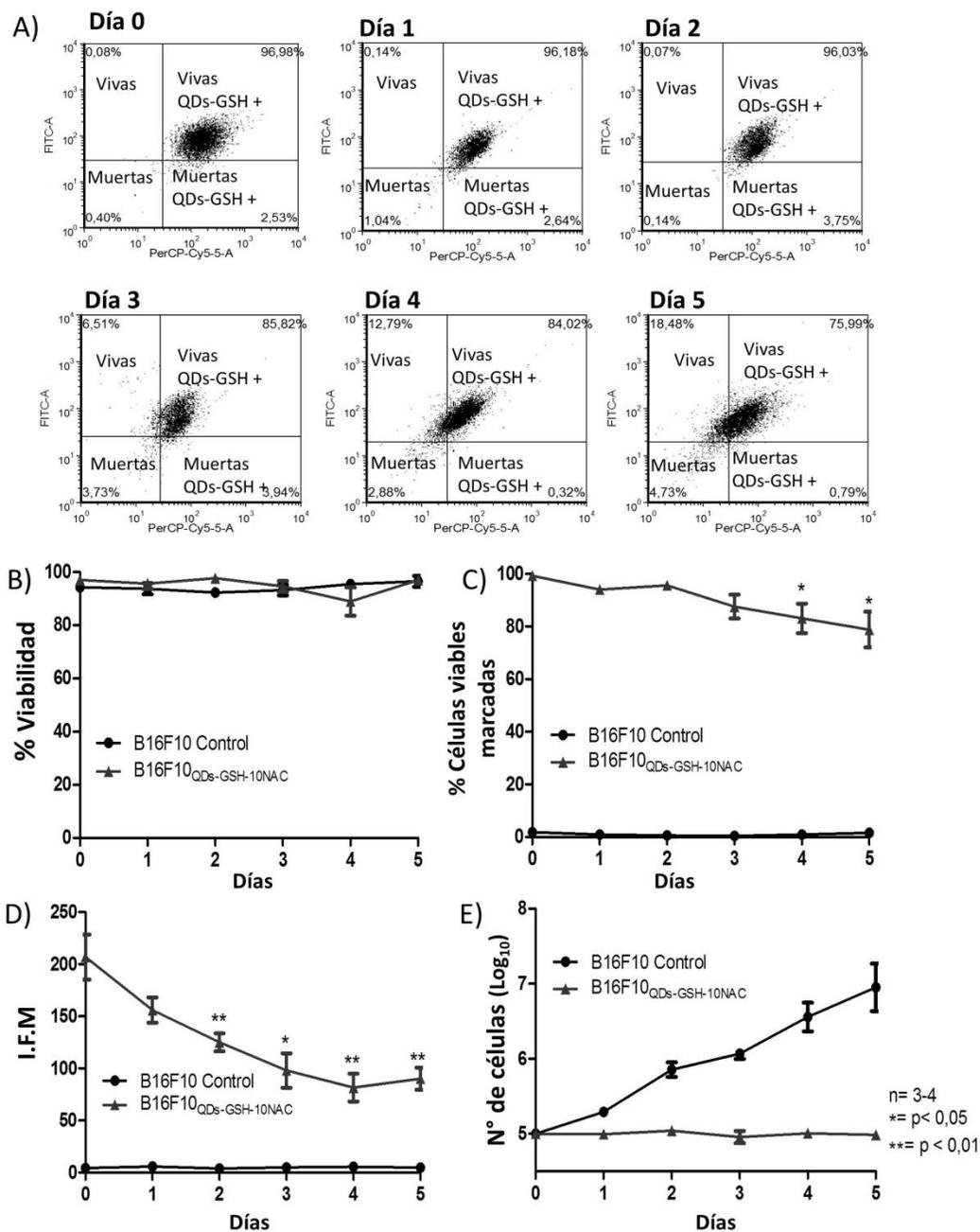


Figura 12: Efecto de la internalización de QDs-GSHr sobre la proliferación de células B16F10 y persistencia de la marca asociada a QDs-GSHr.

1×10⁵ células B16F10 y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} viables fueron sembradas en placas de 60 mm y dejadas crecer. Posteriormente las células fueron colectadas al día 1, 2, 3, 4 y 5 y se determinó, el número de células, viabilidad, porcentaje de células viables marcadas e Intensidad de Fluorescencia Media

(IFM). A) Dot-plot de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} a los días 0, 1, 2, 3, 4 y 5 de incubación. B) Viabilidad de células B16F10 y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} a los días 1, 2, 3, 4 y 5 posterior a ser sembradas. C) Porcentaje de células viables marcadas con QDs-GSHr a los días 1, 2, 3, 4 y 5 posterior a ser sembradas. D) Intensidad de Fluorescencia Media relacionada a QDs-GSHr presentes en células viables marcadas a los días 1, 2, 3, 4 y 5 posterior a ser sembradas. E) Número total de células B16F10 y B16F10_{QDs-GSH-10NAC} presentes en las placas de 60 mm a los días 1, 2, 3, 4 y 5 posterior a ser sembradas. Se muestra el promedio del resultado de 3 o 4 experimentos independientes (n=3-4). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control son indicadas (* = p < 0,05 y ** = p < 0,01).

3.3.4. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD METASTÁSICA *IN VIVO* DE CÉLULAS B16F10_{QDs-GSH-10NAC} EN RATONES C57BL/6

A grandes rasgos, las etapas de la metástasis implican la salida de células desde el tumor primario hasta el sistema circulatorio, por donde viajan a órganos distantes, para luego, invadir y proliferar en estos órganos lejanos generando la formación de tumores secundarios (Sahai, 2007; Valastyan and Weinberg, 2011). Los resultados obtenidos han demostrado que el método seleccionado para la internalización de QDs-GSHr en células B16F10 afecta de manera significativa la capacidad de proliferación y de invasión de células B16F10, lo cual podría afectar la capacidad metastásica de estas células en ratones C57BL/6.

Para responder a esta inquietud, se realizaron ensayos de metástasis *in vivo* utilizando B16F10_{CONTROL} y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. Las células B16F10_{CONTROL} y B16F10_{QDs-GSH-10NAC} (2×10^5 células en 500 μ L de suero

fisiológico) fueron inyectadas por la vena de la cola a ratones C57BL/6. Posteriormente, se siguió la sobrevivencia de estos ratones durante 21 días, al final de los cuales los ratones C57BL/6 fueron sacrificados y sus pulmones cosechados para determinar y cuantificar la presencia de nódulos metastásicos.

Los resultados muestran que la sobrevivencia de ratones C57BL/6 no fue afectada al inyectar las células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. Además, no se detectaron focos de metastasis en pulmones de 11 de los 12 ratones tratados con células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. La ocupación tumoral presente en el único ratón que presento metástasis fue de un 1,4 % (Figura 13 B), dando como resultado un promedio de ocupación tumoral de un 0,12 % aproximado para tratamientos con células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. Por su parte, tratamientos con células B16F10_{CONTROL} disminuyeron la sobrevivencia de estos ratones a un 81,8 % promedio (Figura 13 A). Además, focos metastásicos fueron detectados en todos los ratones tratados con células B16F10_{control} (Figura 13 B, imagen interior), con una ocupación tumoral promedio de 14,4% aproximadamente (Figura 13 B). Este último resultado está de acuerdo con lo reportado para estudios de metástasis *in vivo* utilizando células B16F10 por parte de nuestro laboratorio (Lobos-González et al., 2013; Ortiz et al., 2016).

En resumen, estos resultados muestran que la incorporación de QDs-GSHr en células B16F10, utilizando el tratamiento seleccionado, disminuyó

significativamente la habilidad de producir metástasis *in vivo* por parte de las células B16F10.

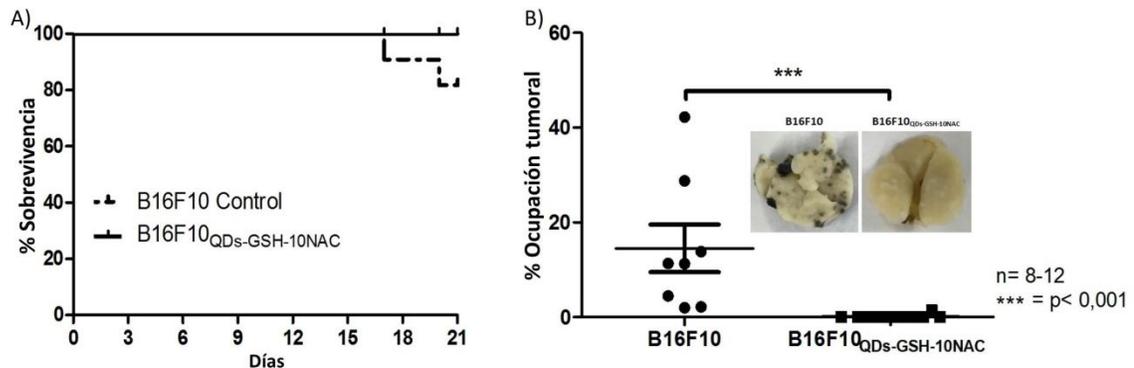


Figura 13: Ensayos de metástasis *in vivo* utilizando células B16F10 y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}.

2×10^5 células B16F10 y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} viables fueron inyectadas por vía intravenosa en ratones C57BL/6. Después de 21 días los ratones fueron sacrificados y sus pulmones fueron colectados para detectar y cuantificar la presencia de focos de metástasis. A) Supervivencia de ratones C57BL/6 a los 21 días posteriores a la inyección de células B16F10_{CONTROL} (línea segmentada) y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} (línea continua). B) Imágenes de pulmones de ratones C57BL/6 a los 21 días posteriores a la inyección de células B16F10 o células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}; junto con la determinación de masa tumoral (nódulos negros) presente en pulmones de estos ratones. Se muestra el promedio del resultado con 8 o 12 ratones (n= 8-12). Los datos fueron analizados utilizando test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control son indicadas (* = $p < 0,05$ y *** = $p < 0,001$).

3.4 OBJETIVO ESPECIFICO 4

Determinar las condiciones necesarias para utilizar células B16F10 marcadas con QDs-GSH, para ensayos de metástasis *in vivo* en ratones C57BL/6.

3.4.1. SEGUIMIENTO DE LA FLUORESCENCIA ASOCIADA A QDs-GSHv Y QDs-GSHr PRESENTES EN CÉLULAS B16F10, RATONES C57BL/6 Y PULMONES DE RATONES C57BL/6.

El objetivo final de este estudio fue obtener células B16F10 marcadas con QDs-GSH, con el potencial de ser usadas en ensayos de metástasis temprana por herramientas de imagenología. Para esto, es importante definir las condiciones necesarias para obtener imágenes que permitan analizar y cuantificar la presencia de células B16F10 marcadas con QDs-GSH en órganos de ratones C57BL/6. Se realizó un estudio preliminar utilizando células B16F10 marcadas con 100 µg/mL de QDs-GSHv, en presencia de lipofectamina y 10 mM de NAC, tal como se describió para la obtención de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, (denominadas células vB16F10_{QDs-GSH-10NAC}) buscando seguir la marca asociada a estos QDs-GSH verdes o rojos utilizando un sistema de imagenología *in vivo* (IVIS). De esta manera se siguió esta fluorescencia en células B16F10, ratones C57BL/6 vivos y en pulmones de ratones C57BL/6.

En este estudio preliminar, se pudo observar la fluorescencia asociada a QDs-GSHr y QDs-GSHv en células B16F10 mediante el uso de IVIS, siendo posible

diferenciar la fluorescencia asociada a QDs-GSHv de la fluorescencia asociada a QDs-GSHr (Figura 14 A). Sin embargo, no fue posible por esta metodología, observar la fluorescencia asociada a QDs-GSHr o QDs-GSHv en ratones C57BL/6 vivos (Figura 14 B), así como en pulmones colectados a desde ratones C57BL/6 (Figura 14 C).

Se sabe que moléculas biológicas como la hemoglobina, el agua o lípidos, pueden interferir en ensayos de imagenología, dado que absorben luz a longitudes menores de 700 nm (Pan et al., 2010). Por este motivo, los pulmones colectados desde ratones tratados con células B16F10_{control}, B16F10_{QDs-GSH-10NAC} o células vB16F10_{QDs-GSH-10NAC}, fueron almacenados durante una semana en solución Fekete, la cual permitió decolorar y fijar tejidos (Wexler, 1966). Posteriormente, pulmones de ratones C57BL/6 almacenados en solución Fekete, fueron observados nuevamente utilizando el sistema IVIS. Los resultados mostraron que el sistema IVIS permitió detectar la fluorescencia asociada a QDs-GSHr a diferencia de la fluorescencia asociada a QDs-GSHv, que no pudo ser detectada (Figura 14 D). De esta manera, los resultados preliminares indican que era posible detectar la fluorescencia asociada a QDs-GSHr en pulmones de ratones C57BL/6 tratados con células B16F10 marcadas con QDs-GSHr. Para esto, es necesario coleccionar órganos provenientes de estos ratones y almacenar estos órganos en solución decolorante/fijación Fekete durante al menos 1 semana, previa a la visualización de la fluorescencia presente en órganos mediante IVIS.

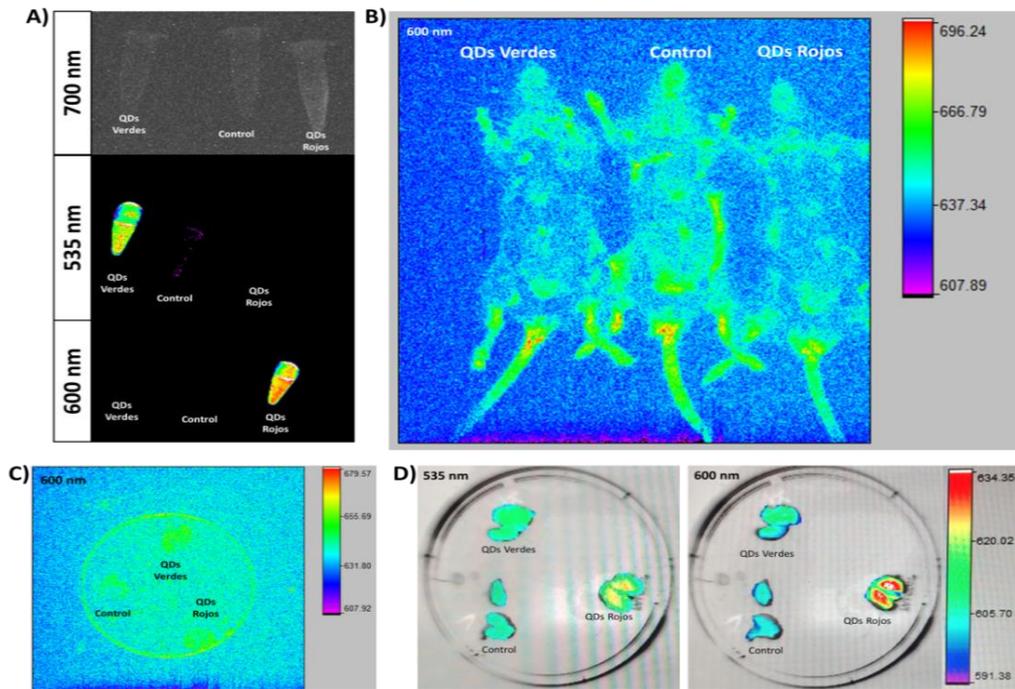


Figura 14: Ensayos preliminares de imagenología utilizando células B16F10 marcadas con QDs-GSHv o QDs-GSHr.

2×10^5 células B16F10_{control}, B16F10 marcadas con QDs-GSHv o QDs-GSHr viables fueron inyectadas por la vena de la cola en ratones C57BL/6. Posteriormente la fluorescencia asociada a QDs-GSHv (QDs verde) y QDs-GSHr (QDs rojo) fue seguida por el sistema de imagenología *in vivo* (IVIS) a los 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 40 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas y 6 horas post-inyección. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados y sus pulmones colectados, siguiéndose su fluorescencia mediante IVIS. Luego, los pulmones colectados fueron guardados en solución decolorante/fijadora Fekete y almacenados durante 1 semana a temperatura ambiente. Finalmente, los pulmones colectados fueron visualizados nuevamente por el sistema IVIS. La fluorescencia asociada a QDs-GSH verde fue seguida a 535 nm y la fluorescencia asociada a QDs-GSH rojos fue seguida a 600 nm, ambas con excitación a 410 nm. A) Imágenes de tubos eppendorf que contenían 4×10^5 células/mL de células B16F10_{control} (control), células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} (QDs Rojo) o vB16F10_{QDs-GSH-10NAC} (QDs Verde). B) Imágenes de ratones C57BL/6, 6 horas post-inyección de células B16F10_{control} (control), células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} (QDs Rojo) o vB16F10_{QDs-GSH-10NAC} (QDs Verde). Se muestra la fluorescencia a 600nm. C) Imágenes de pulmones de ratones C57BL/6 sacrificados a las 6 horas post-inyección. Se muestra la fluorescencia a 600nm. D) Imágenes de pulmones de ratones C57BL/6 sacrificados a las 6 horas post-

inyección almacenados durante 1 semana en solución Fekete. Se muestra la fluorescencia a 535 y 600 nm.

3.4.2. SEGUIMIENTO DE FLUORESCENCIA ASOCIADA A CÉLULAS B16F10_{QDS-GSH-10NAC} EN ÓRGANOS COLECTADOS DESDE RATONES C57BL/6 A DISTINTOS TIEMPOS POST-INYECCIÓN

Para finales del 2013, un estudio publicado por Saitoh y colaboradores, demostró que células B16-BL6 (línea derivadas de células B16F10) se acumulan en pulmones de ratones C57BL/6 a los cinco minutos post-inyección de estas por vía intracardiaca (Saitoh et al., 2014). Esto sugiere que el arribo y acumulación de células tumorales ocurre rápidamente una vez que estas se encuentran en el torrente sanguíneo.

Nuestros resultados indican que células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} son capaces de migrar de manera similar a células B16F10_{control} pero su capacidad de invadir, proliferar y producir focos de metástasis *in vivo* se ven dramáticamente afectadas. Por estas razones, se planteó que células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} podrían ser utilizadas en ensayos de distribución y acumulación temprana de células B16F10 en órganos de ratones C57BL/6, lo que permitiría visualizar este proceso de manera independiente del proceso de invasión y proliferación celular. Buscando comprobar esta hipótesis, 2×10^5 células B16F10_{control} o células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} (Figura 15 A) fueron inyectadas en ratones C57BL/6. Posteriormente estos ratones fueron sacrificados después de 5 minutos, 30 minutos, 2 horas, 6 horas y 24 horas post-inyección y colectados

sus pulmones (órgano blanco de células B16F10)(Fidler, 1975; Lobos-González et al., 2013), hígado, riñones, bazo (principales órganos que acumulan QDs posterior a su inyección al torrente sanguíneo), corazón y timo (órganos que no acumularían QDs posterior a su inyección al torrente sanguíneo) (Haque et al., 2013; Schipper et al., 2007, 2009; Smith et al., 2008; Soo Choi et al., 2007; Ye et al., 2012). Los órganos colectados fueron almacenados en solución Fekete por al menos una semana para finalmente determinar la fluorescencia asociadas a células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} (excitación a 410 nm y emisión a 600 nm) en los distintos órganos mediante sistema IVIS.

Los resultados obtenidos indicaron que la fluorescencia asociada a células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} es claramente distinguible en pulmones de ratones C57BL/6 a las 6 horas post-inyección, en comparación a su control (Figura 15 B). También se observó que la fluorescencia de pulmones aumenta de manera significativa a partir de 5 minutos post-inyección, observándose un aumento del 10 % aproximado a los 5 minutos, 14,6 % aproximado a los 30 minutos, 15,6 % aproximado a las 2 horas, 20,2 % aproximado a las 6 horas (máxima diferencia significativa observada) y un 12,8% aproximado a las 24 horas post-inyección de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} (Figura 15 C). En el hígado se observó un aumento significativo de la fluorescencia solo a los 5 minutos post-inyección (14,5 % aproximado), para luego disminuir a tiempos mayores (Figura 15 D). En el corazón, se observó que la fluorescencia asociada a las células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} aumentó de manera significativa a partir de los 5 minutos post-

inyección la cual aumentó levemente con el transcurso del tiempo, donde se observó un aumento del 5,7 % aproximado a los 5 minutos, 4,7 % aproximado a los 30 minutos, 8,5 % aproximado a las 2 horas, 10,3 % aproximado a las 6 horas y un 9,6% aproximado a las 24 horas (Figura 15 E). En los riñones, se observó que la fluorescencia asociada a células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} aumentó de manera significativa a partir de los 5 minutos post-inyección y continuo aumentando levemente con el transcurso del tiempo, excepto a los 30 minutos, donde no se observó diferencias significativas con órganos control. Los análisis indicaron un aumento del 11,4 % aproximado a los 5 minutos, 5,1 % aproximado a las 2 horas, 5,7 % aproximado a las 6 horas y un 5,7 % aproximado a las 24 horas (Figura 15 F). En el bazo de ratones C57BL/6 no se observaron cambios significativos en la fluorescencia asociada a células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} (Figura 15 G). Finalmente, en el timo se observó que la fluorescencia asociada a células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} aumentó de manera significativa a partir de los 30 minutos post-inyección (8,6 % aproximado) hasta alcanzar un máximo de un 10,9 % a las 2 horas post-inyección. Luego la fluorescencia observada en timo bajó a niveles estadísticamente similares a los órganos control (Figura 15 H).

De esta manera, los resultados sugieren que las células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} se distribuirían rápidamente (5 minutos) en pulmones, hígados, corazón y riñones, para luego comenzar a acumularse mayoritariamente en pulmones de ratones C57BL/6. Además, los resultados indicarían que no habría una acumulación

temprana de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} en bazo o timo. Este último, presenta un aumento en la fluorescencia entre los 30 minutos y las 2 horas, para luego disminuir a niveles estadísticamente similares a órganos control.

En resumen, los resultados obtenidos indican que fue posible seguir y cuantificar la fluorescencia de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} de manera exitosa en órganos de ratones C57BL/6, lo que permitiría seguir la distribución y la acumulación de estas células marcadas en distintos órganos de ratones C57BL/6.

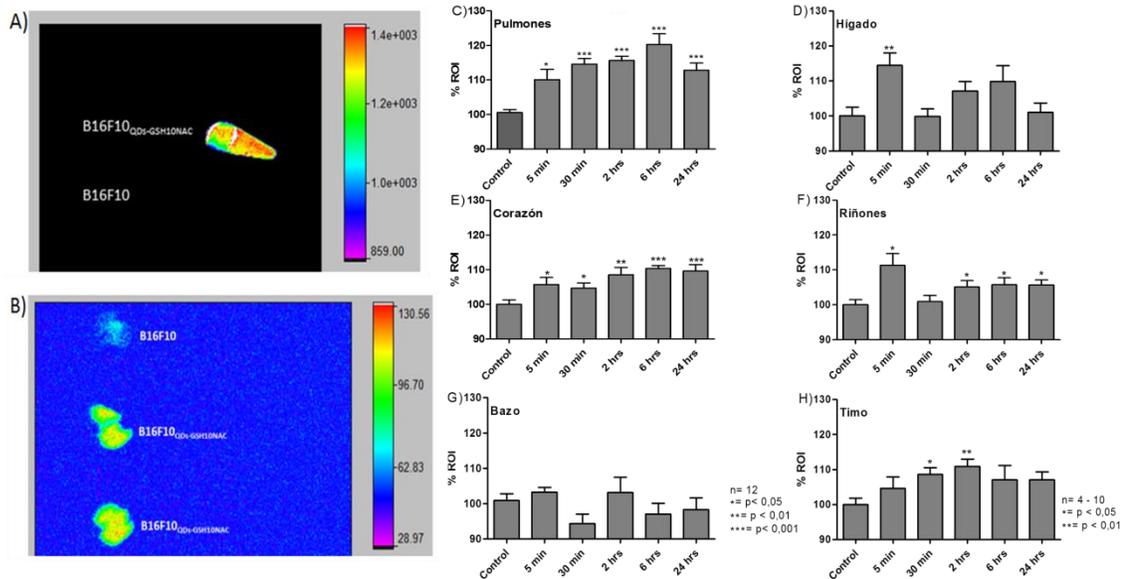


Figura 15: Seguimiento *in vivo* de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}.

2×10^5 células B16F10 o células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} viables fueron inyectadas por vía intravenosa en ratones C57BL/6. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados y sus pulmones, hígado, corazón, riñones, bazo y timo fueron colectados a los 5 minutos, 30 minutos, 2 horas, 6 horas y 24 horas para detectar fluorescencia asociada a células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. A) Imágenes obtenidas por sistema IVIS, de tubos eppendorf que contenían una suspensión de células B16F10 o células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} (4×10^5 células/mL). B) Imágenes obtenidas por sistema IVIS, de pulmones de ratones C57BL/6 obtenidos a las 6 horas posteriores a la inyección de células B16F10 o células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. C-H) Cuantificación de fluorescencia asociada a células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} en pulmones, hígado, corazón, riñones, bazo y timo de ratones C57BL/6 a 5 minutos, 30 minutos, 2 horas, 6 horas y 24 horas posteriores a la inoculación de células B16F10 (Control) o células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. Se muestra el análisis de fluorescencia normalizada con respecto a la fluorescencia de los distintos órganos controles. Se muestra el promedio del resultado con 12 ratones independientes (n=12) para los distintos órganos, excepto para timo, donde se muestra promedio de resultados con 4-10 ratones independientes (n= 4-10). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Las diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control son indicadas (* = p < 0,05; ** = p < 0,001 y *** = p < 0,001).

3.4.3. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CÉLULAS B16F10_{QDs-GSH-10NAC} EN LOS PULMONES DE RATONES C57BL/6

Buscando relacionar el aumento de fluorescencia observado en órganos de ratones C57BL/6 con la presencia de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, se propuso determinar la presencia de estas células en los pulmones de ratones C57BL/6 mediante un análisis histológico. Con esta finalidad, cortes histológicos obtenidos a partir de pulmones de ratones C57BL/6 colectados a las 6 horas post-inyección de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, fueron teñidos con Faloidina (fluorescencia verde), para su análisis mediante microcopia confocal.

Resultados obtenidos mostraron que los pulmones C57BL/6 tratados con células B16F10_{control} no presentaron fluorescencia asociada a QDs-GSHr, a diferencia de imágenes obtenidas a partir de cortes histológicos de pulmones de ratones tratados con células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, donde se observó la presencia de células con fluorescencia asociada a QDs-GSHr (emisión a 600 nm) (Figura 16 A). Estos resultados confirmaron la presencia de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} en pulmones de ratones C57BL/6 tratados con células marcadas, lo que indicaría que el cambio de fluorescencia observado en el ensayo de acumulación/distribución de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} (Figura 15 C-H) se atribuiría a la presencia de células marcadas con QDs-GSHr.

3.4.4. DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS B16F10_{CALCEINA} Y CÉLULAS B16F10_{QDS-GSH-10NAC} EN PULMONES DE RATONES C57BL/6

Durante el proceso de colonización de órganos distantes por parte de células tumorales, la extravasación juega un rol crucial (van Zijl et al., 2011). Por este motivo fue importante determinar si las células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} eran capaces de transmigrar a través del endotelio vascular y colonizar el tejido pulmonar de ratones C57BL/6. Con esto en mente, 2×10^5 células viables B16F10_{QDS-GSH-10NAC} y células B16F10 marcadas con Calceína (B16F10_{Calceína}), fueron inyectadas en ratones C57BL/6. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados a las 6 y 24 horas post-inyección y sus pulmones colectados y utilizados para la realización de estudios histológicos. En este estudio se determinó específicamente la fluorescencia asociada a células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} (emisión a 600 nm) o a células B16F10_{Calceína} (emisión a 510 nm) en endotelio vascular, alveolos y bronquios (Figura 16 y 17A). Como controles, se utilizaron cortes obtenidos a partir de pulmones de ratones C57BL6 tratadas con células B16F10_{control} (Figura 16), donde se utilizó tinción con DAPI para determinar la presencia de núcleos celulares y de faloidina (roja o verde) para determinar el correcto funcionamiento de los canales utilizados.

Las células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} y células B16F10_{Calceína} fueron mayoritariamente observadas en el área perialveolar después de 6 y 24 horas post-inyección (Figura 17 B y C), marca que no se encontró en pulmones de

ratones control (Figura 16 B). Además, se observó un aumento de células presentes en esta área a las 24 horas, en comparación con lo observado a las 6 horas post-inyección. Esto sugeriría que las células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} serían capaces de transmigrar de manera similar al control (B16F10_{Calceína}).

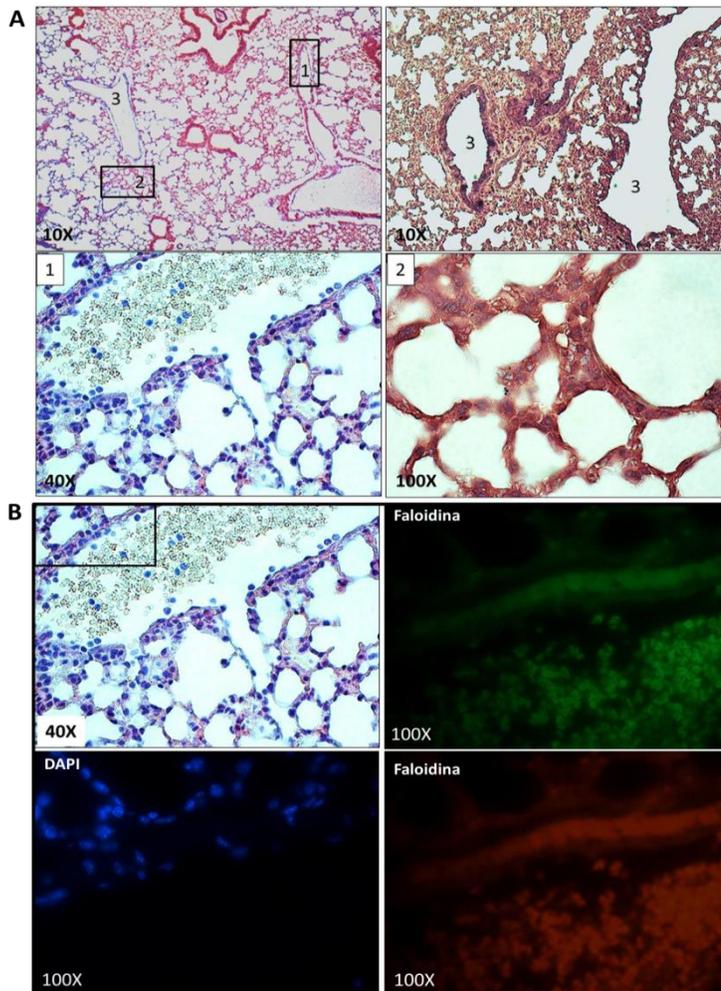


Figura 166: Controles ensayos inmunohistoquímicos de cortes histológicos.

Cortes histológicos obtenidos de pulmones de ratones C57BL/6 tratados con células B16F10_{CONTROL} por 6 horas. Cortes fueron teñidos utilizando Hematoxilina Eosina o utilizados para marcaje con Faloidina (emisión en verde o rojo) y DAPI. A) Imagen de microscopía óptica de secciones histológicas de pulmones colectados de ratones C57BL/6, a las 6 horas post-inyección de células B16F10_{CONTROL}, teñidas utilizando hematoxilina eosina. Se destacan estructuras pulmonares analizadas para la posterior detección de florescencia asociada a células B16F10_{Calceína} y B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. 1) Maculatura endotelial, 2) alveolos, 3) bronquios. B) Imágenes de microscopía confocal de secciones histológicas de pulmones de ratones C57BL/6, colectados a las 6

horas post-inyección de células B16F10_{CONTROL}, y teñidos con Faloidina (roja o verde).

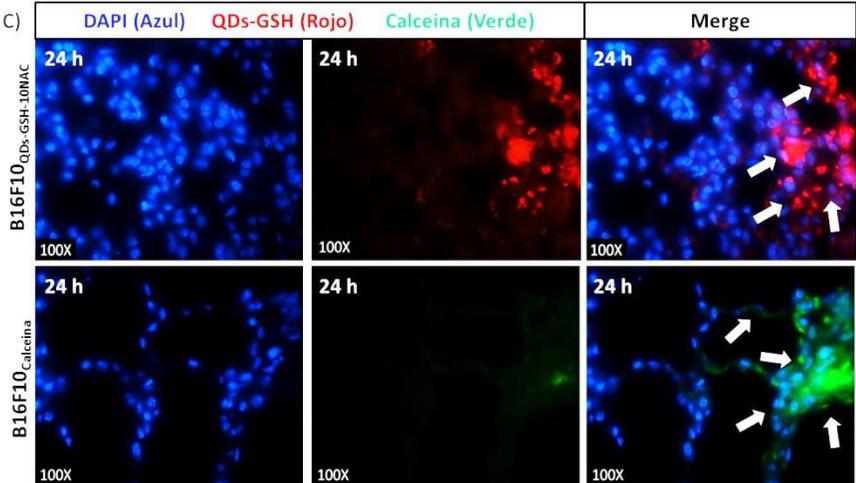
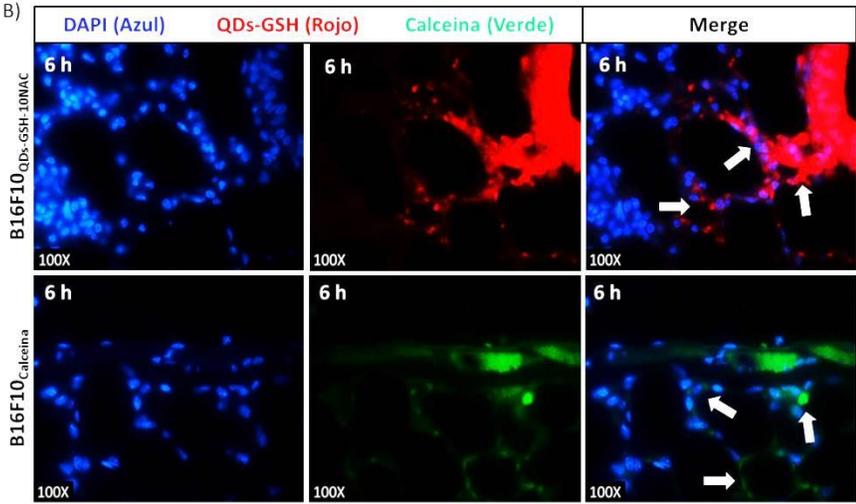
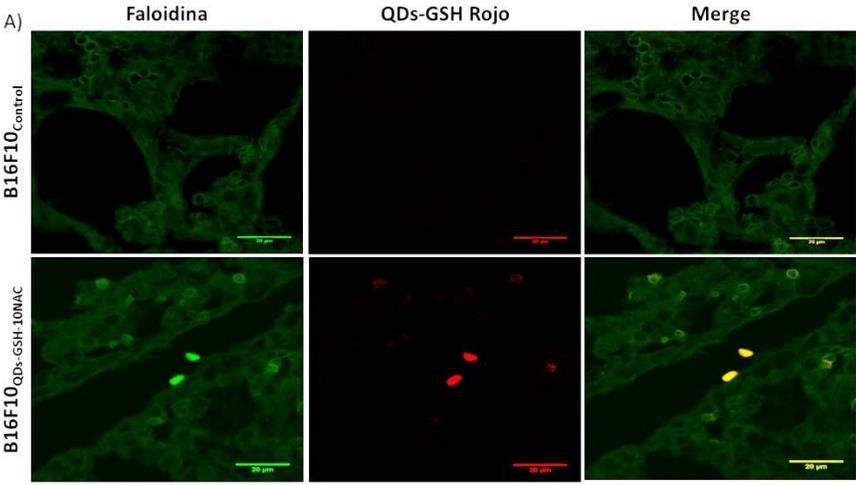


Figura 177: Presencia y distribución de células B16F10 y B16F10_{QDs-GSH-10NAC} en pulmones de ratones C57BL/6 a 6 y 24 horas post-inyección.

2×10^5 células B16F10 sin marcar (B16F10_{control}), células B16F10_{calceína} y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} viables fueron inyectadas por vía intravenosa en ratones C57BL/6. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados y sus pulmones fueron colectados a las 6 y 24 horas posteriores de la inyección de las distintas células, para detectar fluorescencia asociada a células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} y a células B16F10_{calceína}. A) Imágenes confocal de cortes histológicos de pulmones colectados a las 6 horas post inyección de células B16F10_{control} y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. B) Imágenes confocal de cortes histológicos de pulmones colectados a las 6 horas post inyección de células B16F10_{calceína} y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. C) Imágenes confocal de cortes histológicos de pulmones colectados a las 24 horas post inyección de células B16F10_{control} y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}. Flechas blancas muestran sectores que presentan fluorescencia asociada a células B16F10_{calceína} y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}.

Finalmente, el análisis de imágenes con software ImageJ indicó una disminución significativa de la fluorescencia asociada a células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} y a células B16F10_{Calceína} entre las 6 y 24 horas post-inyección. La fluorescencia observada entre células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} y a células B16F10_{Calceína} a las 6 horas post-inyección no presentó diferencia significativa, aunque se observó que la fluorescencia de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} era significativamente mayor a la fluorescencia de células B16F10_{Calceína} a las 24 horas post-inyección (Figura 18).

En resumen, estos resultados indican que células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} se distribuirían de manera similar a células B16F10_{Calceína}, sugiriendo que el proceso de trans migración de estas células no se vería alterado gracias al protocolo de marcaje con QDs-GSHr utilizado. Además, los resultados indican

que la fluorescencia asociada a células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} disminuyó entre las 6 y 24 horas post-inyección, pero esta disminución es significativamente menor a lo observado en células B16F10_{Calceína}, lo que sugeriría que el protocolo de marcaje utilizado favorece la permanencia de la marca asociada a QDs-GSHr en células B16F10 en comparación al marcaje utilizando Calceína.

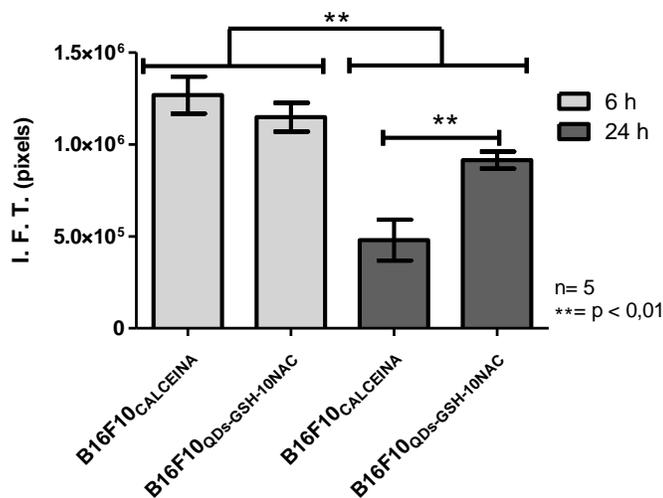


Figura 18: Intensidad de Fluorescencia Total (IFT) de células B16F10_{CALCEINA} y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} a las 6 y 24 horas post-inyección.

La fluorescencia asociada a células B16F10_{CALCEINA} y células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} presentes en cortes histológicos fue medida utilizando software ImageJ 1,4v . Se muestra el promedio del resultado con 5 ratones independientes (n= 5). Los datos fueron analizados utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos son indicadas (** = p < 0,01).

3.4.5 PRUEBA DE CONCEPTO

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis, permitieron seleccionar un protocolo de marcaje de células B16F10 con QDs-GSHr en su interior. Este consiste en la utilización de células B16F10, tratamientos con 10 mM de NAC durante 24 horas y posterior tratamiento con 100 µg/mL de QDs-GSHr, 10 mM de NAC y 4 µL/mL de lipofectamina durante otras 24 horas. Esta metodología permitió obtener células B16F10 marcadas con QDs-GSH en su interior, que poseen la capacidad de migrar y acumularse en pulmones de ratones C57BL6 de manera similar a células B16F10 control. Aunque su capacidad de invasión, proliferación y formación de tumores en pulmones de ratones C57BL/6 se ve drásticamente disminuida. Basado en esto, se planteó que estas células B16F10 marcadas mediante el protocolo desarrollado, pueden ser utilizadas en ensayos de acumulación y/o distribución de células metastásicas en ratones C57BL/6.

Estudios publicados por nuestro laboratorio, utilizando el modelo de metástasis de ratones C57BL/6 y células B16F10, han demostrado que la proteína caveolina-1 (CAV-1), aumenta la migración, invasión, y capacidad de generar focos metastásicos en ratones C57BL/6 de células B16F10 (Lobos-González et al., 2013). Presentando esta proteína como una excelente candidata para probar la factibilidad del uso la novedosa metodología aquí descrita, como una

herramienta de estudio de metástasis temprana, enfocada en la acumulación y llegada de las células B16F10 al pulmón de ratones C57BL/6.

Buscando probar este nuevo protocolo de marcaje desarrollado y relacionarlos a estudios realizados por nuestro laboratorio, se propuso utilizar células B16F10 que contienen el vector pLacIOP [B16F10(Mock)] y células B16F10 que contienen el vector iLacIOP-caveolina-1 que sobre-expresa la proteína caveolina 1 [B16F10(CAV-1)], para ser usadas en ensayos de acumulación temprana de células B16F10 en pulmones de ratones C57BL/6.

Para esto, las células B16F10(Mock) y B16F10(CAV-1) fueron marcadas con QDs-GSHr utilizando el protocolo desarrollado en este estudio. Luego, la viabilidad, porcentaje de células viables marcadas e IFM de las células B16F10(Mock) y B16F10(CAV-1) fueron determinados mediante citometría de flujo. Posteriormente, 2×10^5 células viables B16F10(Mock) y B16F10(CAV-1) marcadas con QDs-GSHr utilizando la metodología antes descrita, fueron inyectadas por vena de la cola en ratones C57BL/6. Luego, los ratones C57BL/6 fueron sacrificados a las 6 horas post-inyección de estas células, sus pulmones colectados y almacenados en solución Fekete durante una semana. Finalmente, la fluorescencia asociada a QDs-GSHr fue determinada mediante sistema IVIS en pulmones de ratones C57BL/6.

Los resultados indicaron que el proceso de marcaje utilizado no afectó de manera significativa la viabilidad de células B16F10(Mock) o B16F10(CAV-1)

(Figura 19 A). Además, la caracterización de la fluorescencia asociada a QDs-GSHr presentes en células B16F10(Mock) y B16F10(CAV-1) indicó que no existe una diferencia significativa en el porcentaje de células viables marcadas (Figura 19 B) o en la IFM de células B16F10(Mock) y B16F10(CAV-1) viables marcadas (Figura 19 C), lo que indica que células B16F10(Mock) y B16F10(CAV-1) presentan características de fluorescencia similares.

Imágenes de los pulmones de ratones C57BL/6 a los cuales se les inyectaron células B16F10(Mock) o B16F10(CAV-1) marcadas con QDs-GSHr utilizando la metodología desarrollada, mostraron mayor marca asociada a QDs-GSHr en los pulmones tratados con células B16F10(CAV-1) marcadas, en comparación a los pulmones de ratón tratados con células B16F10(Mock). Estos resultados permitirían inferir que la sobreexpresión de CAV-1 podría ser relacionada a una mayor acumulación de células B16F10 en los pulmones.

Finalmente, los resultados obtenidos indican que el protocolo desarrollado en este trabajo para el marcaje y seguimiento de células B16F10 en órganos de ratones C57BL/6 tiene la potencialidad de ser utilizado en ensayos orientados a determinar el efecto de alguna proteína (en este caso CAV-1) u otra molécula en la acumulación y distribución temprana de células B16F10 en órganos de ratones C57BL/6.

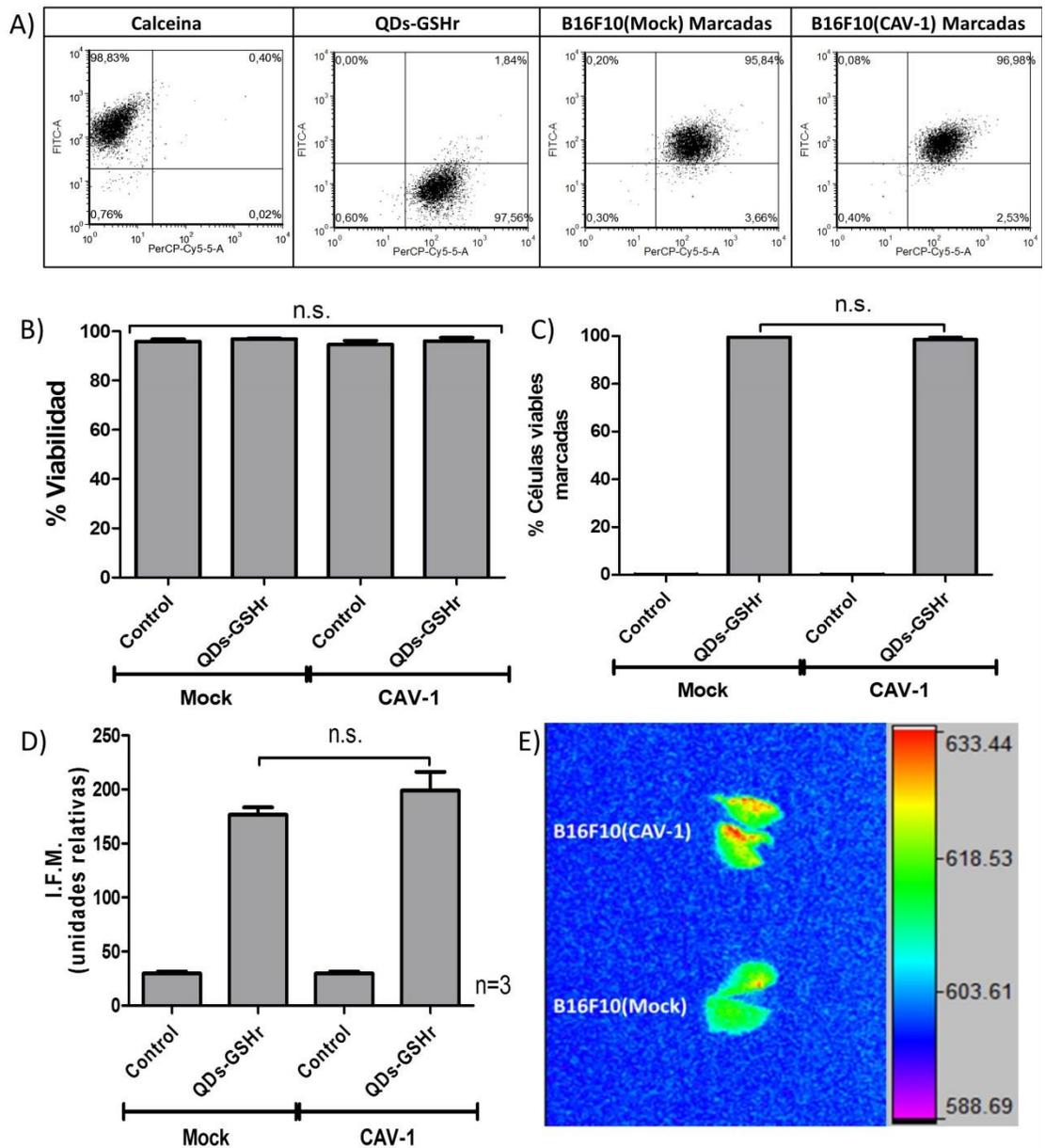


Figura 19: Prueba de concepto utilizando el protocolo de marcaje desarrollado en células B16F10(Mock), B16F10(CAV-1) y ratones C57BL/6.

Células B16F10(Mock) y B16F10(CAV-1) fueron marcadas con QDs-GSHr utilizando el protocolo desarrollado. La viabilidad, el porcentaje de células viables marcadas y la IFM fueron determinadas mediante citometría de flujo. Posteriormente, 2×10^5 células B16F10(Mock) y B16F10(CAV-1) viables marcadas con QDs-GSHr fueron inyectadas en ratones C57BL/6, los cuales fueron sacrificados a las 6 horas post-inyección y sus pulmones fueron

colectados y guardados en solución fekete durante una semana. Finalmente, los pulmones de ratones C57BL/6 fueron observados y seguida la fluorescencia asociada a QDs-GSHr. A) Dot-plot de células B16F10 analizadas por citometría. De izquierda a derecha, células B16F10(Mock) marcadas con Calceina, células B16F10(Mock) marcadas con QDs-GSHr, células B16F10(Mock) marcadas con Calceina y QDs-GSHr y células B16F10(CAV-1) marcadas con Calceina y QDs-GSHr. B) Viabilidad de células B16F10(Mock) y B16F10(CAV-1) marcadas con QDs-GSHr mediante el protocolo desarrollado. C) Porcentaje de células B16F10(Mock) y B16F10(CAV-1) viables marcadas con QDs-GSHr mediante el protocolo desarrollado. D) Intensidad de Fluorescencia Media (I.M.F.) asociada a células B16F10(Mock) y B16F10(CAV-1) viables marcadas con QDs-GSHr mediante el protocolo desarrollado. E) Imagen de pulmones de ratones C57BL/6 colectados a las 6 horas post-inyección de células B16F10(Mock) y B16F10(CAV-1) viables marcadas con QDs-GSHr mediante el protocolo desarrollado. Se muestra el promedio del resultado de experimentos en 3 ratones (n=3). Los datos fueron analizados utilizando test no paramétrico Kruskal-Wallis. Diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control son indicadas (* = $p < 0,05$).

4. DISCUSIÓN

Células de melanoma murino B16F10 son células singénicas con ratones C57BL/6, con elevado potencial metastásico, que se acumulan específicamente en pulmones de ratones C57BL/6 después de ser inyectadas por la vena de la cola de dichos ratones (Fidler, 1975; Lobos-González et al., 2013), formando nodos metastásicos pigmentados (negros) en pulmones a los 15-21 días post-inyección de estas células (Fidler, 1975; Lobos-González et al., 2013). Por esta razón, esta línea celular fue seleccionada como modelo de metástasis para realizar este estudio.

Tal como lo recomiendan Bradburne y colaboradores (Bradburne et al., 2013), en este estudio se evaluaron diversos parámetros para la utilización de QDs-GSH como marcaje de células B16F10: 1) Evaluación del tipo de QDs-GSH utilizado (QDs-GSHv, QDs-GSHr y QDs-GSH10); 2) funcionalización de los QDs con SH-PEGs, para favorecer la biocompatibilidad (Chen et al., 2012; Rzigalinski and Strobl, 2009; Yildirimer et al., 2011); 3) La concentración a utilizar (50, 100, 200 y 400 µg/mL); 4) Tipo de línea celular (MKN45 v/s B16F10) (Pérez-Donoso et al., 2012); y 5) Utilización de tratamientos con NAC para la protección celular (Anderson, 1998; Lovrić et al., 2005; Valko et al., 2005). El objetivo final fue generar una metodología que permita obtener B16F10 marcadas con QDs-GSH en su interior, las cuales posean el potencial de ser utilizadas en estudios de metástasis temprana utilizando ratones C57BL/6.

4.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DISTINTOS QDs-GSH VERDES O ROJOS.

QDs-GSHv y QDs-GSHr utilizados en este estudio fueron sintetizados utilizando método biomimético desarrollado por nuestro laboratorio (Pérez-Donoso et al., 2012). Estos QDs están compuestos por CdTe y poseen una cobertura de glutatión, reportándose un menor contenido de glutatión en QDs-GSHr que QDs-GSHv (Díaz et al., 2012; Gautier et al., 2013). GSH es un tripéptido compuesto por glutamato, cisteína y glicina, con un grupo tiol en su estructura y 2 grupos carboxílicos que le confieren carga negativa (Anderson, 1998). Esto explicaría las cargas negativas y la diferencia en la magnitud de potencial Z observado en QDs-GSHv y QDs-GSHr., confirmando que estas diferencias en el potencial zeta se referirían a la cantidad de glutatión en la capa externa de los QDs-GSH. .

Esta relación también se observó al comparar los potenciales Z de QDs-GSHv y QDs-GSH10 (Tabla 2 y Tabla 4, respectivamente), donde QDs-GSHv, sintetizados utilizando 15mM de GSH muestran mayor potencial zeta que QDs-GSH10, los cuales fueron sintetizados utilizando 10mM de GSH. Lo que sugiere que el uso de una menor cantidad de glutatión durante el proceso de síntesis produce QDs-GSH con una menor cantidad de GSH en la superficie de los QDs-GSH.

4.2 FUNCIONALIZACIÓN DE QDs-GSH CON SH-PEGs. IMPORTANCIA DE LA COBERTURA DE GSH PRESENTES EN QDs.

La funcionalización de QDs con PEG disminuye la carga de superficie, aumenta la estabilidad coloidal de los QDs, permite la acumulación al interior de las células en vesículas y disminuye de manera importante la toxicidad de QDs (Jokerst et al., 2011; Schipper et al., 2009). Esto favorece la obtención de células B16F10 viables marcadas con QDs-GSH, y probablemente, permitiría disminuir el efecto en la viabilidad observado por la internalización de QDs-GSH (Pérez-Donoso et al., 2012).

Nuestros resultados mostraron que la capa de GSH presente en los QDs-GSHv impide la correcta interacción de SH-PEGs con el núcleo de los QDs-GSH, evidenciado por la necesidad de disminuir la cantidad de GSH durante la síntesis. Vale destacar que esta característica no ha sido reportado anteriormente en procesos de funcionalización de QDs utilizando SH-PEGs (Gao et al., 2004; Jokerst et al., 2011; Schipper et al., 2009) y además que el proceso de funcionalización con SH-PEGs no afectó las características espectroscópicas de QDs-GSH10 precursores. Esto último, indicaría que no existieron cambios en el núcleo de CdTe de los QDs, ya que estas características se relacionan directamente al tamaño y componentes del núcleo del nanocrystal (Chen et al., 2012; Rzigalinski and Strobl, 2009).

4.3 TRATAMIENTOS DE CÉLULAS B16F10 CON QDs-GSH10 Y QDs-PEGs Y SU EFECTO EN EL PROCESO DE MARCAJE CELULAR. EFECTO DE LA COBERTURA.

Dado que el tamaño y la cobertura presentes en QDs ejercen efecto en la viabilidad de células tratadas con estas NPs (Chen et al., 2012; Díaz et al., 2012; Rzigalinski and Strobl, 2009; Xu et al., 2016; Yildirimer et al., 2011), era importante determinar si las modificaciones realizadas utilizando PEGs afectan la viabilidad o si favorecen la internalización de estos QDs en células B16F10. Además, vale destacar que se desconoce si la modificación con PEGs favorece la internalización de QDs-GSH en presencia de lipofectamina (Gao et al., 2004; Jokerst et al., 2011; Schipper et al., 2009).

Tratamientos con QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂ no afectaron la viabilidad de células B16F10 (Figura 6 A y C), ni favorecieron la obtención de células B16F10 marcadas con QDs-GSH (Figuras 6 B y D), incluso en presencia de lipofectamina. Por su parte, tratamientos con QDs-PEG-COOH en presencia de lipofectamina afectaron de manera significativa la viabilidad de células B16F10 (Figura 6 A y C), aunque no permiten obtener células viables marcadas (Figura 6 B y D).

Datos obtenidos durante esta tesis (Respaldos Digitales - Laboratorio de comunicaciones celulares), muestran que QDs-PEG-COOH, en un lapso de una semana, pierden la fluorescencia y forman un precipitado negro. Esto sugeriría que la funcionalización de QDs-GSH10 usando SH-PEG-COOH generaría, de

alguna manera, inestabilidad en la nanopartícula, lo que produciría la liberación de Cd^{+2} desde el núcleo de los QDs (Hardman, 2006; Pérez-Donoso et al., 2012) afectando la viabilidad de las células B16F10 (Bertin and Averbeck, 2006).

Lipofectamina es un polímero catiónico que en solución acuosa forma liposomas que permiten internalizar moléculas de carga negativa a la célula (Dalby et al., 2004). Por su parte, la funcionalización con PEGs modifica la carga de superficie de QDs-GSH disminuyendo la magnitud de la carga negativa de QDs-GSH10. La presencia de PEG-MET y PEG-NH₂ en la capa externa de QDs-GSH10 podría inhibir la interacción de los QDs con liposomas catiónicos generados por la presencia de lipofectamina. Esto, explicaría la ausencia de efecto en la viabilidad de células B16F10 tratadas con QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂, así como la ausencia de células B16F10 marcadas mediante los tratamientos realizados.

Es importante destacar que tratamientos con QDs-GSH10 en presencia de lipofectamina afectaron de menor manera la viabilidad de células B16F10 (Figura 6 A) y permitieron obtener la mayor cantidad de células viables marcadas (Figura 6 B) en comparación a los mismos tratamientos con QDs-GSHv (Figura 4 A y 4 B). QDs-GSH10 poseen una menor magnitud de potencial Z que QDs-GSHv. Esto indicaría que la magnitud de potencial Z influiría en el fenómeno de internalización de los QDs-GSH, lo que plantea otra arista en los

parámetros a evaluar, en la búsqueda de un protocolo que permita obtener células B16F10 viables marcadas con QDs-GSH con potencial de ser usadas en estudios de metástasis temprana.

4.4 EFECTO EN LA VIABILIDAD Y MARCACIÓN DE CÉLULAS B16F10 Y MKN45 CON QDs-GSHv. ROL DE LOS TIOLES INTRACELULARES

Nuestros resultados mostraron que no fue posible obtener células B16F10 viables marcadas con los distintos tratamientos con QDs-GSHv o QDs-PEGs, incluso en presencia de lipofectamina (Figura 4 B). Estos resultados no se condicen con lo publicado para tratamientos con QDs-GSHv en células MKN45 (Pérez-Donoso et al., 2012; Pérez-Donoso et al., 2013).

Al reproducir el experimento publicado por Pérez-Donoso y colaboradores (Figura 4 C y B), se observó un comportamiento similar a lo publicado (Pérez-Donoso et al., 2012). A modo de ejemplo, nuestros resultados muestran que con tratamientos con 100 µg/mL de QDs-GSHv y lipofectamina, se obtuvieron aproximadamente un 60 % de las células viables marcadas y una disminución en la viabilidad cercana al 25 %, donde para los mismos tratamientos, el estudio realizado por Pérez-Donoso y colaboradores publicó un 70 % de células viables marcadas y una disminución en la viabilidad de un 20 a 25 % (Pérez-Donoso et al., 2012). Esto sugeriría la existencia de una diferencia intrínseca entre células B16F10 y células MKN45 que permitiría a estas últimas sobrellevar de mejor

manera la internalización de QDs-GSHv. Esta idea también se plantea en diversos estudios que indican que existiría una predisposición a la toxicidad en diferentes líneas celulares expuestas a nanopartículas inorgánicas como los QDs (Bradburne et al., 2013; Catalan-Figueroa et al., 2015).

Está bien establecido que la generación de ROS y la presencia de cadmio en el núcleo de QDs, juegan un rol importante en la inducción de daño en sistemas biológicos (Derfus et al., 2004; Hardman, 2006; Peng et al., 2015; Rzigalinski and Strobl, 2009). Por otro lado, los tioles intracelulares (RSH) juegan un importante rol como mediadores de la tolerancia intracelular a ROS y al daño por metales pesado, como el cadmio, participando como quelantes de estos metales pesados y evitando su interacción con las moléculas biológicas (Anderson, 1998; Valko et al., 2005). Basados en esto, se hipotético que la diferencia en la sensibilidad a tratamientos con QDs-GSHv observada para células B16F10, en comparación a células MKN45, se relacionaría a una diferencia en los niveles de RSH basales presentes en estas líneas celulares. Por esto, se determinaron los niveles intracelulares de RSH presentes en células B16F10 y células MKN45 (Figura 5 A), observándose que células B16F10 poseen niveles intracelulares de RSH significativamente menores a células MKN45, sugiriendo que por esta razón las células B16F10 tendrían una menor tolerancia a la internalización de QDs-GSHv.

Lovrić y colaboradores demostraron que tratamientos con NAC, antioxidante que aumenta los niveles de GSH (principal RSH intracelular) (Anderson, 1998), protegen de mejor manera a la células ante el daño provocado por la internalización de QDs, que otros antioxidantes no tiolados, como Trolox (Lovrić et al., 2005). De este modo, el grupo tiol en la estructura del antioxidante tendría un rol fundamental en la tolerancia al daño provocado por la internalización de QDs. Basado en estos antecedentes, se propuso la utilización de tratamientos con NAC, buscando propiciar la tolerancia de QDs-GSHv en el interior de células B16F10. Estos tratamientos aumentaron de manera significativa los niveles de tioles reducidos intracelulares en células B16F10 (Figura 5 B), lo cual permite plantear el uso de NAC para aumentar la tolerancia de células B16F10 ante el daño producido por la internalización de QDs-GSHv.

4.5 EFECTO EN LA VIABILIDAD E INCORPORACIÓN DE QDs-GSH10, QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET Y QDs-PEG-NH₂ EN CÉLULAS B16F10 TRATADAS CON NAC

Los tratamientos con NAC permitieron aumentar de manera significativa el porcentaje de células viables marcadas. Por su parte, tratamientos con QDs-PEG-MET y QDs-PEG-NH₂ en presencia de NAC no favorecieron la obtención de células viables marcadas con QDs-GSH. Por su parte, tratamientos con NAC y QDs-PEG-COOH permitieron obtener células B16F10 viables marcadas, aunque en niveles menores a tratamientos con QDs-GSH10. Esto se

relacionaría con lo discutido anteriormente en la sección 4 (Efecto en la viabilidad y marcación de células B16F10 con QDs-PEG-COOH, QDs-PEG-MET, QDs-PEG-NH₂ y QDs-GSH10. Rol de la cobertura de QDs-GSHv) y se condice con varios estudios que muestran que la funcionalización de QDs con PEGs inhibirían su interacción con membranas lipídicas (Jokerst et al., 2011; Schipper et al., 2009).

Si bien, la funcionalización con PEGs fue propuesta para evitar la interacción del núcleo de los QDs con el medioambiente intracelular y/o moléculas biológicas (Jokerst et al., 2011; Schipper et al., 2009), los resultados obtenidos nos llevaron a descartar este método, dado que no favorece la internalización de QDs-GSH en células B16F10. Por otro lado, los tratamientos con NAC mostraron resultados más promisorios, por lo que estos tratamientos fueron incorporados en el proceso de marcaje.

4.6 DETERMINACIÓN DEL EFECTO EN LA VIABILIDAD E INCORPORACIÓN DE QDs-GSHv Y QDs-GSHr EN CÉLULAS B16F10

Los resultados mostraron que tratamientos con NAC favorecen la tolerancia de células B16F10 ante la internalización de QDs-GSH, similar a lo descrito anteriormente por Lovrić y colaboradores (Lovrić et al., 2005). Además, se observó una relación entre el potencial Z y la internalización de QDs-GSH en células B16F10. De este modo, una menor magnitud de potencial Z se

relacionaría con la obtención de un mayor número de células B16F10 viables marcadas con QDs-GSHv.

En células MKN45, no se observan células marcadas luego de incubar con QDs-GSHr, incluso en presencia de lipofectamina (Díaz et al., 2012). Por esta razón en una primera instancia, estos QDs no fueron considerados en este estudio. Pero, a la luz de los nuevos resultados obtenidos que indicarían que una menor magnitud en el potencial Z de QDs-GSH podría favorecer la obtención de células B16F10 viables marcadas, se utilizaron QDs-GSHr para tratar células B16F10 en presencia de lipofectamina, buscando determinar la factibilidad del uso de estos QDs-GSH para obtener células B16F10 viables marcadas.

En células B16F10 los QDs-GSHr serían significativamente menos tóxicos que QDs-GSHv (Figura 8), porque permiten obtener un alto porcentaje de células viables marcadas (Figura 8 A y B) con una mayor IFM (100 $\mu\text{g/ml}$). Es importante destacar que tratamientos con QDs-GSHr en presencia de lipofectamina solo generaron una disminución significativa en la viabilidad de células B16F10 a altas concentraciones (400 $\mu\text{g/ml}$), similar a lo observado para tratamientos con QDs-GSHv en células MKN45 (Pérez-Donoso et al., 2012). También fue posible observar una distribución citoplasmática similar a lo descrito en estudios anteriores utilizando células MKN45 y QDs-GSHv (Díaz et al., 2012; Gautier et al., 2013; Pérez-Donoso et al., 2012). Esto sugeriría que las

diferencias intrínsecas entre células B16F10 y células MKN45 no solamente se relacionan con los niveles de como plantean algunos estudios (Bradburne et al., 2013; Catalan-Figueroa et al., 2015), sino que también se referirían a diferencias propias de la membrana o de algún otra estructura o biomoléculas celulares. Por esta razón, es importante abordar en estudios futuros el efecto de QDs-GSH en la viabilidad y marcaje de otras líneas celulares no analizadas en este estudio.

QDs de menores tamaños (verdes) son más hábiles para atravesar membranas intracelulares en comparación a QDs de mayor tamaño (rojo), siendo los QDs de menor tamaño, capaces de entrar al núcleo y a otros compartimientos subcelulares como mitocondria (Lovrić et al., 2005), disminuyendo la viabilidad celular (Lovrić et al., 2005; Pérez-Donoso et al., 2012; Schaeublin et al., 2011). También se ha reportado que la toxicidad de NPs se relaciona al potencial Z de estas, donde una mayor magnitud en la carga negativa de potencial Z se relaciona a un mayor efecto en la viabilidad celular (Schaeublin et al., 2011) (Tabla 1 y Figura 8 A). Esto explicaría en parte, porque QDs-GSHv presentan una mayor toxicidad con respecto a QDs-GSHr en células B16F10.

Finalmente, es importante destacar que la fluorescencia mayores longitudes de onda son absorbidas de menor manera por los tejidos (Sahai, 2007), motivo por el cual la utilización de QDs-GSHr tomó mayor relevancia en este estudio, por lo que se eligieron para la realización de estudios posteriores.

4.7 MODULACIÓN DEL EFECTO DE ROS. EFECTO EN EL MARCAJE Y LA CAPACIDAD METASTÁSICA DE CÉLULAS B16F10 VIABLES MARCADAS CON QDs-GSHr

Efecto en el marcaje: La presencia de QDs produce un aumento de ROS en sistemas biológicos y cambios en niveles de ROS afectan la capacidad de migrar, invadir y de metastatizar de células tumorales (Loo, 2003; Wu, 2006). Por esto, era importante aminorar y/o eliminar el aumento de ROS esperable por la presencia de QDs-GSHr en el interior de células B16F10. Para ello se postuló que tratamientos con NAC permitirían modular los daños asociados a la presencia de QDs-GSHr en células B16F10. La internalización de QDs-GSHr produjo un aumento significativo en los niveles de ROS de células B16F10. Estos niveles disminuyen con los tratamientos con NAC, aumentando la tolerancia a la internalización de QDs-GSHr en células B16F10, evidenciado por el aumento en el porcentaje de células viables marcas y la intensidad de marca asociada a QDs-GSHr. Esto estaría relacionado a la reducción de ROS producido por la internalización de QDs-GSHr (Lovrić et al., 2005), lo que permitiría aumentar la cantidad de QDs-GSHr en el interior de células B16F10 (Pérez-Donoso et al., 2012).

Efecto en capacidad metastásica *in vitro*: Se sabe que los niveles de ROS pueden afectar el comportamiento de células metastásicas (Loo, 2003; Wu, 2006), y que la presencia de QDs genera un aumento de ROS en sistemas biológicos. Por este motivo, es importante determinar el efecto que la

internalización de QDs-GSHr podría producir en las capacidades metastásicas de células B16F10. Para esto, determinamos la capacidad de migrar e invadir de células B16F10 marcadas con QDs-GSHr en presencia de tratamientos con 4mM de NAC, denominadas células B16F10_{QDs-GSH-4NAC} (niveles de ROS ~2,5 veces mayor a células control y aumento significativo en el porcentaje de células marcadas) y células B16F10 marcadas con QDs-GSHr en presencia de tratamientos con 10mM de NAC, denominadas células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} (niveles de ROS similares a células control, aumento significativo en el porcentaje de células marcadas y la mayor IFM observada).

Células B16F10_{QDs-GSH-4NAC} y B16F10_{QDs-GSH-10NAC} migraron manteniendo la marca asociada a QDs-GSHr (Figura 10 A). La migración de células B16F10_{QDs-GSH-4NAC} fue 2,8 veces mayor a células B16F10 control (Figura 10 B), mientras que la migración de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} fue similar a células B16F10 control. Esto se relacionaría con antecedentes que indican que un aumento en los niveles de ROS producen un aumento en la migración de células metastásicas (Loo, 2003; Wu, 2006).

Con respecto a la capacidad invasiva de células B16F10 marcadas con QDs-GSHr, las células B16F10 marcadas con QDs-GSHr fueron capaces de invadir manteniendo la marca asociada a QDs-GSHr (Figura 11 A). La invasión de células B16F10_{QDs-GSH-4NAC} disminuyó en 59% promedio y la invasión de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} disminuyó en un 94% (Figura 11 B). Estos resultados no se

condicen con los niveles de ROS presentes en células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} y B16F10_{QDs-GSH-10NAC} (Figura 9 A) ni con antecedentes que indican que un aumento de los niveles de ROS se relacionan a un aumento en la actividad de metaloproteinasa y por consiguiente, con un aumento en la invasión (Wu, 2006). Lo anterior sugiere que la disminución en la capacidad de invadir observada sería de manera independiente a los niveles de ROS intracelulares.

Como se observa en Figura 9 D, células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} son las que presentan la mayor IFM y a su vez, las que presentan la menor capacidad de invadir (Figura 11 B). Esto sugeriría que la disminución en la capacidad de invadir estaría relacionada a la cantidad de QDs-GSHr internalizadas por células B16F10, observándose que a mayor internalización, menor capacidad de invasión de células B16F10.

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son endopeptidasas encargadas de degradar proteínas de la matriz extracelular (ECM) (Verma and Hansch, 2007), las cuales son exocitadas por las células metastásicas y median cambios en el microambiente de células tumorales durante la progresión del cáncer (Kessenbrock et al., 2010). Células B16F10 expuestas a Cd⁺² han mostrado una reducción de su capacidad de invadir debido a un aumento en la expresión del inhibidor tisular de metaloproteinasa-1 (TIMP-1) (Khokha et al., 1992). Esto sugeriría que la inhibición observada sería generada por mecanismos

dependientes de cadmio, relacionándose al cadmio presente en el núcleo de los QDs-GSHr.

En resumen, los resultados obtenidos demuestran que células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} pueden ser utilizadas en ensayos *in vivo* de pasos metastásicos, en los que la migración es relevante (como la distribución de células metastásicas en órganos), de manera independiente del proceso de invasión. Basado en esto, este tipo de células fue seleccionada para su uso en los ensayos posteriores.

4.8 PERSEVERANCIA DE LA MARCA DE QDs-GSHr EN CÉLULAS B16F10_{QDS-GSH-10NAC} Y LA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN DE ESTAS

El contenido intracelular de NPs puede reducirse mediante diferentes mecanismos, como la muerte celular, la proliferación celular, la difusión de NPs, la degradación lisosomal y/o transcitosis y exocitosis (Fröhlich, 2016). Por ejemplo, se sabe que los QDs revestidos con D-penicilamina (DPA-QDs) no sufren degradación lisosómica durante las primeras 24 horas después de la internalización (Jiang et al., 2010), y que son exocitados rápidamente (tiempo de vida media de 21 minutos). Por lo tanto, es esencial determinar la persistencia de la marca asociada a QDs-GSHr en células B16F10 para la evaluación posterior en los ensayos de metástasis *in vivo*. Por esto, la viabilidad en el tiempo, la proliferación y la permanencia de la marca asociada a QDs-GSHr en células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} fueron evaluadas durante cinco días,

buscando así determinar la ventana de tiempo en la cual se podría utilizar las células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} para ensayos de imagenología.

Células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} permanecieron viables durante los 5 días analizados, con un porcentaje estable de células marcadas viables durante al menos tres días. La IFM de células viables marcadas no varía significativamente hasta el segundo día después del etiquetado, indicando que la metodología de marcaje descrita aquí, permite un marcaje celular con QDs-GSHr, más estable que lo descrito por otras metodologías basadas en QDs (en el orden de los minutos) (Jiang et al., 2010).

Se observó que células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} son incapaces de proliferar durante los cinco días de ensayo (Figura 12 D), lo que se relaciona a antecedentes que indican que la internalización de NPs puede afectar la proliferación celular (Mahmoudi et al., 2011) y que el Cd⁺² inhibe la proliferación celular de manera dependiente de la dosis (Bertin y Averbeck, 2006). Finalmente, esta incapacidad de proliferar explicaría, en parte, la perseverancia de la marca asociada a QDs-GSHr al interior de células B16F10 según lo descrito por Fröhlich (Fröhlich, 2016).

Basado en los resultados obtenidos, se plantea que la metodología descrita en este estudio puede ser utilizada como una estrategia de marcaje celular, que permitiría realizar estudios de los primeros pasos de la metástasis. Por ejemplo

estudios de acumulación/distribución de células metastásicas en órganos distantes, separando este proceso de procesos de invasión y proliferación.

4.9 ENSAYOS DE METÁSTASIS *IN VIVO* UTILIZANDO CÉLULAS B16F10_{QDS-GSH-10NAC} EN RATONES C57BL/6

Los resultados obtenidos hasta esta etapa sugieren que la capacidad metastásica de células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} se vería alterada por la internalización de QDs-GSHr (disminución en la invasión y la proliferación). Para corroborar esto, células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} y células B16F10 control fueron inyectadas en la vena de la cola de ratones y se determinó la supervivencia de los ratones a los 21 días después de la inyección para luego determinar la masa tumoral presente en los pulmones de ratones C57BL/6 (Figura 13).

La administración de células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} no alteró la supervivencia de ratones C57BL/6 (Figura 13 A) y no produjo metástasis detectable en aproximadamente 92 % de los ratones utilizados, al contrario de lo observado con células B16F10 control donde se observó una leve disminución en la supervivencia de ratones C57BL/6 y se detectaron nódulos pulmonares metastásicos en el 100 % de los ratones (Figura 13 B). Se determinó una masa tumoral pulmonar similar a lo descrito en publicaciones anteriores de nuestro laboratorio (Lobos-González et al., 2013, Ortiz et al., 2016). Estos resultados

confirmaron que la incorporación de QDs-GSH reduce significativamente la capacidad de las células B16F10 para formar nódulos metastásicos *in vivo*, planteando que la internalización de QDs-GSHr tendría potentes efectos antitumorales.

En los últimos 30 años se ha expandido el repertorio de compuestos que contienen metales de transición con propiedades antitumorales, incluyendo compuestos que contienen Zn, Co, Ni, Sn, Ag y Cd, entre otros (Abe et al., 2016; Cleare, 1974; Gudasi et al., 2009; Heidari and Brown, 2015; Kareem et al., 2014; Karmakar et al., 2013). Recientemente, se ha atribuido al cadmio efectos antitumorales elevados en comparación con otros metales de transición, aumentando el interés en compuestos y nanopartículas que contienen cadmio (Kareem et al., 2014). En 2016, Sreekanth y colaboradores reportaron que NPs de óxido de cadmio (CdO) inhibían la proliferación de líneas celulares normales y tumorales, aunque, células tumorales fueron afectadas más severamente por los NP de CdO (Sreekanth et al., 2016). De esta manera, los resultados sugieren la necesidad de investigar más a fondo los efectos antitumorales de estos QDs-GSHr, teniendo en cuenta que la acumulación selectiva de tumores podría permitir el uso de estos QDs-GSHr como agentes de diagnóstico y en la terapia anti-tumoral (teragnosis). Sin embargo, nuestro estudio se centró en evaluar el potencial de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} como herramienta para el seguimiento de células metastásicas, dejando esto último como una proyección de este trabajo de tesis.

En resumen, dado que células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} son capaces de migrar pero no invaden o proliferan, se planteó que podrían ser utilizadas en ensayos de detección *in vivo* de la acumulación y distribución de estas células metastásicas de manera independiente del proceso de formación secundaria de nódulos, particularmente en los pulmones.

4.10 SEGUIMIENTO DE LA FLUORESCENCIA ASOCIADA A QDs-GSHv Y QDs-GSHr PRESENTES EN CÉLULAS B16F10, RATONES C57BL/6 Y PULMONES DE RATONES C57BL/6

Buscando evaluar el potencial de las células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} como herramienta para ensayos de metastasis temprana por imagenología y confirmar que QDs-GSHr serían una mejor alternativa para ensayos de imagenología que QDs-GSHv, se inyectaron células marcadas con QDs-GSHv y QDs-GSHr utilizando el protocolo generado durante el desarrollo de esta tesis (B16F10_{QDs-GSH-10NAC})(Figura 14 A) en la vena de la cola de ratones C57BL/6 para el seguimiento de fluorescencia *in vivo* y se obtuvieron imágenes de animales completos usando IVIS (Figura 14 B).

Los resultados muestran que el uso de IVIS permite discriminar la fluorescencia de células marcadas con QDs-GSHv y QDs-GSHr, aunque después de la inyección de dichas células en los ratones, no fue posible detectar la señal de fluorescencia (Figura 14 B) en los ratones o en los pulmones colectados de estos. Esto sugiere la necesidad de eliminar los interferentes biológicos como el

agua, hemoglobina o lípidos, ya que estos absorben luz en el intervalo de 400 y 600 nm (Pan et al., 2010), interfiriendo así con la señal asociada a QDs-GSHv y/o QDs-GSHr.

Los pulmones fueron colocados en una solución Fekete, para decolorar y fijar los órganos (Wexler, 1966) durante una semana. La fluorescencia asociada a QDs-GSHr se distinguía claramente de la fluorescencia de fondo de los controles y de mejor manera que la fluorescencia asociada a QDs-GSHv (Figura 14 D), sugiriendo la utilización de esta metodología como herramienta para la realización de ensayos de acumulación/distribución.

4.11 SEGUIMIENTO DE FLUORESCENCIA ASOCIADA A CÉLULAS B16F10_{QDs-GSH-10NAC} EN ÓRGANOS COLECTADOS DESDE RATONES C57BL/6 A DISTINTOS TIEMPOS POST-INYECCIÓN

Como se propuso anteriormente, células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} fueron utilizadas en ensayos de cinética de la acumulación de B16F10. Para esto, células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} y B16F10_{control} (Figura 15 A) fueron inyectadas por la vena de la cola de ratones C57BL/6 y se analizó la fluorescencia asociada a QDs-GSHr en I) pulmones (objetivo de células metastásicas); II) el bazo, el hígado y los riñones (órgano de almacenamiento de QDs principal después de la inyección intravenosa) y; III) el corazón y el timo (órganos donde no se ha descrito previamente una acumulación extensa de QDs (Soo Choi et al., 2007; Ye et al., 2012). Los ratones fueron sacrificados y los órganos se cosecharon a

5 minutos, 30 minutos, 2 horas, 6 horas y 24 horas después de la inyección y la fluorescencia se detectó por imágenes ex vivo de los órganos (Figura 15 C-H), relacionándose, posteriormente esta fluorescencia a la presencia de células B16F10_{QDs-GSH10NAC} (Figura 16).

Células B16F10_{QDs-GSH10NAC} se distribuyeron rápidamente (cinco minutos) al corazón, hígado, riñones y pulmones de ratones C57BL/6 y probablemente se acumularon allí mediante un proceso de retención embólica (Fidler, 1975; Saitoh et al., 2014). Posteriormente, a pesar de la distribución inicialmente genérica, la acumulación selectiva de células B16F10_{QDs-GSH10NAC} en los pulmones se produce dentro de las primeras horas después de la inyección, mientras que la intensidad de fluorescencia disminuye en los otros órganos. Esto se relacionaría con diversos estudios que muestran que la acumulación de células de melanoma murino (como son las células B16F10) en pulmones de ratones, comienza a los pocos minutos post inyección (Fidler, 1975; Saitoh et al., 2014). Por ejemplo, células B16-BL6 (derivadas de B16F10) (Nakamura et al., 2002) se acumulan en vasos pulmonares pequeños a los 5 minutos post administración en el torrente sanguíneo (Saitoh y col., 2014).

Células B16F10 se acumulan mayoritariamente en los pulmones de ratones C57BL/6, posiblemente debido a su preferencia por laminina y/o fibronectina, dos proteínas de matriz extracelular presentes alrededor de pequeños vasos del pulmón, en la membrana basal y el epitelio alveolar (Ortiz et al. 2016). Esto

sugiere que las células B16F10_{QDs-GSH10NAC} mantienen el "homing" reportado anteriormente (Fidler, 1975; Lobos-González et al., 2013; Saitoh et al., 2014), y por lo tanto tienen el potencial de ser usadas como una herramienta para evaluar la acumulación/distribución de células metastásicas.

Varios estudios han demostrado que la mayoría de los QDs presentes en el torrente sanguíneo de los ratones se acumulan rápidamente en los órganos del sistema reticuloendotelial (hígado y bazo) y se excluyen del corazón y del timo (Haque et al., 2013; Schipper et al., 2007, 2009 Smith et al., 2008a). Sin embargo, en ratones tratados con células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, no se detectó aumento significativo de fluorescencia en el bazo (Figura 15 G), mientras que la acumulación de fluorescencia en el timo se detectó entre 30 min y 2 horas después de la inyección (Figura 15 H). Esto sugiere que los QDs-GSHr permanecerían confinados dentro de las células B16F10, ya que de otro modo, se habría esperado una acumulación de QDs-GSHr en el hígado y el bazo (Haque et al., 2013, Schipper et al., 2007, Smith y col., 2008a).

El timo es un órgano linfático, endocrino e inmune donde se generan continuamente una población diversa de células T (linfocitos T) encargada de generar las respuestas inmunes adaptativas contra patógenos invasores a la vez que promueve la auto tolerancia (Fan et al., 2015). Estos linfocitos T, participan específicamente en la depuración temprana de las células tumorales del torrente sanguíneo (Andersen et al., 2001; Whiteside y Herberman, 1995).

La barrera hematotímica impide el contacto directo entre el timo y los componentes del torrente sanguíneo, pero permite la entrada y salida de células T (Kendall, 1991, Nishino et al., 2006).

El rápido aumento de fluorescencia observado en el timo y su posterior descenso (posterior a las 2 horas post inyección) sugeriría activación de linfocitos T por la presencia de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC}, los cuales actuarían sobre células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} con la consiguiente eliminación de estos. Esto generaría acumulación de QDs-GSHr en células T y la posterior , acumulación de QDs-GSHr en el timo derivado por el recambio de células T con el torrente sanguíneo (Kendall, 1991, Nishino et al., 2006). Esto podría relacionarse a la activación de procesos de respuesta inmune de autotolerancia, ya que esta respuesta puede ocurrir en células T mediante procesos de delección clonal (muerte de células T progenitoras con alta afinidad por antígenos propios), edición de receptores (reordenamiento de receptores autoreactivos por otros benignos inducido por la unión del autoantígeno a linfocitos T durante la maduración) y/o anergia clonal (estado de no respuesta a antígenos por parte de linfocitos T maduros) (Hogquist et al., 2005). Esto último es un fenómeno interesante de estudiar dado su relación directa con el desarrollo de vacunas contra el cáncer (Burg et al., 2016; Melief et al., 2015).

4.12 DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS B16F10_{CALCEÍNA} Y CÉLULAS B16F10_{QDS-GSH-10NAC} EN PULMONES DE RATONES C57BL/6

Durante la colonización de los órganos distantes, el proceso de extravasación es crucial (van Zijl et al., 2011). Dado que las células B16F10 se dirigen específicamente al pulmón en ensayos de metástasis, fue importante determinar si las células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} eran capaces de transmigrar a través del endotelio vascular y colonizar los pulmones de ratones C57BL/6.

Se observó que células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} y B16F10_{Calceína} se encuentran principalmente en el área perialveolar, después de 6 y 24 horas (Figura 16 B y C) y que el número de células presentes en esas áreas aumentó después de 24 horas (Figura 16 C). Esto sugiere que las células B16F10_{QDS-GSH-10NAC} transmigraron de manera similar a las células B16F10_{Calceína}. Estos resultados apoyan el postulado de usar estas células como una herramienta para el seguimiento *in vivo*.

La invasión puede ocurrir por al menos tres procesos diferentes o combinaciones de ellos; I) Invasión de células mesenquimales (dependiente de la proteasa), II) Invasión de células colectivas (dependiente de la proteasa) y III) Invasión de células ameboides (independiente de la proteasa) (van Zijl et al., 2011). Las células de melanoma pueden invadir utilizando todos estos mecanismos y/o pueden cambiar de la invasión dependiente de la proteasa a la

invasión de las células ameboides (Hegerfeldt et al., 2002; van Zijl et al., 2011). De esta manera, la invasión de ameboides puede explicar por qué las células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} que no son invasivas en un ensayo *in vitro* de invasión dependiente de proteasa (Figura 11), muestran la misma capacidad de trans migración *in vivo* que las células control B16F10_{Calceína}.

La intensidad de fluorescencia entre las 6 y 24 horas tanto para células marcadas con QDs-GSHr y células marcadas con Calceina disminuye significativamente. Esto explicaría la disminución de la fluorescencia observada en los pulmones después de 24 horas (Figura 7C) e indicaría que las células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} todavía están presentes en los pulmones en este momento, pero con una disminución de la intensidad de fluorescencia. Cabe destacar que la intensidad de fluorescencia asociada a QDs-GSHr fue significativamente mayor que la asociada con Calceina después de 24 horas, lo que sugiere que la marca asociada a QDs-GSHr es más estable en el tiempo que la fluorescencia asociada con Calceina.

Finalmente, estos resultados demuestran que las células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} pueden ser utilizadas para rastrear la distribución/acumulación temprana de estas células en órganos C57BL/6 mediante imágenes de fluorescencia utilizando IVIS, permitiendo rastrear con éxito los primeros pasos implicados en la colonización de órganos distantes.

4.13 PRUEBA DE CONCEPTO

Buscando evaluar el potencial de este modelo de ser utilizado como una herramienta para determinar de manera más específica cómo la expresión de diferentes proteínas y/o la aplicación de drogas afectan la acumulación y/o distribución de células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} en C57BL/6 ratones, se realizó una prueba de concepto. Se utilizó células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} que sobreexpresan caveolina-1 [B16F10(CAV-1)], y se comparó su acumulación en pulmones de ratones C57BL/6 con células B16F10_{QDs-GSH-10NAC} que contienen el vector vacío usado para la sobreexpresión de caveolina-1 [B16F10(Mock)].

Caveolin-1 (CAV-1) es una proteína scaffold integral de membrana, cuya sobreexpresión ha demostrado aumentar la migración, invasión y metástasis de las células B16F10 tanto en ensayos *in vitro*, como en ensayos *in vivo* utilizando ratones C57BL/6 (Lobos-González et al., 2013).

La sobreexpresión de CAV-1 no afectó la viabilidad (Figura 19 A), el porcentaje de células viables marcadas (Figura 19 B) o la IFM de células B16F10(CAV-1) en comparación a células B16F10(Mock).

Finalmente, se inyectaron 2×10^5 células B16F10 (Mock) o B16F10 (CAV-1) viables y marcadas con QDs-GSHr en la vena de la cola de ratones C57BL/6, colectándose los pulmones de estos ratones a las 6 horas post-inyección. La fluorescencia asociada a QDs-GSHr fue seguida por IVIS. Como se muestra en

Figura 19 D, la intensidad de fluorescencia observada en los pulmones fue notablemente mayor para ratones inyectados con células B16F10(CAV-1) que los que recibieron células B16F10(Mock). Esto sugeriría que la sobreexpresión de CAV-1 en células de melanoma B16F10 promovería la metástasis pulmonar experimental durante las primeras 6 horas, lo que se relacionaría a un aumento de la acumulación de células B16F10 en los pulmones de ratones receptores. Esto se condice con los antecedentes previos, además de permitir complementar lo descrito previamente por nuestro grupo con respecto al rol de CAV-1 en la metástasis (Lobos-González et al., 2013).

Estos experimentos validarían el potencial de usar células marcadas con QDs-GSHr para monitorear los primeros pasos en la metástasis permitiendo profundizar en variados conceptos que hasta la fecha no están completamente abordados.

5. CONCLUSIÓN

En el presente estudio, se describió por primera vez el efecto de la modificación de QDs-GSH en la incorporación de estos QDs en células B16F10. Junto con caracterizar el efecto en la viabilidad y el comportamiento metastásico de las células B16F10 que incorporaron estos QDs-GSH. Además, se definió una metodología que permite mejorar las consecuencias perjudiciales de la internalización de QDs-GSH, permitiendo la obtención de una novedosa herramienta para estudios de metástasis temprana basada en células B16F10 marcadas con QDs-GSHr.

La incorporación de QDs-GSHr aumenta la migración celular B16F10, la cual junto con los efectos citotóxicos, puede ser corregida por tratamiento con NAC. Sin embargo, la proliferación e invasividad de las células B16F10, así como la formación de nódulos pulmonares metastásicos fueron atenuados por la internalización de QDs-GSH, probablemente como consecuencia del cadmio presente en el núcleo de QDs-GSH. Esto sugiere que la internalización de QDs-GSH podría usarse para bloquear metástasis, proyectando la necesidad de realizar estudios futuros al respecto.

Además, se demostró que las células B16F10 marcadas con QDs-GSH pueden usarse para rastrear la distribución/acumulación temprana de estas células en órganos C57BL/6. Este estudio revela que estas células se acumularon preferentemente en los pulmones de ratones C57BL/6 a partir de 5 minutos

después de la inyección. Por lo tanto, aunque la internalización de QDs-GSH bloquea la capacidad de las células B16F10 para formar nódulos metastásicos en el pulmón, las células B16F10 marcadas con QDs-GSH pueden ser rastreadas con éxito durante los primeros pasos implicados en la colonización de órganos distantes.

Finalmente, este estudio proporciona una metodología de marcaje celular que puede ser utilizada para caracterizar la acumulación/distribución temprana de células B16F10 en ratones C57BL/6, lo que permitirá evaluar los efectos de fármacos y/o diferentes factores biológicos (citosinas, proteínas señal, etc.), sobre el proceso de acumulación/distribución temprana de células metastásicas. Esto permitirá mejorar la comprensión de estos eventos y posiblemente actuar sobre ellos. Con esto en mente, proponemos que los QDs-GSH tienen un potencial considerable para su uso futuro en la teragnosis del cáncer.

6. REFERENCIAS

Abe, A.S.F. da S., Ricci-Júnior, E., Branco, M.T.L.C., and Gitirana, L. de B. (2016). Action of the anti-tumoral zinc(II)phthalocyanine in solution or encapsulated into nanoparticles of poly- ϵ -caprolactone internalized by peritoneal macrophages. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 035017.

Anderson, M.E. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* 111–112, 1–14.

Bargheer, D., Giemsa, A., Freund, B., Heine, M., Waurisch, C., Stachowski, G.M., Hickey, S.G., Eychmüller, A., Heeren, J., and Nielsen, P. (2015). The distribution and degradation of radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles and quantum dots in mice. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 111–123.

Bertin, G., and Averbeck, D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88, 1549–1559.

Bradburne, C.E., Delehanty, J.B., Boeneman Gemmill, K., Mei, B.C., Mattoussi, H., Susumu, K., Blanco-Canosa, J.B., Dawson, P.E., and Medintz, I.L. (2013). Cytotoxicity of quantum dots used for in vitro cellular labeling: role of QD surface ligand, delivery modality, cell type, and direct comparison to organic fluorophores. *Bioconjug. Chem.* 24, 1570–1583.

Burg, S.H. van der, Arens, R., Ossendorp, F., Hall, T. van, and Melief, C.J.M. (2016). Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat. Rev. Cancer* 16, 219–233.

Bystrzejewska-Piotrowska, G., Golimowski, J., and Urban, P.L. (2009). Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Manag.* 29, 2587–2595.

Catalan-Figueroa, J., Palma-Florez, S., Fritz, H.F., Jara, M.O., and Morales, J.O. (2015). Nanomedicine and nanotoxicology: the pros and cons for neurodegeneration and brain cancer. *Nanomed.* 11, 171–187.

Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2011). A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* 331, 1559–1564.

Chen, C., Peng, J., Sun, S.-R., Peng, C.-W., Li, Y., and Pang, D.-W. (2012). Tapping the potential of quantum dots for personalized oncology: current status and future perspectives. *Nanomed.* 7, 411–428.

Chomoucka, J., Drbohlavova, J., Businova, P., Ryvolova, M., Adam, V., Kizek, R., and Hubalek, J. (2012). Synthesis of Glutathione Coated Quantum Dots. In *State-of-the-Art of Quantum Dot System Fabrications*, A. Al-Ahmadi, ed. (InTech), p.

Cleare, M.J. (1974). Transition metal complexes in cancer chemotherapy. *Coord. Chem. Rev.* *12*, 349–405.

Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Price, P.J., and Ciccarone, V.C. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* *33*, 95–103.

Danciu, C., Falamas, A., Dehelean, C., Soica, C., Radeke, H., Barbu-Tudoran, L., Bojin, F., Pînzaru, S.C., and Munteanu, M.F. (2013). A characterization of four B16 murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior. *Cancer Cell Int.* *13*, 75.

Derfus, A.M., Chan, W.C.W., and Bhatia, S.N. (2004). Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett.* *4*, 11–18.

Díaz, V., Ramírez-Maureira, M., Monrás, J.P., Vargas, J., Bravo, D., Osorio-Román, I.O., Vásquez, C.C., and Pérez-Donoso, J.M. (2012). Spectroscopic properties and biocompatibility studies of CdTe Quantum Dots capped with biological thiols. *Sci. Adv. Mater.* *4*, 609–616.

Diaz-Valdivia, N., Bravo, D., Huerta, H., Henriquez, S., Gabler, F., Vega, M., Romero, C., Calderon, C., Owen, G.I., Leyton, L., et al. (2015). Enhanced caveolin-1 expression increases migration, anchorage-independent growth and invasion of endometrial adenocarcinoma cells. *BMC Cancer* *15*, 463.

Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* *82*, 70–77.

Fan, Y., Tajima, A., Goh, S.K., Geng, X., Gualtierotti, G., Grupillo, M., Coppola, A., Bertera, S., Rudert, W.A., Banerjee, I., et al. (2015). Bioengineering Thymus Organoids to Restore Thymic Function and Induce Donor-Specific Immune Tolerance to Allografts. *Mol. Ther.* *23*, 1262–1277.

Fang, M., Peng, C., Pang, D.-W., and Li, Y. (2012). Quantum Dots for Cancer Research: Current Status, Remaining Issues, and Future Perspectives. *Cancer Biol. Med.* *9*, 151–163.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality

worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* *136*, E359–E386.

Fidler, I.J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* *35*, 218–224.

Frangioni, J.V., and Hajjar, R.J. (2004). In Vivo Tracking of Stem Cells for Clinical Trials in Cardiovascular Disease. *Circulation* *110*, 3378–3383.

Fröhlich, E. (2016). Cellular elimination of nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *46*, 90–94.

Gao, X., Cui, Y., Levenson, R.M., Chung, L.W.K., and Nie, S. (2004). In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* *22*, 969–976.

Gautier, J.L., Monrás, J.P., Osorio-Román, I.O., Vásquez, C.C., Bravo, D., Herranz, T., Marco, J.F., and Pérez-Donoso, J.M. (2013). Surface characterization of GSH-CdTe quantum dots. *Mater. Chem. Phys.* *140*, 113–118.

Geraldo, D.A., Duran-Lara, E.F., Aguayo, D., Cachau, R.E., Tapia, J., Esparza, R., Yacaman, M.J., Gonzalez-Nilo, F.D., and Santos, L.S. (2011). Supramolecular complexes of quantum dots and a polyamidoamine (PAMAM)-folate derivative for molecular imaging of cancer cells. *Anal. Bioanal. Chem.* *400*, 483–492.

Githens, S. (1991). Glutathione metabolism in the pancreas compared with that in the liver, kidney, and small intestine. *Int. J. Gastrointest. Cancer* *8*, 97–109.

Gudasi, K.B., Patil, S.A., Kulkarni, M.V., and Nethaji, M. (2009). Transition metal complexes of a potential anticancer quinazoline ligand. *Transit. Met. Chem.* *34*, 325–330.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.

Haque, M.M., Im, H.-Y., Seo, J.-E., Hasan, M., Woo, K., and Kwon, O.-S. (2013). Effects of folic acid and polyethylene glycol coated quantum dots on toxicity and tissue uptake to precision-cut spleen slices of rats. *J. Pharm. Investig.* *43*, 375–383.

Hardman, R. (2006). A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ. Health Perspect.* 165–172.

Heath, J.R., and Davis, M.E. (2008). Nanotechnology and Cancer. *Annu. Rev. Med.* 59, 251–265.

Heidari, A., and Brown, C. (2015). Study of composition and morphology of cadmium oxide (CdO) nanoparticles for eliminating cancer cells. *J. Nanomedicine Res.* 2, 20.

Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., and Jameson, S.C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 772–782.

Iversen, T.-G., Skotland, T., and Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano Today* 6, 176–185.

Jain, K.K. (2006). Nanoparticles as targeting ligands. *Trends Biotechnol.* 24, 143–145.

Jokerst, J.V., Lobovkina, T., Zare, R.N., and Gambhir, S.S. (2011). Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomed.* 6, 715–728.

Kareem, A., Zafar, H., Sherwani, A., Mohammad, O., and Khan, T.A. (2014). Synthesis, characterization and in vitro anticancer activity of 18-membered octaazamacrocyclic complexes of Co (II), Ni (II), Cd (II) and Sn (II). *J. Mol. Struct.* 1075, 17–25.

Karmakar, T., Kuang, Y., Neamati, N., and Baruah, J.B. (2013). Cadmium complexes and cocrystals of indium complexes of benzothiazole derivatives and anticancer activities of the cadmium complexes. *Polyhedron* 54, 285–293.

Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 141, 52–67.

Khan, N., and Mukhtar, H. (2010). Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 435–445.

Khokha, R., Zimmer, M.J., Graham, C.H., Lala, P.K., and Waterhouse, P. (1992). Suppression of Invasion by Inducible Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) in B 16-F10 Melanoma Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 84, 1017–1022.

Lobos-González, L., Aguilar, L., Diaz, J., Diaz, N., Urra, H., Torres, V.A., Silva, V., Fitzpatrick, C., Lladser, A., Hoek, K.S., et al. (2013). E-cadherin determines

Caveolin-1 tumor suppression or metastasis enhancing function in melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 26, 555–570.

Loo, G. (2003). Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *J. Nutr. Biochem.* 14, 64–73.

Lovrić, J., Bazzi, H.S., Cuie, Y., Fortin, G.R., Winnik, F.M., and Maysinger, D. (2005). Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *J. Mol. Med.* 83, 377–385.

Lu, Z., Li, C.M., Bao, H., Qiao, Y., Toh, Y., and Yang, X. (2008). Mechanism of antimicrobial activity of CdTe quantum dots. *Langmuir* 24, 5445–5452.

McClatchey, A.I. (1999). Modeling metastasis in the mouse. *Oncogene* 18, 5334–5339.

Melief, C.J.M., Hall, T. van, Arens, R., Ossendorp, F., and Burg, S.H. van der (2015). Therapeutic cancer vaccines. *J. Clin. Invest.* 125, 3401–3412.

Monrás, J.P., Collao, B., Molina-Quiroz, R.C., Pradenas, G.A., Saona, L.A., Durán-Toro, V., Órdenes-Aenishanslins, N., Venegas, F.A., Loyola, D.E., Bravo, D., et al. (2014). Microarray analysis of the *Escherichia coli* response to CdTe-GSH Quantum Dots: understanding the bacterial toxicity of semiconductor nanoparticles. *BMC Genomics* 15, 1099.

Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K., and Kunitomo, M. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci.* 70, 791–798.

Navarro, D.A., Bisson, M.A., and Aga, D.S. (2012). Investigating uptake of water-dispersible CdSe/ZnS quantum dot nanoparticles by *Arabidopsis thaliana* plants. *J. Hazard. Mater.* 211, 427–435.

Ochi, T., Otsuka, F., Takahashi, K., and Ohsawa, M. (1988). Glutathione and metallothioneins as cellular defense against cadmium toxicity in cultured Chinese hamster cells. *Chem. Biol. Interact.* 65, 1–14.

Ortiz, R., Díaz, J., Díaz, N., Lobos-Gonzalez, L., Cárdenas, A., Contreras, P., Díaz, M.I., Otte, E., Cooper-White, J., Torres, V., et al. (2016). Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis. *Oncotarget.*

Pan, D., Caruthers, S.D., Chen, J., Winter, P.M., SenPan, A., Schmieder, A.H., Wickline, S.A., and Lanza, G.M. (2010). Nanomedicine strategies for molecular targets with MRI and optical imaging. *Future Med. Chem.* 2, 471–490.

Peng, L., He, M., Chen, B., Qiao, Y., and Hu, B. (2015). Metallomics Study of CdSe/ZnS Quantum Dots in HepG2 Cells. *ACS Nano* 9, 10324–10334.

Pérez-Donoso, J.M., Monrás, J.P., Bravo, D., Aguirre, A., Quest, A.F., Osorio-Román, I.O., Aroca, R.F., Chasteen, T.G., and Vásquez, C.C. (2012). Biomimetic, mild chemical synthesis of CdTe-GSH quantum dots with improved biocompatibility. *PLoS One* 7, e30741.

Pérez-Donoso, J.M.P., CHARLES, J.P.M., OSORIO-ROMAN, I.O., and GUZMAN, C.C.V. (2013). Synthesis of Highly Fluorescent GSH-CdTe Nanoparticles (Quantum Dots) (Google Patents).

Pericleous, P., Gazouli, M., Lyberopoulou, A., Rizos, S., Nikiteas, N., and Efstathopoulos, E.P. (2012). Quantum dots hold promise for early cancer imaging and detection. *Int. J. Cancer* 131, 519–528.

Riddles, P.W., Blakeley, R.L., and Zerner, B. (1979). Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. *Anal. Biochem.* 94, 75–81.

Riener, C.K., Kada, G., and Gruber, H.J. (2014). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 266–276.

Rosenblum, L.T., Kosaka, N., Mitsunaga, M., Choyke, P.L., and Kobayashi, H. (2010). In vivo molecular imaging using nanomaterials: General in vivo characteristics of nano-sized reagents and applications for cancer diagnosis (Review). *Mol. Membr. Biol.* 27, 274–285.

Rzagalinski, B.A., and Strobl, J.S. (2009). Cadmium-containing nanoparticles: perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 280–288.

Sahai, E. (2007). Illuminating the metastatic process. *Nat. Rev. Cancer* 7, 737–749.

Saitoh, Y., Terada, N., Ohno, N., Hamano, A., Okumura, N., Jin, T., Saiki, I., and Ohno, S. (2014). Imaging of thrombosis and microcirculation in mouse lungs of initial melanoma metastasis with in vivo cryotechnique. *Microvasc. Res.* 91, 73–83.

Sanvicens, N., and Marco, M.P. (2008). Multifunctional nanoparticles—properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol.* 26, 425–433.

Schaeublin, N.M., Braydich-Stolle, L.K., Schrand, A.M., Miller, J.M., Hutchison, J., Schlager, J.J., and Hussain, S.M. (2011). Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity. *Nanoscale* 3, 410–420.

Schipper, M.L., Cheng, Z., Lee, S.-W., Bentolila, L.A., Iyer, G., Rao, J., Chen, X., Wu, A.M., Weiss, S., and Gambhir, S.S. (2007). microPET-based biodistribution of quantum dots in living mice. *J. Nucl. Med.* 48, 1511–1518.

Schipper, M.L., Iyer, G., Koh, A.L., Cheng, Z., Ebenstein, Y., Aharoni, A., Keren, S., Bentolila, L.A., Li, J., Rao, J., et al. (2009). Particle Size, Surface Coating, and PEGylation Influence the Biodistribution of Quantum Dots in Living Mice. *Small* 5, 126–134.

Schneider, R., Wolpert, C., Guilloteau, H., Balan, L., Lambert, J., and Merlin, C. (2009). The exposure of bacteria to CdTe-core quantum dots: the importance of surface chemistry on cytotoxicity. *Nanotechnology* 20, 225101.

Slowing, I.I., Vivero-Escoto, J.L., Wu, C.-W., and Lin, V.S.-Y. (2008). Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1278–1288.

Smith, A.M., Duan, H., Mohs, A.M., and Nie, S. (2008a). Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1226–1240.

Smith, A.M., Duan, H., Mohs, A.M., and Nie, S. (2008b). Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1226–1240.

Soo Choi, H., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J.P., Iltis Ipe, B., Bawendi, M.G., and Frangioni, J.V. (2007). Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 25, 1165–1170.

Sreekanth, T.V.M., Pandurangan, M., Dillip, G.R., Kim, D.H., and Lee, Y.R. (2016). Toxicity and efficacy of CdO nanostructures on the MDCK and Caki-2 cells. *J. Photochem. Photobiol. B* 164, 174–181.

Srivastava, R.K., Rahman, Q., Kashyap, M.P., Lohani, M., and Pant, A.B. (2011). Ameliorative effects of dimethylthiourea and N-acetylcysteine on nanoparticles induced cyto-genotoxicity in human lung cancer cells-A549. *PLoS One* 6, e25767.

- Su, C.-K., and Sun, Y.-C. (2013). In vivo monitoring of distributional transport kinetics and extravasation of quantum dots in living rat liver. *Nanotechnology* 24, 165101.
- Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A., and Nabiev, I. (2018). Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Res. Lett.* 13, 44.
- Talmadge, J.E., Singh, R.K., Fidler, I.J., and Raz, A. (2007). Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am. J. Pathol.* 170, 793–804.
- Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147, 275–292.
- Valko, M., Morris, H., and Cronin, M.T.D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161–1208.
- Velasco-Aguirre, C., Morales, F., Gallardo-Toledo, E., Guerrero, S., Giralt, E., Araya, E., and Kogan, M.J. (2015). Peptides and proteins used to enhance gold nanoparticle delivery to the brain: preclinical approaches. *Int. J. Nanomedicine* 10, 4919.
- Verma, R.P., and Hansch, C. (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 2223–2268.
- Weston, S.A., and Parish, C.R. (1990). New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. *J. Immunol. Methods* 133, 87–97.
- Wexler, H. (1966). Accurate Identification of Experimental Pulmonary Metastases. *J. Natl. Cancer Inst.* 36, 641–645.
- Wu, W.-S. (2006). The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 695–705.
- Xu, G., Zeng, S., Zhang, B., Swihart, M.T., Yong, K.-T., and Prasad, P.N. (2016). New Generation Cadmium-Free Quantum Dots for Biophotonics and Nanomedicine. *Chem. Rev.*
- Xu, Q., Wang, J.-H., Wang, Z., Yin, Z.-H., Yang, Q., and Zhao, Y.-D. (2008). Interaction of CdTe quantum dots with DNA. *Electrochem. Commun.* 10, 1337–1339.
- Ye, L., Yong, K.-T., Liu, L., Roy, I., Hu, R., Zhu, J., Cai, H., Law, W.-C., Liu, J., Wang, K., et al. (2012). A pilot study in non-human primates shows no adverse

response to intravenous injection of quantum dots. *Nat. Nanotechnol.* 7, 453–458.

Yildirimer, L., Thanh, N.T.K., Loizidou, M., and Seifalian, A.M. (2011). Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano Today* 6, 585–607.

Zhang, R., Wang, X., Wu, C., Song, M., Li, J., Lv, G., Zhou, J., Chen, C., Dai, Y., Gao, F., et al. (2006). Synergistic enhancement effect of magnetic nanoparticles on anticancer drug accumulation in cancer cells. *Nanotechnology* 17, 3622.

Zhang, T., Hu, Y., Tang, M., Kong, L., Ying, J., Wu, T., Xue, Y., and Pu, Y. (2015). Liver Toxicity of Cadmium Telluride Quantum Dots (CdTe QDs) Due to Oxidative Stress in Vitro and in Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 23279–23299.

Zheng, Y., Gao, S., and Ying, J.Y. (2007). Synthesis and Cell-Imaging Applications of Glutathione-Capped CdTe Quantum Dots. *Adv. Mater.* 19, 376–380.

van Zijl, F., Krupitza, G., and Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat. Res.* 728, 23–34.