

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE PUNTOS DE CARBONO EN CÉLULAS
3T3-L1 Y VERO**

MARÍA CAMILA LANCHEROS VEGA

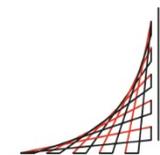
Trabajo Dirigido

Tutores

**Alejandro Oyono Ondo Méndez, PhD
Diana Consuelo Rodríguez Burbano, PhD**



**Universidad del
Rosario**



**ESCUELA
COLOMBIANA
DE INGENIERÍA
JULIO GARAVITO**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
ESCUELA COLOMBIANA DE INGENIERÍA JULIO GARAVITO
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
BOGOTÁ D.C
2021**

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este proyecto fue posible gracias a las siguientes personas (o entes) que hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

A Dios y La Virgen María, a quienes recurrí siempre que me sentí ansiosa o estresada y me dieron paz para poder seguir.

A los doctores Alejandro Ondo Méndez y Diana Rodríguez Burbano, asesores del proyecto, por su enseñanza, orientación, apoyo, colaboración y mucha paciencia durante todo el proyecto.

A mi mamá, quien a pesar de la preocupación que mostró en todos los momentos de mi carrera siempre me apoyó y me consoló, dándome fuerzas para seguir adelante.

A mi papá, quien desde pequeña me enseñó a ser creativa y curiosa, habilidades que me han traído hasta este punto en mi vida, quien también muestra solo orgullo y amor cada vez que habla de mí.

A mi hermano, quien es el encargado de liberarme del estrés y reestablecer todas mis funciones fisiológicas que terminan muy alteradas cada semestre, también por contestar todas mis preguntas sobre medicina que a veces no tienen sentido.

A Ximena, por apoyarme incondicionalmente y leer mi trabajo las infinitas veces que se lo envié.

A mis amigos, Juan Sebastián, Rubén, Carolina y Julián con quienes hice todos los trabajos a lo largo de la carrera y sin ellos no habría logrado llegar a este punto, este logro es de nosotros.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| 1.1. Principales aplicaciones biomédicas de los puntos de carbono | 6 |
| 1.1.1. Puntos de carbono para bioimagen | 7 |
| 1.1.2. Puntos de carbono para liberación de fármacos | 8 |
| 1.1.3. Puntos de carbono para radioterapia | 9 |
| 1.2. Ensayos de citotoxicidad | 10 |
| 1.2.1. Ensayos de exclusión de colorante | 10 |
| 1.2.2. Ensayos colorimétricos | 10 |
| 1.2.3. Ensayos fluorométricos..... | 11 |
| 1.2.4. Ensayos luminométricos de ATP | 11 |
| 1.3. Citotoxicidad de los puntos de carbono | 11 |
| 2. OBJETIVOS | 16 |
| 2.1. General..... | 16 |
| 2.2. Específicos | 16 |
| 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL..... | 17 |
| 3.1. Síntesis de puntos de carbono..... | 17 |
| 3.2. Evaluación de la citotoxicidad de los puntos de carbono | 18 |
| 3.2.1. Líneas celulares | 18 |
| 3.2.2. Exposición de líneas celulares a puntos de carbono..... | 18 |
| 3.2.3. Ensayo de citotoxicidad por Azul Tripán | 19 |
| 3.2.4. Ensayo de citotoxicidad por MTT..... | 19 |
| 3.3. Análisis estadístico | 20 |
| 4. RESULTADOS | 21 |
| 4.1. Síntesis de puntos de carbono | 21 |
| 4.2. Ensayo de citotoxicidad por Azul Tripán..... | 21 |
| 4.3. Ensayo de citotoxicidad por MTT | 24 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 26 |
| 6. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS..... | 28 |
| 7. CONCLUSIONES | 29 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Procedimiento para la síntesis de puntos de carbono. | 17 |
| Figura 2. Solución antes y después de llevar a microondas, se evidencia cambio en su coloración. | 18 |
| Figura 3. Distribución experimental para los ensayos de citotoxicidad por Azul Tripán y MTT. | 19 |
| Figura 4. Resultado del proceso de síntesis | 21 |
| Figura 5. Viabilidad de la línea celular VERO tratada con diferentes concentraciones de puntos de carbono medida con el ensayo de Azul Tripán | 22 |
| Figura 6. Viabilidad de la línea celular 3T3-L1 tratada con diferentes concentraciones de puntos de carbono medida con el ensayo de Azul Tripán | 23 |
| Figura 7. Viabilidad de la línea celular VERO tratada con diferentes concentraciones de puntos de carbono medida con el ensayo MTT | 24 |
| Figura 8. Viabilidad de la línea celular 3T3-L1 tratada con diferentes concentraciones de puntos de carbono medida con el ensayo MTT..... | 25 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Síntesis de los datos reportados en la literatura sobre citotoxicidad de puntos de carbono evaluada a partir del ensayo de exclusión de Azul Tripán y el ensayo colorimétrico MTT..... | 15 |
| Tabla 2. Resultados de la prueba post-hoc para el ensayo Azul Tripán practicado en células Vero..... | 23 |
| Tabla 3. Resultados de la prueba post-hoc para el ensayo Azul Tripán practicado en células 3T3-L1..... | 23 |
| Tabla 4. Resultados de la prueba post-hoc para el ensayo MTT practicado en células Vero..... | 24 |
| Tabla 5. Resultados de la prueba post-hoc para el ensayo MTT practicado en células 3T3-L1..... | 25 |

1. INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas (NPs) son definidas como materiales con por lo menos una de sus dimensiones a escala nanométrica (entre 1nm y 100nm) [1]. En los últimos años ha crecido el interés en su investigación, debido a que por su tamaño evidencian propiedades diferentes del material a granel o “*bulk material*”, como el incremento en el área superficial y la posible aparición de efectos cuánticos [2].

Las NPs tienen varias características de interés en el área biomédica, como el tamaño, que les permite mayor interacción celular que aquellas del orden de los micrómetros, y mayor endocitosis ya que su internalización no requiere de receptores de membrana sino de interacciones físicoquímicas [3]–[5]. Además, la disminución en el tamaño de las partículas significa un aumento en la relación área superficial/volumen de las mismas, lo cual indica que tendrán mayor interacción con el entorno biológico [4]. También la toxicidad resulta interesante pues en algunos materiales esta propiedad cambia según el tamaño, puesto que partículas muy pequeñas, menores a 10nm pueden favorecer reacciones biológicas desencadenando efectos tóxicos, lo cual se ha visto en diferentes síntesis de NPs [1], [6].

Los puntos de carbono (“*CDs*,” por sus siglas en inglés) son nanomateriales con fotoluminiscencia intensa cuya estructura posee un diámetro igual o menor a los 10 nm. El descubrimiento de estas nanopartículas data del año 2004 como consecuencia de la purificación de nanotubos de pared sencilla [7]; ya en 2006 se acuña el término CDs [8]. Su estructura contiene grupos funcionales con oxígeno, nitrógeno, carbono e hidrógeno, o también agregaciones poliméricas [9]. Mayormente se encuentra que la estructura de los CDs posee carbono con hibridación sp^2 , es decir enlaces dobles entre carbonos (C=C), en algunas síntesis puede ser sp^3 (C–C); esto depende de los precursores y el método de síntesis [10]. Desde su descubrimiento, los CDs han llamado la atención en biomedicina, pues se ha demostrado baja citotoxicidad, estabilidad coloidal en medio acuoso, biocompatibilidad, fotoestabilidad y fluorescencia sintonizable tanto de emisión como de excitación [11]. Las propiedades ópticas y superficiales de los CDs permiten candidatizarlos para aplicaciones terapéuticas, como bioimagen, liberación controlada de fármacos, radioterapia, también como técnica no invasiva para detección de tumores ya que su internalización se puede mediar por inyecciones intravenosas u otras partículas como endosomas evitando incisiones o remociones de tejido que son características de las terapias invasivas [11], [12].

1.1. Principales aplicaciones biomédicas de los puntos de carbono

Con las propiedades que caracterizan a los CDs como baja toxicidad, estabilidad coloidal en medio acuoso, hidrofiliidad, estabilidad química, y fotoluminiscencia se considera que este material es versátil para aplicaciones en el campo biomédico. Hay muchos ejemplos en los cuales los CDs han sido utilizados como plataformas multifuncionales para liberación de fármacos, liberación magnética, Imagen por resonancia magnética (IRM) y liberación de más de un fármaco de manera simultánea, las aplicaciones más relevantes se presentan en esta sección.

1.1.1. Puntos de carbono para bioimagen

Se ha investigado la aplicación de bioimagen *in vitro* para usarlos en vez de los medios de contraste orgánicos por su fotoestabilidad, sensibilidad, brillo y resistencia a la degradación metabólica [6]. Las investigaciones que se presentan a continuación han tenido éxito al usar CDs para bioimagen *in vitro*.

Hu et al. [13] sintetizaron CDs a partir de polietilenimina ramificada (BPEI) por el método hidrotérmico, las partículas resultantes la incubaron con células de cáncer de mama (MCF-7) y las excitaron a 450 nm, se observó luminiscencia desde el interior de las células, además se distribuyeron uniformemente en el citoplasma. Finalmente, la fotoluminiscencia no disminuyó durante los 30 minutos de excitación de los CDs, evidenciando poco fotoblanqueo e incrementada fotoestabilidad [13].

Mehta et al. [14] sintetizaron CDs a partir de jugo de caña de azúcar, posteriormente las inocularon en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Por medio de microscopía confocal de láser evidenciaron luminiscencia roja, verde y azul aplicando diferentes longitudes de onda de excitación. Las imágenes obtenidas mostraron dispersión uniforme de los CDs en el citoplasma y los investigadores concluyeron que estos ingresaron por medio de endocitosis. Más del 90% de las células se mantuvieron con vida [14].

Yang et al. [15] propusieron la síntesis de CDs a partir de miel. Para evaluar su potencial como plataforma para bioimagen se inocularon en las líneas celulares de adenocarcinoma cervical (Hep-2 y Hela). Los autores declararon que luego de una hora de incubación se originó fluorescencia en las líneas celulares correspondiente a los CDs concluyendo que sirven como agentes para tinción e imagenología celular. Sin embargo, el artículo no especifica porcentajes de viabilidad celular luego del tratamiento [15].

Du et al. [16] sintetizaron CDs con serina y glucosa como precursores. La presencia de serina permitió la presencia de heteroátomos de nitrógeno. Los inocularon en células adenocarcinoma basal epitelial (A549), luego de 6 horas de incubación usaron microscopía confocal para observar la fluorescencia de las células con diferentes longitudes de onda para excitar las partículas. Al variar las longitudes de excitación variaban las longitudes de emisión. La fluorescencia de los CDs sobresalió en la membrana celular, citoplasma y alrededor del núcleo, mientras que dentro del núcleo la fotoluminiscencia fue muy baja; este estudio concluyó que su síntesis puede ser efectiva para bioimagen y marcación biológica [16].

La aplicación de los CDs en bioimagen *in vitro* ha sido de las más destacadas puesto que en muchos estudios se ha probado la baja citotoxicidad de los CDs. Pocos estudios han reportado el ingreso de los CDs al núcleo de las células y quizás más importante se ha mostrado que la intensidad fotoluminiscente de este material no se reduce al someterlos a prolongados tiempos de excitación [9]. A pesar de que se siguieron diferentes síntesis los estudios convergen en la baja citotoxicidad de los CDs y en que se deben continuar las investigaciones en modelos *in vivo* ya que si bien se tiene una idea del comportamiento en

sistemas *in vitro* esta no es completa ya que los resultados pueden cambiar cuando se someten a todas las variables que rigen en los organismos.

Otras investigaciones los han estudiado para bioimágenes *in vivo* ya que por su baja toxicidad se prefiere su uso por sobre el de otras nanopartículas que contienen metales pesados. En estos casos se prefiere el uso de CDs con longitudes de onda largas ya que la penetración tisular aumenta y el fondo autofluorescente disminuye, lo que a su vez mejora la relación señal a ruido (SNR)[17].

Zhang et al. [18] sintetizaron CDs utilizando como precursor cabello humano y piel porcina. Al inocularlos en el pez cebra (*Danio rerio*) el cual se ha usado como modelo para imágenes fluorescentes se encontró que los CDs sintetizados se acumulan selectivamente en el ojo y en el saco vitelino, manteniendo su fluorescencia por 60 horas. A raíz de eso se concluyó que los CDs son adecuados para observación a largo plazo de las etapas de desarrollo de este pez [18].

Zhang et al. [19] desarrollaron una plataforma para tomografía computarizada con CDs dopados con yodo. Luego se realizaron experimentos *in vitro* en las líneas de adenocarcinoma basal epitelial (A549) y cáncer de mama (4T1) los cuales indicaron que la viabilidad celular era del 90% a las 24 horas de incubación además estos penetraron la membrana celular y se ubicaron en el citosol. Los experimentos *in vivo* en ratones (*Mus musculus*), mostraron que a los 10 minutos de inyectar los CDs vía intravenosa se ubicaron en la vejiga y en los riñones por medio de tomografía computarizada. La investigación resalta que no hubo efectos adversos asociados a la inyección de las nanopartículas y fueron excretadas vía urinaria, con base en estos resultados se propone el uso de esta plataforma como medio de contraste para tomografía computarizada [19].

Es poca la literatura que se encuentra de inoculación de CDs en modelos *in vivo*, sin embargo, ambas investigaciones concuerdan en que los CDs mostraron buenas propiedades fluorescentes, y gracias a su estabilidad coloidal en medio acuoso ambos casos evidenciaron excreción de los CDs por vía urinaria, pero no declaran si las especies debieron ser sacrificadas a causa de los CDs y tampoco hicieron estudios a largo plazo donde se busque saber los que ocurre luego de exposiciones largas.

1.1.2. Puntos de carbono para liberación de fármacos

También se ha estudiado el uso de CDs para la liberación de fármacos, en este caso se deben diseñar sistemas capaces de transportar medicamentos a un sitio específico. Los nanomateriales al combinarse con los fármacos mejoran su absorción, distribución y eliminación [9], [20]. También se ha visto que son apropiados para transportar fármacos con baja dispersibilidad, y para liberar más de un compuesto [9].

Lai et al. [20] prepararon CDs utilizando glicerol como precursor, posteriormente encapsularon doxorubicina para evaluar la liberación controlada del fármaco y los cambios que puede causar en las propiedades fluorescentes de los CDs. Al obtener imágenes fluorescentes de las células en las cuales inocularon las nanopartículas, se evidenció fluorescencia verde en el citoplasma inherente a los CDs y fluorescencia roja en el núcleo

por la doxorubicina. Con este estudio se concluyó el favorable ingreso de los CDs a las células y la posterior liberación del fármaco al núcleo para tratamiento [17].

Los CDs al ser dopados con iones se pueden volver magnéticos, incorporando Eu^{3+} , Mn^{2+} o Gd^{3+} de esta manera se pueden usar en MRI la cual combinada con la propiedad fluorescente de los CDs permite incrementar la penetración tisular y la resolución espacial. Este dopaje se ha realizado junto con doxorubicina para la liberación de fármacos en células de tumor cervical (HeLa) [21].

Al revisar la literatura se encontró que la liberación de fármacos en este tipo de nanopartículas está orientada hacia medicamentos para el cáncer como la doxorubicina, las miradas hacia otras aplicaciones se han dado en pocas ocasiones, no obstante, para este caso han mostrado penetración en la membrana y adecuada liberación del fármaco, además la viabilidad celular se ha visto disminuida, sin embargo hacen falta estudios que demuestren el comportamiento de éstas síntesis en células no cancerosas.

1.1.3. Puntos de carbono para radioterapia

La radioterapia consiste en la utilización de altas dosis de radiación ionizante la cual es energía liberada en forma de partículas o rayos que poseen la capacidad de desplazar electrones o átomos de la materia [22], [23]. A nivel celular la radioterapia daña el ADN porque cuando la radiación ioniza moléculas de agua se generan radicales libres y superóxido, causando rompimientos en la doble hélice que terminan impidiendo el crecimiento y división celular [22], [23]. esto resulta útil cuando se busca frenar el crecimiento de células cancerosas, sin embargo, debido a que las células cancerosas se encuentran rodeadas de tejido sano resulta de capital importancia desarrollar plataformas cuya toxicidad sea muy baja o nula en el tejido sano ya que la baja especificidad es uno de los mayores inconvenientes de los métodos de radioterapia que se ofrecen hoy en día [24].

Sin embargo, el efecto terapéutico de la radioterapia se ve limitado por diversos factores como la radiosensibilidad, que es proporcional a la capacidad de la célula para reparar daño al ADN, y la baja especificidad ya que no se limita a dañar tejido canceroso sino también sano [22], [23]. A raíz de estos problemas se ha planteado el uso de nano-radiosensibilizadores, los cuales buscan aumentar el alcance de la radioterapia pues está en estudio su capacidad de incrementar la apoptosis de los tumores, además su área de acción se podría delimitar ya que se permite posicionamiento en el tejido canceroso [24].

Zou et al. [25] prepararon CDs a partir de glicina y los doparon con gadolinio. El propósito de esta síntesis fue implementar radioterapia guiada por MRI. Los CDs fueron inyectados en ratones, estos circularon alrededor de 6 horas para luego ser excretados por la orina. Luego de 10 minutos de ser inyectados se evidenciaron regiones más brillantes en el corazón, riñones y vejiga. Además, este estudio evaluó la proliferación de la línea celular de cáncer de pulmón (HepG2) luego de tratamiento con rayos X y con los CDs preparados, se evidenció que se inhibió la formación de colonias indicando que los CDs mejoraron la

dosis de radiación, principalmente debido al Gadolinio ya que este es un metal pesado que aumenta la radiosensibilidad de los tejidos [25].

Demir et al. [26] encapsularon CDs en una plataforma liposomal con mora azul (*Vaccinium corymbosum*) como precursor. Para la evaluación de potenciales aplicaciones en radioterapia se inocularon los CDs en las líneas celulares de queratinocitos (HaCaT) y glioblastoma (U-87MG) y se irradiaron con 5.0Gy, los resultados indican que la viabilidad celular del grupo control (con radiación pero sin liposomas) fue del 60%, mientras que la viabilidad celular de los grupos con liposomas fue de entre 40% y 30%, lo cual demuestra que los CDs se pueden usar como agentes teragnósticos en oncología [26].

En estos estudios se encuentra que se afecta la viabilidad celular considerablemente cuando los CDs son dopados con metales pesados y acompañados con radiación, sin embargo, en el primer estudio no mencionan el porcentaje de viabilidad celular, lo cual sería interesante para poder compararlo con el segundo estudio y concluir si ésta se ve más afectada cuando los CDs son internalizados en liposomas. Los estudios demuestran que los CDs funcionan como focalizadores de radiación en los tejidos, aumentando su radiosensibilidad que es la respuesta de un sistema biológico frente a la radiación [27]. Como se ha venido diciendo existe un déficit de estudios en células normales, pues los estudios en células tumorales no se pueden extrapolar a células sanas ya que la respuesta a la radiación depende de factores genéticos, los cuales varían entre líneas celulares [27].

1.2. Ensayos de citotoxicidad

Existen 4 tipos de ensayos de citotoxicidad in vitro clasificados según el tipo de medición y el resultado que se obtiene.

1.2.1. Ensayos de exclusión de colorante

Su principio se basa en que las células viables poseen membrana celular intacta que les permite excluir el colorante mientras que las no viables no tienen la membrana celular en óptimas condiciones permitiendo filtración de colorante a su interior, por ello presentan tinción [28]. En estos ensayos se debe tener en cuenta que las células dañadas pueden tomar días en perder la integridad de la membrana. Durante este tiempo, las células que sobreviven pueden continuar proliferando, pero algunas células dañadas se pueden desintegrar, lo cual conlleva la subestimación de muerte celular. Sin embargo, en comparación con otros ensayos estos son de uso más simple y requieren menos cantidad de células [28]. Ejemplos de estos ensayos son Azul Tripán, eosina, rojo Congo y eritrosina B.

1.2.2. Ensayos colorimétricos

Estos ensayos miden marcadores bioquímicos para así evaluar actividad metabólica celular. En este caso los reactivos usados cambian de color en concordancia con la viabilidad celular. La medición colorimétrica se realiza por medio de espectrofotometría. Su amplio uso radica en la facilidad del procedimiento y bajo costo, sin embargo, la absorbancia

se ve influenciada por el tipo de célula, el tiempo de incubación y el número de células [28], [29].

El MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) es un ejemplo de estos ensayos colorimétricos que mide marcadores bioquímicos para así identificar actividad metabólica celular. El MTT evalúa la actividad de algunas enzimas, propiamente la reducción de MTT a formazán por la enzima succinato deshidrogenasa, y otras deshidrogenasas principalmente mitocondriales. La cantidad de formazán reducido es proporcional al número de células viables. Otros ensayos son MTS, XTT, captación de rojo neutro, WST, LDH, SRB y CVS.

1.2.3. Ensayos fluorométricos

El principio es similar al de los ensayos colorimétricos, sin embargo, se consideran más sensibles y se pueden practicar en células adherentes y no adherentes. No obstante, pueden presentar interferencia fluorescente y solapamiento del espectro entre los fluoróforos usados y agentes citotóxicos a evaluar [28], [30] Ejemplos de estos ensayos son resazurina, GF-AFC, CFDA-AM.

1.2.4. Ensayos luminométricos de ATP

La base teórica de este ensayo radica en que cuando una célula se daña, pierde integridad en la membrana y la habilidad para sintetizar ATP se afecta disminuyendo su producción. Este ensayo demuestra proporción lineal entre la señal luminiscente y la cantidad de ATP o el número de células. No obstante, el ensayo se ve limitado por su baja reproducibilidad [28], [29]

Por otro lado, varios estudios han planteado los CDs para el desarrollo de nanoplateformas diagnósticas con fines terapéuticos, no obstante son pocos los que se proponen evaluar su citotoxicidad en la primera etapa de desarrollo. Es decir, los CDs sin modificaciones después del proceso de síntesis y pasivación. Es válido aclarar que son muy pocos los estudios que se han enfocado en evaluar la citotoxicidad de los CDs en células sanas, lo cual es de capital importancia al desarrollar una nueva aplicación. Una respuesta citotóxica de los CDs puede llevar a efectos secundarios no deseados en su aplicación, lo cual constituye un elemento determinante y limitante para el alcance de su uso [11].

1.3. Citotoxicidad de los puntos de carbono

La citotoxicidad de los CDs es una de las propiedades que más ha llamado la atención porque se ha visto que varía según el procedimiento experimental para su generación, ya que el uso de diferentes métodos de síntesis, precursores y solventes adiciona diferentes grupos funcionales los cuales determinan las propiedades fisicoquímicas de los CDs, es por ello que la citotoxicidad no es una propiedad que se pueda generalizar para todas las síntesis [31]. En consecuencia, ha sido investigada desde diferentes acercamientos en varias ocasiones y en general han mostrado tener baja citotoxicidad *in vitro* [31] En la Tabla 1 se sintetiza la información que se encontró en el estado del arte sobre estudios de citotoxicidad de CDs. Para la búsqueda de literatura que se presenta a continuación se

buscaron artículos cuya metodología incluyera a evaluación de citotoxicidad de CDs por medio de los ensayos Azul Tripán y MTT, ya que estos fueron los ensayos implementados en este trabajo; también que las síntesis no incluyeran modificaciones ni funcionalizaciones, y que el por lo menos un periodo de incubación fuera de 24 horas, siendo éste el que se practicaría en la realización de este trabajo dirigido.

Ray et al. [32] sintetizaron CDs a partir de hollín de carbón. La citotoxicidad se midió por medio de los ensayos MTT y Azul Tripán en carcinoma de hígado (HepG2). Los resultados mostraron que entre el 90-100% de las células sobrevivieron luego de 24 horas de exposición a concentraciones de CDs menores a 0.5 mg/mL [32].

Otros experimentos de citotoxicidad en CD también han concluido que es baja, propiamente según *Yingliang Liu et al.* [33]. Sintetizaron CDs a partir de quitosán. Los inocularon en adenocarcinoma de pulmón (A549), por medio del ensayo MTT se mostró baja citotoxicidad y a través de microscopía confocal se evidencia que los CDs penetraron la célula hasta llegar al citoplasma sin ingresar al núcleo. No obstante, los CDs de este estudio poseían grupos amino en la superficie, los cuales según la literatura mejoran la estabilidad acuosa, reduciendo a su vez la biotoxicidad, debido a que pueden ser excretados en la orina y no tienden a acumularse en el cuerpo [33].

Hui-Fen Wu et al. [34] sintetizaron CDs utilizando como precursor ácido cítrico; los ensayos de citotoxicidad se hicieron en células de cáncer cervical (HeLa) y su viabilidad fue determinada por medio de la prueba de exclusión por de Azul Tripán. En conclusión los CDs mostraron buenas propiedades ópticas y con un máximo de emisión fluorescente a 585 nm, postulándolos como óptimos para imagenología fluorescente; también evidenciaron baja citotoxicidad y alta biocompatibilidad, sin embargo declaran que es la primera investigación realizada bajo esas características [34].

Liu et al. [35] realizaron dos síntesis de CDs, para la primera utilizaron como precursor nanopolvo de carbono, para la segunda síntesis utilizaron hollín de carbón. Para las evaluaciones de citotoxicidad se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y adenocarcinoma colorectal (HT-29) las cuales fueron sometidas a los ensayos Azul Tripán y MTT. Según el ensayo de Azul Tripán ninguna de las síntesis descritas tuvo efectos significativos en la proliferación y mortalidad de las líneas celulares. En cuanto al ensayo MTT los resultados parecen erráticos y puede que no sean válidos ya que previamente se ha reportado que al aplicar este ensayo en nanotubos de carbono, éstos se aglomeran junto al formazán y evitan la dilución de los cristales. La baja toxicidad obtenida del ensayo por Azul Tripán se atribuye a que estas síntesis de CDs son químicamente inertes, el estudio permite concluir que incluso en altas concentraciones estos CDs son biocompatibles en términos de proliferación celular y tasas de mortalidad [35]. De esta investigación se debe resaltar que es la única que cuestiona los resultados del ensayo colorimétrico MTT; en otras investigaciones se ha planteado que al realizar estudios de citotoxicidad se deben realizar por lo menos dos con principios diferentes, por ejemplo MTT y AT, para así verificar la citotoxicidad que se obtiene de cada uno [36]. Además se ha visto que al aplicar colorantes, como los utilizados en ensayos colorimétricos, algunos materiales a base de carbono absorben el colorante reduciendo la absorbancia, lo cual da viabilidades bajas por ende se

obtienen falsos positivos [37], no obstante los autores de este artículo no concluyeron acerca de la razón por la cual se obtuvieron resultados erróneos en MTT debido a la poca literatura que se encuentra al respecto, es por ello que invitan a realizar más investigaciones sobre el tema.

Mohapatra et al. [38] sintetizaron CDs a partir de jugo de naranja (*Citrus nobilis deliciosa*); la citotoxicidad se evaluó por medio del ensayo MTT en la línea celular de fibrosarcoma (L929). En conclusión, los CDs no mostraron toxicidad significativa y fueron tolerados por las células incluso a concentración de 200 µg/mL y periodos de incubación de 72 horas [38].

En contraste, Dias et al. [39] produjeron tres lotes de CDs a partir de kiwi (*Actinidia*), pera (*Pyrus*) y aguacate (*Persea americana*). Para medir la citotoxicidad se tomaron dos líneas celulares de adenocarcinoma colorectal (HK-2 y Caco-2) las cuales fueron inoculadas con los CDs, para luego someterlas al ensayo de exclusión de Azul Tripán. Los resultados muestran cierto nivel de toxicidad de los CDs en ambas líneas celulares, la máxima mortalidad fue de 25% a una concentración de 1 mg/mL la toxicidad de estos CDs se atribuye al alto contenido de fenoles y polifenoles de los precursores los cuales tienen propiedades antioxidantes. Este estudio y el de Mohapatra et al. [38] evaluaron citotoxicidad con incubaciones de 24, 48 y 72 horas, lo cual es clave ya que mostraron que si bien la viabilidad no se afecta considerablemente en ninguno de los tiempos esto no se debe generalizar para tiempos más largos ni para otras síntesis ya que una prolongada exposición a los CDs puede cambiar las propiedades físicoquímicas de los CDs pues estos tienen grupos funcionales en la superficie que interactúan con el medio celular y desencadenan reacciones que pueden tanto favorecer como afectar la proliferación celular [39].

Pandey et al. [40] sintetizaron CDs a partir de hollín de vela. Para evaluar la citotoxicidad se implementó el ensayo de exclusión de Azul Tripán en la línea celular perteneciente a fibroblastos de pulmón de hámster (V-79) la cual es aprobada por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD) para llevar a cabo ensayo de genotoxicidad y mutagenicidad. El ensayo reveló que no hubo muerte celular significativa y las nanopartículas tampoco afectaron la integridad de la membrana. Este estudio realizó evaluación de genotoxicidad, lo cual se debe destacar ya que es el único estudio de los mencionados en este trabajo que lo ha hecho y es de vital importancia conocer si los CDs generan daño en el ADN, debido a que se cree que los nanomateriales incrementan la producción de ROS, las cuales son moléculas reactivas inestables que oxidan moléculas como el ADN y las proteínas impidiendo su correcto funcionamiento. En este caso se vio que los CDs no causaron estrés oxidativo en la línea celular ni daño en el ADN [40].

Al revisar las conclusiones de los artículos encontrados todos reportan baja citotoxicidad *in vitro* con porcentajes de viabilidad mayores a 90%, esto en concentraciones menores a 500 µg/mL. Sin embargo el artículo de Mohapatra et al. [38] utilizó concentraciones de entre 1-5 mg/mL y aún así el porcentaje de viabilidad superó el 95%, ellos aclaran que son concentraciones muy elevadas que superan las necesarias para

aplicaciones de CDs. En los casos de las síntesis de Ray et al. [31], Hui-Fen Wu et al. [34] y Dias et al. [39] concuerdan en que a altas concentraciones se pueden presentar efectos tóxicos, que variarán según la metodología por la cual se realizó la síntesis.

Otro punto en común entre los estudios es que las propiedades ópticas de las síntesis las postulan como candidatas para bioimagen, además todas las síntesis presentaron emisión de luz dependiente de la longitud de onda de excitación y también persistencia luminiscente luego de largas excitaciones, aunque no mencionan el periodo de tiempo. Los estudios invitan a continuar con investigaciones de citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* para concluir sobre la bioseguridad de diferentes síntesis y poder escalarlas a aplicaciones en humanos. Cabe resaltar que solo uno de los estudios discutidos, el presentado por Dias et al. [28] realizó estudios *in vivo* en donde concluyeron que las síntesis fueron más tóxicas en el modelo animal que en el modelo *in vitro*, sin delucidar el por qué, pero invitando a continuar los estudios ya que es muy poca la literatura que se encuentra al respecto.

Como se ha evidenciado en el desarrollo del estado del arte no se encontraron estudios que revisen la citotoxicidad de los CDs sintetizados a partir de ácido cítrico en células no tumorales. Como se evidencia en los párrafos anteriores, la mayor parte de estudios demuestran su baja citotoxicidad en células tumorales. Es por esto que con la realización de este estudio se busca obtener una primera mirada a los efectos citotóxicos de los CDs en líneas no tumorales, puntualmente las líneas Vero y 3T3-L1.

Tabla 1. Síntesis de los datos reportados en la literatura sobre citotoxicidad de puntos de carbono evaluada a partir del ensayo de exclusión de Azul Tripán y el ensayo colorimétrico MTT.

| Literatura | Precursor | Solvente | Línea(s) celular(es) | Ensayo(s) de citotoxicidad | Citotoxicidad |
|---------------------------|---|-----------------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Ray et al. [32] | Hollín de carbón | Ácido nítrico | HepG2 | MTT y Azul Tripán | Baja |
| Yingliang Liu et al. [33] | Quitosán | No específica | A549 | MTT | Baja |
| Hui-Fen Wu et al. [34] | Ácido cítrico | Bromuro de tetraoctilamonio | HeLa | Azul Tripán | Baja |
| Mohapatra et al. [38] | Jugo de naranja (<i>Citrus nobilis deliciosa</i>) | No específica | L929 | MTT | Baja |
| Liu et al. [35] | Nanopolvo de carbono | Ácido nítrico | MCF-7 y HT-29 | Azul Tripán y MTT | Baja según AT, MTT fue inconcluso |
| | Hollín de carbón | Dimetilformamida | MCF-7 y HT-29 | Azul Tripán y MTT | Baja según AT, MTT fue inconcluso |
| Dias et al. [39] | Kiwi, pera y aguacate | No específica | HK-2 y Caco-2 | Azul Tripán | Baja |
| Pandey et al. [40] | Hollín de vela | Ácido nítrico y etanol | V-79 | Azul Tripán | Baja |

2. OBJETIVOS

2.1. General

Estudiar el efecto de los puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico sobre la citotoxicidad, en líneas celulares derivadas de preadipocitos (3T3-L1) y riñón (VERO).

2.2. Específicos

- Sintetizar puntos de carbono, a partir de ácido cítrico, por reacción microondas.
- Evaluar el impacto de los puntos de carbono sobre la citotoxicidad, en las líneas celulares 3T3-L1 y VERO.
- Comparar los hallazgos obtenidos de los diferentes ensayos de citotoxicidad aplicados.

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1. Síntesis de puntos de carbono

La síntesis de CDs se realizó por el método de reacción por microondas según se indica en la Figura 1. Esta técnica consiste en calentar rápidamente precursores que contienen carbono, lo cual aumenta considerablemente su velocidad de reacción. Además, el microondas permite calentar de manera uniforme toda la mezcla. La radiación de las microondas ejerce fuerza sobre las partículas cargadas, causando que estas se muevan y colisionen con otras moléculas, generando fricción la cual produce calor [41].

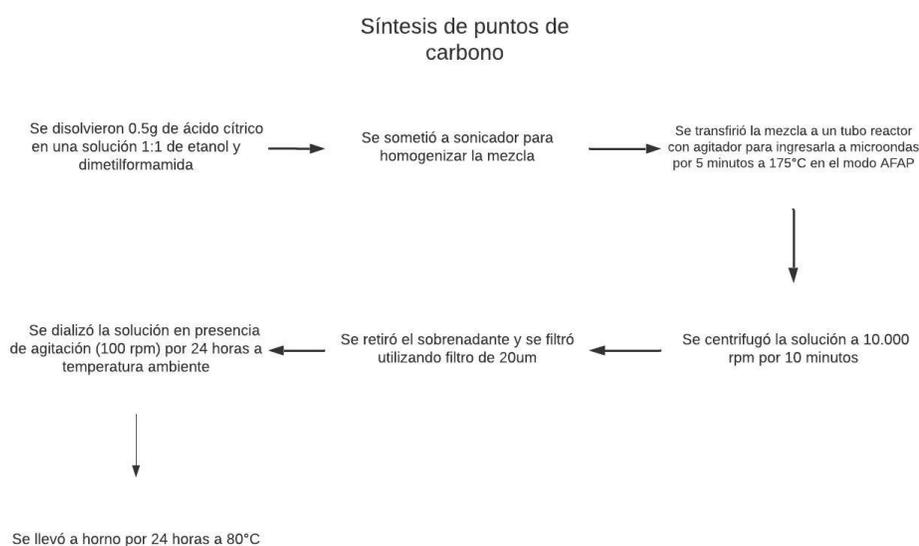


Figura 1. Procedimiento para la síntesis de puntos de carbono.

Para la síntesis se siguió el procedimiento indicado en la Figura 1, como precursor orgánico se utilizó ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) y como solventes etanol (C_2H_5OH) y N, N-Dimetilformamida (C_3H_7NO). Todos los reactivos fueron comprados en Scharlau. Esta solución se sometió a sonicación por 6 minutos, se obtuvo una solución transparente que se somete a microondas a $175^{\circ}C$ por 5 minutos en el Monowave 50 fabricado por Anton Paar en Austria. Al salir del microondas se obtiene una solución ligeramente amarilla (Figura 2). En seguida se centrifuga la solución en el dispositivo mySPIN de Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos, y se filtra para proceder a diálisis con agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se lleva a horno por 24 horas a $80^{\circ}C$.

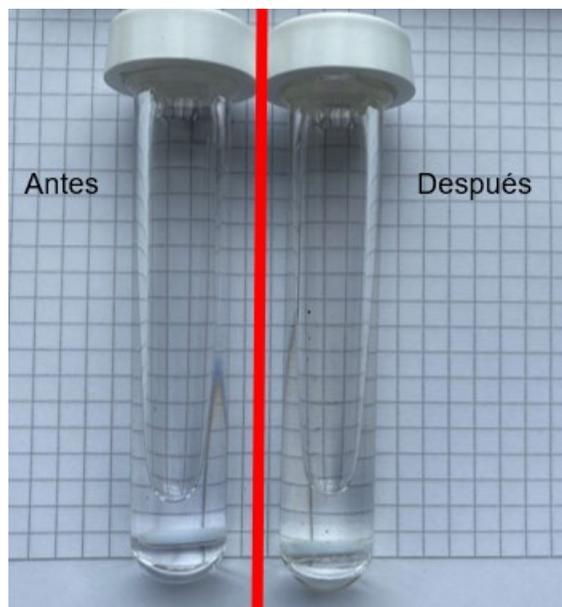


Figura 2. Solución antes y después de llevar a microondas, se evidencia cambio en su coloración.

3.2. Evaluación de la citotoxicidad de los puntos de carbono

3.2.1. Líneas celulares

La línea celular Vero es originaria de riñón del mono verde africano (*Chlorocebus sabaeus*), su morfología es de fibroblastos, son adherentes de cariotipo pseudo-diplode, de amplio uso en cultivo celular. Se usa para estudiar la propagación de bacterias y parásitos intracelulares y para la evaluación de efectos de químicos, toxinas y otras sustancias a nivel celular y molecular, ya que esta línea es susceptible a varios tipos de microbios y toxinas [42].

Por otro lado, la línea celular 3T3-L1 es originaria de embriones de ratón (*Mus musculus*), inicialmente posee morfología de fibroblastos pero se pueden aplicar agentes pro-diferenciadores para convertirlas en adipocitos. Su frecuente uso en cultivo radica en que soportan elevado número de pases y más importante que se suelen obtener respuestas homogéneas a tratamientos y cambios en condiciones experimentales.

Para propiciar las condiciones adecuadas al cultivo y permitir la correcta proliferación celular se utilizó medio de cultivo completo el cual contiene DMEM, suero fetal bovino al 10%, además se agregó antibiótico y antimicótico al 1% de Sigma-Aldrich (Estados Unidos) para evitar el crecimiento de bacterias, las células se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO₂.

3.2.2. Exposición de líneas celulares a puntos de carbono

Los CDs se dispersaron en medio de cultivo de DMEM. Ambas líneas celulares fueron expuestas a concentraciones de 50, 125, 250 y 500 µg/mL de CDs, por un período de incubación de 24 horas. Se realizó un control positivo con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y un control negativo con células y sin CDs, únicamente medio completo. Una vez culminado el tiempo de exposición, se lavaron las células con PBS para eliminar los CDs del medio y se llevaron a cabo los experimentos de citotoxicidad.

3.2.3. Ensayo de citotoxicidad por Azul Tripán

Para realizar el ensayo, en placas de 12 pozos se sembraron 100.000 células en cada pozo. Pasadas 24 horas se sometieron a las concentraciones de CDs ya mencionadas, distribuidas según lo indica la *Figura 3*, en donde se presentan tres réplicas técnicas por cada condición. En otra placa se dispuso 3 controles negativos no tóxicos, es decir sin CDs y 3 positivos tóxicos con H_2O_2 . Éste también se añadió luego de 24 horas de haber sembrado las células. Pasadas las 24 horas de incubación se lavaron las células dos veces con PBS y se despegaron utilizando la enzima Accutase® (Innovative Cell Technologies, Inc.) la cual mimetiza la acción de la tripsina y la colagenasa que son usadas para desadherir las células en cultivo. Luego se tomó un volumen de 10 μ L de cada pozo y se mezcló con 10 μ L de Azul Tripán (Gibco) para establecer una relación 1:1, luego de incubar aproximadamente 3 minutos a temperatura ambiente, se agregó una gota de esta mezcla al hematocitómetro para así contar las células viables en el contador automático de células (CytoSMART™, Holanda).

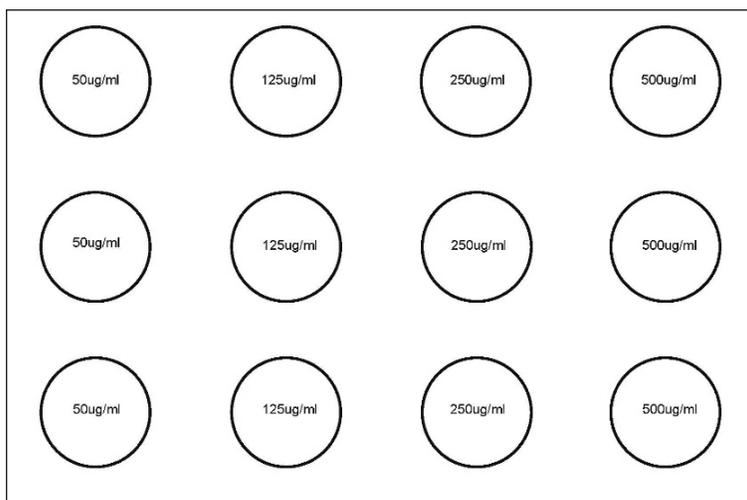


Figura 3. Distribución experimental para los ensayos de citotoxicidad por Azul Tripán y MTT.

3.2.4. Ensayo de citotoxicidad por MTT

Para el ensayo se sembraron 10.000 células por pozo en una placa de 96 pozos. Éstas se dejaron adherir durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se adicionaron las concentraciones de CDs, en una distribución similar a la propuesta en la *Figura 3*, en donde se presentan tres réplicas técnicas por cada condición. Adicionalmente se añadieron 3 controles negativos (no tóxicos) sin CDs y 3 positivos (tóxicos) con H_2O_2 , de la misma manera que para el ensayo de Azul Tripán, se permitió incubación con las respectivas condiciones por 24 horas.

El protocolo escogido para MTT fue el propuesto por Chen R. en [43] donde se estipula que pasado el tiempo de incubación con el agente cuya toxicidad se quiere evaluar se debe añadir una solución de MTT la cual en este caso se preparó mezclando 10mg de MTT en polvo y 2 mL de PBS obteniendo una concentración de 5 mg/mL de MTT. De esta solución

se añaden 20 μL por pozo, una vez terminado se lleva a plancha de agitación por 5 minutos a 150rpm para mezclar el MTT con el medio. Al cabo de este tiempo se permite incubación por 3 horas para que el MTT sea metabolizado. Pasado este tiempo se succiona el medio, se añaden 200 μL de DMSO por pozo, y se lleva a plancha de agitación por 5 minutos a 150rpm. Para finalizar se lee la densidad óptica a 560nm en el Cytation, esta longitud de onda corresponde a la absorbancia del formazán.

3.3. Análisis estadístico

Para determinar si los datos son paramétricos se realizó la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov dada la cantidad de datos por concentración. La comparación entre la citotoxicidad de diferentes concentraciones se hizo por medio de la prueba ANOVA para los datos paramétricos y por medio de la prueba de Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos debido a que esta es la alternativa a la prueba ANOVA para datos no paramétricos. Luego se realizó análisis post-hoc para determinar diferencias significativas por parejas en los diferentes grupos. El análisis estadístico y las representaciones gráficas se llevaron a cabo en el software GraphPad Prism versión 9 para MacOS [44]. El nivel de significancia estadística utilizado fue $p < 0.05$ en todos los casos.

4. RESULTADOS

4.1. Síntesis de puntos de carbono

Para sintetizar los CDs se siguió el procedimiento descrito en 3.1. El precursor utilizado fue ácido cítrico, cuya estructura se muestra en la Figura 4. El precursor define las propiedades ópticas de los CDs. Se ha reportado que al carbonizar ácido cítrico se obtiene ácido citracínico el cual es un compuesto fluorescente cuya emisión se encuentra en el espectro azul [45].

Por otro lado, los solventes utilizados fueron etanol y N, N-Dimetilformamida, por ello en la reacción se esperan especies atómicas de nitrógeno, carbono, hidrógeno y oxígeno. Así como los precursores impactan en las propiedades de los CDs los solventes también lo hacen, en particular la inclusión de heteroátomos como el nitrógeno ha mostrado mejorar las propiedades ópticas de los CDs [45].



Figura 4. Resultado del proceso de síntesis, la solución obtenida se irradió con lámpara UV ($\lambda=365\text{nm}$).

La solución resultante evidenció un cambio en su coloración de transparente a ligeramente amarilla luego de someterla a microondas (Figura 2), esto indica que los CDs que se obtuvieron en la síntesis son de menos de 10nm pues, según la literatura, cuando se usan reducidas cantidades del precursor, se permite poco tiempo de calentamiento y la potencia del microondas ocurre lo mencionado se acortó al final[46]. La mezcla al ser irradiada con una longitud de onda de 365nm (lámpara UV) exhibe fluorescencia azul (Figura 4) lo cual concuerda con lo esperado debido al precursor y solventes utilizados, indicando también la presencia de especies fluorescentes obtenidas del carbono.

4.2. Ensayo de citotoxicidad por Azul Tripán

En el ensayo de AT la viabilidad celular de la línea Vero (Figura 5) no se vio afectada ya que los porcentajes de viabilidad para todas las concentraciones se encuentran entre el 90% y el 100%, mientras que en el control positivo la viabilidad fue cercana al 60%. Al realizar la prueba de normalidad se determinó que todos los grupos tienen una distribución normal. El resultado de la prueba ANOVA muestra que existieron diferencias significativas entre los grupos tratados ($p < 0.05$). De igual manera en el caso de la línea Vero al contrastar las diferentes concentraciones por medio de la prueba post-hoc con el H_2O_2 se

obtuvo que hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en la Figura 5; la misma prueba indicó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, esta información se sintetizó en la Tabla 2.

En el caso de la línea celular 3T3-L1 (Figura 6) la viabilidad no disminuyó en todas las concentraciones de CDs. La concentración de 250 mg/mL fue la que menos afectó la viabilidad celular. La prueba ANOVA indicó que existen diferencias significativas entre los grupos tratados ($p < 0.05$); y por medio de la prueba post-hoc se encontraron diferencias significativas al contrastar los tratamientos con el control positivo y con el control negativo excepto en 0 $\mu\text{g/mL}$ vs 50 $\mu\text{g/mL}$ y en la comparación de los controles ($p < 0.05$). En la Tabla 3 se presenta el resultado de las pruebas estadísticas aplicadas.

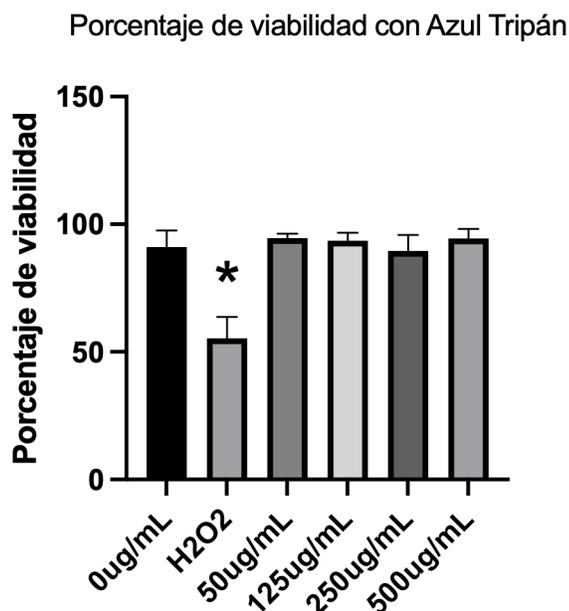


Figura 5. Viabilidad de la línea celular VERO tratada con diferentes concentraciones de puntos de carbono medida con el ensayo de Azul Tripán luego de 24 horas de incubación. Para los ensayos se realizaron triplicados biológicos y técnicos y las barras de error representan la desviación estándar entre las réplicas. * indica que existen diferencias significativas del control positivo respecto a los demás grupos con $p < 0.05$.

Tabla 2. Resultados de la prueba post-hoc para el ensayo Azul Tripán practicado en células Vero donde o indica que no existen diferencias significativas entre los grupos y * indica que si existen con $p < 0.05$.

| | 0 µg/mL | H2O2 | 50 µg/mL | 125 µg/mL | 250 µg/mL | 500 µg/mL |
|-----------|---------|------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 0 µg/mL | - | * | o | o | o | o |
| H2O2 | | - | * | * | * | * |
| 50 µg/mL | | | - | o | o | o |
| 125 µg/mL | | | | - | o | o |
| 250 µg/mL | | | | | - | o |
| 500 µg/mL | | | | | | - |

Porcentaje de viabilidad con Azul Tripán

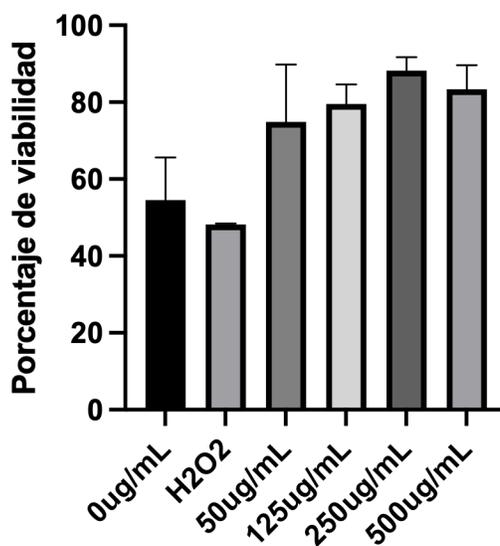


Figura 6. Viabilidad de la línea celular 3T3-L1 tratada con diferentes concentraciones de puntos de carbono medida con el ensayo de Azul Tripán luego de 24 horas de incubación. Para los ensayos se realizaron triplicados técnicos y las barras de error representan

Tabla 3. Resultados de la prueba post-hoc para el ensayo Azul Tripán practicado en células 3T3-L1 donde o indica que no existen diferencias significativas entre los grupos y * indica que si existen con $p < 0.05$.

| | 0 µg/mL | H2O2 | 50 µg/mL | 125 µg/mL | 250 µg/mL | 500 µg/mL |
|-----------|---------|------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 0 µg/mL | - | o | o | * | * | * |
| H2O2 | | - | * | * | * | * |
| 50 µg/mL | | | - | o | o | o |
| 125 µg/mL | | | | - | o | o |
| 250 µg/mL | | | | | - | o |
| 500 µg/mL | | | | | | - |

4.3. Ensayo de citotoxicidad por MTT

A continuación, en la Figura 7 y Figura 8 se presentan los resultados obtenidos con el ensayo de MTT en las concentraciones de CDs establecidas en las líneas celulares Vero y 3T3-L1. Se determinó por medio de la prueba Kruskal-Wallis que existen diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$), y al realizar la prueba post-hoc se obtuvo que solo existen diferencias significativas al evaluar los tratamientos con el control positivo ($p < 0.05$).

Según el análisis estadístico del ensayo MTT para la línea 3T3-L1 se encontró que hubo diferencias significativas con el control positivo con la prueba ANOVA mientras que en el resto se determinó que no hubo diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$) empleando la prueba post-hoc. En la Tabla 4 y Tabla 5 se presenta el resultado de las pruebas estadísticas aplicadas.

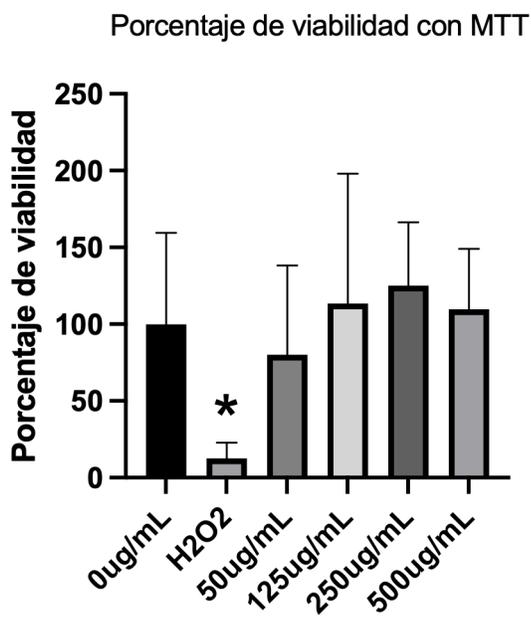


Figura 7. Viabilidad de la línea celular VERO tratada con diferentes concentraciones de puntos de carbono medida con el ensayo MTT luego de 24 horas de incubación. Para los ensayos se realizaron triplicados biológicos y técnicos y las barras de error representan la desviación estándar entre las réplicas. * indica que existen diferencias significativas del control positivo respecto a los demás grupos con $p < 0.05$.

Tabla 4. Resultados de la prueba post-hoc para el ensayo MTT practicado en células Vero donde o indica que no existen diferencias significativas entre los grupos y * indica que si existen con $p < 0.05$.

| | 0 µg/mL | H2O2 | 50 µg/mL | 125 µg/mL | 250 µg/mL | 500 µg/mL |
|-----------|---------|------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 0 µg/mL | - | * | o | o | o | o |
| H2O2 | | - | * | * | * | * |
| 50 µg/mL | | | - | o | o | o |
| 125 µg/mL | | | | - | o | o |
| 250 µg/mL | | | | | - | o |
| 500 µg/mL | | | | | | - |

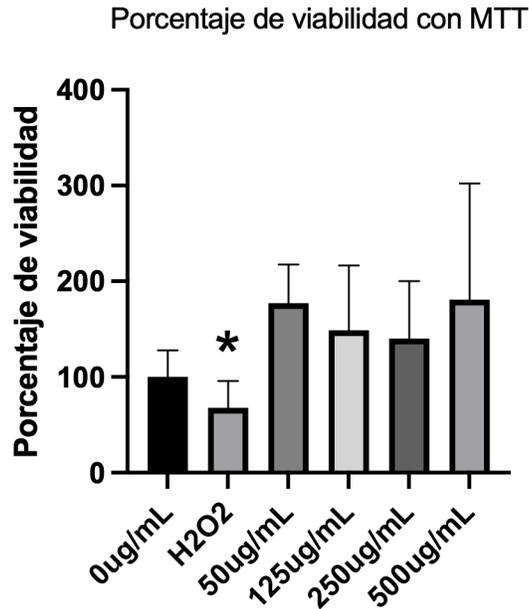


Figura 8. Viabilidad de la línea celular 3T3-L1 tratada con diferentes concentraciones de puntos de carbono medida con el ensayo MTT luego de 24 horas de incubación. Para los ensayos se realizaron triplicados biológicos y técnicos y las barras de error representan la desviación estándar entre las réplicas. * indica que existen diferencias significativas del control positivo respecto a los demás grupos con $p < 0.05$.

Tabla 5. Resultados de la prueba post-hoc para el ensayo MTT practicado en células 3T3-L1 donde o indica que no existen diferencias significativas entre los grupos y * indica que si existen con $p < 0.05$.

| | 0 µg/mL | H2O2 | 50 µg/mL | 125 µg/mL | 250 µg/mL | 500 µg/mL |
|-----------|---------|------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 0 µg/mL | - | o | o | o | o | o |
| H2O2 | | - | * | * | * | * |
| 50 µg/mL | | | - | o | o | o |
| 125 µg/mL | | | | - | o | o |
| 250 µg/mL | | | | | - | o |
| 500 µg/mL | | | | | | - |

5. DISCUSIÓN

Uno de los parámetros más importantes para evaluar la aplicabilidad de un nanomaterial es el nivel de toxicidad que éste induce cuando interactúa con las células. La citotoxicidad del material sintetizado se evaluó por medio del ensayo de exclusión de AT y el ensayo colorimétrico MTT luego de 24 horas de exposición a diferentes concentraciones.

La viabilidad del control negativo en el ensayo de Azul Tripán de la línea Vero es similar a la encontrada en las concentraciones de CDs según la Figura 5, por lo tanto, la presencia de CDs no tuvo efectos en la viabilidad celular. La viabilidad celular del control positivo es menor en comparación con los pozos en presencia de CDs, y los resultados de las pruebas estadísticas permiten argumentar que en este caso el peróxido de hidrógeno posee mayor toxicidad que los CDs.

En cuanto al ensayo de AT con la línea 3T3-L1 la prueba ANOVA indica que existen diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, en este experimento el control negativo presentó reducida viabilidad, por lo tanto, esto no permite realizar comparaciones de la toxicidad de los CDs con esta condición. Adicional a esto no existen diferencias significativas de este grupo frente al control positivo, lo cual una vez más comprueba la afirmación anterior ya que la toxicidad del peróxido de hidrógeno se conoce *a priori* y aun así las pruebas estadísticas no lo muestran cuando se compara con el control negativo. Esta menor viabilidad podría explicarse por contaminación bacteriana como consecuencia de falta de asepsia en el manejo de cultivo o fallas en la manipulación técnica al momento de siembra de células. Al realizar las pruebas post-hoc existen diferencias significativas entre los grupos tratados y el control positivo lo cual indica que éste último es más tóxico frente a los CDs. Se necesitan hacer más réplicas de este experimento para corregir el error presentado con el control negativo y así poder establecer la tendencia de los datos.

En el ensayo de Azul Tripán se debe tener en cuenta que las células dañadas pueden tomar días en perder la integridad de la membrana. Durante este tiempo, aquellas que sobreviven pueden continuar proliferando, pero algunas células dañadas se pueden desintegrar, lo cual conlleva la subestimación de muerte celular [28]. También al despegar las células para hacer el conteo se puede subestimar la cantidad de células viables, si no se verifica que todas las células se despeguen de la caja. Las células que despegan más rápido podrían morir pronto por prolongada exposición a la enzima, y las que se mantienen adheridas no se cuentan.

En lo que respecta al ensayo MTT para la línea Vero al no encontrar diferencias significativas quiere decir que no hay diferencia en la viabilidad entre las concentraciones de CDs por ello no es posible concluir cuál presenta más toxicidad. Al comparar este ensayo con el ensayo de AT en 3T3-L1, se observa un comportamiento similar dosis dependiente en las concentraciones de 50 a 250 $\mu\text{g/mL}$, esto a pesar de las limitaciones encaradas en el ensayo de AT en 3T3-L1, sin embargo, para concluir sobre la veracidad de este comportamiento es imperativo realizar más réplicas de los experimentos. En cuanto al control positivo este sí presenta diferencias significativas frente a las otras condiciones, lo cual concuerda con lo visto en AT para la misma línea y con lo que se esperaba ya que al ser una prueba de toxicidad el control positivo debe ser aquel en el que la viabilidad va a disminuir, con lo anterior se infiere que en ambos casos se evidencia el considerable efecto tóxico del peróxido de hidrógeno comparado con los CDs.

Al realizar el ensayo MTT en la línea celular 3T3-L1 se obtienen desviaciones estándar muy grandes. Por ejemplo, para la concentración de 500 µg/mL hubo una réplica técnica con porcentaje de viabilidad de 350% mientras que en otra réplica técnica se presentó 70%. Esta variabilidad causa que al practicar las pruebas estadísticas no existan diferencias significativas con la concentración de 500 µg/mL. A raíz de los porcentajes obtenidos para este caso se calculó el coeficiente de variación el cual da 70% y prueba una vez más la dispersión de los datos, y la poca confiabilidad de la media, lo cual dificulta concluir sobre el conjunto. Lo anterior se debe a fallas técnicas en el experimento, como al momento de sembrar las células se necesitaban volúmenes muy pequeños que al ponerlos mal genera cambios dramáticos en el resultado del ensayo, pues se van a presentar absorbancias elevadas para los pozos con mayor cantidad de células ya que habrá más células metabolizando para la formación de formazán en comparación con los pozos que tienen menos células, impidiendo la comparación entre condiciones y pozos.

Las pruebas estadísticas con el control positivo del ensayo MTT en la línea 3T3-L1 indicaron que éste es más tóxico que las concentraciones de CDs utilizadas debido a las absorbancias obtenidas del ensayo.

Los resultados del ensayo de MTT deben repetirse ya que se cometieron múltiples errores técnicos que pudieron ser variaciones en la densidad de células sembradas por pozo obteniendo absorbancias que difieren mucho entre concentraciones y réplicas técnicas y biológicas lo cual lleva a la errada normalización de los datos, también pudo haber contaminación del cultivo llegando a lecturas y conclusiones erróneas debido a la aumentada desviación estándar del ensayo. Como consecuencia de estos errores los coeficientes de variación en ambas líneas son los más altos entre los 4 experimentos realizados.

Al comparar la viabilidad de las dos líneas celulares se observa que la línea 3T3-L1 obtuvo mayor porcentaje de viabilidad que la línea Vero. Esto puede ser porque la línea Vero es más susceptible a toxinas que la 3T3-L1, es por esto que suele usarse para evaluar efectos tóxicos de químicos o materiales. Por ejemplo, se ha visto que a diferentes concentraciones de ciertos químicos nefrotóxicos las células Vero activan la autofagia como método para eliminar la toxina, también se ha evidenciado vacuolización del citoplasma y Aparato de Golgi, lo cual es señal de posible muerte celular tras exposición a toxinas [47].

6. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

El alcance de este proyecto se vio limitado por la contingencia que se está viviendo en el mundo, es por esto que la investigación realizada se puede complementar en los siguientes aspectos: i) caracterizar los CDs; esto incluiría determinar su tamaño, morfología, determinar grupo funcionales en la superficie y el núcleo y evaluar el potencial zeta ii) repetir la evaluación de citotoxicidad con un tiempo de exposición a 24 horas y si es posible evaluar tiempos de exposición más largos como 48 y 72 horas ya que puede que en el plazo de 24 horas no se refleje toxicidad considerable, pero en un plazo más largo habría que comprobarlo; iii) cuantificar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), pues la literatura ha mencionado que la generación de luz azul y la presencia de grupos funcionales oxidativos puede aumentar la producción de ROS; iv) realizar ensayos de genotoxicidad con el ánimo de cuantificar el daño en el ADN de células individuales.

Se recomienda continuar con la exploración sobre la citotoxicidad de los CDs utilizando diferentes concentraciones, ensayos de citotoxicidad, líneas celulares y realizando más réplicas biológicas de los mismos ensayos. Si bien la citotoxicidad *in vitro* se implementa para tener una primera aproximación de la toxicidad de las nanopartículas, no reemplaza la complejidad de los sistemas biológicos en los modelos *in vivo*. Existen aspectos como la biodistribución, biodegradabilidad, exposición a largo plazo que no se pueden determinar en experimentos *in vitro*, por ello en investigaciones a largo plazo se recomienda la realización de estudios *in vivo*.

Con este proyecto se llevó a cabo la primera etapa del desarrollo de una nanoplataforma con uso en bioimagen y radioterapia, teniendo presente la reducida citotoxicidad del material presentada en Azul Tripán se puede continuar con el diseño y estudio de la nanoplataforma complejizando la síntesis de los CDs ya sea funcionalizándolos o dopándolos con agentes que permitan obtener una plataforma para los usos que se le quieren dar.

7. CONCLUSIONES

Se sintetizaron CDs por reacción de microondas utilizando como precursor ácido cítrico y como solvente etanol y N, N-dimetilformamida la cual permite presencia de heteroátomos de nitrógeno obteniendo emisión en el espectro azul al excitar la solución con luz UV.

Al realizar los análisis estadísticos de los dos ensayos de citotoxicidad aplicados se evidencia que no hay un efecto tóxico de los CDs sintetizados en las 4 concentraciones evaluadas. De todas formas, las evaluaciones de citotoxicidad de esta síntesis se deben continuar para asegurar su bioseguridad *in vitro* en primera instancia.

Al comparar los hallazgos obtenidos de los dos ensayos de citotoxicidad aplicados no se evidencia un efecto tóxico de los CDs sobre la viabilidad celular, esto es posible concluirlo ya que siempre existieron diferencias significativas entre el control positivo y las concentraciones de CDs planteadas.

Lo desarrollado en este proyecto solo es un ápice de las investigaciones que se pueden y deben desarrollar para lograr plantear una nanoplataforma terapéutica, por lo que los estudios se deben continuar para comprobar lo encontrado y plantear nuevas perspectivas para esta síntesis.

REFERENCIAS

- [1] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, and M. K. Danquah, "Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations," *Beilstein J. Nanotechnol*, vol. 9, pp. 1050–1074, 2018, doi: 10.3762/bjnano.9.98.
- [2] G. Guisbiers, S. Mejía-Rosales, and F. Leonard Deepak, "Nanomaterial properties: Size and shape dependencies," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/180976.
- [3] V. Francia, D. Montizaan, and A. Salvati, "Interactions at the cell membrane and pathways of internalization of nano-sized materials for nanomedicine," *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 11, no. 1, pp. 338–353, Feb. 2020, doi: 10.3762/bjnano.11.25.
- [4] V. J. Mohanraj and Y. Chen, "Nanoparticles - A review," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 5, no. 1, pp. 561–573, 2007, doi: 10.4314/tjpr.v5i1.14634.
- [5] C. Contini, M. Schneemilch, S. Gaisford, and N. Quirke, "Nanoparticle–membrane interactions," *Journal of Experimental Nanoscience*, vol. 13, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.1080/17458080.2017.1413253.
- [6] J. Fan, M. Claudel, C. Ronzani, Y. Arezki, L. Lebeau, and F. Pons, "Lessons from a comprehensive study on a nanoparticle library," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 569, p. 118521, 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118521i.
- [7] X. Xu *et al.*, "Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, no. 40, Oct. 2004, doi: 10.1021/ja040082h.
- [8] Y. P. Sun *et al.*, "Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, no. 24, pp. 7756–7757, 2006, doi: 10.1021/ja062677d.
- [9] M. J. Molaei, "Carbon quantum dots and their biomedical and therapeutic applications: A review," *RSC Advances*, vol. 9, no. 12, pp. 6460–6481, 2019, doi: 10.1039/c8ra08088g.
- [10] T. v. de Medeiros, J. Manioudakis, F. Noun, J.-R. Macairan, F. Victoria, and R. Naccache, "Microwave-assisted synthesis of carbon dots and their applications," *Journal of Materials Chemistry C*, vol. 7, no. 24, 2019, doi: 10.1039/C9TC01640F.
- [11] S. Zheng *et al.*, "Preparation of gadolinium doped carbon dots for enhanced MR imaging and cell fluorescence labeling," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 511, no. 2, pp. 207–213, 2019, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.098.
- [12] L. Gonzalez, D. Lison, and M. Kirsch-Volders, "Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review," *Nanotoxicology*, vol. 2, no. 4, Jan. 2008, doi: 10.1080/17435390802464986.
- [13] L. Hu *et al.*, "Multifunctional carbon dots with high quantum yield for imaging and gene delivery," *Carbon*, vol. 67, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.carbon.2013.10.023.
- [14] V. N. Mehta, S. Jha, and S. K. Kailasa, "One-pot green synthesis of carbon dots by using *Saccharum officinarum* juice for fluorescent imaging of bacteria (*Escherichia coli*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 38, May 2014, doi: 10.1016/j.msec.2014.01.038.
- [15] X. Yang, Y. Zhuo, S. Zhu, Y. Luo, Y. Feng, and Y. Dou, "Novel and green synthesis of high-fluorescent carbon dots originated from honey for sensing and imaging,"

- Biosensors and Bioelectronics*, vol. 60, pp. 292–298, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.bios.2014.04.046.
- [16] F. Du *et al.*, “Nitrogen-doped carbon dots with heterogeneous multi-layered structures,” *RSC Advances*, vol. 4, no. 71, pp. 37536–37541, 2014, doi: 10.1039/c4ra06818a.
- [17] M. Tuerhong, Y. XU, and X.-B. YIN, “Review on Carbon Dots and Their Applications,” *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 45, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1016/S1872-2040(16)60990-8.
- [18] J. H. Zhang, A. Niu, J. Li, J. W. Fu, Q. Xu, and D. S. Pei, “In vivo characterization of hair and skin derived carbon quantum dots with high quantum yield as long-term bioprobes in zebrafish,” *Scientific Reports*, vol. 6, Nov. 2016, doi: 10.1038/srep37860.
- [19] F. Du *et al.*, “Engineering iodine-doped carbon dots as dual-modal probes for fluorescence and X-ray CT imaging,” *International Journal of Nanomedicine*, Nov. 2015, doi: 10.2147/IJN.S82778.
- [20] C.-W. Lai, Y.-H. Hsiao, Y.-K. Peng, and P.-T. Chou, “Facile synthesis of highly emissive carbon dots from pyrolysis of glycerol; gram scale production of carbon dots/mSiO₂ for cell imaging and drug release,” *Journal of Materials Chemistry*, vol. 22, no. 29, 2012, doi: 10.1039/c2jm32206d.
- [21] Y.-Y. Yao, G. Gedda, W. M. Girma, C.-L. Yen, Y.-C. Ling, and J.-Y. Chang, “Magnetofluorescent Carbon Dots Derived from Crab Shell for Targeted Dual-Modality Bioimaging and Drug Delivery,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 9, no. 16, Apr. 2017, doi: 10.1021/acsami.7b01599.
- [22] “Radiación ionizante (Ionizing Radiation) | ToxFAQ | ATSDR.” https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts149.html (accessed Apr. 15, 2021).
- [23] “Radiation Therapy for Cancer - National Cancer Institute.” <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy> (accessed Apr. 15, 2021).
- [24] J. Ruan *et al.*, “Graphene Quantum Dots for Radiotherapy,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 10, no. 17, May 2018, doi: 10.1021/acsami.7b18975.
- [25] F. Du *et al.*, “Engineered gadolinium-doped carbon dots for magnetic resonance imaging-guided radiotherapy of tumors,” *Biomaterials*, vol. 121, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.07.008.
- [26] B. Demir *et al.*, “Carbon dots and curcumin-loaded CD44-Targeted liposomes for imaging and tracking cancer chemotherapy: A multi-purpose tool for theranostics,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 62, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.jddst.2021.102363.
- [27] A. Montoro *et al.* “Evaluación de la radiosensibilidad del personal sanitario en procedimientos de tratamiento o diagnóstico médico con radiaciones” *Dialnet*, N^o. 134, 2014, págs. 15-25. ISSN: 1888-5438.
- [28] Ö. S. Aslantürk, “In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages,” *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, pp. 1–18, 2018, doi: 10.5772/intechopen.71923.
- [29] J. M. Posimo *et al.*, “Viability assays for cells in culture,” *Journal of Visualized Experiments*, vol. 2, no. 83, pp. 1–14, 2014, doi: 10.3791/50645.
- [30] T. L. Riss *et al.*, *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- [31] P. Zuo, X. Lu, Z. Sun, Y. Guo, and H. He, “A review on syntheses, properties, characterization and bioanalytical applications of fluorescent carbon dots,”

- Microchimica Acta*, vol. 183, no. 2. Springer-Verlag Wien, pp. 519–542, Feb. 01, 2016, doi: 10.1007/s00604-015-1705-3.
- [32] S. C. Ray, A. Saha, N. R. Jana, and R. Sarkar, “Fluorescent Carbon Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Bioimaging Application,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 113, no. 43, Oct. 2009, doi: 10.1021/jp905912n.
- [33] Y. Yang *et al.*, “One-step synthesis of amino-functionalized fluorescent carbon nanoparticles by hydrothermal carbonization of chitosan,” *Chemical Communications*, vol. 48, no. 3, pp. 380–382, 2012, doi: 10.1039/c1cc15678k.
- [34] M. L. Bhaisare, A. Talib, M. S. Khan, S. Pandey, and H. F. Wu, “Synthesis of fluorescent carbon dots via microwave carbonization of citric acid in presence of tetraoctylammonium ion, and their application to cellular bioimaging,” *Microchimica Acta*, vol. 182, no. 13–14, pp. 2173–2181, 2015, doi: 10.1007/s00604-015-1541-5.
- [35] J.-H. Liu *et al.*, “Cytotoxicity of Fluorescent Carbon Nanoparticles,” *Nano LIFE*, vol. 01, no. 01n02, Mar. 2010, doi: 10.1142/S1793984410000158.
- [36] A. Kroll, M. H. Pillukat, D. Hahn, and J. Schnekenburger, “Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays,” *Archives of Toxicology*, vol. 86, no. 7, Jul. 2012, doi: 10.1007/s00204-012-0837-z.
- [37] N. A. Monteiro-Riviere and A. O. Inman, “Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin,” *Carbon*, vol. 44, no. 6, May 2006, doi: 10.1016/j.carbon.2005.11.004.
- [38] S. Sahu, B. Behera, T. K. Maiti, and S. Mohapatra, “Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bioimaging agents,” *Chemical Communications*, vol. 48, no. 70, 2012, doi: 10.1039/c2cc33796g.
- [39] C. Dias *et al.*, “Biocompatibility and bioimaging potential of fruit-based carbon dots,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 2, Feb. 2019, doi: 10.3390/nano9020199.
- [40] S. Singh, D. Singh, S. P. Singh, and A. K. Pandey, “Candle soot derived carbon nanoparticles: Assessment of physico-chemical properties, cytotoxicity and genotoxicity,” *Chemosphere*, vol. 214, pp. 130–135, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.112.
- [41] Ashmi Mewada and Madhuri Sharon, *Carbon Dots As Theranostic Agents*, vol. 1. Wiley, 2018.
- [42] N. C. Ammerman, M. Beier-Sexton, and A. F. Azad, “Growth and Maintenance of Vero Cell Lines,” *Current Protocols in Microbiology*, vol. 11, no. 1, Nov. 2008, doi: 10.1002/9780471729259.mca04es11.
- [43] R. Chen, “MTT Assay of Cell Numbers after Drug/Toxin Treatment,” 2011. [Online]. Available: <http://www.bio-protocol.org/e51>.
- [44] “GraphPad Prism.” La Jolla, California, USA, Mar. 15, 2021.
- [45] J. Schneider *et al.*, “Molecular Fluorescence in Citric Acid-Based Carbon Dots,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 121, no. 3, Jan. 2017, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b12519.
- [46] L. Tang *et al.*, “Deep Ultraviolet Photoluminescence of Water-Soluble Self-Passivated Graphene Quantum Dots,” *ACS Nano*, vol. 6, no. 6, Jun. 2012, doi: 10.1021/nn300760g.
- [47] C. Menezes, E. Valerio, and E. Dias, “The Kidney Vero-E6 Cell Line: A Suitable Model to Study the Toxicity of Microcystins,” in *New Insights into Toxicity and Drug Testing*, InTech, 2013.