



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
FACULTAD DE FARMACIA**

**“Estudio de la interacción de nanopartículas de CdS-Dextrina  
con componentes sanguíneos y sus efectos fisiopatológicos  
asociados”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN FARMACIA**

**P R E S E N T A**  
**M. en F. YANETH ANAHI RODRÍGUEZ LÓPEZ**

**DIRECTORA DE TESIS**  
**DRA. MARÍA DE LOURDES RODRÍGUEZ FRAGOSO**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**2021.**

**ESTE PROYECTO SE REALIZÓ EN EL  
LABORATORIO 6: FARMACOLOGÍA,  
TOXICOLOGÍA E INMUNOMODULADORES DE  
LA FACULTAD DE FARMACIA  
UAEM.**

**“No hay ninguna ley física que impida manipular átomos y moléculas individualmente, o fabricar estructuras a partir de los mismos. En principio se puede hacer; en la práctica no se ha hecho porque somos demasiado grandes”**

**“There’s Plenty of Room at the Bottom...”  
Richard Feynman como padre “conceptual” de la nanotecnología.  
1959**

**“Una meta sin un plan, es simplemente un deseo.”**





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA  
Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., a 19 de noviembre de 2020  
Asunto: Asignación de jurado  
Folio: FF/D/SI/JP/DF/102/2020

M.F. YANETH ANAHÍ RODRÍGUEZ LÓPEZ  
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
PRESENTE

Por este conducto le informo que la Comisión Académica de Doctorado en la sesión del 18 de noviembre de 2020 le asignó jurado para revisar y presentar la defensa oral de la tesis titulada:

**“Estudio de la interacción de nanopartículas de CdS-dextrina con componentes sanguíneos y sus efectos fisiopatológicos asociados”**

Dra. Leticia González Maya	<u>Presidente</u>
Dra. Judith González Christen	<u>Secretaria</u>
Dr. César Millán Pacheco	Vocal 1
Dra. Vivechana Agarwal	Vocal 2
Dra. María Luisa Garduño Ramírez	Vocal 3
Dr. Gerardo González de la Cruz	Vocal 4
Dr. Alfonso Leija Salas	Vocal 5

De acuerdo al Artículo 75. (Reglamento General de Posgrado) **DE LOS VOTOS PARA EL EXAMEN DE GRADO.** Será requisito previo al examen de grado que los integrantes de la Comisión Revisora emitan su voto y opinión favorable en términos de que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el jurado de examen correspondiente.

II. Será requisito para presentar el examen de grado académico de maestría que al menos cuatro de los cinco votos emitidos sean favorables.

Lo anterior no compromete de ningún modo el dictamen del jurado en la presentación y defensa de la tesis o tesina.

Asimismo, le recuerdo que es responsabilidad de usted enviar los respectivos ejemplares a su comité sinodal y dar seguimiento a las correspondientes revisiones para poder concluir este importante proceso.

Sin más por el momento, me despido de usted, no sin antes felicitarla por estar próxima a obtener el título de Doctora en Farmacia.

Atentamente  
*Por una humanidad culta  
Una universidad de excelencia*

**DR. SERGIO ALCALÁ ALCALÁ**  
JEFE DE POSGRADO

C.c.p. Dra. Leticia González Maya, Dra. Judith González Christen, Dr. César Millán Pacheco, Dra. Vivechana Agarwal, Dra. María Luisa Garduño Ramírez, Dr. Gerardo González de la Cruz y Dr. Alfonso Leija Salas.

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 82209. Facultad de Farmacia, Edificio 81 C  
Tel. (777) 329 7000 Ext. 7988 /posgrado\_ff@uaem.mx, maestríafarmacia@uaem.mx, doctoradofarmacia@uaem.mx

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRONICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**SERGIO ALCALA ALCALA** | Fecha:2020-11-19 18:13:52 | Firmante

WxY2IKmft:DV8vobGBFiOYnUXdYcVgCOFEDAci3MXgTHchzUSVwKTWFZxfuZNSujyK+Hm06W1JA8gBywV5bUESrDqmGyUj5aigs7RGFoYY+tsNMeKSLVqU8qSQn0auoni  
N8qYusDT3J5sDNM1/gdGG5Nsynd04KcKha3Ny9FUEZFq+owWVQlyPJ8olwqqlaDxbhAfrvOcxApvundW7wZMSf+YXZ+YTxd0PRqMRpujPvrsk4PlykWc0GyJd9bHTqrMv4e  
KAC4Z0abNkBHcCKK16O2IRyDeMQvWBE5n85q+2RX1CT72mEEE9F+OVMvgd+4jM1ZOT0YUULBY8/Λ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



mTc8IL

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dkjhVnPXZWvYqYf6VFQXybyqqYSb3yh1Z>

UA  
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 26 de Febrero de 2021.

**VOTO APROBATORIO**

Nombre del alumno: **M.F. Yaneth Anahi Rodríguez López**

Título de tesis: **“Estudio de la interacción de nanopartículas de CdS-Dextrina con componentes sanguíneos y sus efectos fisiopatológicos asociados”.**

Grado a obtener:

Maestría

**Doctorado**

Miembro del jurado: **Dr. Gerardo Acacio González de la Cruz**

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta.

Se rechaza

**Observaciones (sólo en caso de rechazo):**

---

---

---

\_\_\_\_\_  
**Dr. Gerardo González de la Cruz**

Miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**GERARDO ACACIO GONZÁLEZ DE LA CRUZ | Fecha:2021-03-10 18:10:20 | Firmante**

NuregchFmtVTfqRivzebDWDsVJowlob7Klec6+QkPqnal9xpTcU/VfnMpiyq3QiMJZHvsd5qQ6FEikb1XMDCIWZLfHm4gvrM5Rag6gQ+2NZtq0pj6zMIP+QbX1KI95oSKWCQgDVcJ  
NxLZSLBytAUo8TmVlcTXCtTFvVs8ko++ef9bAq36yNvlVNFo1FCiVMAnYNUHDTdPgLFF9j+Wt/L6fSVqp9PPIYU/zY0Hf+8ozpMrPIHtggMJTXQ+JVu1SQwlypNba3gtoMXv3Guy  
mRYXzobjBqyUBAdTrNpQrT3KZpgVc9gorAj09BNE6W+YrmKen9buql6fnLWfF42DwP7kbA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[mOx2Np](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/CQd0QDXucQqF7vO66Wm5i3X6gzkXuXpC>







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 26 de Febrero de 2021.

### VOTO APROBATORIO

Nombre del alumno: **M.F. Yaneth Anahi Rodríguez López**

Título de tesis: “**Estudio de la interacción de nanopartículas de CdS-Dextrina con componentes sanguíneos y sus efectos fisiopatológicos asociados**”.

Grado a obtener:

Maestría

**Doctorado**

Miembro del jurado: **Dra. Judith González Christen**

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta.

Se rechaza

**Observaciones (sólo en caso de rechazo):**

---

---

---

\_\_\_\_\_  
**Dra. Judith González Christen**

Miembro del jurado

26/02/2021

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2021-03-01 13:35:34 | Firmante

uUvIignQIDJhOINZvM3edMIGeV5Fxel/nkxtu09x1ori3979rkYT0iHwdb4wriJAoMpBNVpW0T7cxjf8mw36FzHR57Do2Bjsbd/tDt7m/ypIGjwqog/INzkLx7YNH6NLjZ5r5n0YKaY112OB  
B/u320KCwyj7gUQ/iMT8SLQ8gzFprck8kNp4o8+TIGpE7f8Xtd+IOR0IR4pfZ+0DxKnDC/N1/zwYQspCjtxsoxQI0psX8ZJ+IQXrR+ozNQA5VGS3sa2NBLdRLvB/GAmwbX4LCb+C/  
KKWOii4gGZ0kyWGkIZMEFn+iVFq9vH4gRLmEKJWJWBVvnWhNc4BCwOUF1fHQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



dgYjLX

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/W7UrJuyuwigSBevC4poRAnRZjs8HvQf7>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 26 de Febrero de 2021.

**VOTO APROBATORIO**

Nombre del alumno: **M.F. Yaneth Anahi Rodríguez López**

Título de tesis: **“Estudio de la interacción de nanopartículas de CdS-Dextrina con componentes sanguíneos y sus efectos fisiopatológicos asociados”.**

Grado a obtener:

Maestría

**Doctorado**

Miembro del jurado: **Dra. Leticia González Maya**

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta.

Se rechaza

**Observaciones (sólo en caso de rechazo):**

---

---

---

\_\_\_\_\_  
**Dra. Leticia González Maya**

Miembro del jurado

\_\_\_\_ 1ro de marzo 2021 \_\_\_\_

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**LETICIA GONZALEZ MAYA** | Fecha:2021-03-01 13:54:27 | Firmante

VfHC8TofflCJrHox/1YBcljbaPN9SqbDGKGDerABI2aaHHL9hHZsnitBOMEJ29n13f38S8Htsy2wRQSh7W8q0RRnrD3UoNDj4zWkM8KNu1MWdv5+Xo/6eqVvKPCy7cNBG5VyA+PuF7EnrsSkXvRlirE48CzL2+06MopWa6OU+p2aCTwhl6xC1H4rZmJgJE3RVCAEgNGYIde94iXwZJ8oajzB2N79P7WmVY0dpoor+l3p6CMLs1mk/nwsAzzXKQPuzSlw7Nj2rUtOZ32FbXUCieB67hA+Im6Wr1BHNseeYpYyUT51YjrTJlut4kFVFYtuh1Vqt8eYaMv1/XELB8Cw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



2Piqd7

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/1bGe8Yu56nr9SoHmj8tFXSiNj5M89Mnc>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 26 de Febrero de 2021.

### VOTO APROBATORIO

Nombre del alumno: **M.F. Yaneth Anahi Rodríguez López**

Título de tesis: “**Estudio de la interacción de nanopartículas de CdS-Dextrina con componentes sanguíneos y sus efectos fisiopatológicos asociados**”.

Grado a obtener:

Maestría

**Doctorado**

Miembro del jurado: **Dra. María Luisa Garduño Ramírez.**

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta.

Se rechaza

**Observaciones (sólo en caso de rechazo):**

---

---

---

\_\_\_\_\_  
**Dra. María Luisa Garduño Ramírez.**

Miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
26-Feb-2021

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2021-02-26 13:55:31 | Firmante

bAVeUDAmvBEQWlUAQI1MmulH3ISrE103u0V6bJSH/tZ0i6aN3bEO7DofLSS0wLWz5c6C0Q8zJKI7Max33sBmMshN0ihWSVkXz2K5Fysi3Klwr1F3NfX2gNITR1DvdyJW/9oFCJYfov5imVSHXBmPVZEP21hdqW11De6fi0dK5cRDgsobGrzzv8D9UEmi2ko0I271AINqEqL6NSSXjrG/dYifQhN4sXuh4af8P54Hev4Mfs4C2DW/XhuiVsuorQBavs2gr9oijprxugx8akfwCkUGYErZMAW2K8HII3LcyvL5YTcDFXx3Nu/79162pryHd/PE9KJXN61S21axoLcHQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[KXuB2v](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3XE5B1qLnBFFDBG1ixgrTWIV2C6Qoc67>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 26 de Febrero de 2021.

### VOTO APROBATORIO

Nombre del alumno: **M.F. Yaneth Anahi Rodríguez López**

Título de tesis: **“Estudio de la interacción de nanopartículas de CdS-Dextrina con componentes sanguíneos y sus efectos fisiopatológicos asociados”.**

Grado a obtener:

Maestría

**Doctorado**

Miembro del jurado: **Dr. César Millán Pacheco**

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

**Sí se aprueba tal como se presenta.**

Se rechaza

**Observaciones (sólo en caso de rechazo):**

---

---

---

\_\_\_\_\_

**Dr. César Millán Pacheco**

Miembro del jurado

\_\_\_\_\_ 26 de febrero del 2021 \_\_\_\_\_

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**CESAR MILLAN PACHECO** | Fecha:2021-02-26 16:03:42 | Firmante

WG+BxZ8cEzYkB9zo8qd8af4q6vMYVsD164y/Zfnjb7E2OpsOyl6wQJrYzk1vUMGbU5UalJ/dallla2nJ6j2NBj/Tz9rTVlanPBHSP0aGTLouZZksJMerlMhjZ2vuR+R8k2W5Cnq3eV8N+fPgVGP9Md8do2NWaYjOnzTLu5l6Cjt0vPHG5Mb5u0tfsrOOSTx+9gZh2Kjdb0JcEdqZBOCRYtjFoJrPLDqet0quk0SCGF0n0Po/aNgq9iE8uB24rmXuXAVI/jvVM5n39fDa0xn+LyfZs32lR6pm9PhM+rG+NHCOi3e6bnrylDCzIG1K673HO7xdRL6fbsvjmPaAS7Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



4Zlgy3

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/O5FJ0fORYOY8RfCjmisnVVjiOHuTxICS>







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 26 de Febrero de 2021.

### VOTO APROBATORIO

Nombre del alumno: **M.F. Yaneth Anahi Rodríguez López**

Título de tesis: **“Estudio de la interacción de nanopartículas de CdS-Dextrina con componentes sanguíneos y sus efectos fisiopatológicos asociados”.**

Grado a obtener:

Maestría

**Doctorado**

Miembro del jurado: **Dra. Vivechana Agarwal**

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta.

Se rechaza

**Observaciones (sólo en caso de rechazo):**

---

---

---

\_\_\_\_\_  
**Dra. Vivechana Agarwal**

Miembro del jurado

\_\_\_\_\_  
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

VIVECHANA AGARWAL | Fecha:2021-02-27 16:55:51 | Firmante

oZh5uagoYOlcl18LPoHDxoQuQ7mWnWhcLuaOVDugg5pT196JtMwsMRpJMtG7dmGydEFecPndEs5w4EiZfAuT5yn7VB1HG+W8W3W0KclddnNn2g1FUt7KDbid7WArRtsLM2Jju  
o0EcNocEnZ8mk1nVd+bkHenad+pRwUFtoxRPyHejYmuTgJp1xR69+2z0ADsxc4YaxsuZIZEWQ1uXEq2jDk9Vbz5Ofcb+sh46U+pYbpek2dv0emNWFkgfUE8xthwalys4NxS2ML  
nOwDDTuBOjmeIF3ute5TMOSmv6QM8uH2Wxcq5TOY+gw0ispMWDmp+xpHfyMS6dyjg6DOE4dPhg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[bBVvMP](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/lczkcLnXKKu0PUCeAVlfbpvTQM000OK8>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos a 26 de Febrero de 2021.

**VOTO APROBATORIO**

Nombre del alumno: **M.F. Yaneth Anahi Rodríguez López**

Título de tesis: **“Estudio de la interacción de nanopartículas de CdS-Dextrina con componentes sanguíneos y sus efectos fisiopatológicos asociados”.**

Grado a obtener:

Maestría

**Doctorado**

Miembro del jurado: **Dr. Alfonso Leija Salas**

La tesis fue leída y se hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Sí se aprueba tal como se presenta.

Se rechaza

**Observaciones (sólo en caso de rechazo):**

---

---

---

---

**Dr. Alfonso Leija Salas**

Miembro del jurado

---

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ALFONSO LEIJA SALAS** | Fecha:2021-03-10 09:26:18 | Firmante

jnKNw4f52DgR2PiqV3plqcyHN2z0PRLyfYBA/a8yNX4ADT4Zk11lzZUf+R8zM4tyUgG8E3XNI3NT4xJnGIZKmYtOjNVh01tFvngd6ZXOwMCIrB82ngJzXYtxoRrN5Tmdkovt4gJ2XHtHdK+V3+8PKaXwgBXUeLO6hfpoYgDWplqK1x5ubgGiGHaaR5zrvNjuuNRoWSCleNXBnt6v1cD5Btvx9vtFkKzwxkAfEgHTLAZanR7wUgUZqJjsrJmOVopEsWGt6UV0ZFoHUpYK+bjcnmBrwxxM2GYxldE7nfU9pz9FIGUpoKUghATa96Pkho8WmJOzgzUlvywXwTE/bte1Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



fEGpmg

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/aXPtlLahSpDqReJOPBryG5fRX6JKTCWs>



**Dedicatoria especial, en memoria del:**

**Dr. Jorge Alberto Reyes Esparza**

**Quien en vida fue mi director del laboratorio en la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, mentor y amigo. Siempre compartiendo su entusiasmo y pasión por la ciencia, la innovación tecnológica y su enorme generosidad.**

**A quien agradezco todo su apoyo a lo largo de 11 años de mi carrera profesional.**

## A mi mamá

Para ti con todo mi amor e infinito agradecimiento, porque eres quien de manera incondicional me ha apoyado en todo sentido.

Sabes que este es tu proyecto, estuviste en casi todos los experimentos. Esperabas pacientemente a que terminara, me acompañaste en el lab cuando salía tarde, me animabas a no rendirme si uno no salía bien. Te desvelaste conmigo cuando tenía que estudiar para mis exámenes.

Me preparaste cientos de tazas de café y en cada una decías:  
¡ya casi terminas!, ¡tú puedes!, ¡ya llegaste hasta aquí, no puedes darte por vencida!

Me has dado tanto y no sé cómo le haces, pero siempre, siempre has sabido qué decir. Ese es tu poder, esa es tu magia.

Has creído y confiado en mí, incluso más que yo misma. Sin ti,  
nada sería igual.

Gracias por ser, por estar y por todo tu amor.

*¡cómo el agua y la sal, Nanny!*

*Te amo.*

## **A mi hermano Felipe...**

**Por estar en las buenas, en las malas y en las peores. Por ser mi más sólido apoyo cuando quise rendirme. Por estar conmigo sin pedírtelo, no dudaste en ningún momento en hacerme sentir que podía lograrlo. Por hacerme reír, cuando estaba triste y algún experimento no había salido bien. Por acompañarme por las noches, fines de semana y en las madrugadas al laboratorio, a pesar de tus clases y responsabilidades. Como olvidar cuando me ayudaste a cuidar de mis ratas, acompañándome a CdMx a sintetizar mis nanopartículas, a bajar artículos científicos con el pretexto de que en algún momento era algo que te servirá para tu carrera. En fin, un buen de anécdotas de todo tipo pasamos en estos 4 años de mi doctorado. Sin duda alguna, te dedico con todo mi amor este proyecto y sabes que estaré para ti, siempre.**

*Te amo.*

## **Agradecimientos especiales**

**Agradezco a Dios por permitirme cumplir un sueño y meta más. Por su infinita bondad y por sus misteriosas formas de decirme que está presente en cada paso que doy.**

**A mis queridas hermanas, Itzell y Tiana, por su paciencia cuando no podía estar con ellos físicamente, por quererme y brindarme su apoyo muy a pesar de los kilómetros que nos separan, por sus oraciones y su amor.**

**A mis sobrinos, mis muñecos hermosos Javier y Milla, porque con su existencia me hacen la vida más maravillosa.**



## AGRADECIMIENTOS

- ∞ A mi jefa de laboratorio, la **Dra. Lourdes Rodríguez** por sus consejos y apoyo brindado a lo largo de 11 años que me dió la oportunidad y el honor de formar parte de este laboratorio. Por toda su confianza, por creer en mí, por su dedicación y empeño para mi proyecto y por sus palabras de aliento cuando lo necesité. Me siento muy orgullosa de haber pertenecido a este laboratorio, pero sobre todo al haber aprendido tanto de una gran investigadora como ella.
- ∞ A la Dra. Patricia Rodríguez, por sus consejos y apoyo para la síntesis de las nanopartículas. También por brindarme su apoyo en la realización de este proyecto y su atención.
- ∞ Dra. Judith González Christen, gracias por su ayuda y consejos a lo largo de los 4 años de la realización de este proyecto.
- ∞ A la Dra. Vivechana Agarwal, por permitirme usar equipos de su laboratorio de nanomateriales en el Centro de Investigación en Ingenierías y ciencias aplicadas de la UAEM para la realización de algunos experimentos.
- ∞ Al Dr. Alfonso Leija Salas, por ayudarme a conseguir un lugar temporal en el Centro de Ciencias Genómicas-UNAM, cuando fue el terremoto del 2017 y nuestra facultad tuvo que cerrar por daños estructurales. Sin él no hubiera podido avanzar en mi proyecto.
- ∞ Al M.C. Arturo Galván Hernández del Instituto de Ciencias Físicas (UNAM), por su asistencia técnica en la obtención de imágenes en microscopía de fuerza atómica (AFM).
- ∞ Q.F.B. Xóchitl Alvarado-Affantrager del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (UNAM), por su asistencia técnica en la obtención de imágenes de microscopía confocal de fluorescencia.
- ∞ Al Dr. César Millán Pacheco, por todo su apoyo, consejos, por escucharme pacientemente cuando estaba a tope con la escritura de mi tesis. Por su colaboración en el experimento de docking molecular para mi proyecto, aprendí mucho.
- ∞ A la Dra. Rocío Gómez Cansino (Chío), quien en su estancia en mi laboratorio fue un gran apoyo para la realización de algunos experimentos y siempre conté con su ayuda para mi proyecto. De todo corazón, muchas gracias.

- ∞ A mi hermano David Durán, porque no me dejaste sola, por los sandiwches de mantequilla de maní y mi cafecito con canela que me hacían el día. Gracias porque sin pedirlo, siempre me brindaste tu ayuda. Te quiero mucho.
- ∞ Anilú y Miguel Barrera, por darme ánimo y su apoyo en los momentos difíciles, muchas gracias. Las carcajadas nunca faltaron.
- ∞ A mi amigo Pepe Vázquez porque siempre me dio ánimo para seguir adelante, por los cafecitos que nunca faltaron. Muchas gracias por todo tu cariño y amistad.
- ∞ A mi amigo Alex Manrique, por todo su apoyo, consejos y ánimo. Muchas gracias por todo.
- ∞ A mi Rufus (mi perrito), por su amor incondicional y por desvelarse conmigo estos 4 años de mi proyecto.
- ∞ A mis compañeros del L6: Rubí, Janet, Emmanuel, Zahid, José María y Daniel. Porque siempre me dieron una palabra de aliento, un consejo o simplemente me ayudaron a sobrellevar mi estrés con sus ocurrencias.
- ∞ A todas y cada una de aquellas personas que hicieron posible que esta meta se cumpliera, muchas gracias por todo.

**AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA (CONACyT) EL APOYO CON UNA BECA  
(No. 581876) PARA LA REALIZACIÓN DE MIS ESTUDIOS  
DE DOCTORADO EN FARMACIA.**

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>II</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>III</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VI</b>

## I. ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
1.1 Generalidades de nanopartículas semiconductoras o puntos cuánticos.	2
1.2 Hemocompatibilidad de las nanopartículas.	5
1.3 Las propiedades fisicoquímicas de las NP y su influencia en la hemocompatibilidad.	6
1.4 Interacción de NP y proteínas plasmáticas.	7
1.5 Interacción de NP y el sistema de coagulación.	10
1.6 Estructura y función de los eritrocitos en la hemostasia y los efectos implicados en la interacción con NP	11
1.7 Interacción entre NP y eritrocitos: alteraciones y cambios morfológicos de los eritrocitos relacionados con la hemostasia.	17
1.8 Interacción de NP con plaquetas y su efecto relacionado en la función en la hemostasia.	19
1.9 El efecto de la interacción entre NP y macrófagos en la captación celular y fagocitosis.	23
2.0 Antecedentes	25
3.0 Justificación	43
4.0 Hipótesis	45
5.0 Objetivo General	46
5.1 Objetivos específicos	46
6.0 Materiales y métodos	48
6.1 Proyecto en colaboración	48
6.2 Nanopartículas de CdS-Dextrina (NP CdS-Dex).	48
6.3 Líneas celulares.	48
6.4 Animales y obtención de sangre.	49
6.5 Determinación de la formación de la corona de proteínas de las NP de CdS-Dex en presencia de albúmina por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.	50
6.6 Determinación del potencial Z asociado a la formación de la corona de proteínas de NP de CdS-dex expuestas a albúmina.	52
6.7 Determinación del efecto de la interacción de NP de CdS-Dex sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA).	52
6.8 Determinación del efecto de la interacción de NP de CdS-Dex sobre el tiempo de PROTROMBINA.	53
6.9 Determinación del efecto de la interacción de NP de CdS-Dex sobre la concentración de fibrinógeno.	54
6.10 Preparación de eritrocitos.	55
6.11 Determinación del efecto hemolítico de NP de CdS-Dex. sobre eritrocitos de ratas wistar macho <i>in vitro</i> .	56
6.12 Análisis topográfico de eritrocitos por microscopia de fuerza atómica.	56

6.13 Determinación del potencial Z ( $\zeta$ ) asociado a la pérdida de la funcionalidad de eritrocitos tratados con NP de CdS-dex.	57
6.14 Determinación de la captación y localización intracelular de NP de CdS-Dex en eritrocitos por microscopía confocal de fluorescencia.	58
6.15 Acoplamiento molecular de la interacción de NP de CdS-dextrina con eritrocitos.	58
6.16 Determinación del efecto de la interacción de NP de CdS/Dex sobre la agregación plaquetaria.	59
6.17 Determinación de la captación y localización intracelular de NP de CdS-Dex en plaquetas por microscopía confocal de fluorescencia.	60
6.18 Análisis topográfico de plaquetas por microscopía de fuerza atómica.	60
6.19 Ensayo del efecto de de las NP de CdS-Dex sobre la viabilidad celular en células Raw 264.7	61
6.20 Determinación de la captación de NP de CdS-Dex por macrófagos RAW 264.7 mediante microscopía confocal de fluorescencia.	62
6.21 Determinación del efecto de NP de CdS-Dex sobre la producción de ON inducida en macrófagos RAW 264.7.	62
6.22 Determinación del efecto fagocítico inducido por NP de CdS-Dex en macrófagos RAW 264.7.	63
6.23 Análisis estadístico.	64
7.0 Resultados.	65
7.1 Efecto de la interacción de NP de CdS-Dex con albúmina de suero bovino (BSA).	65
7.2 Identificación de la formación de la corona de proteínas asociado a la dispersión del tamaño de las NP de CdS-Dex en presencia de albúmina.	67
7.3 Efecto de la interacción de NP de CdS-Dex sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) a 5, 10 y 30 minutos de tiempo de exposición.	69
7.4 Efecto de la interacción de NP de CdS-Dex sobre el tiempo de protrombina (PT) a 5, 10 y 30 minutos de tiempo de exposición.	70
7.5 Efecto de la interacción de NPs de CdS-Dex sobre el fibrinógeno a 5, 10 y 30 minutos de tiempo de exposición.	72
7.6 Efecto de las NP de CdS-Dex. sobre plaquetas: agregación plaquetaria	73
7.7 Identificación de la captación de NP de CdS-Dex en plaquetas, por medio de microscopia confocal de fluorescencia.	75
7.8 Identificación de la agregación plaquetaria por medio del análisis topográfico en microscopia de fuerza atómica.	78
7.9 Efecto comparativo de las NP de CdS-Dex. sobre eritrocitos a 30 minutos de tiempo de exposición.	80
7.10 Determinación de la captación y localización de NP de CdS-Dex en eritrocitos de ratas wistar, por microscopía confocal de fluorescencia.	81
7.11 Identificación de hemólisis por medio del análisis topográfico en microscopia de fuerza atómica.	82
7.12 Efecto de la interacción de NP de CdS-Dex con eritrocitos de sangre de rata, por microscopía de fuerza atómica (AFM).	84

<b>7.13 Determinación del potencial <math>\zeta</math> en eritrocitos tratados con NP de CdS-dextrina asociado a la integridad de la membrana celular.</b>	<b>86</b>
<b>7.14 Acoplamiento molecular de CdS-dextrina/eritrocito.</b>	<b>87</b>
<b>7.15 Efecto de la interacción de las NP de CdS-Dex sobre la viabilidad celular en células Raw 264.7.</b>	<b>89</b>
<b>7.16 Efecto de la captación celular de NP de CdS-Dex en macrófagos RAW 264.7 estudiado por microscopía confocal de fluorescencia.</b>	<b>90</b>
<b>7.17 Efecto de NP de CdS-dex sobre la producción de NO inducida en macrófagos RAW 264.7.</b>	<b>92</b>
<b>7.18 Efecto de la interacción de NP de CdS-dex con macrófagos RAW 264.7 sobre la fagocitosis de levaduras.</b>	<b>93</b>
<b>8.0 Discusión</b>	<b>96</b>
<b>9.0 Conclusión general</b>	<b>114</b>
<b>9.1 Conclusiones específicas</b>	<b>114</b>
<b>10.0 Perspectivas</b>	<b>116</b>
<b>11.0 Referencias</b>	<b>117</b>

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Escala que muestra dimensiones nanométricas y micrométricas.</b>	<b>1</b>
<b>Figura 2. Representación gráfica de puntos cuánticos y su emisión de color.</b>	<b>3</b>
<b>Figura 3. Efectos de la interacción de nanopartículas (NP) con componentes sanguíneos.</b>	<b>5</b>
<b>Figura 4. Nanopartículas (NP) en interacción con biomoléculas y la formación de la corona de proteínas.</b>	<b>9</b>
<b>Figura 5. Morfología del eritrocito.</b>	<b>13</b>
<b>Figura 6. Membrana eritrocitaria.</b>	<b>13</b>
<b>Figura 7. Efecto de la interacción de NP de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sobre los eritrocitos y el impacto sobre la circulación sanguínea.</b>	<b>16</b>
<b>Figura 8. Principales proteínas de adhesión que en la plaqueta participan en el proceso de activación plaquetaria.</b>	<b>22</b>
<b>Figura 9. Imágenes de la caracterización de NP de CdS-dextrina.</b>	<b>25</b>
<b>Figura 10. Visualización microscópica de la fluorescencia en células endoteliales (HUVEC) tratadas con NP de CdS-Dex.</b>	<b>26</b>
<b>Figura 11. Efecto de las NP de CdS-Dex sobre la viabilidad celular de líneas celulares humanas.</b>	<b>27</b>
<b>Figura 12. Ensayo de muerte celular inducida por NP de CdS-Dex en líneas celulares humanas.</b>	<b>28</b>
<b>Figura 13. Visualización microscópica de la fluorescencia en líneas celulares tratadas con NP de CdS-Dex.</b>	<b>29</b>
<b>Figura 14. Imágenes microscópicas de fluorescencia que muestran la distribución y localización de NPs de CdS-Dex en secciones de tejido de ratas después de 3, 7 y 18 h administradas vía I.P.</b>	<b>30</b>
<b>Figura 15. Imágenes de análisis microscópico de fluorescencia que muestran la distribución y localización de NPs de CdS-Dex en diferentes tejidos de ratas tratadas durante 7 días.</b>	<b>31</b>



<b>Figura 16. Análisis del efecto de las nanopartículas de CdS-Dextrina en subconjuntos CD4/CD8 de timocitos.</b>	<b>32</b>
<b>Figura 17. Análisis microscópico y de nanopartículas de CdS-Dextrina en el timo de ratas.</b>	<b>33</b>
<b>Figura 18. Análisis microscópico y cuantitativo de NPs de CdS-Dextrina en el bazo de ratas.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 19. Perfiles de tiempo-concentración de dosis única de NPs de CdS-Dex en tejidos en ratas.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 20. Imágenes de distribución y localización de NP de CdS-Dex en tejidos de rata.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 21. Curva de parámetros bioquímicos después de administración de dosis única de NP de CdS-Dex (I.P.).</b>	<b>38</b>
<b>Figura 22. Imágenes para análisis de distribución y localización de NP de CdS-Dex en cortes de tejido de rata.</b>	<b>39</b>
<b>Figura 23. Cortes histológicos de tejidos de ratas tratadas diariamente con NP de CdS-Dex durante 30, 60 y 90 días.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 24. Representación esquemática de la estrategia utilizada para aislar e identificar proteínas adsorbidas en la superficie, cuando las nanopartículas interactúan con albúmina.</b>	<b>66</b>
<b>Figura 25. Gráfico de puntos cuánticos de potencial Z incubados con albúmina.</b>	<b>68</b>
<b>Figura 26. Efecto de NP de CdS-Dex sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada en plasma sanguíneo.</b>	<b>70</b>
<b>Figura 27. Efecto de NP de CdS-Dex sobre el tiempo de protrombina (PT) en plasma sanguíneo.</b>	<b>71</b>
<b>Figura 28. Efecto de NP de CdS-Dex sobre el fibrinógeno en plasma sanguíneo.</b>	<b>73</b>
<b>Figura 29. Efecto de NP de CdS-Dex sobre plaquetas: agregación plaquetaria.</b>	<b>74</b>
<b>Figura 30-1. Fotografías de plaquetas y agregación plaquetaria tomadas con microscopio confocal de fluorescencia.</b>	<b>75</b>

<b>Figura 30-2. Fotografías de plaquetas y agregación plaquetaria tomadas con microscopio confocal de fluorescencia.</b>	<b>77</b>
<b>Figura 31. Análisis topográfico (3D) por AFM de plaquetas tratadas con NP de CdS-Dextrina.</b>	<b>79</b>
<b>Figura 32. Efecto de NP de CdS-dex sobre la integridad de los eritrocitos.</b>	<b>80</b>
<b>Figura 33. Visualización en microscopía fluorescente de eritrocitos tratados con NP de CdS/dextrina.</b>	<b>81</b>
<b>Figura 34. Imágenes en AFM reconstrucción en 3D de eritrocitos tratados con las NP de CdS-Dex.</b>	<b>83</b>
<b>Figura 35. Análisis topográfico en AFM de eritrocitos.</b>	<b>85</b>
<b>Figura 36. Potencial zeta de los eritrocitos tratados con NP de CdS/dextrina.</b>	<b>86</b>
<b>Figura 37. Transportador de glucosa hipotético GLUT1 unido a dextrinas.</b>	<b>88</b>
<b>Figura 38. Efecto de NP de CdS-Dex sobre la viabilidad celular de RAW 264.7.</b>	<b>89</b>
<b>Figura 39. Imágenes de células RAW 264.7 tomadas con microscopio confocal de fluorescencia.</b>	<b>91</b>
<b>Figura 40. Efecto de NP de CdS-Dex sobre la producción de NO en macrófagos RAW 264.7.</b>	<b>93</b>
<b>Figura 41. Visualización en microscopio de luz visible (40X) de células RAW 264.7 en presencia de levaduras y tratados con NP de CdS-Dex.</b>	<b>94</b>
<b>Figura 42. Efecto fagocítico de macrófagos inducido por NP de CdS-Dex.</b>	<b>95</b>

### **III. ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1: Parámetros farmacocinéticos después de la administración de 36 dosis única de NP de CdS-Dex.**

**Tabla 2. Efecto de las NP de CdS-Dex sobre parámetros bioquímicos en 41 ratas tratadas diariamente durante 30, 60 y 90 días (n = 6).**

#### IV. ABREVIATURAS

3-(4,5-dimetil tiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol	<b>MTT</b>
Ácido Carboxílico	<b>CA</b>
Ácido clorhídrico	<b>HCl</b>
Ácido desoxirribonucleico	<b>ADN</b>
Ácido etilendiaminotetraacético	<b>EDTA</b>
Ácido ribonucleico	<b>ARN</b>
Agarosa de punto de suición bajo	<b>LMPA</b>
Agarosa de punto de fusion normal	<b>NMPA</b>
<i>American Type Culture Collection</i>	<b>ATCC</b>
Atomic Force Microscopy	<b>AFM</b>
Bióxido de carbono	<b>CO<sub>2</sub></b>
Buffer de fosfatos salino	<b>PBS</b>
Cadmio	<b>Cd</b>
Células de adenocarcinoma de cérvix humano	<b>HeLa</b>
Células de hepatocarcinoma humano	<b>HepG2</b>
Células de epitelio renal humano	<b>HEK 293</b>
Cloruro de sodio	<b>NaCl</b>
Cloruro de polidialildimetilamonio	<b>PDDA</b>
Densidad óptica	<b>DO</b>
Difosfato de adenosina	<b>ADP</b>
Difracción de rayos X	<b>DRX</b>
Dimetil sulfóxido	<b>DMSO</b>
Grados centígrados	<b>°C</b>
Glicosilfosfatidilinositol	<b>GPI-a</b>
Hidróxido de sodio	<b>NaOH</b>
Infrarrojo	<b>IF</b>
Intravenosa	<b>I.V.</b>
Intraperitoneal	<b>I.P.</b>
Macrófago	<b>Mφs</b>
Microscopia Electrónica de Barrido	<b>SEM</b>

Microlitro	$\mu\text{L}$
Microgramo	$\mu\text{g}$
Mililitros	$\text{mL}$
Milímetros	$\text{mm}$
Milimolar	$\text{mM}$
Molar	$\text{M}$
Molécula de adhesión en la superficie de las células	<b>PECAM-1</b>
Nanogramo	$\text{ng}$
Nanómetro	$\text{nm}$
Nanopartículas semiconductoras	<b>NP</b>
Normal	<b>N</b>
Óxido nítrico	<b>NO</b>
Óxido de cerio	<b>CeO<sub>2</sub></b>
Óxido de Níquel	<b>NiO</b>
Óxido de Titanio	<b>TiO<sub>2</sub></b>
Óxido de Zinc	<b>ZnO</b>
Polietilenglicol	<b>PEG</b>
Puntos Cuánticos	<b>PC</b>
Receptor de péptido natriurético 3/siRNAs	<b>siRNA-<i>Npr3</i></b>
Teluro de Cadmio	<b>CdTe</b>
Transportador de glucosa	<b>GLUT1</b>
Trifosfato de adenosina	<b>ATP</b>
Selenuro de Cadmio	<b>CdSe</b>
Suero fetal bovino	<b>SFB</b>
Sulfato de Bario	<b>BaSO<sub>4</sub></b>
Sulfuro de Cadmio/Dextrina	<b>CdS/Dex</b>
Ultravioleta	<b>UV</b>
Unidades arbitrarias	<b>UA</b>

## V. RESUMEN

Las nanopartículas (NP) al ser administradas de manera sistémica van a interactuar con componentes de la sangre. Las interacciones entre las NP-célula aún no se comprende bien. Las NP de sulfuro de cadmio-dextrina (CdS-Dex), son nanomateriales inorgánicos en el orden de nanómetros (3 nm), con propiedades ópticas que presentan ventajas sobre los biomarcadores fluorescentes tradicionales, lo que permite su uso en detección de fluorescencia e imágenes sin causar daño en tejidos a largo plazo, por lo que se consideran biocompatibles con el organismo. La hipótesis de este trabajo es que las NP de CdS-Dex al interactuar con componentes sanguíneos, pueden desencadenar procesos fisiopatológicos en forma concentración dependiente. El objetivo de este proyecto es evaluar la interacción de NP de CdS-Dex con componentes sanguíneos y sus posibles efectos fisiopatológicos asociados. Las NP de CdS-Dex se evaluaron *in vitro* con componentes sanguíneos de ratas Wistar a concentraciones de 0,1, 1, 10, 100 y 1000 µg/mL. Se evaluó el efecto de la interacción de NP de CdS-Dex con albúmina, por electroforesis en gel SDS-PAGE y el potencial Z. Los resultados sugieren que se forma la corona de proteínas, principalmente de albúmina, siendo evidente a 100 y 1000 µg/mL. Este proceso generó un potencial Z bajo, es decir, que hay una mayor atracción entre las NP de CdS-Dex y la albúmina. Por otro lado, estas nanopartículas causaron una alteración en el tiempo de cambio de protrombina, siendo concentración y tiempo de exposición dependiente a partir de 5 minutos, para 0.01 y 0.1 µg/mL y hasta 30 minutos para 0.1 a 10 µg/mL de NP de CdS-Dex. Lo cual puede indicar que, a mayor concentración y tiempo de exposición, comienza a activarse la vía extrínseca y podría desencadenarse la cascada de coagulación. Sin embargo, las NP no alteran la concentración de fibrinógeno de manera significativa. Así mismo, el estudio sobre eritrocitos aislados de rata, por medio de un ensayo de hemólisis y análisis topográficos usando métodos como espectrofotometría y microscopia de fuerza atómica (AFM), mostraron que NP de CdS-Dex produjeron hemólisis (5%) con todas las concentraciones utilizadas y causaron cambios morfológicos como pérdida de biconcavidad y grietas en la superficie a 0.1 y 1 µg/mL (30 min). En eritrocitos incubados a 60 min, además de la pérdida de biconcavidad, hubo presencia de depósitos en la superficie, que aumentó de una manera dependiente de la concentración. No hubo cambio al determinar el potencial  $\zeta$ , en ninguna de las concentraciones. Las NP de CdS-Dex no fueron internalizadas por los eritrocitos, aunque se observó fluorescencia verde en la periferia de cada célula. En la evaluación por microscopia de fluorescencia y agregación plaquetaria, las NP de CdS-Dex causaron agregación plaquetaria a partir de 0.01 µg/mL y modificaron la morfología de la plaqueta. Se evaluó la viabilidad celular de Mφs por la técnica de MTT. Se observó que no produjeron disminución de la viabilidad celular a concentraciones de 0.001 hasta 100 µg/mL, aunque fueron analizadas por microscopia confocal y se observó que se localizaban en todo el interior de la célula, hasta nucleolos. En estas células inducen la producción de óxido nítrico y fagocitosis a partir de 0.01 µg/mL, siendo mayor el efecto observado en la concentración de 1000 µg/mL. Finalmente, por estudios *in silico* el acoplamiento molecular reveló que la dextrina que recubre a las NP podría estar interactuando con el transportador de glucosa GLUT1. No se puede determinar si estos cambios podrían estar asociados con alteraciones funcionales. Estos hallazgos evidencian que los nanomateriales interactúan con diferentes componentes sanguíneos y pueden causar procesos fisiopatológicos asociados después de la administración en el organismo.

## VI. ABSTRACT

When NP were administered systemically will interact with components of the blood. These NP-cell interactions are not yet well understood. CdS-Dex NP are inorganic nanomaterials of nanometric size (3 nm), have an optical property that exhibit advantages over traditional fluorescent biomarkers and include imaging and fluorescence detection without causing long-term tissue damage, for which they are considered biocompatible with the body. The proposed hypothesis is that CdS-Dex NP interact with blood components and trigger pathophysiological processes in a concentration-dependent manner. The aim of this project was to evaluate the interaction of CdS-Dex nanoparticles with blood components and their associated pathophysiological effects. CdS-dextrin NP were evaluated (*in vitro*) with blood components at concentrations of [0.1, 1, 10, 100 and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ], the blood was obtained from Wistar rats (healthy). In which the effect of the interaction of CdS-Dex NP with albumin was evaluated by SDS-PAGE gel electrophoresis and the Z potential. The results suggest that the protein crown is formed, being evident at 100 and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The  $\zeta$  potential, associated with the formation of the crown protein of CdS-Dex NP exposed to albumin is low, that is, there is a greater attraction between the CdS-Dex NP and albumin. The effect of CdS-Dex NP influenced the prothrombin time concentration and dependent exposure time from 5 minutes (0.01 and 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to 30 minutes (0.1 to 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). This may indicate that, at higher concentration and exposure time, the extrinsic pathway begins to be activated and could trigger the coagulation cascade. However, NP did not significantly alter fibrinogen concentration. The erythrocytes were isolated by centrifugation. A hemolysis assay and topographic analysis were performed using methods such as spectrophotometry and AFM, respectively. The Z potential and coupling were also determined. The CdS-Dex NP produced hemolysis (5 %) with all the concentrations used and caused morphological changes such as loss of biconcavity and surface cracks at 0.1 and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (30 min). In erythrocytes incubated for 60 min, in addition to the loss of biconcavity, there was the presence of deposits on the surface, which increased in a concentration-dependent manner. There was no change when determining the Z potential values, in any of the concentrations used. CdS-Dex NP were not internalized by erythrocytes, although green fluorescence was observed at the periphery of each cell. Molecular coupling revealed that the NP-coating dextrin could be interacting with the glucose transporter GLUT1. In the evaluation by fluorescence microscopy and platelet aggregation, the NP of CdS-Dex caused platelet aggregation in a concentration-dependent manner from 0.01  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and modified the platelet morphology. The cell viability of M $\phi$ s (RAW 264.7) was evaluated by the MTT technique. It was observed that they did not produce a decrease in cell viability at concentrations of 0.001 to 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , although they were analyzed by confocal microscopy and it was observed that they were located throughout the interior of the cell, up to nucleoli. Although they increase NO production and phagocytosis from 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the observed effect being greater at a concentration of 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . It cannot be determined if these if these changes could be associated with functional changes. But we can with these preliminary findings provide evidence that nanomaterials can interact with different blood components and can cause associated pathophysiological processes after administration in the body.

## 1. Introducción

Nanociencia es el estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a escala nanométrica (ver figura 1). En la última década, la nanotecnología se ha colocado como uno de los campos más importantes y de vanguardia en diferentes áreas de la salud. La nanotecnología, es multidisciplinaria y abarca un amplio rango de herramientas y técnicas con potencial de ampliar el panorama en áreas como la nanomedicina. (Whitesides, G.M. et al., 2003).

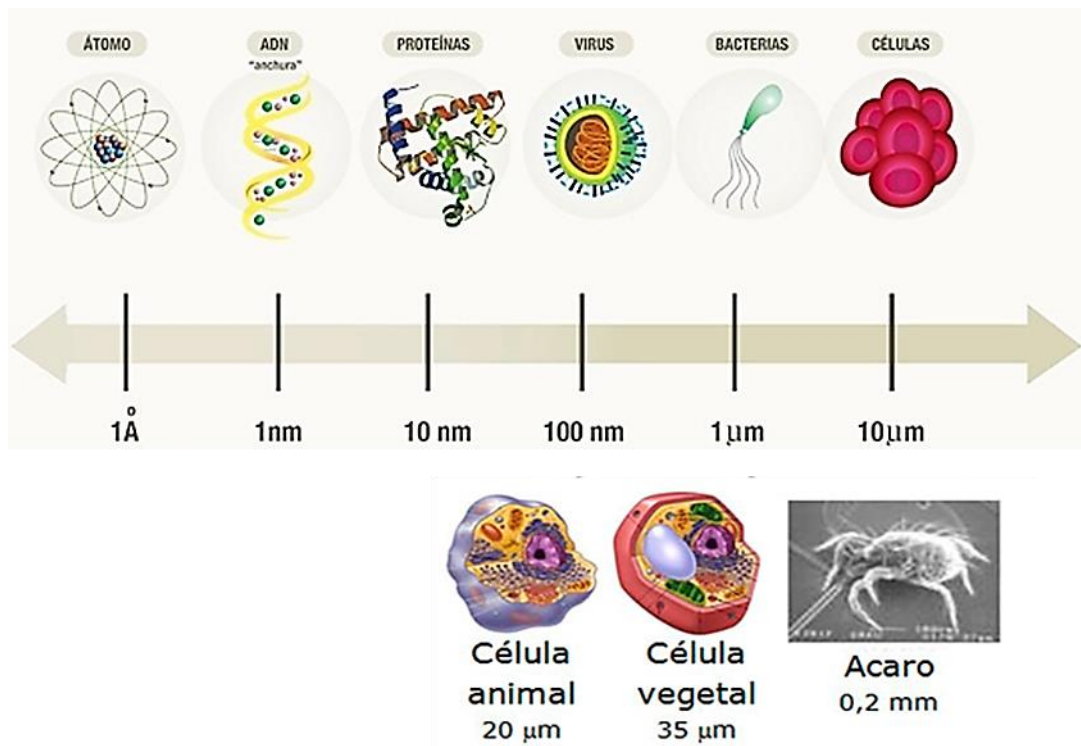


Figura 1. Escala que muestra dimensiones nanométricas y micrométricas.

Modificada de Britto & Castro, 2012.



En la actualidad, existe una amplia gama de nanodispositivos utilizados en detección temprana de enfermedades, diagnóstico y selección de estrategias terapéuticas, como señales moleculares y biomarcadores en tiempo real. Por ejemplo, algunos nanotubos, liposomas y nanopartículas semiconductoras o puntos cuánticos. Teniendo como ventaja fundamental, la capacidad y la multifuncionalidad de actuar como agentes de liberación específica de fármacos y de imagen (Biju, et al., 2010; Surendiran, et al., 2009).

Se ha reportado un sinnúmero de aplicaciones biomédicas para las nanopartículas (NP), tales como vehículos para fármacos, vacunas, antimicrobianos y para nanodiagnóstico como nanobiosensores (Gao et al., 2016; Lan et al., 2017). Sin embargo, todavía existen muchos obstáculos para la transferencia tecnológica en aplicaciones clínicas. En evaluaciones toxicológicas de nanomateriales, se ha reportado que, las NP causan indudablemente efectos adversos sobre el organismo. Estas investigaciones van desde los estudios que demuestran que NP de óxido de níquel (NiO) causan inflamación en los pulmones de ratas (Shinohara et al., 2017) o puntos cuánticos de telururo de cadmio (CdTe) que causan nefrotoxicidad tanto en células de riñón embrionario humano (HEK 293) como en ratones (Jiang et al., 2018). Aun así, los mecanismos moleculares de la nanotoxicidad inducida por diversos nanomateriales no se entiende completamente (Missaoui et al., 2018).

### **1.1 Generalidades de nanopartículas semiconductoras o puntos cuánticos.**

Las nanopartículas semiconductoras (NP) o puntos cuánticos (PC), son nanocristales coloidales semiconductores tridimensionales en escalas de 1-10 nm (Lourenço, et al., 2014; Resch-Genger, et al., 2008) (ver figura 2). La característica esencial de los PC es que los electrones que lo constituyen están obligados a mantenerse confinados en las tres dimensiones, lo que genera diversos fenómenos cuánticos. El tamaño de las NP, es la característica que determina la longitud de onda a la que emite y no su composición. Por lo que, NP de 2 nm emiten en azul, de 3-5 nm en verde, de 6-8 nm en naranja y tamaños de aproximadamente 8-10 nm en rojo. (Timothy, et al., 2007; S Mukherjee & Ushasi, 2011)

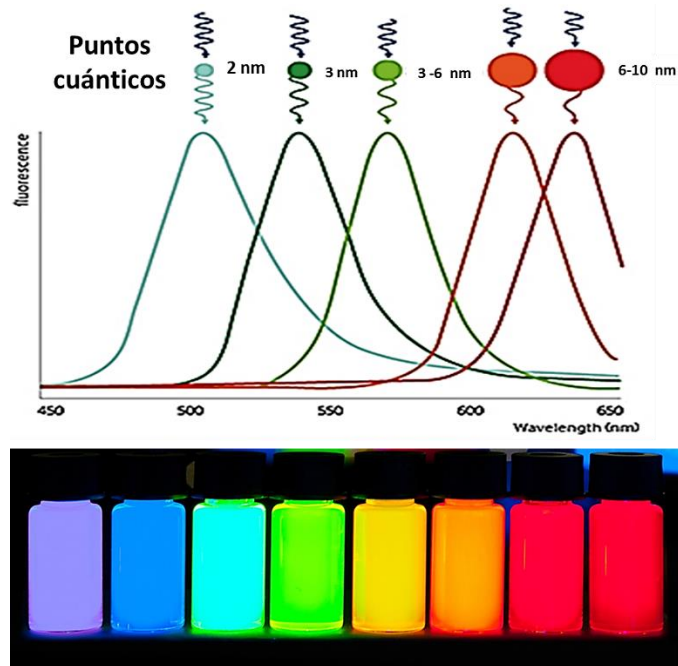


Figura 2. Representación gráfica de puntos cuánticos y su emisión de color.

Las NP prometen ser una herramienta esencial en nanomedicina sin embargo, entre los principales desafíos es su biocompatibilidad. Algunos autores refieren que, la caracterización de las NP solas o bioconjugadas es de gran importancia, ya que permitirá además de conocer su tamaño y composición, la predicción y/o evaluación de los efectos tras la interacción con el organismo. Los investigadores sugieren que, un nanomaterial, es lo suficientemente pequeño para entrar a una célula; independientemente de la vía de exposición que se haya tenido. Además de desencadenar algún efecto debido a la interacción con un sistema biológico (Wang, et al., 2009; Egusquiaguirre, et al., 2012).

En general, la aplicación de nanomateriales en nanomedicina, representan un escenario complicado para los nanotoxicólogos, debido a los eventos que se originen después de la exposición a las NP. Esta interacción NP-organismo, está totalmente basado en términos de características fisicoquímicas de las NP, dosis, frecuencia y vía de administración. La

vía de administración intravenosa (I.V.) permite la entrega de medicamentos de manera sistémica (Dobrovolskaia y McNeil, 2013; Alyautdin, Khalin, Nafeeza, Haron y Kuznetsov, 2014). El que las NP sean seguras, es uno de los grandes retos en el desarrollo de nanoterapias, por ejemplo; la interacción nanomaterial-sangre y así conocer los efectos secundarios y adversos. Actualmente, muchos nanomateriales se encuentran en estudio que, en su mayoría, combinan dianas terapéuticas y biológicas y su gran capacidad como agentes de transporte farmacológico personalizado (Pinto Reis, et al., 2006; Dobrovolskaia, et al., 2008; Kumari, et al., 2010; Mura, et al., 2012). En estudios previos, se sugirió la importancia de estudiar al menos tres de los factores de la posible interacción de las NP al ser administradas vía I.V. como la adsorción de proteínas, el efecto sobre la cascada de coagulación, así como su efecto hemolítico (Fornaguera, et al., 2015).

En el momento en que las NP llegan a la circulación sanguínea, entran en contacto directo con las células que la componen y con proteínas plasmáticas, donde pueden afectar la estructura y las funciones críticas de estos componentes sanguíneos (Brash, 2018; Ritz, et al., 2015). Las proteínas plasmáticas se adsorben en la superficie de las NP para formar una corona de proteínas que puede influir significativamente en su interacción con los componentes sanguíneos e incluso puede conducir a la activación de las plaquetas, células como los macrófagos y estas a su vez, tienen consecuencias como reacciones de hipersensibilidad, trombosis, hemólisis, agregación plaquetaria e internalización de proteínas (ver figura 3) (Rodríguez-Fragoso, et al., 2018; Jiskoot, van Schie, Carstens, Schellekens, 2009).

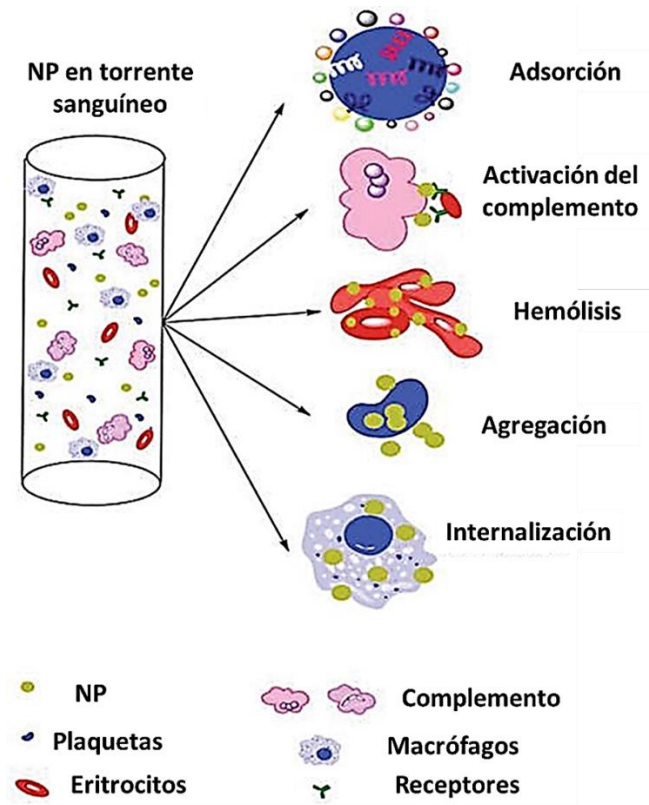


Figura 3. Efectos de la interacción de NP con componentes sanguíneos (Rodríguez-Fragoso, et al., 2018).

La hemólisis, agregación plaquetaria e internalización y adsorción de proteínas son efectos fisiológicos por los que es necesario evaluar estos efectos de la interacción de nanopartículas con los componentes sanguíneos y así conocer los riesgos al ser administradas en un sistema biológico.

## 1.2 Hemocompatibilidad de las nanopartículas.

Las NP más usados en la industria cosmética, ingeniería y actualmente comercializados son las NP basadas en carbono, tales como: fullerenos y nanotubos de carbono, metal, cerámica, las semiconductoras (puntos cuánticos), poliméricas y basadas en lípidos (Khan, Saeed and Khan, 2017). Cada uno presenta propiedades fisicoquímicas únicas que los

hacen indispensables dentro de sus campos de aplicación. Los diseños innovadores de este tipo de NP les confiere el potencial de ser útiles en el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades (Gobbo, Sjaastad, Radomski, Volkov and Prina-Mello, 2015; Hajipour, Santoso, Rezaee, Aghaverdi, Mahmoudi and Perry, 2017; Sarmah, et al., 2017). Sin embargo, muy pocos son los nanomateriales que pueden llevarse al uso en humanos, ya que poseen características tóxicas o imprevistas interacciones entre la superficie de la NP y las células del organismo. Es debido a estas interacciones que, se han sugerido realizar pruebas de hemocompatibilidad que permitan determinar si estos nanomateriales pueden causar efectos adversos (Szebeni and Haima, 2013).

Algunos componentes celulares de la sangre sirven como barrera y tienen una estructura física y una maquinaria específica que les permite realizar funciones cruciales en la homeostasia de un organismo. A continuación, se hablará de la importancia de evaluar la interacción de nuestras NP con algunos de estos componentes sanguíneos con base a su cambio estructura, funcionamiento y los efectos que pueden provocar. Estos ensayos pueden ayudar a conducir a la síntesis y diseño de novedosas NP biocompatibles y hemocompatibles que permitan ser utilizadas con fines terapéuticos.

### **1.3 Las propiedades fisicoquímicas de las NP y su influencia en la hemocompatibilidad.**

La composición química de la superficie de las NP, juegan un papel muy importante en términos de hemocompatibilidad (Das, et al., 2017). Estas propiedades fisicoquímicas como: carga superficial, geometría, porosidad y funcionalización superficial con polímeros específicos o grupos funcionales pueden ser determinantes en la formación de la corona de proteínas e influenciar la captación y potencial celular, así como su nivel de toxicidad (Zhang, et al., 2011). Se sabe que las NP catiónicas al entrar al organismo, pueden internalizarse eficientemente a través de la membrana celular debido a la carga negativa de la superficie celular (Buzea, Pacheco and Robbie, 2007). Es así como, los diseños más innovadores de NP son aquellas que tienen carga positiva; ya que, los convierte en el

vehículo idea para la administración de fármacos. No obstante, los estudios reportados sobre NP con carga positiva han demostrado que son los que poseen un potencial más tóxico en comparación con los de carga negativa (Zhao, F.; Zhao, Liu, Chang, Chen and Zhao, 2011). Lo anterior debido a que, las NP aniónicas tienen mayor dificultad debido a las fuerzas repulsivas entre las dos superficies y por lo tanto, la captación celular es desfavorable (Greish, et al., 2012).

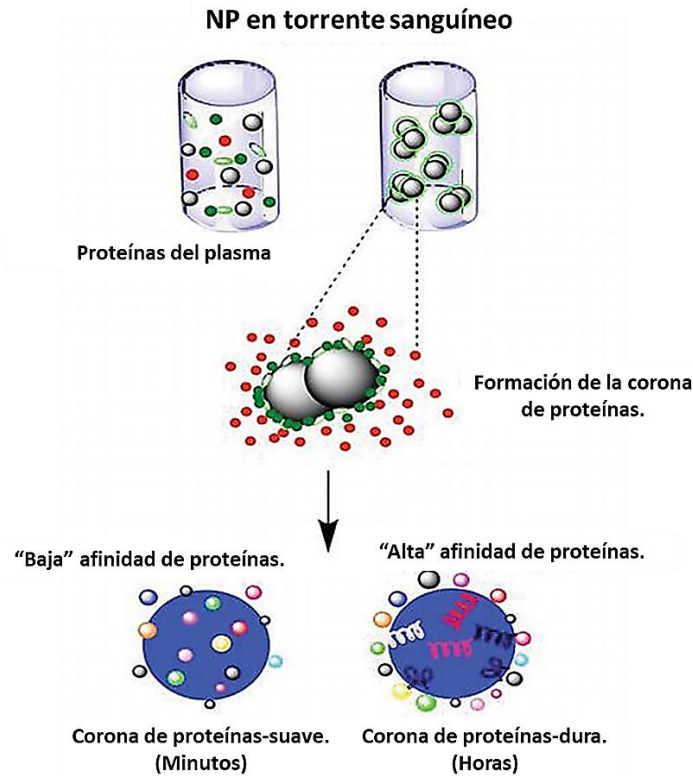
#### **1.4 Interacción de NP y proteínas plasmáticas.**

A lo largo de los años, las NP han logrado gran impacto y muestran una presencia cada vez mayor en muchos diseños científicos y desarrollos farmacéuticos. Pero tienen una serie de desventajas, como los efectos citotóxicos previamente reportados, que pueden limitar su uso en el entorno clínico-humano (Sanchez, Sobolev, 2010; Ingle, Duran, Rai, 2014). Sin embargo, las NP tienen ventajas que las convierten en candidatos ideales para aplicaciones biomédicas, como su capacidad intrínseca para ingresar al cuerpo humano a través de la inhalación, la piel y otras vías. Debido a sus ya mencionadas propiedades fisicoquímicas hacen que potencialmente accedan a los órganos vitales a través del flujo sanguíneo (Verma, Stellacci, 2010). Aunque se ha recomendado tener detenida atención en la interacción de NP con su microambiente, principalmente con otros nanomateriales y biomoléculas dentro del organismo.

La adsorción de proteínas es un fenómeno que contribuye a la determinación del destino de las NP en el organismo, que depende en gran medida del patrón de cada proteína (tipo y cantidad de proteínas) adsorbidas en diferentes NP (Hadjidemetriou, Kostarelos, 2017; Ke, Lin, Parak, Davis, Caruso, 2017). La corona de proteínas se compone principalmente de proteínas con diferentes proteínas tales como, inmunoglobulina G, albúmina sérica, fibrinógeno y apolipoproteínas (Choi, Webster y Kim, 2015). Es decir, una vez que las NP entran en el torrente sanguíneo, comienza un proceso dinámico competitivo entre biomoléculas y esto desencadena la formación de la corona de proteínas o la adsorción por afinidad de proteínas en la superficie de las NP e inicia una interacción NP-proteína.

Las primeras proteínas en unirse a la superficie de las NP son aquellas que se encuentran en alta concentración y de baja afinidad y que gradualmente son reemplazadas por proteínas de mayor afinidad, aunque con baja concentración plasmática; este proceso de acuerdo con el efecto Vroman (ver figura 4) (Hirsh, Mckenzie, Nosworthy, Denman, Sezerman and Bilek, 2013). Esta formación de la corona de proteínas se clasifica en dura y blanda según la duración de los intercambios o reemplazos de proteínas. La corona dura es una capa unida de proteínas con alta afinidad y largo tiempo de intercambio. Las proteínas de la corona dura conforman la capa más cercana a la superficie NP, por lo que son susceptibles termodinámicamente a cambios conformacionales favorables (irreversibles) dependiendo de la funcionalización química, hidrofobicidad o hidrofilia, naturaleza del fluido biológico proximal y la temperatura (Megido, Díez and Fuentes, 2018).

No obstante, la corona de proteínas suave o blanda es una capa de proteínas de baja afinidad con un rápido intercambio en el tiempo. En este caso, la unión de estas proteínas a la superficie de las NP es más débil con respecto a la corona de proteínas dura, aunque esta corona dura tenga baja interacción de biomoléculas (Liu, Rose, Plantevin, Auffan, Bottero, Vidaud, 2013). Por lo tanto, la concentración, tamaño, tipo de nanomaterial y las propiedades de la superficie son factores que determinan las capas de biomoléculas y la formación de la corona de proteínas.



**Figura 4. Nanopartículas (NP) en interacción con biomoléculas y la formación de la corona de proteínas. (Rodríguez-Fragoso, et al., 2018).**

El tipo de nanomaterial influye en la interacción con diferentes tipos de biomoléculas. Por ejemplo, en un estudio con NP de óxido de cerio (CeO) recubiertas con silica, sulfato de bario (BaSO<sub>4</sub>) y óxido de zinc (ZnO) que se incubaron con fluido de revestimiento pulmonar de rata (*in vitro*) se encontró que, la formación de la corona de proteína en los cuatro tipos de NP varió significativamente. Las cantidades de albúmina, transferrina y  $\alpha$ -1 antitripsina fueron mayores en las coronas evaluadas de BaSO<sub>4</sub> y ZnO que en las de los dos tipos de NP de CeO<sub>2</sub> (Konduru, et al., 2017). Se han utilizado diferentes métodos y técnicas para determinar las interacciones de las NP con proteínas en diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* (Del Pino, Pelaz, Zhang, Maffre, Nienhaus, Parak, 2014).

De acuerdo con esos estudios, la corona de proteínas se forma en un tiempo aproximado de 0.5 min sobre la superficie de las NP. Lo que provoca un aumento considerado del



tamaño de las NP (Tenzer, et al., 2013). Por ejemplo, la adsorción de albúmina de suero bovino (BSA) en las NP reduce su captación celular por células monocíticas y macrófagos a través de la reducción de la adhesión inespecífica de la NP y la membrana celular (Yan, et al., 2013). Las técnicas que se describen habitualmente para la evaluación de la formación de la corona de proteínas van desde el análisis proteómico (Liu, Rose, Plantevin, Auffan, Bottero, Vidaud, 2013), centrifugación, titulación por calorimetría isotérmica, espectrometría ultravioleta y visible (UV-visible), cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS), cuantificación y electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) (Strojan, Leonardi, Bregar, Kriz, 2017).

### **1.5 Interacción de NP y el sistema de coagulación.**

Las interacciones de las nanopartículas con el sistema de coagulación sanguínea pueden ser beneficiosas o adversas dependiendo del blanco terapéutico de un nanomaterial. Las NP pueden diseñarse o funcionalizarse con factores iniciadores de la coagulación para tratar ciertos trastornos o para llevar fármacos anticoagulantes e intervenir en otras patologías en las que la coagulación es el problema. (Ilinskaya, Dobrovolskaia, 2013). El impacto que pueden tener los nanomateriales en el sistema de coagulación va desde el contacto con los factores de coagulación, en donde, la adsorción/unión de estos factores de coagulación en la superficie de las NP puede desencadenar consecuencias como su inactivación o deficiencia en la activación de la cascada de coagulación. Como hemos mencionado antes, uno de los efectos de la interacción de NP con proteínas plasmáticas es la adsorción y formación de la “corona de proteínas” (Mayer, Vadon, Rinner, Novak, Wintersteiger, Frohlich, 2009; Nel, Madler, Velegol, et al., 2009). Con base en esto, podemos sugerir su relevancia al evaluar la interacción “indeseable” entre las NP y el sistema de coagulación, porque la unión a proteínas puede alterar las propiedades fisicoquímicas de las NP que, a su vez, determina la interacción con proteínas involucradas en la coagulación de la sangre como por ejemplo, el fibrinógeno y por lo tanto, desencadenar alteraciones en los tiempos de coagulación (Lundqvist, Stigler, Elia, Lynch,

Cedervall, Dawson, 2008; Aggarwal, Hall, McLeland, Dobrovolskaia, McNeil, 2009; Tenzer, Docter, Rosfa, et al., 2011).

También, se sabe que, las NP de superficie aniónica interactúan con el factor de coagulación XII e inducen su autoactivación (Sperling, Fischer, Maitz, Werner, 2009). Asimismo, NP compuestas por poliestireno aniónico causan la activación de la coagulación intrínseca. Aunque, se destaca que este efecto es dependiente del tamaño de las NP, ya que este efecto es notorio en NP de tamaño de 220 nm, pero no en aquellas cuyo tamaño no rebasa los 24 nm (Oslakovic, Cedervall, Linse, Dahlback, 2012). Aunque los nanomateriales han demostrado un gran potencial en los controles de hemorragia, existe una preocupación creciente sobre la coagulopatía inducida por nanomateriales. En diferentes estudios se ha informado que las NP aumentan significativamente el riesgo de inducir coagulopatías e incluso causar complicaciones trombóticas (Brook, Rajagopalan, Pope, et al., 2010; Baccarelli, Martinelli, Zanobetti, et al., 2008).

Por ejemplo, la administración intravenosa (I.V.) de ciertos nanomateriales como dendrímeros de poli catiónicos (amidoaminas) y dendrímeros amino terminales se han relacionado con la inducción de coagulación intravascular diseminada (Greish K, Thiagarajan, Herd, et al., 2012; Nabeshi, Yoshikawa, Matsuyama, et al., 2012). Desde hace varias décadas, el uso de nanomateriales en aplicaciones biomédicas ha estado en duda, debido a la hemocompatibilidad de algunos nanomateriales. Otro ejemplo muy claro, es el trastorno de la coagulación como la trombosis venosa profunda que se caracteriza por la formación de coágulos en las venas y que se asocia al uso de nanotubos de carbono en la ingeniería (Radomski, Jurasz, Alonso-Escolano, et al., 2005).

## **1.6 Estructura y función de los eritrocitos en la hemostasia y los efectos implicados en la interacción con nanopartículas.**

Ya hemos hablado de la interferencia de las nanopartículas con la cascada de la coagulación, en esta revisión exploraremos la hemocompatibilidad de las nanopartículas

desde un ángulo celular. Se destacan las funciones más importantes de tres componentes celulares de la sangre, a saber, proteínas, eritrocitos y plaquetas, en la hemostasia. Debido a que se consideran uno de los componentes con mayor abundancia en la sangre, los eritrocitos contribuyen principalmente a la hemostasia y trastornos tromboticos gracias a sus propiedades reológicas (Du, Huskens, Maas, Al Dieri, De Groot and De Laat, 2013). La hemorreología hace referencia a la influencia del flujo sanguíneo en la hemostasia que depende en gran medida a los cambios en la viscosidad de la sangre y sus elementos de plasma y células (Mehri, Mavriplis and Fenech, 2018).

Los eritrocitos son células sanguíneas que continuamente están expuestas a agresiones durante su lapso de vida, lo cual resulta en constantes cambios bioquímicos y morfológicos. La morfología de los eritrocitos, tienen forma de disco bicóncavo, miden aproximadamente 8  $\mu\text{m}$  de diámetro y unos 2  $\mu\text{m}$  de espesor en la zona más ancha y puede variar en diferentes especies (ver figuras 5 y 6). Los glóbulos rojos tienen una estructura de membrana altamente especializada y organizada, y el citosol está altamente enriquecido con hemoglobina. La forma bicóncava de los eritrocitos le permite su estabilidad en condiciones normales, pero también puede sufrir alteraciones que hacen que se deforme de manera extraordinaria, pudiendo pasar a través de capilares, vasos sanguíneos (con diámetros de unos 3  $\mu\text{m}$ ) más pequeños que el propio tamaño del eritrocito. Esta estabilidad en su estructura es gracias a la composición principal de la membrana de los eritrocitos. Tienen una concentración de colesterol por encima del 30%, más que las membranas plasmáticas de las demás células del organismo. Esto hace a su membrana más rígida y más hidrófoba (menos permeables). Con ellos son capaces de soportar las fuerzas mecánicas en las grandes arterias.

Además, la membrana plasmática está anclada a una trama de citoesqueleto de unos 100  $\mu\text{m}$  de espesor que cubre toda la superficie interna de dicha membrana, y por ello es capaz de responder y resistir a los cambios de forma. Los eritrocitos circulantes son responsables del intercambio gaseoso en los tejidos, cuya importancia es vital. Pero esta no es la única función que cumplen. Además de transportar hemoglobina, los eritrocitos participan en la

cadena de señales celulares y responden a condiciones fisiológicas y en situaciones de estrés.

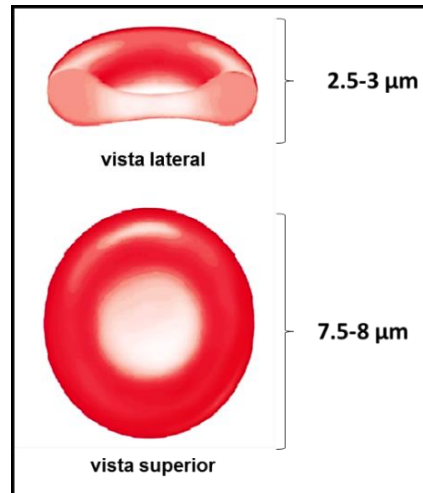


Figura 5. Morfología del eritrocito.

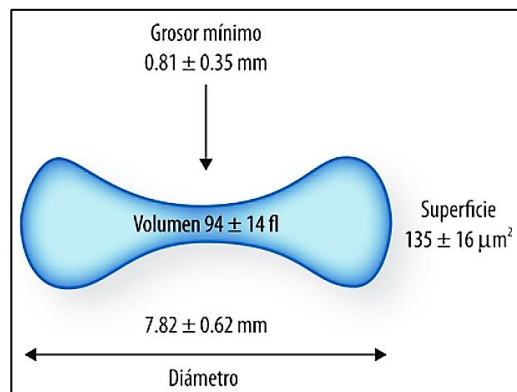


Figura 6. Membrana eritrocitaria. (Modificada de Fernández-Tresguerres: Fisiología humana, 4a. edición. Mc. Graw-Hill.)

La membrana eritrocitaria, es la primera entidad celular que entra en contacto directo con las NP. Los estudios en células han demostrado que los nanomateriales pueden alterar la integridad de su membrana, lo que conduce a efectos nocivos sobre la viabilidad celular (Zhang, et al., 2012; Shinto, Fukasawa, Yoshisue, Tezuka and Orita, 2014; Chen and Bothun, 2014). Por lo tanto, es importante investigar los mecanismos subyacentes por los cuales las nanopartículas alteran la integridad de la membrana y de qué manera las NP inducen daño en la membrana con base en sus propiedades fisicoquímicas o factores como el tiempo de exposición. La estructura semi-oval y el tamaño de los eritrocitos, depende principalmente de la estructura oxigenada o desoxigenada de la hemoglobina (Hb), por lo cual estas células tienen membranas con gran capacidad de deformación. De hecho, muchas de estas alteraciones son irreversibles y se utilizan en la práctica clínica para identificar algunas patologías hematológicas (Wintrobe, M. M, 2009).

Algunos estudios indican que los eritrocitos pueden verse afectados después de la interacción y reaccionan al contacto con diversos agentes físicos, biológicos o con objetos no biológicos, y puede alterar su función. Pero el mecanismo que conduce a esta interacción y deformidad aún no está clara (Venkatesan, Tumala, Subramanian and Vellaichamy, 2016). Se ha reportado que nanopartículas de quitosán cargadas con siRNA-*Npr3* y en nanopartículas de apatita coloidal poseen una alta hemocompatibilidad por lo que no causan daño en eritrocitos, no modifican su estructura o función. (Choimet, Hyung-Mi, Jae-Min, Tourrette and Drouet, 2016).

Por otro lado, se demostró que puntos cuánticos de grafeno a concentraciones de 5 mg/Kg, incrementaban la concentración de eritrocitos y hemoglobina en ratas (Wang, Gao, Gao, Wo, Wang and Shen G, 2013). En este estudio se demostró que, no solo incrementaron las células periféricas, sino que células mononucleares de médula ósea incrementaron su proliferación cuando fueron expuestas a puntos cuánticos de grafeno durante 72 horas de exposición.

La razón por la cual los eritrocitos no presentan daño inmediato a sustancias tóxicas es debido a que tienen un sistema de defensa antioxidante, que incluye antioxidantes no-enzimáticos como el glutatión y enzimas antioxidantes como la catalasa y

peroxiredoxin-2 (Gonzalez, Auclair, Voisin, Gautero, Dhermy, and Boivin, 1984; Lee, Kim, Yu, Kim, Park and Moon H, 2003). Estos hallazgos sugieren que los eritrocitos pueden desempeñar un papel activo en la hemostasia normal o anormal en ciertas condiciones en las que se produce perturbación de la membrana celular.

La hemólisis, es uno de los parámetros importantes a evaluar sobre el efecto de los nanomateriales al interactuar con eritrocitos (Krajewski, et al., 2013). Este, es un indicativo de toxicidad causada por la interacción de NP con eritrocitos. Sin embargo, este efecto no es el único que puede ser causado por la interacción de las NP con eritrocitos como se describe en la evaluación de NP magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Ran, et al., 2015). En donde, concluyeron que NP de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a la concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  causaron un daño en eritrocitos en experimentos *in vitro* y en ensayos *in vivo* a dosis de 12 mg/kg. Estas NP magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  conducen a la apoptosis de los eritrocitos o también denominada eriptosis (ver figura 7). Este último fenómeno, no induce a la hemólisis aguda causando la liberación de hemoglobina; sin embargo, está relacionada con procesos patológicos en la membrana del eritrocito y por lo tanto a pérdida de la funcionalidad.

La deformabilidad es el reflejo y la capacidad de los eritrocitos para cambiar su geometría en respuesta a los cambios al transitar con el torrente sanguíneo. De esta manera, los eritrocitos resisten la tensión en el flujo sanguíneo y así les permite desplazarse a través de los vasos más pequeños y así asegurar el transporte óptimo de oxígeno y nutrientes a todos los tejidos (Geekiyanaage, Balanant, Sauret, Saha, Flower, Lim and Gu, 2019). Los eritrocitos son tan flexibles que pueden adaptar su forma en respuesta a factores y condiciones ambientales a los que sean sometidos, esta capacidad única de los eritrocitos tiene una influencia directa en la viscosidad de la sangre (Kim, Lee and Shin, 2019). Además de que, un cambio en su forma se asocia con un aumento en su potencial trombótico. Ya que los eritrocitos más rígidos pueden llegar a ocluir fácilmente los microvasos y como consecuencia principal atenuar y alterar el flujo sanguíneo y facilitar la activación plaquetaria (Kwaan and Samama, 2019).

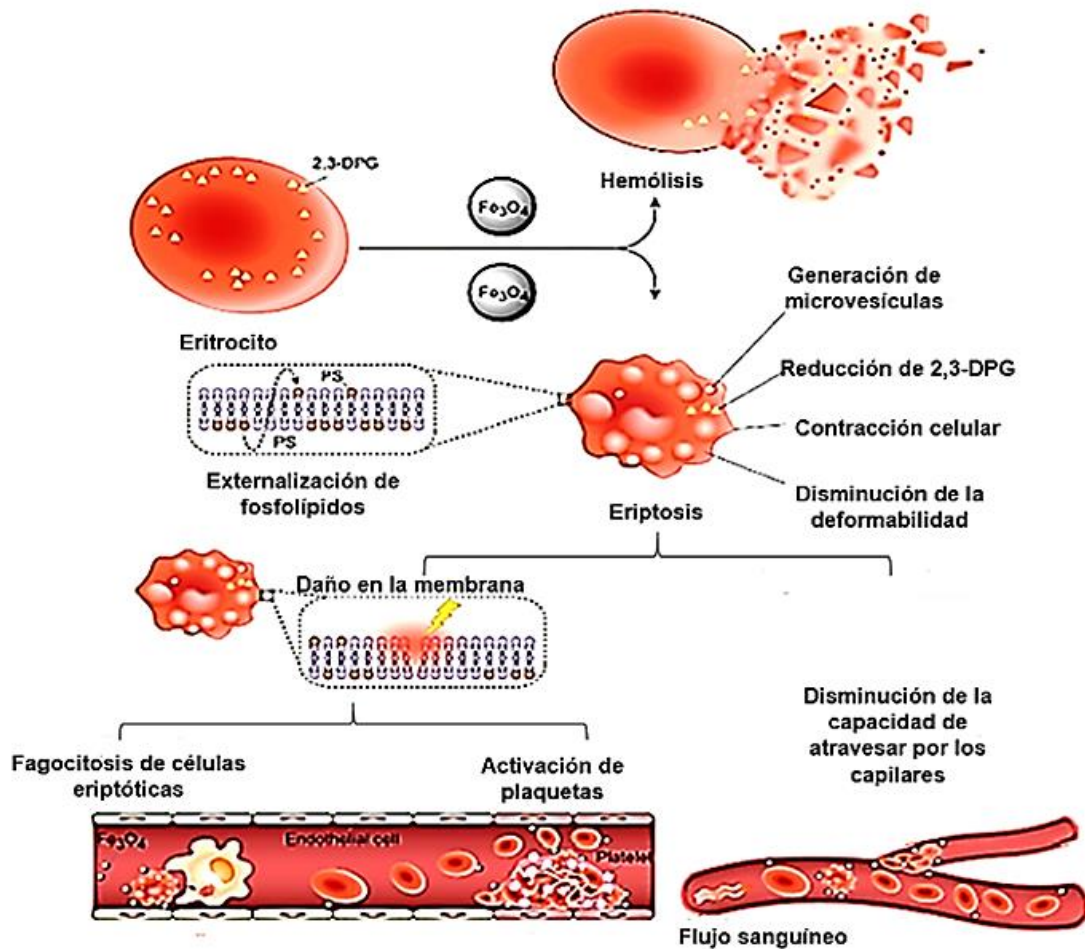


Figura 7. Efecto de la interacción de NP de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sobre los eritrocitos y el impacto sobre la circulación sanguínea (Ran, et al., 2015).

Es bien sabido que la interacción de los nanomateriales con estas células produce diversos efectos, según el nanomaterial empleado. Se ha observado que algunos nanomateriales son capaces de inducir hemólisis (destrucción inmediata de los eritrocitos), dependiendo de la concentración a la que sean expuestos (*in vitro*) (Kim, Heo, and Shin, 2016). Uno de los factores que pueden influir para que un nanomaterial no destruya al eritrocito es la presencia de tensoactivos (Thasneem,



Sajeesh, Sharma, 2011) y tipo de recubrimiento del nanomaterial (Barshtein, Livshits, Shvartsman, Shlomai, Yedgar and Arbell, 2016). Sin embargo, la hemólisis no es la única alteración que se ha asociado con la interacción nanomaterial/eritrocito.

### **1.7 Interacción entre NP y eritrocitos: alteraciones y cambios morfológicos de los eritrocitos relacionados con la hemostasia.**

Algunos estudios han demostrado la importancia del efecto de las interacciones célula-NP ya que pueden alterar la membrana eritrocitaria (Gov, and Safran, 2005). Estos cambios en los eritrocitos pueden causar una agregación significativa de eritrocitos con consecuencias perjudiciales en el organismo, aun cuando las NP tengan poca actividad hemolítica. Los trabajos más recientes sobre los efectos de la interacción de NP-células sanguíneas, incluyen agregación y cambios morfológicos de eritrocitos, además de ensayos de viabilidad celular y hemólisis, para demostrar la hemocompatibilidad. Así es como se demostró en un estudio reciente en el que NP poliméricas de 600 nm, NP de TiO<sub>2</sub> de 15, 180 y 250 nm, NP de ZnO de 270 nm y nanodiamantes de 100 nm causaron la formación de agregados de diferentes formas y tamaños irregulares. Estos resultados revelaron que los nanodiamantes causaron el mayor número de agregados eritrocitarios a diferencia de las NP poliméricas que no tuvieron influencia significativa en la interacción con los eritrocitos. (Avsievich, et al., 2019).

En otro estudio, se evaluó el efecto hemolítico de puntos cuánticos de carbono, los resultados mostraron que el nanomaterial era citocompatible, tras la exposición inmediata a estos, reportó que no hubo cambios significativos a la morfología de la superficie celular a través del análisis topográfico en imágenes de AFM (Das, et al., 2019). Los puntos cuánticos de carbono, no produjeron hemólisis y agregación eritrocitaria de manera significativa. Por otro lado, en un estudio eritrocitos fueron incubados con puntos cuánticos de ácido carboxílico (CA), cloruro de polidialildimetilamonio (PDDA) y polietilenglicol (PEG); a diferentes concentraciones (2.5 a 320 nM) durante 4 horas. Los resultados demostraron que tanto los PC de CA



como los PC de PEG tuvieron efecto hemolítico a las concentraciones que van de 2.5 a 320 nM. Mientras que, los PC de PDDA causaron hemólisis de manera concentración dependiente (Liu, Li, Xia, Liu, and Xiao, 2015). Estos resultados sugieren que este nanomaterial podría ser útil con fines de bioimágenes debido a su mínima citotoxicidad. En la literatura estos hallazgos son favorables ya que sugieren que este tipo de nanomateriales pueden ser utilizados en aplicaciones biomédicas debido a que no alteran la morfología y funcionalidad de los eritrocitos. Algunos investigadores han evaluado el efecto de la interacción de NP con la membrana eritrocitaria y han sugerido que la morfología de estas células sanguíneas se ve afectada y por lo tanto su función intrínseca en el transporte de oxígeno es deficiente (Lin and Tsai, 2012).

Otro ejemplo sobre el efecto de las NP en eritrocitos es el realizado con PC de oro, NP de oro pegilado y NP de mesosporos de silicio. En este estudio de hemocompatibilidad, se expuso que los nanomateriales tuvieron efecto significativo sobre la membrana del eritrocito ya que modificaron su flexibilidad y causaron cambios morfológicos (Zhao, Sun, Zhang, Trewyn, Slowing and Lin, 2011; He, Liu and Du, 2014; Kim, Nafiujjaman, Nurunnabi, Lee and Park, 2016). Estos hallazgos sugieren que, al reducir la morfología de los eritrocitos, se afecta el flujo sanguíneo y puede aumentar la acumulación de eritrocitos en el bazo. Esta acumulación puede obstaculizar la actividad funcional normal de este órgano vital, esta afectación ya ha sido estudiada con NP de mesosporos de silicio (Kim, Nafiujjaman, Nurunnabi, Lee and Park, 2016).

Se sabe que los eritrocitos no son los únicos contribuyentes al volumen sanguíneo y el principal determinante de la viscosidad de la sangre, pero también tienen distintas propiedades que le dan a la sangre la capacidad de actuar como un fluido (Sriram, Intaglietta and Tartakovsky, 2014). Es debido a estas propiedades que los eritrocitos tienen la tendencia a descender por el centro del vaso sanguíneo, empujando plaquetas hacia la periferia, donde pueden interactuar fácilmente con la vasculatura para formar un tapón hemostático (Walton, et al., 2017). Este fenómeno es denominado como marginación axial y permite tener influencia en la distribución de

plaquetas y NP a lo largo del torrente sanguíneo y dentro de la vasculatura. Así que, el cambio estructural o daño en los eritrocitos puede influenciar la viscosidad sanguínea, lo que a su vez intensifica las colisiones entre plaquetas por lo que puede aumentar el riesgo de formación de trombos (Brass, Tomaiuolo, Welsh, Poventud-Fuentes, Zhu, Diamond, and Stalker, 2019).

Las propiedades fisicoquímicas de las NP como la composición, el tamaño y la forma podrían tener una influencia significativa en las interacciones célula-NP y determinar en gran medida los cambios morfológicos, así como otros efectos inducidos. Por lo que, los efectos de las NP con alguno de los componentes de la sangre pueden relacionarse entre sí en mayor medida o no y tener implicaciones significativas para la eficacia terapéutica de varios medicamentos a nanoescala que dependen en gran medida de dicha marginación para alcanzar sus blancos terapéuticos (Cooley, Sarode, Hoore, Fedosov, Mitragotri and Gupta, 2018).

### **1.8 Interacción de NP con plaquetas y su efecto relacionado en la función en la hemostasia.**

Las plaquetas tienen un papel fundamental en hemorragias al formar un tapón hemostático después de una lesión vascular. Una disminución en el número de plaquetas podría causar riesgo en la formación de coágulos necesarios en daño vascular (Broos, Feys, De Meyer, Vanhoorelbeke and Deckmyn, 2011). Las plaquetas son pequeñas células que se encuentran circulando en la sangre. Estas carecen de núcleo con un tamaño aproximado de 3.6 a 0.7  $\mu\text{m}$ .

En condiciones fisiológicas basales, las plaquetas circulan en sangre en un estado inactivo y tienen en su superficie diferentes tipos de gránulos (fundamentalmente gránulos densos, gránulos  $\alpha$  y lisosomas que, en estado activo, liberan diferentes factores almacenados en ellos y que a su vez estimulan más la actividad de la propia plaqueta (Senzel, Gnatenko and Bahou, 2009; Yeaman, et al., 2010). Es decir, van a facilitar su interacción con otras plaquetas, con otras células o agentes extraños de su

entorno (Clemetson, 2012). Una vez que se activan, llegan a formar un tapón hemostático y causar daño endotelial adhiriéndose a la pared vascular, causando a su vez la activación de la cascada de coagulación (Broos, Feys, De Meyer, Vanhoorelbeke, Deckmyn, 2011). No obstante, los mecanismos por los cuales las plaquetas regulan la hemostasia no están claros, aunque se reconoce su participación en la inmunidad innata, inflamación vascular, combate de infecciones, regulación en desarrollo de tumores y la angiogénesis (Holinstat, 2017; Mancuso, 2017).

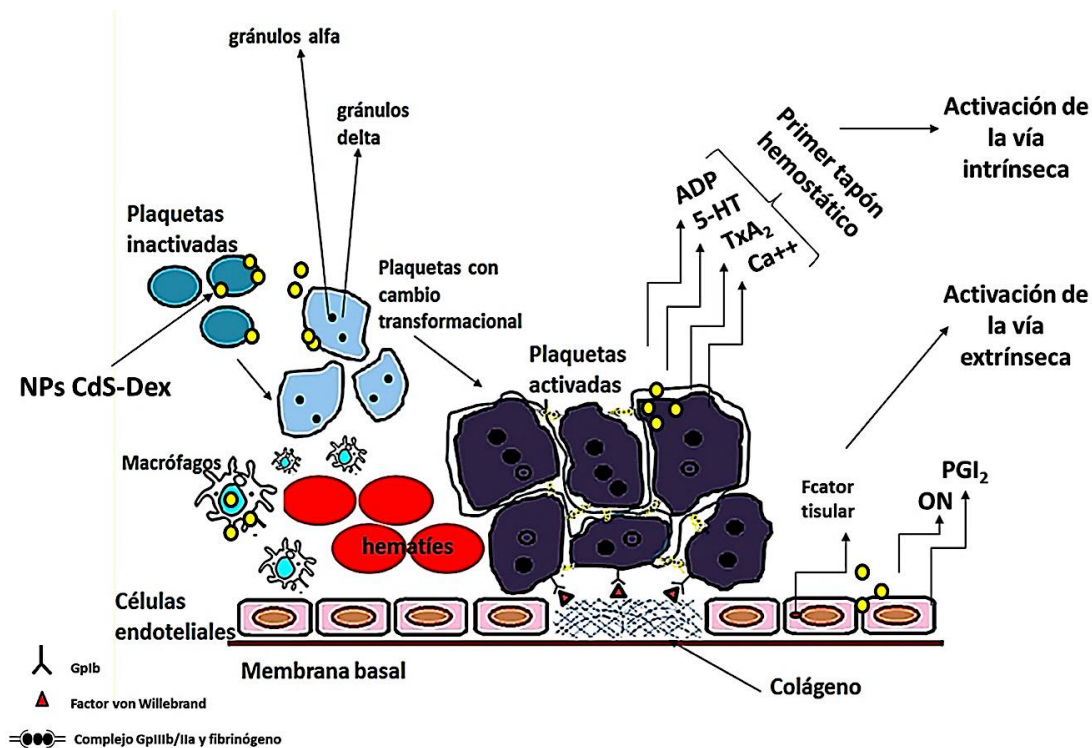
Las plaquetas se encuentran circulando en torrente sanguíneo y la interacción con las NP puede causar distintos efectos que pueden interferir en la hemostasia primaria. Cuando esto sucede, las plaquetas pasan por tres etapas críticas, tales como, la adhesión, activación y agregación. La adhesión es un proceso que se da de manera inmediata una vez que hay lesión vascular y conlleva la desaceleración de las plaquetas que se mueven rápidamente para permitir la adherencia a la pared vascular (Bergmeier and Stefanini, 2018). Por ejemplo, las NP de sílice que han sido ampliamente utilizados en nanomedicina, nanofarmacia y nanodiagnóstico, no obstante, en recientes estudios se ha demostrado que tienen efectos adversos al causar alteraciones en la hemostasia vascular (Corbalan, Medina, Jacoby, Malinski and Radomski, 2012). Estas evaluaciones sobre la hemocompatibilidad de las NP de sílice han limitado su uso como candidatos ideales para aplicaciones biomédicas. También se sabe que, estas NP de sílice tienen efecto sobre la adhesión de las plaquetas, es decir, mejoraron la interacción plaqueta-célula endotelial a través del aumento de la expresión de PECAM-1 (molécula de adhesión en la superficie de las células) (Saikia, Mohammadpour, Yazdimamaghani, Northrup, Hlady and Ghandehari, 2018).

Las plaquetas contienen en su superficie tres tipos de gránulos de almacenamiento: los gránulos densos, los gránulos  $\alpha$  y los lisosomas. De los gránulos densos se liberan difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), fosfato inorgánico, polifosfatos, serotonina y calcio, entre otros. El ADP, es esencial como cofactor de la agregación plaquetaria y actúa mediante su interacción con receptores específicos

localizados en la superficie plaquetaria (Wang, Andrews, Yang, Lang, Jin, Cameron-Vendrig, Zhu, Rehemam and Ni, 2013). El calcio liberado de los gránulos plaquetarios es necesario para la formación de fibrina (Kahner, Shankar, Murugappan, Prasad and Kunapuli, 2006; Angiolillo, Ferreiro, 2010).

Finalmente, la serotonina actúa como vasoconstrictor e interviene en la activación de las propias plaquetas. El mecanismo por el cual se forma un trombo plaquetario puede darse mediante la activación y adhesión firme de la plaqueta a la pared del vaso. Eso provoca que a esas plaquetas ya adheridas se agregue un número mayor de estas y comience el crecimiento del trombo. La proteína GPIIb actúa en la fase inicial de frenado de las plaquetas sobre la pared vascular. La GPIIb se expresa de forma constitutiva en la superficie de la plaqueta e inicia el proceso de adhesión plaquetario uniéndose al fibrinógeno y al factor von Willebrand (FvW) (Zaidi and Green, 2019).

Las plaquetas al activarse sufren cambios conformacionales y adoptan una forma semi esférica con prolongaciones prominentes que conducen a un aumento del ligando y la secreción de factores procoagulantes contenidos en sus gránulos (ver figura 8). Una vez que las plaquetas se han activado, los cambios en su morfología permiten que la integrina GPIIb/IIIa se una a varios ligandos (fibrinógeno, tromboxano A<sub>2</sub>) y provocan que otras plaquetas que se encuentren circulando comiencen a agregarse entre ellas y formen un tapón plaquetario en el sitio de lesión. Mientras esta interacción entre el receptor de glicoproteína y las proteínas circulantes es más eficiente, permitirá que el agregado plaquetario sea estable y controlado (Austin, 2017; Zaidi and Green, 2019).



**Figura 8.** Principales proteínas de adhesión que en la plaqueta participan en el proceso de activación plaquetaria. ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; FvW: factor de von Willebrand; GP: glicoproteína; TxA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>; 5-HT: serotonina; Ca<sup>++</sup>: Calcio; ON: óxido nítrico.

En la membrana de las plaquetas hay grupos siálicos ionizables que le confieren carga negativa, esta carga puede ser neutralizada si el nanomaterial tiene carga positiva neta. Por lo tanto, si un nanomaterial es catiónico puede facilitar la interacción entre plaquetas y causar la formación del agregado plaquetario (Radomska, Leszczyszyn and Radomski, 2016). De hecho, se ha descubierto que los polipéptidos catiónicos aumentan la agregación plaquetaria. Sin embargo, no todos los nanomateriales conducen a la agregación plaquetaria, ya que diferentes nanosistemas pueden

interactuar a través de cargas electrostáticas y dar como resultado un efecto diferente (Radomski, Jurasz, Alonso-Escolano, Drews, Morandi, Malinski and Radomski, 2005).

### **1.9 El efecto de la interacción entre NP y macrófagos en la captación celular y fagocitosis.**

Los macrófagos (M $\phi$ s), son células mononucleares fagocíticas que se originan a partir de monocitos que se encuentran circulando en sangre y se diferencian. En presencia de un estímulo, los M $\phi$ s son capaces de proliferar (Mantovani & Sozzani, et al., 2002). Bajo un estímulo, los M $\phi$ s son substancialmente heterogéneos, lo que probablemente refleja el grado de especialización requerido dentro del ambiente tisular en el que se encuentren. Dicha heterogeneidad se ve reflejada en su morfología, el tipo de patógenos que pueden reconocer, así como el nivel de citocinas inflamatorias que producen (ej. IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa) (Frantz & Vincent, et. al., 2005). Además, los macrófagos producen especies reactivas de oxígeno, como el óxido nítrico, que permite la destrucción de las bacterias fagocitadas. Los macrófagos pueden migrar y circular entre casi todos los tejidos, buscando la presencia de patógenos y eliminando células muertas.

Los M $\phi$ s responden a varios estímulos, por lo que esta interacción NPs-M $\phi$ s, no pasa desapercibida, ya que los M $\phi$ s son componentes esenciales y efectores cruciales de la inmunidad innata en las respuestas primarias a los patógenos (Paola Italiani & Diana Boraschi, 2014; Egners, Erdem & Cramer, 2016). También, los M $\phi$ s cumplen funciones importantes en la eliminación de partículas y las reacciones inflamatorias (Rabolli, Lison & Huaux, 2016) y, por lo tanto, participan en la homeostasis y la regeneración de tejidos (Kaur, Raggatt, Batoon, Hume, Levesque & Pettit, 2016). Una vez activados, los macrófagos inducen una variedad de efectos biológicos, como la mediación de las respuestas inflamatorias *in vivo* y la respuesta inmune específica, a través del procesamiento y presentación antigénicos, la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas. (Patel, Rajasingh, Samanta, Cao, Dawn & Rajasingh,

2016; Murray, P.J., et al., 2017). Los M $\phi$ s son células especializadas que de forma basal se encuentran en disposición de realizar una serie de funciones tales como detección, fagocitosis y destrucción de bacterias y otros agentes extraños al organismo. Aunque muchas de sus funciones pueden realizarse con mayor eficiencia una vez activados (Mosser, & Edwards, 2008).

En un estudio en el que los M $\phi$ s RAW 264.7 fueron tratados con PC de CdSe/ZnS (9.79 nm) a concentraciones de 0, 10, 50 and 100  $\mu$ g/mL por 4 horas de tiempo de exposición. Los resultados del ensayo Cell Counting Kit-8 (CCK – 8) demostraron que los puntos cuánticos de CdSe/ZnS a la concentración de 50  $\mu$ g/mL causaron proliferación celular de M $\phi$ s RAW 264.7 de manera significativa con respecto al grupo sin tratamiento. Sin embargo, este aumento de la proliferación no fue diferente de los macrófagos tratados con puntos cuánticos a la concentración de 100  $\mu$ g/mL. Estos resultados indicaron que los puntos cuánticos tienen la capacidad de aumentar la proliferación de macrófagos independiente de la concentración (Li, Zhang, Hao, He, Shen, & Lu, 2018).

## 2. Antecedentes

La Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) en colaboración con el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), se han dado a la tarea de sintetizar una serie de nanomateriales y a realizar su evaluación biológica. Uno de ellos es la preparación de nanopartículas semiconductoras de sulfuro de cadmio cubiertas con dextrina (CdS-Dex), las cuales pertenecen a la clasificación de nanopartículas semiconductoras (NP) o puntos cuánticos (PC), que tienen amplia utilidad en las áreas biomédicas. Las NP de CdS-Dex son nanomateriales inorgánicos de tamaño nanométrico (3 nm), que tienen notables propiedades ópticas y electrónicas; por lo que, exhiben distintas ventajas sobre los biomarcadores fluorescentes tradicionales. Estas han sido caracterizadas y evaluadas en estudios *in vitro* e *in vivo*; en donde se demostró que son menos citotóxicas en comparación con otros nanomateriales. (ver figura 9).

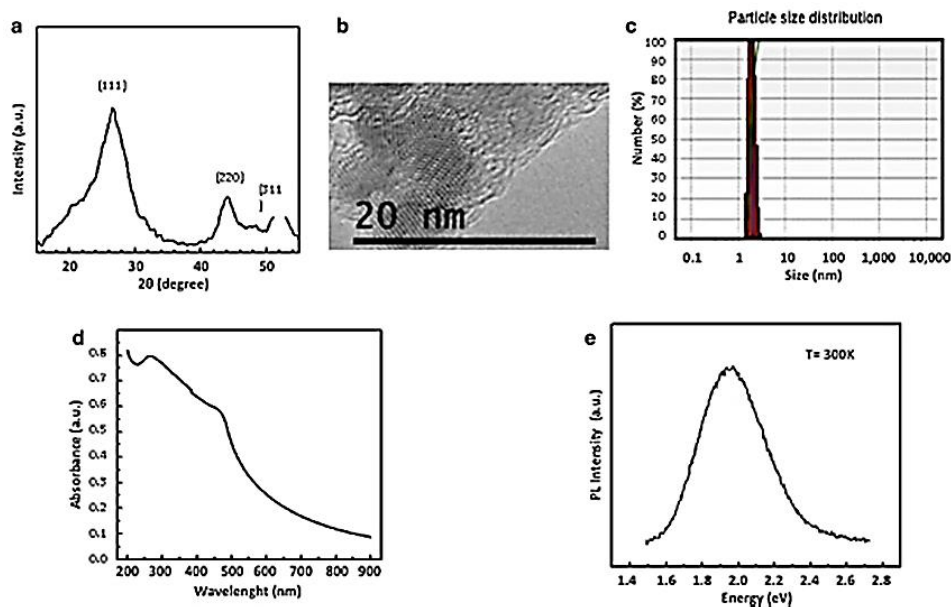
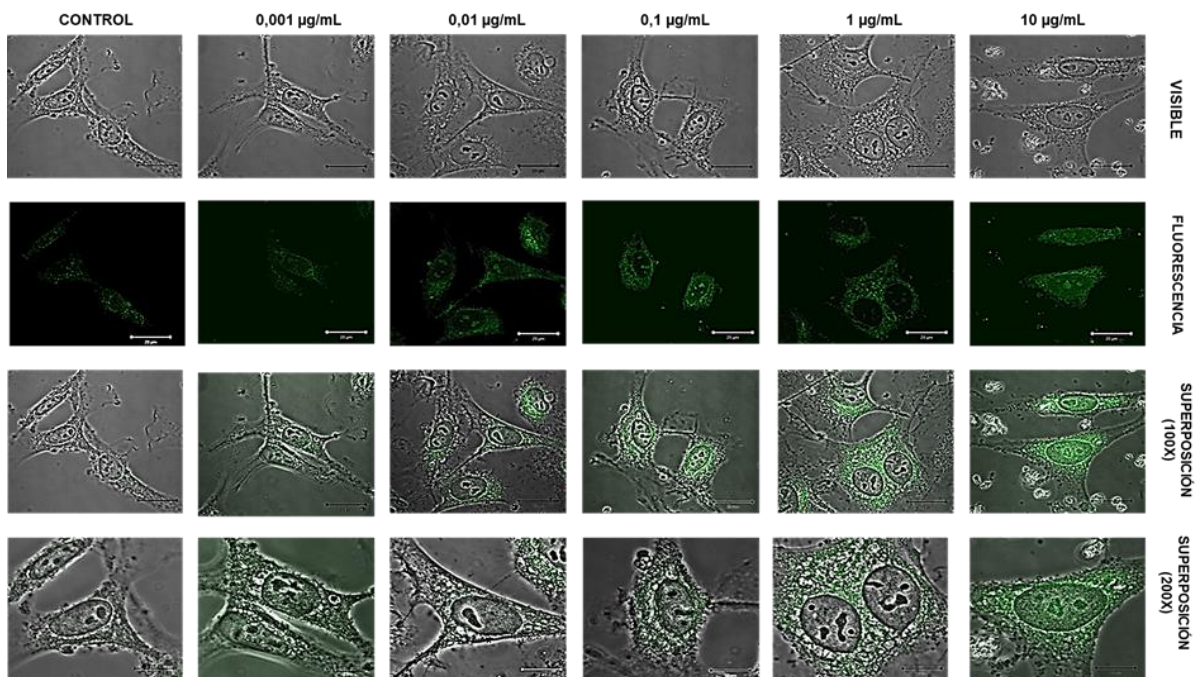


Figura 9. Imágenes de la caracterización de NP de CdS-dextrina. a. Difracción de rayos X de NP de CdS-dex. b. imágenes de HRTEM de NP de CdS-Dex. c. Distribución de tamaño de NP de CdS-Dex. d. Distribución de tamaño por UV-visible NPs de CdS-Dex. e. Espectro de fotoluminiscencia a temperatura ambiente NP de CdS-Dex. (Reyes-Esparza *et. al.*, 2015).

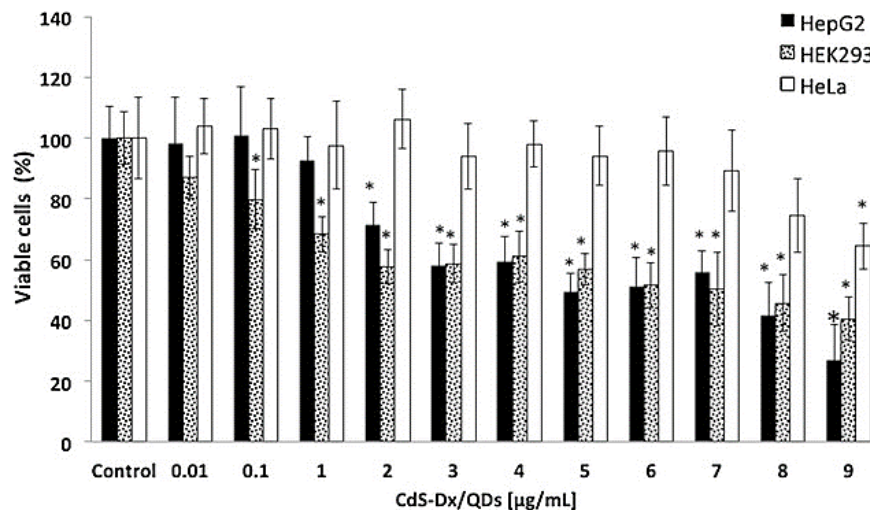


Presentan la ventaja de que pueden ser detectadas por su emisión de fluorescencia en verde, por lo que se pueden visualizar imágenes de células y tejidos. Se ha observado que al ingresar a las células, pueden localizarse en varios compartimentos subcelulares, como el citoplasma, núcleo y nucléolos. Así mismo también se ha observado que logran distribuirse en todos los órganos estudiados (cerebro, corazón, hígado, riñón, intestino, estómago, bazo, pulmón y testículo) y logran penetrar barreras fisiológicas (ver figura 10).



**Figura 10. Visualización microscópica de la fluorescencia en células endoteliales (HUVEC) tratadas con NP de CdS-Dex. Las células se incubaron durante 24 h con NP de CdS-Dex (0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10 µg/mL). Imágenes de fluorescencia (verde) muestran la captación celular de NPs en el citoplasma y núcleo de las células HUVEC. Barra de escala de 20 µm.**

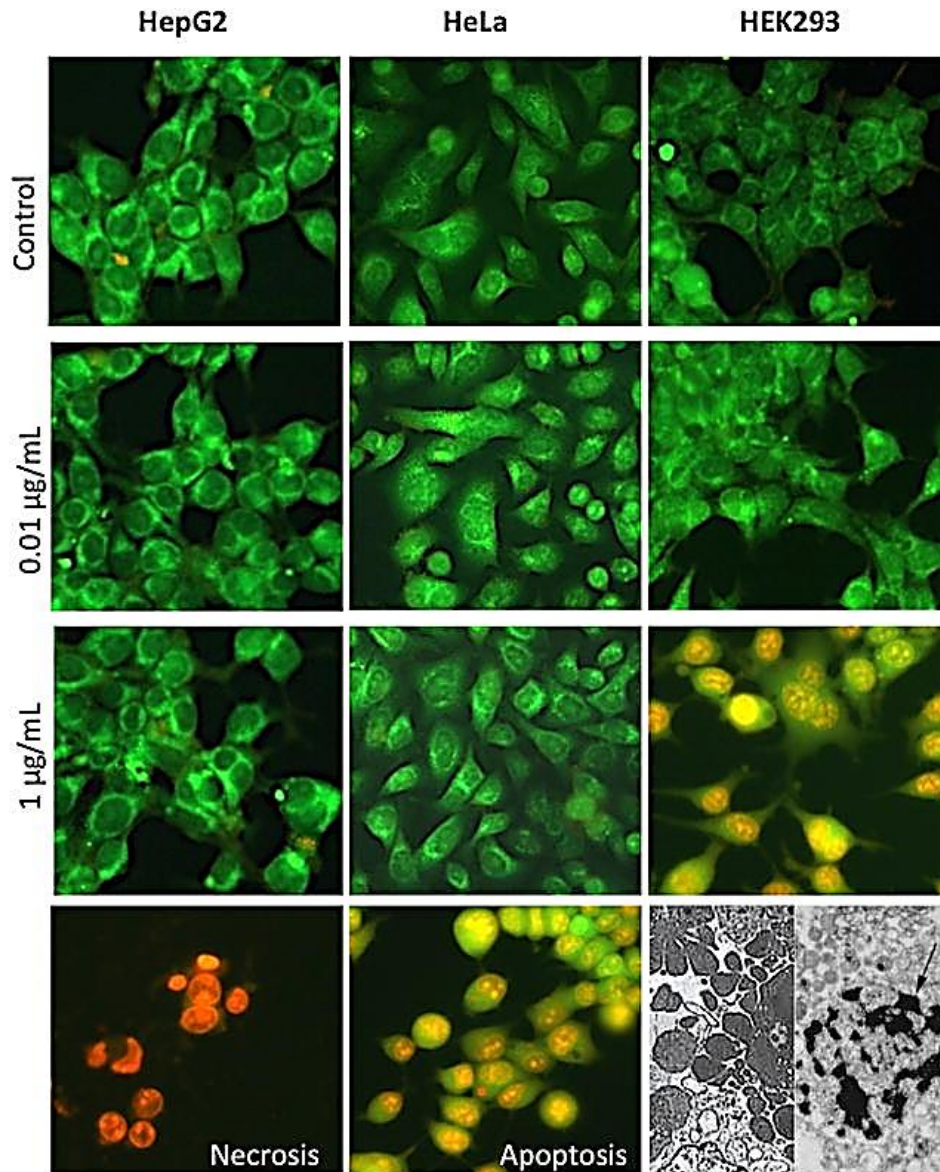
Aún así, no causan daño morfológico en tejidos ni afectan las funciones hepáticas y renales en ratas Wistar hembras y machos administrados por vía intraperitoneal (I.P.) (Reyes-Esparza et al., 2015), por lo que se consideran biocompatibles con el organismo. En este estudio los resultados demostraron que las NP de CdS-Dex son citotóxicas sólo a altas concentraciones ( $> 2 \mu\text{g/mL}$ ) en células hepáticas (HepG2) y renales (HEK293) (ver figura 11), pero en bajas concentraciones ( $<1 \mu\text{g/mL}$ ), no son tóxicas en las células HepG2 o células de cáncer cérvico uterino (HeLa). También, se mostró que sólo indujeron la muerte celular por apoptosis en células HEK293 a concentraciones de  $1 \mu\text{g/mL}$  (ver figura12).



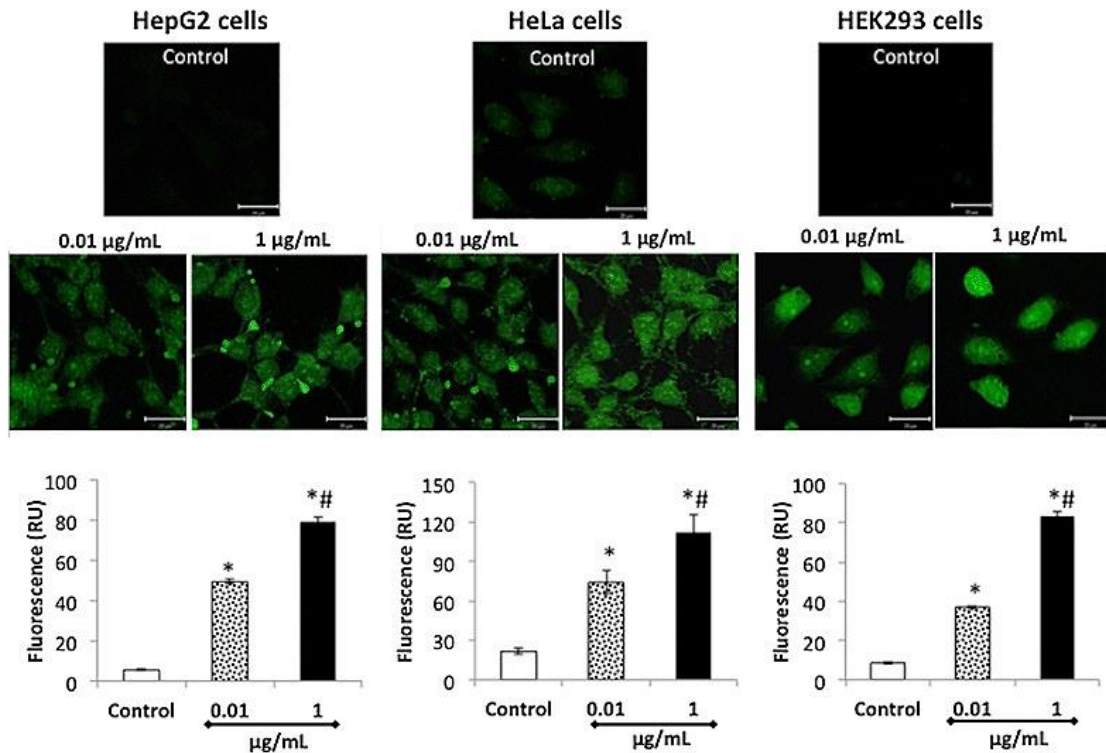
**Figura 11. Efecto de las NP de CdS-Dex sobre la viabilidad celular de líneas celulares humanas. A. Efecto de las NPs de CdS-Dex sobre la viabilidad celular en células HepG2, HEK293 y HeLa. Tiempo de exposición 24 h. Los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad celular en comparación con el grupo de control. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de al menos tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  en comparación con el grupo de control. (Reyes-Esparza et. al., 2015)**

Se sabe que fueron internalizadas por células, esto con base en los resultados *in vitro* en donde se mostró que las células absorbieron eficientemente las NP de CdS-Dex

observadas en el citoplasma de células HeLa (ver figura 13). Aunque en el caso de células HEK293, era más abundante y se encontraban en el núcleo.



**Figura 12.** Ensayo de muerte celular inducida por NP de CdS-Dex en líneas celulares humanas. Tratamiento a concentraciones (0,01 y 1 µg/mL) durante 24 horas. Tinción de naranja de acridina/Bromuro de etidio. Se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (x 100). Control de apoptosis: células expuestas a 1 µl/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 2 h; Control necrosis: células expuestas a 100°C durante 5 min; y las células no tratadas se utilizaron como control negativo. Estos son resultados representativos de al menos tres experimentos independientes (n= 3). (Reyes-Esparza *et. al.*, 2015)



**Figura 13. Visualización microscópica de la fluorescencia en líneas celulares tratadas con NP de CdS-Dex. Las células se incubaron durante 24 h con NP de CdS-Dex (0.01 y 1 µg/mL). Imágenes de fluorescencia (verde) muestran la captación celular de NP en el citoplasma de las células HepG2 y HeLa, y en el núcleo de las células HEK293. Barra de escala de 20 µm. Para medir la captación celular de NP de CdS-Dex se analizaron usando el software Image-Pro Insight 9. Los datos se presentan como la media ± DE de al menos tres experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  en comparación con el grupo de control. #  $p < 0,05$  en comparación con 0.01 µg/mL. (Reyes-Esparza *et. al.*, 2015)**

En ensayos *in vivo*, los animales tratados con 100 µg/kg de NP de CdS-Dex y que se sacrificaron a diferentes tiempos (3, 7 y 18 h), se observó que se distribuyeron de manera homogénea en los órganos. Tal como se muestra en la imagen (figura 14) en la que se detectó una intensa fluorescencia en pulmón y riñón, con una moderada fluorescencia detectada en hígado, bazo y cerebro.



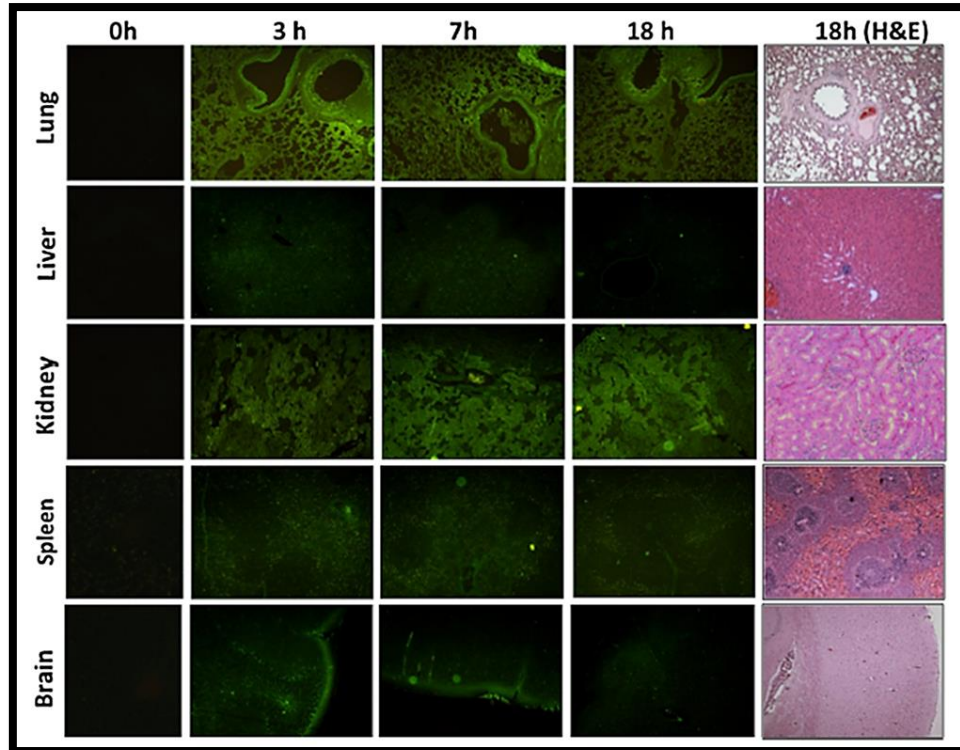


Figura 14. Imágenes microscópicas de fluorescencia que muestran la distribución y localización de NP de CdS-Dex en secciones de tejido de ratas después de 3, 7 y 18 h administradas vía I.P. Las imágenes pertenecen a pulmón, hígado, riñón, bazo y cerebro y tienen un aumento de 10X. La fluorescencia (verde) NP de CdS-Dex en los tejidos mostró su distribución y localización. La columna de la derecha muestra los tejidos después de 18 h de administración; los tejidos se tiñeron con hematoxilina y eosina (aumento  $\times 10$ ). La columna de la izquierda muestra los tejidos del grupo de control observados bajo microscopía de fluorescencia. (Reyes-Esparza *et. al.*, 2015)

La biocompatibilidad y toxicidad NP de CdS-Dex en animales tratados con una dosis diaria con  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  durante 1 semana mostró que el nivel más alto de fluorescencia se observó en riñón, hígado y cerebro. Sin embargo, se detectó menor fluorescencia en pulmón y bazo, con presencia evidente de fluorescencia en los testículos. Estos análisis histopatológicos y bioquímicos sugirieron que las NP de CdS-Dex no fueron tóxicos para los animales tratados (ver figura 15).

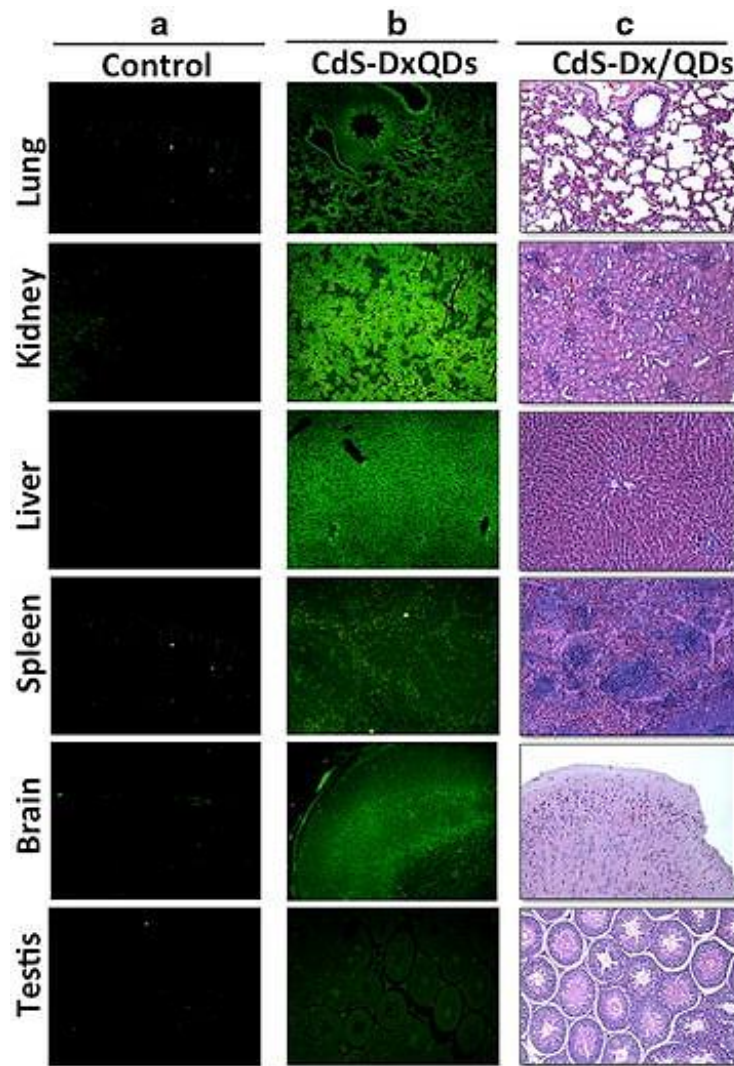


Figura 15. Imágenes de análisis microscópico de fluorescencia que muestran la distribución y localización de NP de CdS-Dex en diferentes tejidos de ratas tratadas durante 7 días. Las imágenes pertenecen a pulmón, riñón, hígado, bazo, cerebro y testículos (con un aumento de  $\times 10$ ). a. Tejidos del grupo de control observados bajo microscopía de fluorescencia. b La distribución y localización de NP de CdS-Dex en tejidos (verde fluorescente). c Secciones histológicas de tejidos después de 7 días de administración de NP; teñidos con hematoxilina y eosina (aumento  $\times 10$ ). (Reyes-Esparza *et. al.*, 2015)

En animales experimentales, se ha demostrado que pueden atravesar barreras biológicas, tienen un suministro importante de tejido y pueden permanecer en los tejidos durante períodos prolongados de tiempo después de una sola administración (Gómez-Cansino, Reyes-Esparza, Rodríguez-Fragoso, González de la Cruz and Rodríguez-Fragoso, 2017).

Por ejemplo, en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación en el que se utilizaron ratas Wistar (macho) administradas con una dosis diaria vía I.P. de nanopartículas de CdS-Dextrina (100 µg/kg) durante 30, 60 y 90 días., mostró que el efecto de la administración subaguda y crónica de NP CdS-Dextrina en subpoblaciones CD4/CD8 de timocitos, las NP de CdS-Dex causaron una reducción significativa de los timocitos CD4+ en hasta un 17 % y de CD8+ en un 13.7 % a los 90 y 60 días, respectivamente (ver figura 16). También se observó que a los 60 días de tratamiento hubo un aumento en las células derivadas del bazo CD4+. Sin embargo, aumentaron subpoblaciones de CD4+ (28%), CD8 + (25%) y CD3 + (27%) a los 60 días de tratamiento. No obstante, a 90 días, hubo una disminución considerable en CD4+, CD8+ en más del 40%.

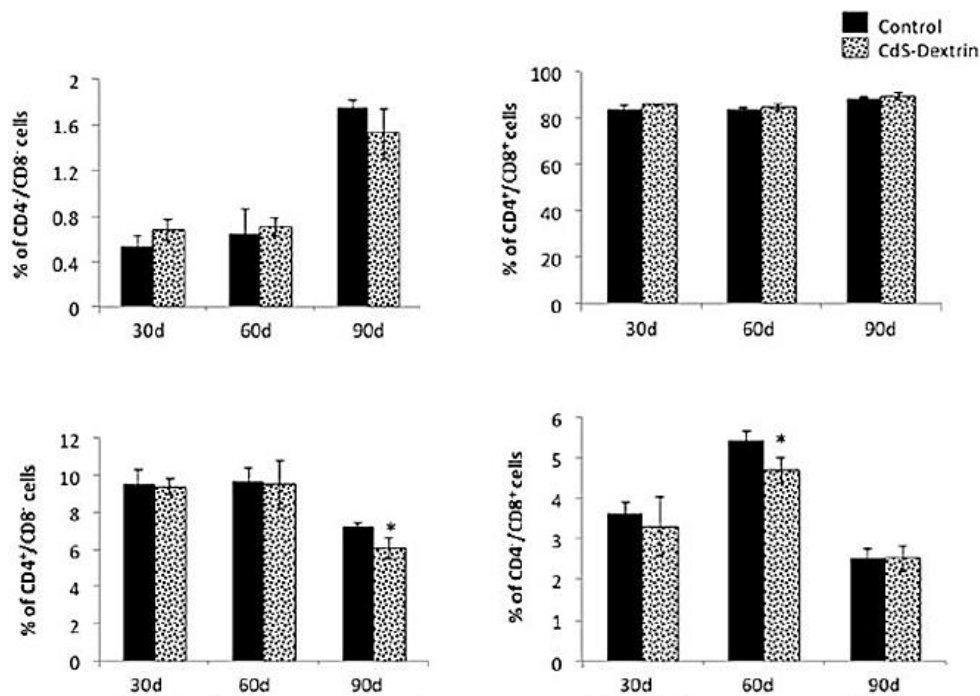


Figura 16. Análisis del efecto de las nanopartículas de CdS-Dextrina en subconjuntos CD4/CD8 de timocitos. Dosis de 100 µg/kg) administradas por vía I.P. durante 30, 60 y 90 días. Los resultados se representan como media ± D.E. n=4, \*datos significativamente diferentes del grupo de control (p < 0.05). (Gómez-Cansino, Reyes-Esparza, Rodríguez-Fragoso, González de la Cruz and Rodríguez-Fragoso, 2017)

Otro hallazgo sobre el estudio de biocompatibilidad de nuestras NP de CdS-Dex, es que se distribuyeron en el tejido de timo y bazo. Aunque la intensidad de fluorescencia en el tejido del timo al principio del tratamiento fue mínima comparada con la intensidad observada a los 60 días de tratamiento y a 90 días casi fue insignificante (ver figura 17).

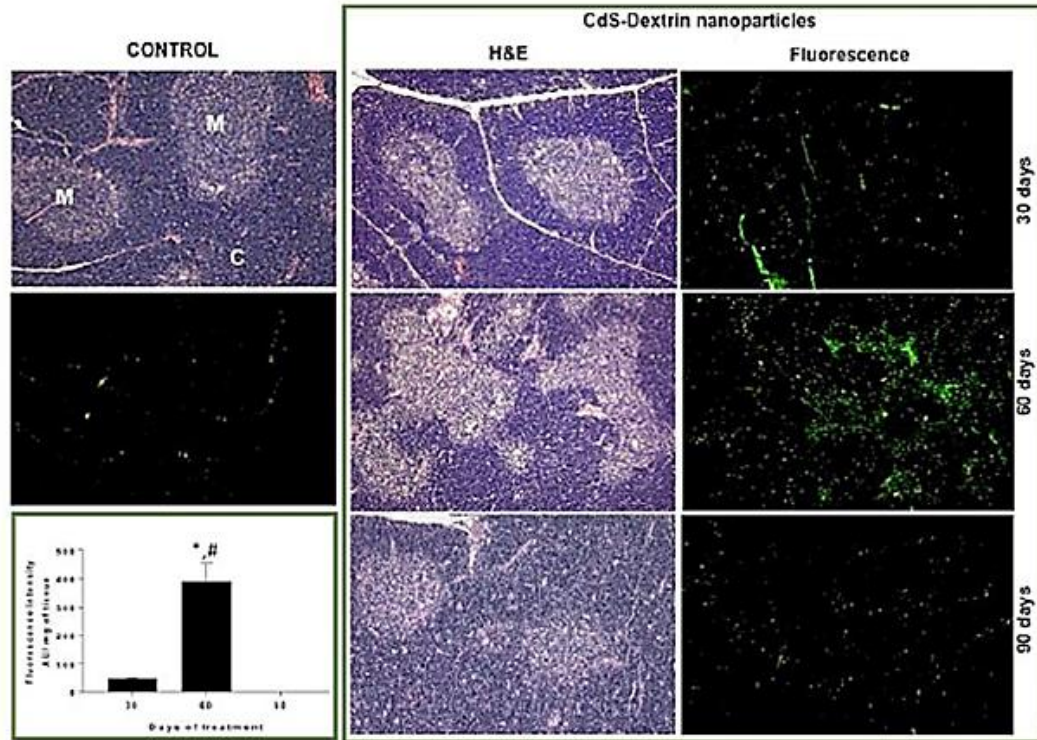


Figura 17. Análisis microscópico y de nanopartículas de CdS-Dextrina en el timo de ratas. Dosis de tratamiento de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de NP de CdS-Dextrina administradas por vía i.p. durante 30, 60 y 90 días. (Gómez-Cansino, Reyes-Esparza, Rodríguez-Fragoso, González de la Cruz and Rodríguez-Fragoso, 2017)

Cabe destacar que, en el bazo se observó un aumento dependiente del tiempo en la cantidad de fluorescencia inducida por nanopartículas de CdS-Dextrina. (ver Figura 18). La cantidad de fluorescencia que se observó en el bazo fue mucho mayor que en el timo a los 60 días, hasta casi 300 veces más.



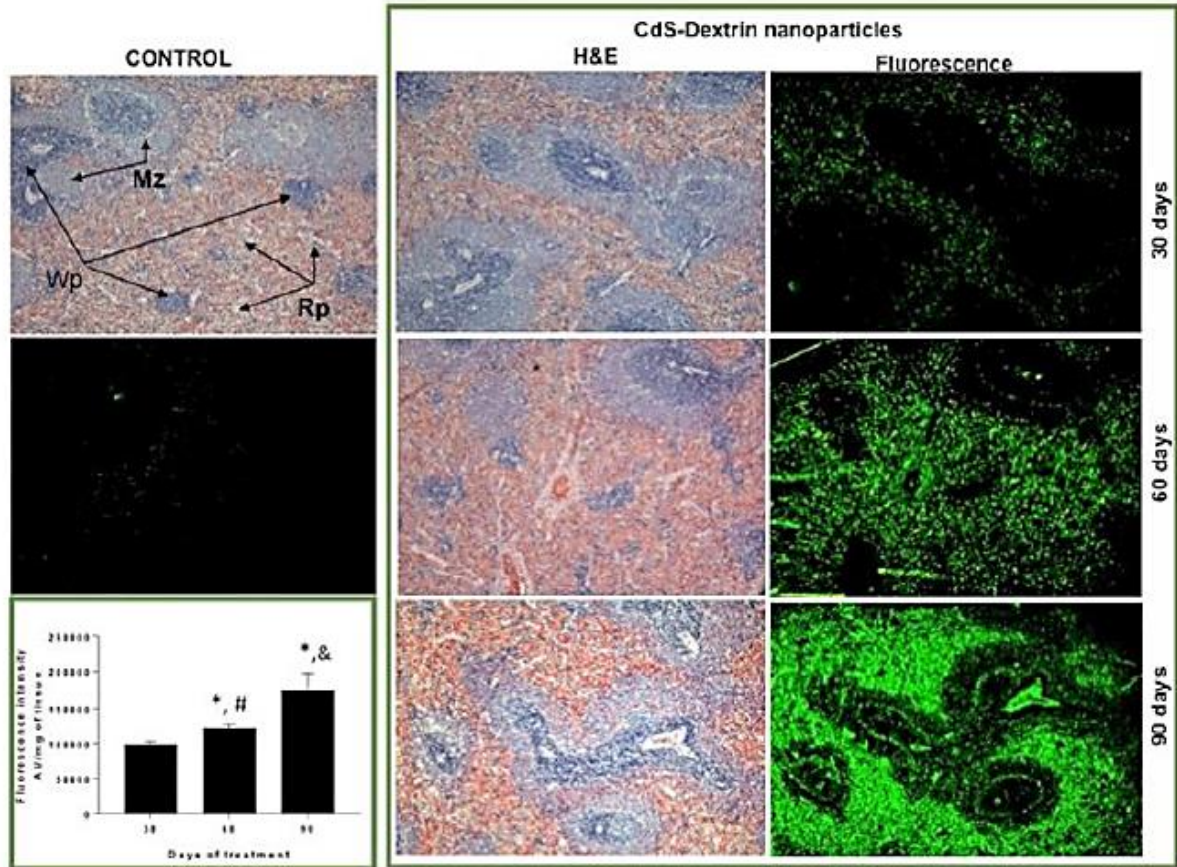


Figura 18. Análisis microscópico y cuantitativo de NP de CdS-Dextrina en el bazo de ratas. Dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de nanopartículas de CdS-Dextrina administradas por vía i.p. durante 30, 60 y 90 días; la intensidad de la fluorescencia es evidente en la pulpa roja. La tinción H&E muestra el aspecto morfológico del bazo después de la exposición a nanopartículas (aumento de 10X). Wp (pulpa blanca), Rp (pulpa roja), Mz (zona marginal). (Gómez-Cansino, Reyes-Esparza, Rodríguez-Fragoso, González de la Cruz and Rodríguez-Fragoso, 2017)

También se ha evaluado la disposición y eliminación de NP de CdS-Dex, se administraron dosis únicas (I.P.). En este estudio, se realizó un perfil de concentración-tiempo a través de la medición de la intensidad de fluorescencia (UA) en hígado, riñón, corazón, pulmón, bazo, timo, músculo, cerebro y testículos analizado por espectrofotometría (ver figura 19).

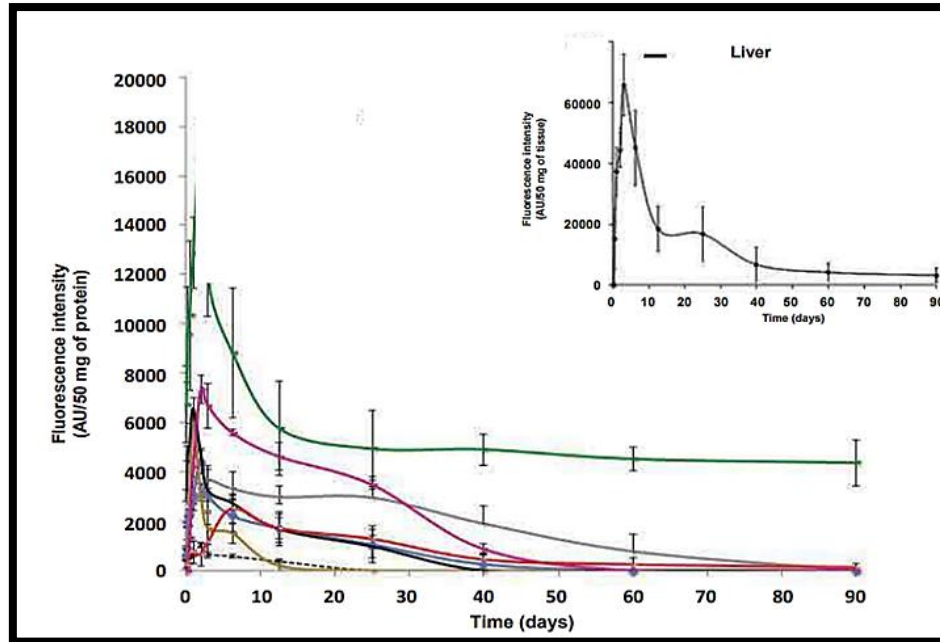


Figura 19. Perfiles de tiempo-concentración de dosis única de NP de CdS-Dex en tejidos en ratas. Análisis de distribución durante un periodo de 90 días después de la administración de dosis única (I.P.). (—♦—) Bazo, (-----) timo, (—) riñón, (—) corazón, (—) cerebro, (—) testículo, (—) pulmón, (—) músculo. (Gonzalez de la cruz, *et.al.*, 2019)

Se obtuvieron parámetros farmacocinéticos de la concentración de NP de CdS-Dex en tejidos. Después de la administración de dosis única en ratas, las NP de CdS-Dex logran distribuirse rápidamente con una  $C_{max}$  que se produjo en las primeras 72 horas en todos los tejidos analizados. Así como el tiempo de eliminación media ( $t_{1/2}$ ), fue de menos de 12 días en riñón, bazo, pulmón y cerebro. Sin embargo, pasaron más de 40 días en músculo, hígado y testículo con un  $t_{1/2}$  de residencia superior a 50 días (ver tabla 1). En esta tabla observamos los parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración de dosis única. La concentración máxima ( $C_{max}$ ) de NP en los tejidos fue principalmente entre las 24-48 h, aunque permaneció en el músculo hasta 150 h. Como podemos observar, la  $C_{max}$  fue más intensa en el hígado (65.739 AU), alcanzando la  $T_{max}$  el día 3 (72 h).

**Tabla 1: Parámetros farmacocinéticos después de la administración de dosis única de NP de CdS-Dex. (Gonzalez de la cruz, *et.al.*, 2019)**

Tissue	$C_{max}$ (AU)	$T_{max}$ (h)	$AUC_{0-t}$ (AU *h)	MRT (d)	$T_{1/2}$ (d)	$K_e$ (h <sup>-1</sup> )
Liver	65 739±1621	72	26 484 058±74650	69±8	48±6	0.0006±0.00008
Kidney	6018±1257	24	519 582±8348	9.3±9	6.41±0.8	0.0045±0.0009
Heart	3679±552	72	3 637 750±45 823	16.0±7	11.1±3	0.0026±0.0007
Lung	7339±2070	48	3 794 373±72859	14.8±6	10.31±4	0.0028±0.0006
Spleen	4386±468	48	1 147 335±93 856	10.4±7	7.04±2	0.0041±0.0009
Brain	6561±1427	24	1 487 975±69784	8.5±4	5.9±0.8	0.0049±0.0005
Testis	16 810±5426	48	11 677 942±79 385	83.3±3	58±12	0.0005±0.00001
Muscle	2515±896	150	1 582 380±99 563	59±8	41.3±17	0.0007±0.00002

Each value represents the average±SD, n=5

Además, se analizaron cortes histológicos por microscopía UV visible y microscopio de epifluorescencia en muestras teñidas y no teñidas, respectivamente; las microfotografías fueron tomadas durante el tiempo máximo de fluorescencia ( $t_{max}$ ) y a los 90 días. Las NP de CdS-Dex se observaron debido a su emisión de fluorescencia (color verde) como se ha visto en estudios previos. Esta intensidad de fluorescencia varió dependiendo del tejido analizado (ver figura 20). No hubo cambios estructurales en los tejidos; sin embargo, el análisis histopatológico reveló alteraciones morfológicas en los testículos debido a la presencia de NP. Los cambios observados en los testículos, se caracterizaron por una reducción de células de Leydig, cambios en el tejido intersticial y conductos seminíferos.

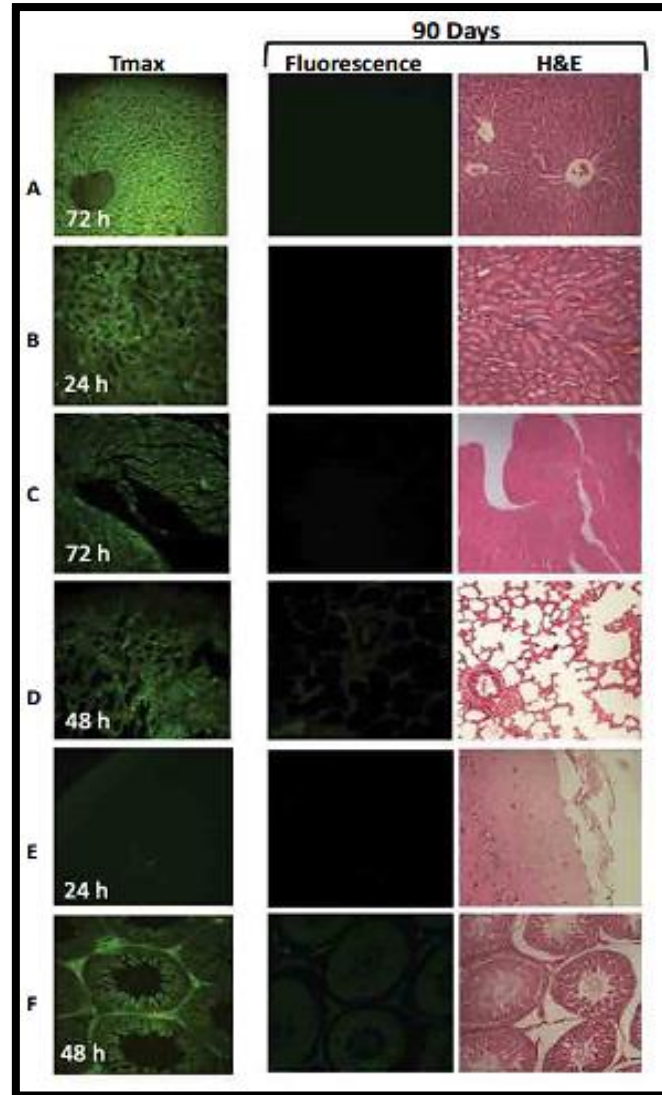


Figura 20. Imágenes de distribución y localización de NP de CdS-Dex en tejidos de rata. Tratamiento de dosis única de 100 µg/Kg. Emisión de fluorescencia por presencia de NPs (color verde). Estas imágenes corresponden a tejidos de: A. hígado, B. riñón, C. corazón, D. pulmón, E. cerebro y F. testículo; obtenidos en el momento de la concentración máxima ( $T_{max}$ ) y a los 90 días. Todos los tejidos se tiñeron con H y E. Aumento 20X. (Gonzalez de la cruz, *et.al.*, 2019).

En el análisis bioquímico se demostró que las NP de CdS-Dex son capaces de inducir cambios, tales como, alteraciones en glucosa, triglicéridos (TG) y fosfatasa alcalina (ALP) a partir del primer día y continuaron durante los 90 días posteriores a la administración. Es decir, se observaron cambios desde la primera hora hasta los 45 días. Sin embargo, las variaciones observadas a lo largo de los 90 días del estudio,

solo la glucosa, TG y ALP fueron relevantes. Aunque la glucosa y la ALP alcanzaron valores normales al final del estudio. Los niveles de TG, por otro lado, se mantuvieron altos hasta los 90 días. También, se encontraron ligeros cambios en AST, ALT y urea. No obstante, no se observaron cambios en colesterol, ácido úrico y creatinina (ver figura 21).

Otra de las evaluaciones fue por microscopía de epifluorescencia en donde se observaron muestras de cortes histológicos obtenidos de ratas tratadas diariamente durante 30, 60 y 90 días. En todos los días se observó una distribución homogénea de NP en todos los tejidos analizados. La intensidad de la fluorescencia aumentaba con respecto al tiempo de tratamiento (ver figura 22).

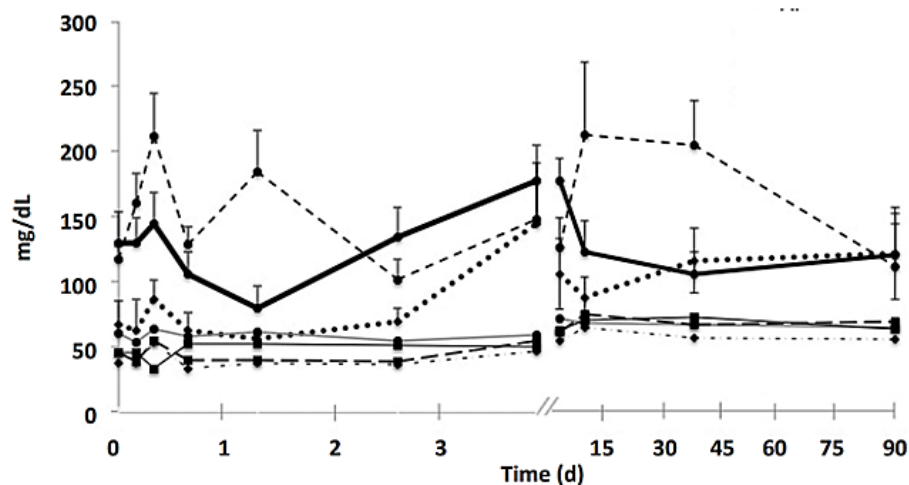
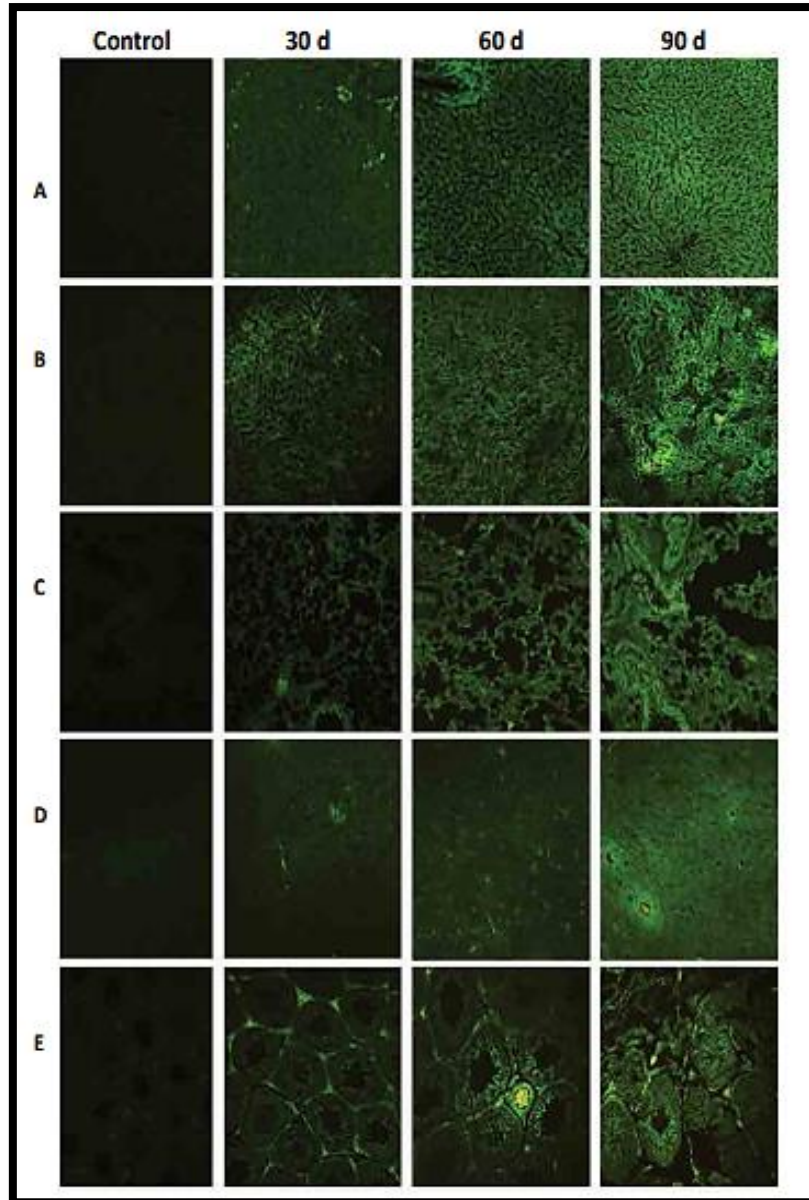


Figura 21. Curva de parámetros bioquímicos después de administración de dosis única de NP de CdS-Dex (I.P.). Dosis: 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de NP de CdS-Dex. Cada punto representa la media  $\pm$  DE de 5 animales. (—) Glucosa, (···) Triglicéridos, (---) colesterol, (---) AP, (—) AST, (---), urea. (Gonzalez de la cruz, *et.al.*, 2019)





**Figura 22.** Imágenes para análisis de distribución y localización de NP de CdS-Dex en cortes de tejido de rata. Tratamiento diario con una dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  durante 30, 60 y 90 días. Ampliación 20X. (A) Hígado, (B) riñón, (C) pulmón, (D) cerebro, (E) testículo. (Gonzalez de la Cruz, *et.al.*, 2019).

A pesar de la distribución evidente de las NP de CdS-Dex en los tejidos. Las muestras de cortes representativos de tejido de hígado, riñón y cerebro (teñido con H y E), no mostraron alteraciones morfológicas, y en apariencia son similares al grupo control.

Sin embargo, destacaron que en el caso de cierta sección del pulmón se demostró la presencia de una inflamación después de 90 días de tratamiento. Por otra parte, en el testículo fue notoria la atrofia y cambios degenerativos causados por las NP de CdS-Dex (ver figura 23).

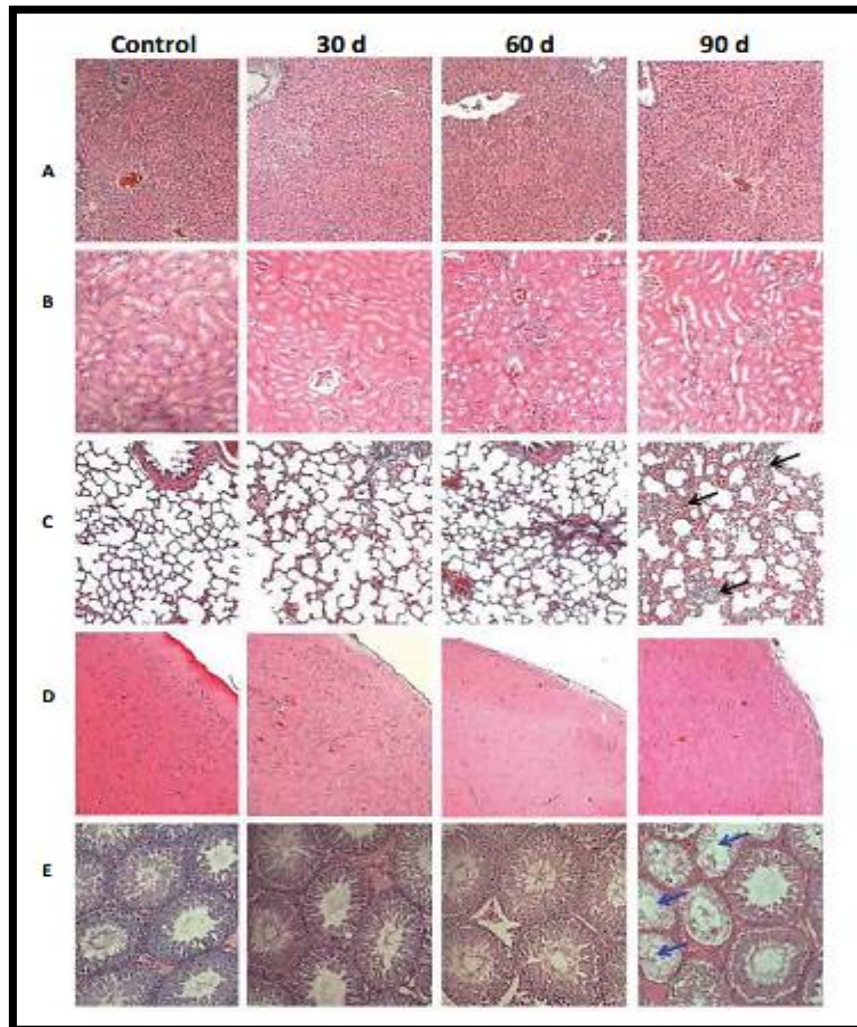


Figura 23. Cortes histológicos de tejidos de ratas tratadas diariamente con NP de CdS-Dex durante 30, 60 y 90 días. Evidencia de proceso inflamatorio crónico en los pulmones después de 90 días de tratamiento (flechas negras). Atrofia y alteraciones degenerativas en los testículos (flechas azules). Tinción con H y E. Magnification 20X. (A) Hígado, (B) riñón, (C) pulmón, (D) cerebro, (E) testículo. (Gonzalez de la Cruz, *et.al.*, 2019).

A pesar de estos hallazgos, no se encontraron alteraciones en los parámetros bioquímicos (Tabla 2) de ratas tratadas diariamente con NP de CdS-Dex a 30 días de tratamiento. Sin embargo, a los 60 días las NP causaron niveles elevados de AP (73%) y urea (41%). Aunque, los niveles de urea permanecieron elevados sólo en un 28%, después de 90 días de tratamiento. De manera interesante, no se observaron cambios en niveles de colesterol o creatinina durante todo el tiempo de tratamiento (90 días). (Gonzalez de la Cruz, *et.al.*, 2019).

**Tabla 2. Efecto de las NP de CdS-Dex sobre parámetros bioquímicos en ratas tratadas diariamente durante 30, 60 y 90 días (n = 6).**

Parameter	Control	30 days	60 days	90 days
Glucose	140.2±19.4	120.5±36.1	152.0±43.3	159.9±19.4
Triglycerides	60.8±13.7	112.3±51.7	122.4±34.4	187.0±15.5
Cholesterol	54.9±8.9	59.4±12.9	58.7±3.3	64.9±10.3
ALT	54.3±8.6	54.5±8.9	74.9±25	57.5±9.7
AST	160.2±26	168.3±20.1	146.5±40.9	176.1±29.0
AP	121.6±33.7	156.9±13	210±31.4 <sup>#</sup> <sup>##</sup>	113.8±23.8
Urea	39.6±8.4	35.8±6.6	55.9±8.3 <sup>#</sup>	50.8±2.0 <sup>#</sup>
Creatinine	0.6±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1	0.7±0.04
Uric Acid	5.2±1.8	5.6±1.7	10.6±5.4	10.5±3.4

Each value represents the mean±SD. \*P<0.05 compared with control group; <sup>#</sup>p<0.05 compared with 30 d group; <sup>##</sup>p<0.05 compared with 60 d group; and <sup>#</sup>p<0.05 compared with 90 d group

Con estos resultados tenemos clara evidencia de que las NP de CdS-Dex son biocompatibles, pero que producen toxicidad selectiva después un largo periodo de tratamiento e interactúan con los órganos e incluso llegan hasta los compartimentos celulares. Así también que son capaces de modificar las poblaciones celulares y actuar como moduladores del sistema inmunológico. Estas NP han demostrado en diversos estudios que tienen el potencial de ser utilizados con propósitos terapéuticos. Sin embargo, y a pesar de que las nanopartículas han demostrado tener toxicidad selectiva, se necesita más investigación para garantizar que nuestras NP puedan aplicarse de forma segura y eficaz en nanomedicina. Así que, estos hallazgos



farmacológicos y toxicológicos, nos indicaron que podría haber efectos secundarios después de administrar las NP.

¿Dependería del tiempo, de la concentración o tipo de interacción?

Es esta la interrogante a responder, necesitamos evaluar el comportamiento biológico al interactuar con componentes sanguíneos. Ya que las NP al ser administradas por vía intravenosa (I.V.) tendrán contacto con componentes de la sangre.

### 3. Justificación

Las NP prometen ser una herramienta esencial en nanomedicina sin embargo, entre los principales desafíos es su biocompatibilidad. Algunos autores refieren que la caracterización de las NP solas o conjugadas es de gran importancia, ya que permitirá además de conocer su tamaño y composición, la predicción y/o evaluación de los efectos tras la interacción con el organismo. Pues sugieren que un nanomaterial es lo suficientemente pequeño para entrar a una célula; independientemente de la vía de exposición que se haya tenido. Además de desencadenar algún efecto debido a la interacción con un sistema orgánico.

La administración sistémica de NP, ha sido ampliamente reportado como una alternativa prometedora para la administración de medicamentos de manera específica. Estos últimos años, nuestro grupo de investigación en el laboratorio 6 de Farmacología, toxicología e inmunomoduladores de la Facultad de Farmacia-UAEM y en colaboración con el departamento de FÍSICA del CINVESTAV, nos hemos dado a la tarea de diseñar nanomateriales con la intención de que sean útiles con fines de diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades. Nuestras NP de CdS-Dex han demostrado ser candidatas ideales debido a sus propiedades fisicoquímicas y ópticas con capacidades nanoteragnósticas. Además, han sido caracterizadas y evaluadas en estudios *in vitro* e *in vivo*, en donde se demostró que se distribuyen en todos los órganos (cerebro, corazón, hígado, riñón, intestino, estómago, bazo, pulmón y testículo) y logran penetrar barreras fisiológicas. Así mismo, no causan daño morfológico en tejidos ni afecta las funciones hepáticas y renales en ratas Wistar hembras y machos administrados vía intraperitoneal (I.P.) cuando se han administrado en dosis múltiples por periodos de tiempo corto y prolongado. Además, un estudio farmacocinético ha mostrado que se distribuyen en forma diferente en los diversos tejidos y su tiempo de residencia es diferente, sin producir efectos tóxicos, por lo que se consideran biocompatibles con el organismo.

La vía de administración intravenosa (I.V.), permite la entrega de medicamentos de manera sistémica. Uno de los grandes retos en el desarrollo de nanoterapias, es evitar

la interacción nanomaterial-sangre, así como los efectos secundarios y adversos. Pues las interacciones NP-sangre están íntimamente unidas y puede desencadenar efectos nocivos. Estos efectos están asociados a la formación de la corona de proteínas, los tiempos de coagulación, la agregación de plaquetas y la hemólisis son evaluaciones básicas para determinar el potencial tóxico de nuestro nanomaterial. Estos fenómenos fisiopatológicos pueden ser desde problemas respiratorios (disnea) hasta derrame pleural. Ya que se sabe que algunos nanomateriales pueden penetrar a alveolos pulmonares, donde se puede producir una inflamación aguda o crónica y evolucionar a fibrosis pulmonar (Song, *et.al.*, 2009). Por lo que las enfermedades cardiovasculares como trombosis, son ampliamente asociadas a la toxicidad causada por los nanomateriales. Otra de las posibles patologías puede estar asociada a la hemólisis causada por las NP. Es decir, la destrucción aguda de eritrocitos puede desencadenar una condición de crisis hemolítica, que es una afección característica de la lisis de grandes cantidades de eritrocitos durante en un período corto de tiempo y culmina con anemia aguda.

Conocer las características hemorreológicas, de las NP de CdS-Dex nos permitirá predecir los efectos tras la interacción con el organismo. Aunque resulta desafiante, con este proyecto, nos hemos dado a la tarea de aportar y generar conocimiento científico en el campo de las ciencias farmacéuticas para ser aplicado en la nanomedicina. Conocer las interacciones de las NP de CdS-Dex nos permitirá tener evidencia científica sobre su relación con los componentes sanguíneos y sus efectos fisiopatológicos asociados y contribuir en gran medida a generar un avance sobre su seguridad, la que es limitada para ser usados en aplicaciones biomédicas.

#### 4. Hipótesis

Las nanopartículas de CdS-Dextrina interactúan con componentes sanguíneos y podrían desencadenar procesos fisiopatológicos en forma concentración dependiente.

## 5. Objetivo General

Evaluar la interacción de nanopartículas de CdS-Dex con componentes sanguíneos y sus efectos fisiopatológicos asociados.

### 5.1 Objetivos Específicos

#### 1.- Evaluar el efecto de la interacción de NP de CdS-Dex con albúmina.

- ✚ Formación de la proteína por electroforesis en gel SDS-PAGE.
- ✚ Potencial Z ( $\zeta$ -potential) asociado a la formación de la proteína corona de NP de CdS-Dex expuestas a albúmina.

#### 2. Evaluar el efecto de la interacción de NP Cd-Dex sobre los tiempos de coagulación sanguínea.

- ✚ Protrombina
- ✚ Tiempo de Tromboplastina parcial activada (TTPA)
- ✚ Concentración de fibrinógeno

**3. Evaluar el efecto de la interacción de NP de CdS-dex sobre eritrocitos:**

- ✚ Citotoxicidad mediante un ensayo de hemólisis,
- ✚ Captación y localización intracelular (*in vitro*) mediante microscopía de fluorescencia.
- ✚ Análisis topográfico mediante microscopía de fuerza atómica (MFA).
- ✚ Determinación de potencial Z ( $\zeta$ -potential).
- ✚ Acoplamiento molecular

**4. Evaluar el efecto de la interacción de NP CdS-dex con plaquetas:**

- ✚ Ensayo de agregación plaquetaria.
- ✚ Captación y localización intracelular (*in vitro*) mediante microscopía de fluorescencia.
- ✚ Análisis topográfico mediante microscopía de fuerza atómica (MFA).

**5. Evaluar el efecto de la interacción de NP de CdS-Dex macrófagos (Raw 264.7):**

- ✚ Ensayo de viabilidad celular.
- ✚ Captación y localización intracelular (*in vitro*) mediante microscopía de fluorescencia.
- ✚ Producción de óxido nítrico (NO)
- ✚ Inducción de fagocitosis.

## **6. Metodología**

### **6.1 Proyecto en colaboración.**

Este proyecto se realizó en colaboración con el laboratorio 6 de Farmacología, Toxicología e Inmunomoduladores de la Facultad de Farmacia-UAEM y el Departamento de Física del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (**CINVESTAV**).

También se contó con el apoyo del laboratorio de Ingeniería Ambiental, Nanoestructuras y Semiconductores del Centro de Investigación en Ingeniería y Ciencias Aplicadas (**CIICAp**) de la UAEM y el Departamento de Biofísica del Instituto de Ciencias Físicas (**ICF**) de la UNAM

### **6.2 Nanopartículas de CdS-Dextrina (NP CdS-Dex).**

Los puntos cuánticos de sulfuro de cadmio cubiertos con dextrina se prepararon de acuerdo con el procedimiento reportado anteriormente (Reyes-Esparza et al., 2015).

### **6.3 Línea celular**

Para los ensayos de este proyecto se utilizó la línea celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) las cuales son células transformadas (leucemia murina de Abelson). Estas células fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM HG), suplementado con 2 mM de L-glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales y 1 mM de piruvato de sodio, 10% de suero fetal bovino (SFB), a 37°C y 5.0% de CO<sub>2</sub>. Todos los reactivos de cultivo celular fueron adquiridos de GIBCO® life technologies™ (Nueva York, EE. UU.).

Se realizaron pases celulares 2 veces por semana (dependiente del crecimiento del cultivo) y se sembraban 500,000 por pase (dependiendo de la confluencia celular). Las células se descongelaron a partir de crioviales. Para descongelar las células que están en crioviales, se debe esperar a que el medio estuviera completamente líquido. Posteriormente, se transfirieron a un tubo de 15 mL con 3 mL de medio y se centrifugaron a 1000 rpm a 25°C por 5 minutos. A continuación, se decantó el sobrenadante con cuidado de no llevarnos el pellet y sin tocar superficies para evitar contaminación. Se añadió 1 mL de medio suplementado y se homogenizó con micropipeta hasta solubilizar el pellet. Se pasaron las células solubilizadas en el medio suplementado (5 o 10 mL) a una caja de cultivo debidamente rotulado (Nombre de línea, fecha). Se incubaron a  $37 \pm 1$  °C en una atmósfera de  $5 \pm 0.5\%$  de CO<sub>2</sub>.

Una vez que se alcanzó una confluencia celular de aproximadamente 80-90% en el plato de cultivo, las células RAW264.7 se recolectaron y se utilizaron para los diferentes ensayos. El pase celular se realizó retirando cuidadosamente el medio suplementado que contenían. Se realizaron tres lavados a las células con PBS 1X (para platos de 5 mL con 500 µL y para el de 10 mL con 1000 µL). Se añadió tripsina (se utilizó el mismo volumen que el PBS 1X) para poder despegarlas del plato. Se añadió medio de pase sin suplementos (se agregó el doble del volumen utilizado de tripsina para desactivar) y se recolectaron las células en un tubo para centrífuga. Después se centrifugó las células (1000 rpm, 5 minutos a 25 °C), se resuspendieron con medio suplementado y se contaron con ayuda de una cámara de Neubauer. Se realizaron los cálculos correspondientes para cada ensayo dependiendo del número de células a utilizar.

#### **6.4 Animales y obtención de sangre.**

En un cuarto especial para alojamiento de animales de experimentación, se colocaron ratas Wistar macho sanas (20) (100-150 g.) (Bioterio CÍRCULO ADN S.A. de C.V.), con luz y temperatura controladas ( $22 \pm 1$ °C). Se alimentaron con agua y gránulos



estándar (dieta para roedores, EE.UU.) *ad libitum*. Todos nuestros procedimientos experimentales siguieron las Guías Institucionales para la práctica en animales y la Ley de Bienestar de las Leyes Públicas del Estado de Morelos (México) y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los animales se sacrificaron bajo anestesia y luego se extrajo la sangre del corazón y se recolectó en tubos con citrato de sodio al 3.2% (Becton Dickinson Co. New Jersey, EE. UU.).

### **6.5 Determinación de la formación de la corona de proteínas de las NP de CdS-Dex en presencia de albúmina por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.**

Para esta prueba, se utilizaron las NP de CdS-Dex a diferentes concentraciones 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg/mL y se incubó con 50 µg/mL de albúmina y se agitaron en vórtex (velocidad fija) durante 10 min y se dejan incubar durante 30 minutos a 37°C, respectivamente. A continuación, se realizaron lavados con PBS 1X (frío) seguido de centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se realizó un gel de poliacrilamida electroforesis en gel (PAGE) que a continuación se describe.

La técnica consiste en la migración de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su tamaño o peso molecular. Para controlar el avance de la separación de las moléculas en la matriz y establecer un patrón de fragmentos, las moléculas deberán ser teñidas con diferentes colorantes. Se prepararon las soluciones amortiguadoras “upper” y “lower” en diferentes tubos con bis-acrilamida al 40% para un gel de SDS-PAGE al 15%. Una vez preparado el lower se agitó en el vórtex y se fue añadiendo lentamente dentro de la hendidura de los cristales previamente montados. Una vez polimerizado el lower, se agregó el upper hasta llenar la capacidad del cristal, donde se colocó un peine (1.5 mm) para la formación de los pozos. Transcurrido el tiempo de polimerización se desmontan los cristales y

se transfieren a la cámara de electroforesis, a la que previamente se le añadió la solución amortiguadora de corrida (1X).

Preparación de las muestras:

La preparación de la proteína consiste en un proceso fisico-químico, en el cual se rompen enlaces peptídicos y puentes disulfuro gracias a la acción de detergentes iónicos, reactivos reductores y altas temperaturas, los que en conjunto consiguen desnaturalizar la proteína hasta su estructura primaria.

Una vez incubadas la proteína albúmina con las NPs de CdS-Dex (antes descrito), se procedió a mezclar la proteína con la solución amortiguadora de la muestra concentrada por cuatro veces (4x) en proporción 3:1 (tres partes de la muestra y una de buffer). Nos aseguramos de que la tapa de los tubos con lámina extensible de parafina y colocamos la muestra en un termo-baño seco a una temperatura de 95°C durante 5 minutos. Finalizado el procedimiento, se retiraron los tubos del termo-baño seco y se centrifugaron por diez segundos para garantizar que la muestra se concentre en el fondo del tubo de microcentrifuga.

Se procedió a depositar cuidadosamente la muestra en los pozos del gel. Se colocó un marcador estándar de albúmina (Precision Plus Protein WesternC Standards-BioRad) para la medición del peso molecular de la muestra. Una vez finalizada la colocación de las muestras en cada pocito del gel se encendió la fuente de poder previamente conectada a la cámara de electroforesis y se comenzó a correr a un voltaje de 180 V (constantes), amperaje (no constante) y por un tiempo de entre 1-1:10 h).

Cuantificación de intensidad de bandas:

Una vez que se terminó el tiempo de corrida, se removió el gel, cuidadosamente para evitar su ruptura debido a la fragilidad del gel. Se colocó el gel en un recipiente para tinción y se agrega solución colorante de azul brillante de Coomassie por 30 minutos. Después, se retira el colorante y se hacen lavados con solución desteñidora por 1

hora. Transcurrido este tiempo, se visualizaron las bandas del gel en el analizador de imágenes de BioRad y se analizaron los datos con el programa FIJI IMAGE J (programado en Java-desarrollado en el National Institutes of Health) (Bethesda, Maryland; Estados Unidos).

### **6.6 Determinación del potencial Z asociado a la formación de la corona de proteínas de NPs de CdS-dex expuestas a albúmina.**

Para esta prueba, se utilizaron las NPs de CdS-Dex a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se incubó con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de albúmina y se agitaron en vórtex (velocidad fija), durante 10 min. Se dejaron incubar durante 30 minutos a 37°C, respectivamente. A continuación, se realizan lavados con PBS 1X (frío) seguido de centrifugación a 1200 g durante 10 minutos. A continuación, se determina el potencial Z mediante el equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instrument Inc.), el cual se basa en el fundamento de microelectroforésis Lasser-Doppler, por medio de la medición de muestra en celdas electroforéticas del mismo equipo. En donde se colocan una alícuota de cada muestra de un lado de la celda evitando derramar y se introduce en el equipo. Es importante que después de cada lectura se lave con agua estéril 3 veces y después con etanol y se deje secar para evitar errores en las lecturas. Los datos que se obtuvieron de la lectura de las muestras, se graficaron en excel (3 experimentos independientes) para su análisis.

### **6.7 Determinación del efecto de la interacción de NPs de CdS-Dex sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA)**

El ensayo se basa en la medida del tiempo que tarda en coagular un plasma descalcificado, colocado en un baño a 37°C y en presencia de un exceso de cefalina, activador y calcio. El método consiste en obtener sangre cuidadosamente, evitando estasis o espuma, y colocarla en un tubo con anticoagulante en proporción 9 + 1

(ejemplo: 4,5 ml de sangre + 0,5 ml de anticoagulante). Se mezcló suavemente. A continuación, se centrifugó y se separó el plasma antes de los 30 minutos. Para obtener el plasma se emplea anticoagulante citrato de sodio 3.2%.

Una vez obtenido el plasma, se colocan 100  $\mu$ L de plasma en una placa de 96 pozos y se trataron con NP de CdS-Dex a diferentes concentraciones (0.001 a 10  $\mu$ g/mL) y tiempos de exposición (5, 10 y 30 minutos), respectivamente. Se precalentó el Reactivo B (solución de cloruro de calcio 0.025 mol/L.) antes de realizar la prueba en el recipiente específico para el reactivo a 37°C en el equipo previamente encendido. En una cubeta para muestra se colocaron 50  $\mu$ L, también se agregó el Reactivo A (cefalina con tierra de diatomeas como activador particulado) (homogeneizado) 50  $\mu$ L. Se mezcló e incubó por 3 minutos a 37°C en el coagulómetro (WIENER LAB COL 1 K1766241). Se agregó 50  $\mu$ L del Reactivo B (previamente precalentado a 37°C). A continuación, se registró el tiempo de formación del coágulo en función de la concentración y tiempo de exposición correspondiente. Se repitió la determinación y se promedió el resultado para cada muestra.

### **6.8 Determinación del efecto de la interacción de NP de CdS-Dex sobre el tiempo de PROTROMBINA**

El método se basa en la medición del tiempo de formación del coágulo de fibrina, al agregar una tromboplastina cálcica a un plasma citratado. Se obtuvo sangre cuidadosamente, evitando estasis o espuma, y colocarla en un tubo con anticoagulante en proporción 9:1 (ejemplo: 4,5 ml de sangre + 0,5 ml de anticoagulante). Se mezcló suavemente. A continuación, se centrifugó y se separó el plasma antes de los 30 minutos. Para obtener el plasma se empleó anticoagulante citrato de sodio 3.2%.

Una vez obtenido el plasma, se colocaron 100  $\mu$ L de plasma en una placa de 96 pozos y se trataron con NPs de CdS-Dex a diferentes concentraciones (0.001 a 10  $\mu$ g/mL)

y tiempos de exposición (5, 10 y 30 minutos), respectivamente. Se precalentó el Reactivo A (liofilizado de tromboplastina de cerebro de conejo con una concentración final de 10 mM de cloruro de calcio) a 37°C (no más de 20 minutos) Soluplastin C 870890022 / 02 p. 2/11. En una cubeta precalentada a 37°C, se colocaron 50 µL de muestra. Se incubó 1 minuto en el coagulómetro (WIENER LAB COL 1 K1766241) previamente encendido a 37°C. Transcurrido este tiempo, se colocó la cubeta dentro del lector y se agregaron 100 µL del Reactivo A previamente precalentado. A continuación, se registró el tiempo de formación del coágulo en función de la concentración y tiempo de exposición correspondiente. Se repitió la determinación y se promedió el resultado para cada muestra.

### **6.9 Determinación del efecto de la interacción de NP de CdS-Dex sobre la concentración de fibrinógeno.**

El ensayo se basa en el método de Clauss, designado como procedimiento de referencia por el NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*). Cuando un exceso de trombina se adiciona a un plasma diluido, el tiempo de coagulación es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno plasmático. El tiempo de coagulación obtenido se compara posteriormente con una preparación de fibrinógeno estandarizada.

El método consiste en obtener sangre cuidadosamente, evitando estasis o espuma, y colocarla en un tubo con anticoagulante en proporción 9:1. Se mezcló suavemente. A continuación, se centrifugó y se separó el plasma antes de los 30 minutos. Para obtener el plasma se emplea anticoagulante citrato de sodio 3.2%. Una vez obtenido el plasma, se colocaron 100 µL de plasma en una placa de 96 pozos y se trataron con NP de CdS-Dex a diferentes concentraciones (0.001 a 10 µg/mL) y tiempos de exposición (5, 10 y 30 minutos), respectivamente. Antes de colocar la muestra en cada celda, se precalentaron 0.2 mL de cada muestra a 37°C durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo, se colocó la cubeta en el coagulómetro (WIENER LAB COL

1 K1766241) para procesar la muestra. A continuación, se agregó 0.1 mL del reactivo (sin precalentar) de la prueba (kit). Se registró el tiempo de formación del coágulo en función de la concentración y tiempo de exposición correspondiente. Se repitió la determinación y se promedió el resultado para cada muestra.

### **6.10 Preparación de eritrocitos**

Procedimiento del método para recolectar muestra (plasma):

Se obtuvo sangre cuidadosamente (evitando estasis o trauma) y se colocó en un tubo con anticoagulante citrato de sodio al 3.2% (0.109 M). A continuación, la sangre de ratas macho Winstar obtenida se mezcló por inversión.

Para conteo de eritrocitos:

Luego, los eritrocitos se separaron por centrifugación a 1000 rpm durante 15 minutos. Con la ayuda de una pipeta de toma para eritrocitos, se aspiró sangre (por capilaridad) hasta la marca de 0.5. A continuación, se aforó con buffer KCl 150mM + Tris 3mM hasta la marca de 101. Se mezcló por inversión y se desecharon las primeras 5 gotas (para tener uniformidad en la muestra). Con la misma pipeta de toma, se cargó la cámara de Neubauer y se realizó el conteo de eritrocitos. Se tomó una alícuota que contenga  $1 \times 10^7$  células y se colocaron en tubos de 15 mL. Después se resuspendió con buffer de KCl 150mM + Tris 3mM para cada concentración [0.001, 0.1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ ]. Se agregó un control positivo con NaCl 35mM. Una vez ya preparadas las muestras, se dejó incubando a temperatura ambiente por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 1200 g durante 1 minuto. El sobrenadante y los eritrocitos se recolectaron por separado para los ensayos de hemólisis, análisis topográfico, localización y determinación del potencial  $\zeta$  que a continuación se describen, respectivamente.

### **6.11 Determinación del efecto hemolítico de NPs de CdS-Dex sobre eritrocitos de ratas wistar macho *in vitro*.**

El método consiste en resuspender  $1 \times 10^7$  eritrocitos con una solución amortiguadora de KCl 150 mM + Tris 3 mM y se incubaron con CdS-dextrina a concentraciones de 0,01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Durante 30 minutos de exposición. Como grupo control positivo se utilizó una solución amortiguadora de NaCl 35 mM. A continuación, se recolectó el sobrenadante, se transfirió a una placa de 96 pozos y se midió la cantidad de hemoglobina en un espectrofotómetro (Lector de placas multimodo VICTOR X3 PerkinElmer, Massachusetts, EE. UU.) a una longitud de onda de 550 nm. Los resultados se expresaron como el porcentaje de hemólisis en comparación con el grupo de hemólisis. Se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  en comparación con el grupo de hemólisis.

### **6.12 Análisis topográfico de eritrocitos por microscopia de fuerza atómica.**

Se resuspendieron  $1 \times 10^7$  eritrocitos con una solución amortiguadora de KCl 150 mM + Tris 3 mM y se incubaron con NP de CdS-Dex a concentraciones de 0,01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Durante 30 minutos de exposición. Como grupo control positivo se utilizó una solución amortiguadora de NaCl 35 mM. A continuación, los eritrocitos se trataron con NP de CdS-dextrina a diferentes concentraciones (0,1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubaron nuevamente durante 30 y 60 min. Pasado este tiempo, se tomaron alícuotas de aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  y se realizaron frotis en seco. Después, sobre un portaobjetos, se colocó una gota de glicerol al 10% (aproximadamente 12  $\mu\text{L}$ ) y se fijó el cubreobjetos de manera que la monocapa de células quedara sobre la gota. Se selló el cubreobjetos sobre el portaobjetos con barníz transparente y se dejó secar 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de secado, se utilizó un microscopio de fuerza atómica XE-Bio (Park Systems Co., Suwan, Corea) para obtener imágenes

topográficas de las plaquetas con software XEP y XEI de Park Systems para analizar los datos. Se utilizaron “cantilevers” de nitruro de silicio PPP-NCHR con constante de resorte nominal de 42 N/m de nanosensores en modo sin contacto y “cantilevers” de nitruro de silicio DNP-S-D con constante de resorte nominal de 0,06 N/m (Bruker, EE. UU.) Los “cantilevers” DNP-S-D se calibraron utilizando la rutina del método térmico incorporada en el software XEI. Las representaciones topográficas se obtuvieron a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Las imágenes son de 256 píxeles x 256 píxeles y se tomaron a una frecuencia entre 1,5 y 3,5 Hz. Los barridos realizados en el modo de contacto se llevaron a cabo con fuerzas de carga inferiores a 1 nN. Las imágenes mostradas corresponden a una muestra típica.

### **6.13 Determinación del potencial Z ( $\zeta$ ) asociado a la pérdida de la funcionalidad de eritrocitos tratados con NPs de CdS-dex.**

Se resuspendieron  $1 \times 10^7$  eritrocitos con una solución amortiguadora de KCl 150 mM + Tris 3 mM y se incubaron con NP de CdS-Dex a concentraciones de 0,01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Los eritrocitos tratados, se dejaron incubar durante 30 minutos. Como grupo control positivo se utilizó una solución amortiguadora de NaCl 35 mM. La prueba consiste en realizar un lavado a los eritrocitos previamente obtenidos y se resuspenden con una solución amortiguadora de fosfato al 10%, pH 7.5. Después, los eritrocitos se incubaron con NP de CdS-dextrina a diferentes concentraciones (0,1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se determinó el potencial  $\zeta$  utilizando un Zetasizer, que se basa en la técnica de microelectroforesis Lasser-Doppler (Tokumasu F, *et.al.*, 2009). El potencial  $\zeta$  se midió indirectamente controlando la velocidad de las partículas con un láser, que permite medir la motilidad electroforética de los eritrocitos. Para este ensayo se utilizó el equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instrument Inc., Westborough, EE. UU.). Los resultados se analizaron utilizando el software de tecnología de dispersión 6.2 (Malvern Instrument Inc., Westborough, EE. UU.). Se determinó el potencial  $\zeta$  de eritrocitos de dos



experimentos independientes. Los datos se graficaron y se representaron como la media  $\pm$  DE. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

#### **6.14 Determinación de la captación y localización intracelular de NP de CdS-Dex en eritrocitos por microscopía confocal de fluorescencia.**

Para esta prueba se utilizaron ( $1 \times 10^7$ ) eritrocitos, se resuspendieron  $1 \times 10^7$  eritrocitos con una solución amortiguadora de KCl 150 mM + Tris 3 mM y se incubaron con CdS-Dex concentraciones de 0,01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  por 30 minutos. Como grupo control positivo se utilizó una solución amortiguadora de NaCl 35 mM. A continuación, se trataron con NPs de CdS-dextrina 0,1, 1, 10, 1 y 00  $\mu\text{g/mL}$  durante 30 min. Los eritrocitos empleados para verificar la captación y localización se cultivaron durante 10 min, se lavaron con PBS y luego se incubaron con. Las células se fijaron en portaobjetos por medio de frotis en seco. Luego se analizaron microscopio confocal, utilizando el software Image-Pro Insight 9 (Digital Imaging Systems, Bourne End, Reino Unido). Las NPs de CdS-dextrina se excitaron con un láser de 488 nm y sus señales de emisión a partir de 515 nm. Los cortes se observaron bajo microscopía de fluorescencia y se analizaron.

#### **6.15 Acoplamiento molecular de la interacción de NP de CdS-dextrina con eritrocitos.**

En este ensayo se utilizó el transportador de glucosa humano GLUT1 (ID de PDB: 4PYP). Este transportador GLUT1 se colocó en una membrana con 75/25 de 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y colesterol, respectivamente. La orientación de GLUT1 se realizó siguiendo la base de datos de Orientaciones de Proteína en Membrana (OPM) (Lomize, *et.al.*, 2012). El sistema GLUT1 se construyó utilizando el servidor charmm-gui (Wu, Dávila-Contreras, Im, 2014). La concentración de sal fue de KCl 0.15 M. El sistema completo se equilibró con Gromacs 2019.2 siguiendo las

entradas arrojadas por el servidor charmm-gui utilizando los parámetros charmm36. La última estructura después de la estabilización del sistema se utilizó como receptor para estudios de acoplamiento molecular. Se realizaron 50 corridas de acoplamiento en ciego independientes de GLUT1 sobre la región extracelular (según la base de datos OPM) empleando Autodock vina 1.12 (Huang, D MacKerell, 2013). Para este ensayo se utilizó una caja de  $45 \times 45 \times 23 \text{ \AA}$  con un espaciado de  $0.375 \text{ \AA}$ . Se construyeron dextrinas de 6 y 12 carbonos utilizando el servidor charmm-gui empleando la opción de modelo y lector de glicanos. Ambos glicanos se solvataron y equilibraron con NAMD 2.12 utilizando entradas proporcionadas por charmm-gui. Ambos sistemas se prepararon en Pymol 2.3.0 utilizando el complemento Autodock Vina para pymol (Seeliger, D., and de Groot, B. L., 2010). Las imágenes de los complementos se crearon utilizando Maestro (Trott, Olson, 2010) y VMD (Sang-Jun Park, *et.al.*, 2017).

#### **6.16 Determinación del efecto de la interacción de NPs de CdS/Dex sobre la agregación plaquetaria.**

Procedimiento del método para recolectar muestra (plasma):

Se obtuvo sangre cuidadosamente (evitando estasis o trauma) y se colocó en un tubo con anticoagulante citrato de sodio al 3.2% (0.109 M). Para la prueba de identificación de la captación de las NPs de CdS-Dex, la sangre se cambió a tubos de 15 mL (Corning Incorporated Costar) y se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos para separar eritrocitos. Para obtener plasma rico en plaquetas (PRP) se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos y se tomó el sobrenadante. A continuación, se volvió a centrifugar el sobrenadante a 3000 rpm a 15 minutos y se decantó el sobrenadante, quedando las plaquetas en el fondo del tubo. Como control positivo de agregación plaquetaria, se utilizó colágeno a una concentración de 0.19 mg/mL y un grupo control sin tratamiento para eritrocitos y plaquetas, respectivamente. Se prepararon las plaquetas por separado y se trataron con NP de CdS-Dex a concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  y se incubó nuevamente durante 30 minutos.

Transcurrido este tiempo, se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  y se colocaron en una placa de 96 pozos (Corning Incorporated Costar) y se analizó en un espectrofotómetro (Multimode plate Reader VICTOR X3 PerkinElmer) a una longitud de onda de 550 nm. Los datos obtenidos se graficaron, para su análisis. Los resultados se expresaron como el porcentaje de agregación plaquetaria en comparación con el grupo de agregación plaquetaria inducida por colágena.

### **6.17 Determinación de la captación y localización intracelular de NP de CdS-Dex en plaquetas por microscopía confocal de fluorescencia.**

Siguiendo el mismo procedimiento de obtención de plaquetas antes mencionado, se tomaron alícuotas de aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  y se realizaron frotis en seco. Después, sobre un portaobjetos, se colocó una gota de glicerol al 10% (aproximadamente 12  $\mu\text{L}$ ) y se fijó el cubreobjetos de manera que la monocapa de células quedara sobre la gota. Por último, se selló con barniz transparente y se tomaron fotografías en tres modalidades: visible, fluorescencia y superposición, con un objetivo de 100X en inmersión de aceite mediante Microscopio Confocal Olympus FV100 Invertido para adquisición de imágenes de alta resolución (3D) en muestras vivas o fijadas.

### **6.18 Análisis topográfico de plaquetas por microscopía de fuerza atómica.**

Las laminillas obtenidas anteriormente se utilizaron para el análisis topográfico por microscopía de fuerza atómica (AFM). Para esto se utilizó un microscopio de fuerza atómica XE-Bio (Park Systems Co., Suwan, Corea) para obtener imágenes topográficas de las plaquetas con software XEP y XEI de Park Systems para analizar los datos. Se utilizaron “cantilevers” de nitruro de silicio PPP-NCHR con constante de resorte nominal de 42 N/m de nanosensores en modo sin contacto y “cantilevers” de nitruro de silicio DNP-S-D con constante de resorte nominal de 0,06 N/m (Bruker, EE. UU.) En el modo de contacto. Los “cantilevers” DNP-S-D se calibraron utilizando la rutina del método térmico incorporada en el software XEI. Las representaciones

topográficas se obtuvieron a  $21\pm 1^\circ\text{C}$ . Las imágenes son de 256 píxeles x 256 píxeles y se tomaron a una frecuencia entre 1.5 y 3.5 Hz. Los barridos realizados en el modo de contacto se llevaron a cabo con fuerzas de carga inferiores a 1 nN. Las imágenes mostradas corresponden a una muestra típica.

### **6.19 Ensayo del efecto de de las NP de CdS-Dex sobre la viabilidad celular en células Raw 264.7.**

Para este ensayo, se empleó el ensayo colorimétrico por medio de la técnica de MTS, la cual se fundamenta en la conversión de dicho colorante a un precipitado insoluble llamado formazán. Este se usa como el indicador de la función mitocondrial en células vivas, el cual mide la capacidad metabólica en las células y sirve como indicador de citotoxicidad. Ha sido reportado que los resultados de esta prueba son comparables en sensibilidad con aquellos obtenidos usando la incorporación de [ $^3\text{H}$ ].

La prueba consiste en sembrar 10,000 células por pozo en placas de 96 pozos (Corning Incorporated Costar) en medio de acuerdo a cada línea celular, respectivamente e incubarlas (Nuair autoflow CO<sub>2</sub> water-jacketed incubator) durante 24 h a 37°C y 5.0 % de CO<sub>2</sub>. Se incluyeron diferentes concentraciones de tratamiento: 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg/ml de NP de CdS-Dex. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron tratadas e incubadas un lapso de 24h más. Pasando el tiempo de incubación con los tratamientos, se aspiró con cuidado el medio y se agregó 20 µL por cada 100 de tratamiento con medio de pase (medio sin suplementos, sin antibiótico a temperatura ambiente y sin tratamiento). Se incubó por 3 horas bajo las mismas condiciones ya mencionadas. Transcurrido este tiempo se leyó en un espectrofotómetro (Multimode Plate Reader VICTOR X3 PerkinElmer) a una longitud de onda de 550 nm. Los datos obtenidos se graficaron para su análisis.

### **6.20 Determinación de la captación de NP de CdS-Dex por macrófagos RAW 264.7 mediante microscopía confocal de fluorescencia.**

Para la prueba de identificación de la captación de las NP de CdS-Dex, se sembraron 250,000 células Raw 264.7 en placas de 6 pozos (Corning Incorporated Costar) a los que previamente se les colocó un cubreobjetos estéril (para que se adhieran en la superficie) y se dejó incubar durante 24 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Nuair autoflow CO<sub>2</sub> water-jacketed incubator). Después de este tiempo, se trataron con NP de CdS-Dex a diferentes concentraciones 0.01, 0.1, 1, 1, 10, 100, 1000 µg/mL y después incubamos nuevamente durante 24 h. Incluimos un grupo control sin tratamiento. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio con tratamiento y realizamos dos lavados con PBS estéril 1X a temperatura ambiente. A continuación, agregamos 1 mL de formaldehído al 3.7% por pozo para fijar las células, por 20 minutos a temperatura ambiente. Después, se retiró el formaldehído y realizamos tres lavados con PBS 1X por cada pozo para evitar residuos de formaldehído. Una vez que agregamos el PBS por tercera vez se dejó en los pozos y metemos la placa en refrigeración (4°C) por 1 hora. Transcurrido este tiempo, cuidadosamente; sobre un portaobjetos, se colocó una gota de glicerol al 10% (aproximadamente 12 µL) y se fijó el cubreobjetos sobre de manera que la monocapa de células quedara sobre la gota. Por último, se selló con barníz transparente y se tomaron fotografías en tres modalidades: visible, fluorescencia y superposición, con un objetivo de 100X en inmersión de aceite mediante Microscopio Confocal Olympus FV100 Invertido para adquisición de imágenes de alta resolución (3D) en muestras vivas o fijadas.

### **6.21 Determinación del efecto de NP de CdS-dex sobre la producción de ON inducida en macrófagos RAW 264.7.**

Se sembraron 10,000 células Raw 264.7 en placas de 96 pozos (Corning Incorporated Costar) y se dejó incubar durante 24h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Nuair autoflow CO<sub>2</sub> water-jacketed incubator). Después de este tiempo, se trataron con NP de CdS-Dex a

diferentes concentraciones 0.01, 0.1, 1, 1, 10, 100 Y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se incluyó un grupo control sin tratamiento (negativo) y un control de células con LPS (lipopolisacárido) [10  $\text{mg}/\text{mL}$ ], para inducir producción de ON (positivo). El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor del kit para detección de ON (PROMEGA G2930). La técnica consiste en medir el nitrito ( $\text{NO}_2$ ), que es uno de los dos productos de descomposición primarios, estables y no volátiles de ON. Este ensayo se basa en una reacción de diazotación que se describió originalmente por Griess en 1879 (Griess, P., 1879). La técnica consiste en una reacción química usando sulfanilamida y diclorhidrato de N-1-naftiletilendiamina (NED) en condiciones ácidas (ácido fosfórico). El límite de detección es 2.5  $\mu\text{M}$  (125 pmol) de nitrito (en agua desionizada).

## **6.22 Determinación del efecto fagocítico inducido por NPs de CdS-dex en macrófagos RAW 264.7**

### Preparación de *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras se tomaron de un sobre comercial y se resuspendieron en 10 mL de PBS (1X) en un tubo para centrífuga. Se colocó un vaso de precipitado con 50 mL de agua desionizada y se llevó a una temperatura entre 95-100°C. Después, se sumergió el tubo por 10 min. A continuación, se realizó un conteo bacteriano en cámara de Neubauer. Se contaron las bacterias que estén dentro de los 25 cuadrantes de ambas cuadrículas. Se obtuvo el promedio de bacterias contadas y se multiplica el resultado por  $1 \times 10^4$ . El resultado obtenido se multiplicó por el volumen de PBS 1X en el que se resuspendieron las bacterias. Se sembraron 50,000 células Raw 264.7 en placas de 24 pozos (Corning Incorporated Costar) y se dejó incubar durante 24 h a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$  (Nuair autoflow  $\text{CO}_2$  water-jacketed incubator). Después de este tiempo, se trataron con NP de CdS-Dex a diferentes concentraciones 0.01, 0.1, 1, 1, 10, 100 Y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de la suspensión de levaduras inactivadas (agregan 5  $\mu\text{L}$  que contengan 10 levaduras por cada célula en la muestra), previamente contadas en una cámara de Neubauer. Se incluyó un grupo control sin tratamiento (negativo) y un control de células con levaduras y sin NP (control positivo). Se mezclaron suavemente y se incubaron a 37°C durante 1 h con 30 min. Transcurrido el

tiempo, se observaron por microscopía visible para realizar el análisis cualitativo y cuantitativo de 5 campos en total (50 células por cada campo por muestra).

### **6.23 Análisis estadístico.**

Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes. Los datos se procesaron mediante la prueba T (para grupos independientes) utilizando el software SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

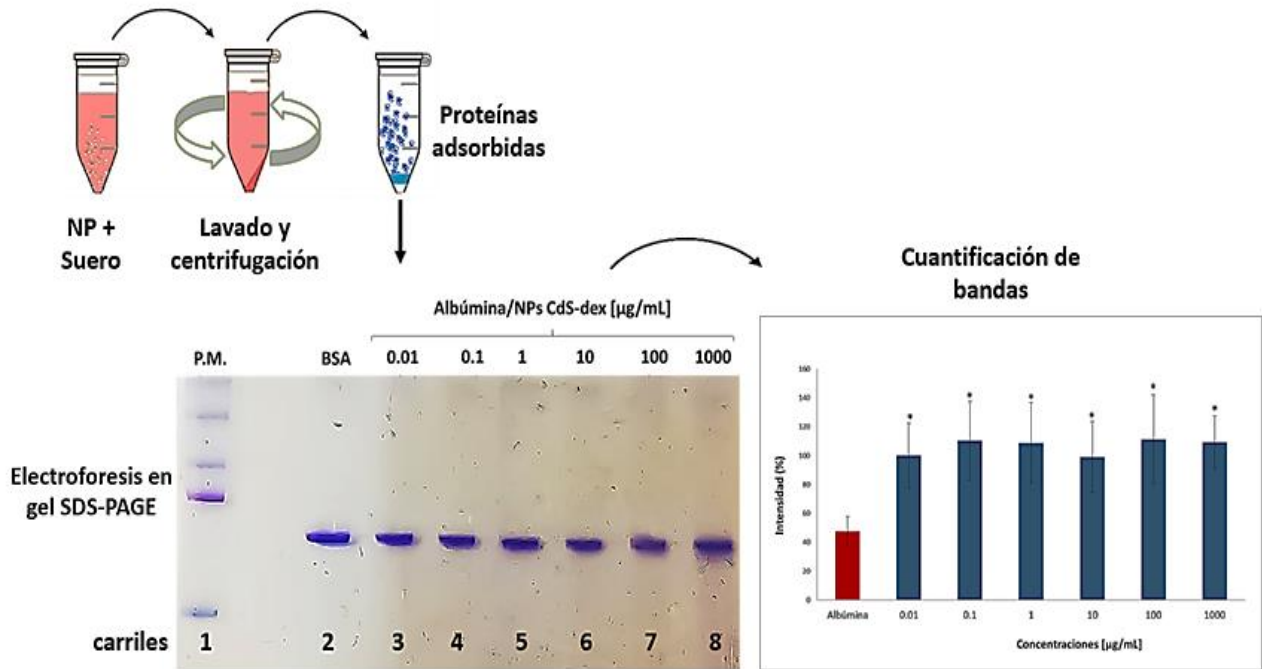
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Efecto de la interacción de NP de CdS-Dex con albúmina de suero bovino (BSA).

En la figura 24, podemos observar el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE. En donde, evaluamos si se forma la corona de proteínas, cuando las NP de CdS-Dex se incuban con albúmina de suero bovino. El control positivo correspondiente al peso molecular del suero albúmina (67 kDa), aproximadamente.

Los resultados ilustran una clara diferencia en la identidad de la formación de la corona de proteína y una tendencia evolutiva en la intensidad de la banda conforme aumenta la concentración desde bajas concentraciones desde 0.01 hasta 1000  $\mu\text{g/mL}$ , con respecto al grupo de BSA sin tratamiento. En la gráfica, podemos observar la cuantificación de la intensidad relativa de las bandas del gel de electroforesis SDS-PAGE para la identificación de la corona de proteínas tras la incubación de NP de CdS-Dex con albúmina por 30 min. De izquierda a derecha podemos observar, la primera barra corresponde a albúmina [75  $\mu\text{g/mL}$ ] sin NP con una intensidad de banda de más del 40%. A partir de la concentración de 0.01 hasta 1000  $\mu\text{g/mL}$ , esta intensidad es mayor hasta en un 30 % con respecto a lo observado en albúmina ( $p < 0,05$ ). Estos hallazgos sugieren que, la caracterización y análisis de proteínas unidas a las NP de CdS-dex es el primer paso hacia la comprensión de la verdadera naturaleza de la interacción y los efectos biológicos mediados por NP. Hasta ahora podemos destacar que a altas concentraciones las NP de CdS-Dex afectan la adsorción de las proteínas. Esto puede ser indicio de como significativamente la reactividad de las NP con algunos componentes biológicos puede marcar y determinar la ruta y la eficiencia de la absorción de NP en el organismo.

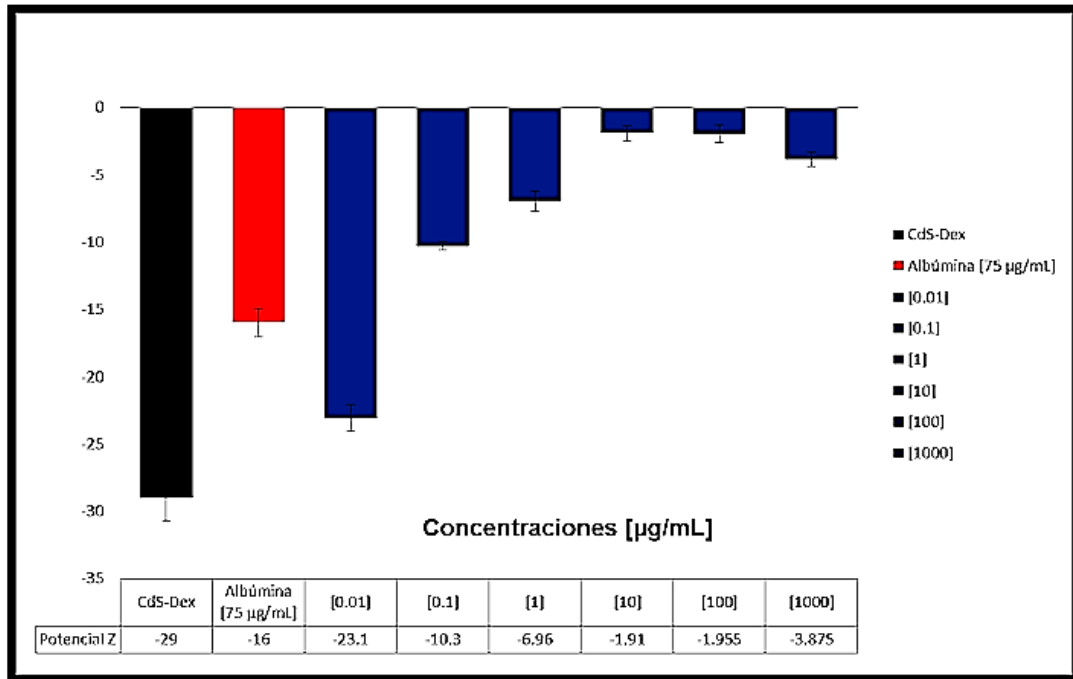




**Figura 24.** Representación esquemática de la estrategia utilizada para aislar e identificar proteínas adsorbidas en la superficie, cuando las nanopartículas interactúan con albúmina. Gel de electroforesis SDS-PAGE. De izquierda a derecha. Carril 1: Peso molecular (P.M.). Carril 2: Control Albúmina de suero bovino (BSA). Carril 3-8: Albúmina + NPs de CdS-dex a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg/mL).

## **7.2 Identificación de la formación de la corona de proteínas asociado a la dispersión del tamaño de las NP de CdS-Dex en presencia de albúmina.**

En la figura 25, de izquierda a derecha podemos observar un alto potencial Z para las NP de CdS-dex, lo cual sugiere que al ser partículas de tamaño nanométrico y tener un potencial Z de hasta -29, esto le confiere estabilidad, es decir, las nanopartículas se encuentran lo suficientemente dispersas y no forman agregados. Sin embargo, en la segunda barra podemos observar el resultado para albúmina, que, si bien no sugiere estabilidad suficiente, se encuentra dentro de los valores esperados para una molécula con tamaño mayor al nanométrico. A continuación, a partir de la concentración de 0.01 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ , podemos observar que el potencial Z es bajo, es decir, que hay una mayor atracción entre las NP de CdS-Dex y la albúmina. Este resultado que es evidente de manera concentración dependiente, sugiere que se ha dado la formación de la proteína corona, debido a que esta atracción ha superado a la repulsión NP-albúmina y ha formado flóculos, en lugar de dispersarse. Por lo tanto, las NP de CdS-dex son estables en solución, pero podría formar la corona de proteínas en presencia de una o más proteínas como se muestra en este análisis.



**Figura 25.** Gráfico de puntos cuánticos de potencial Z incubados con albúmina. Tratamiento a diferentes concentraciones [0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg/mL]. Tiempo: 30 min. La medición se evaluó usando dispersión de luz dinámica en un Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instrument Inc.).

### **7.3 Efecto de la interacción de NP de CdS-Dex sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) a 5, 10 y 30 minutos de tiempo de exposición.**

En la figura 26, podemos observar los resultados obtenidos del ensayo de determinación de los tiempos de coagulación (TTPA) que se llevó a cabo a en sangre (plasma) tratada con NP de CdS-Dex a concentraciones de 0.01 hasta 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y a diferentes tiempos de exposición (5, 10 y 30 min). En el tiempo de 5 minutos podemos observar que el efecto de estas NP sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) se reduce a partir de la concentración de 0.1 hasta 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo cual puede ser un indicativo de que ha entrado en activación la vía intrínseca de la coagulación. En el caso del minuto 10, el efecto que se observa es diferente, ya que a partir de la concentración de 0.01 hasta 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aumenta en comparación con el tiempo de 5 minutos. Aunque aún se mantiene por debajo del control de manera significativa. Sin embargo, a los 30 minutos, el TTPA se incrementa de manera significativa con respecto al grupo control, a partir de las concentraciones de 0.1 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0.05$ ).

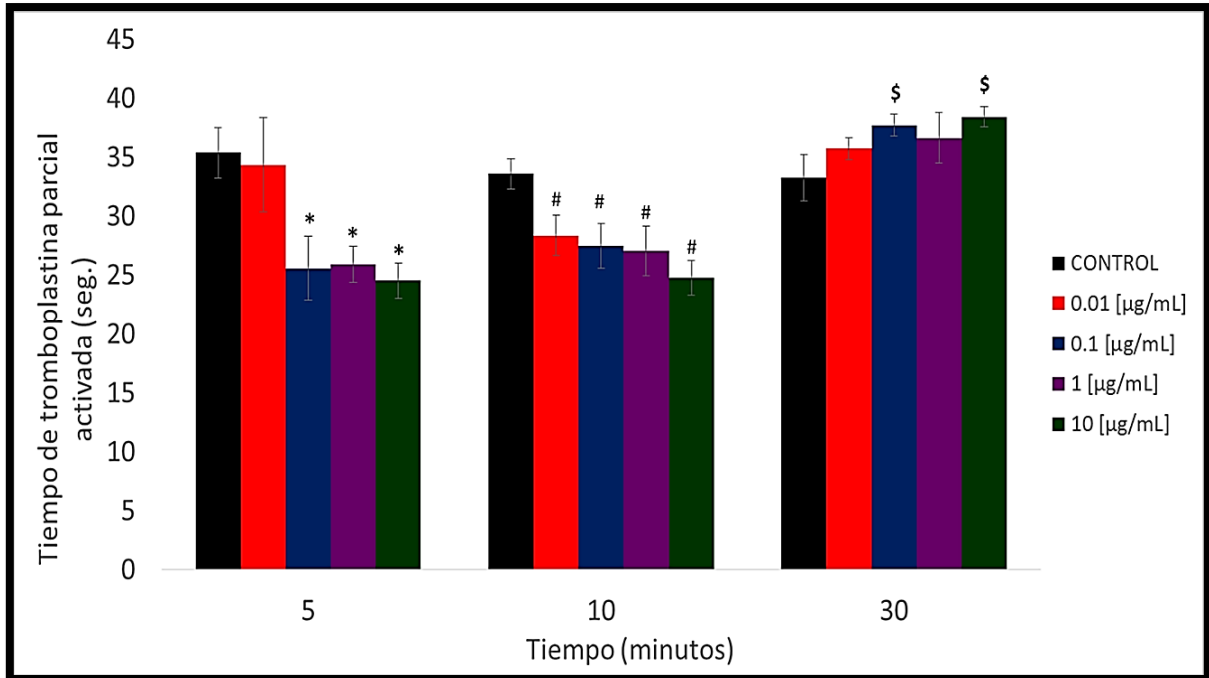


Figura 26. Efecto de NP de CdS-Dex sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada en plasma sanguíneo. Tiempo de exposición: 5, 10 y 30 minutos. Cada barra representa la media  $\pm$  DS de dos experimentos independientes. N=4. \* $p < 0.05$  con respecto al grupo control.

#### 7.4 Efecto de la interacción de NP de CdS-Dex sobre el tiempo de protrombina (PT) a 5, 10 y 30 minutos de tiempo de exposición.

En la figura 27, podemos observar el efecto de las NP de CdS-Dex sobre el tiempo de protrombina (PT). Al hacer el análisis pudimos observar que, a partir de los 5 minutos de exposición, el tiempo de protrombina se reduce en las concentraciones de 0.01 y 0.1  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, a los 10 minutos, el PT se reduce a partir de la concentración de 0.01, 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  de manera significativa con respecto al grupo control.

Cabe mencionar que, a los 10 minutos, después de una “lesión” o activación por agente extraño, se activa la vía extrínseca de la coagulación. Por lo que este hallazgo es importante destacarlo ya que la evaluación del PT es de mayor importancia clínica, es decir, es el tiempo necesario para detener una hemorragia. Por lo que se sugiere que, las NP no están alterando la vía extrínseca de la coagulación. Esto puede corroborarse con los valores obtenidos a los 30 minutos, en donde el PT aumenta con respecto al grupo control y si bien es de manera significativa, a ese tiempo ya han actuado los factores de coagulación ( $p < 0.05$ ).

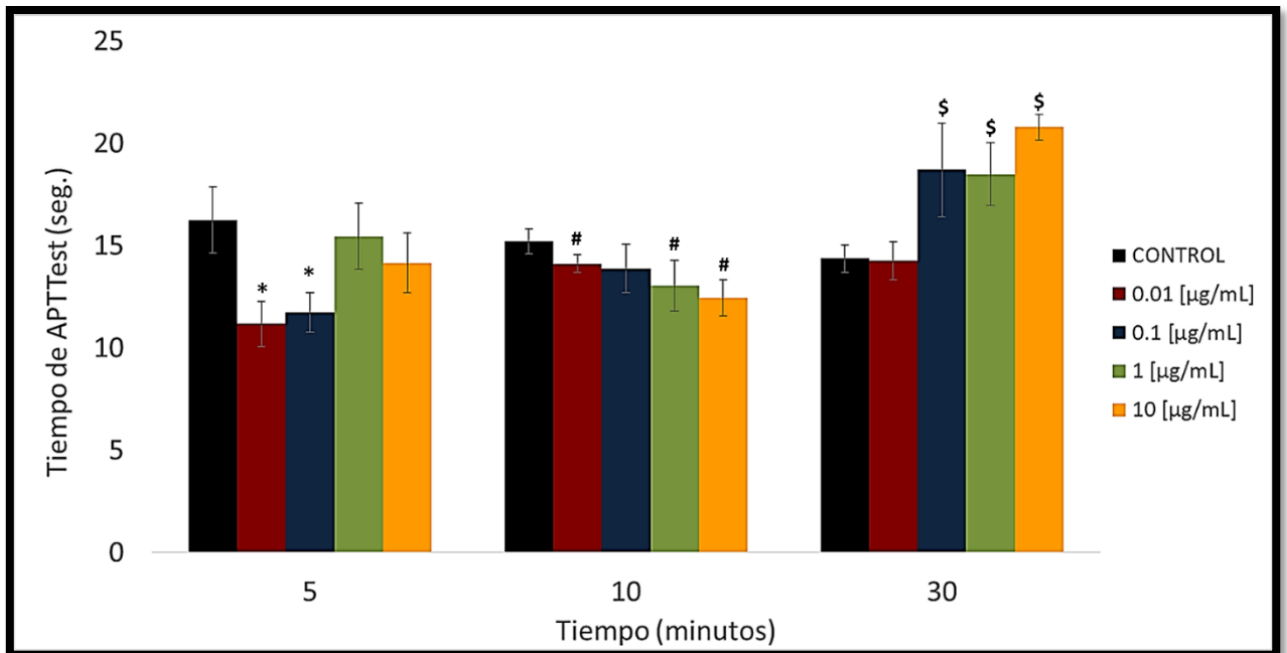


Figura 27. Efecto de NP de CdS-Dex sobre el tiempo de protrombina (PT) en plasma sanguíneo. Tiempo de exposición: 5, 10 y 30 minutos. Cada barra representa la media  $\pm$  DS de dos experimentos independientes.  $n=4$ . \* $p < 0.05$  con respecto al grupo control.

### **7.5 Efecto de la interacción de NP de CdS-Dex sobre el fibrinógeno a 5, 10 y 30 minutos de tiempo de exposición.**

En la figura 28, podemos observar los resultados obtenidos del ensayo de determinación de los tiempos de coagulación fibrinógeno que se llevó a cabo a en sangre (plasma) tratada con NP de CdS-Dex a diferentes tiempos de exposición (2, 4 y 10 min). La sangre tratada con NP desde 0.001 a 0.1  $\mu\text{g/mL}$  no causó efecto significativo con respecto al grupo control, aún a diferentes tiempos de exposición. El fibrinógeno es uno de los factores que se encuentra en mayor concentración plasmática, sus valores normales oscilan entre 200 a 400 mg/dL en adultos sanos. Sólo hubo variaciones ligeramente notorias, aunque no significativas a diferentes tiempos de exposición como el de 10 minutos, en donde se observó un incremento de los mg/dL. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta prueba sugieren que efectivamente la vía extrínseca está activada o que las NP no están ocasionando un trastorno hemorrágico o riesgo de sangrado excesivo intravascular y se relaciona con los resultados obtenidos en la prueba de PT.

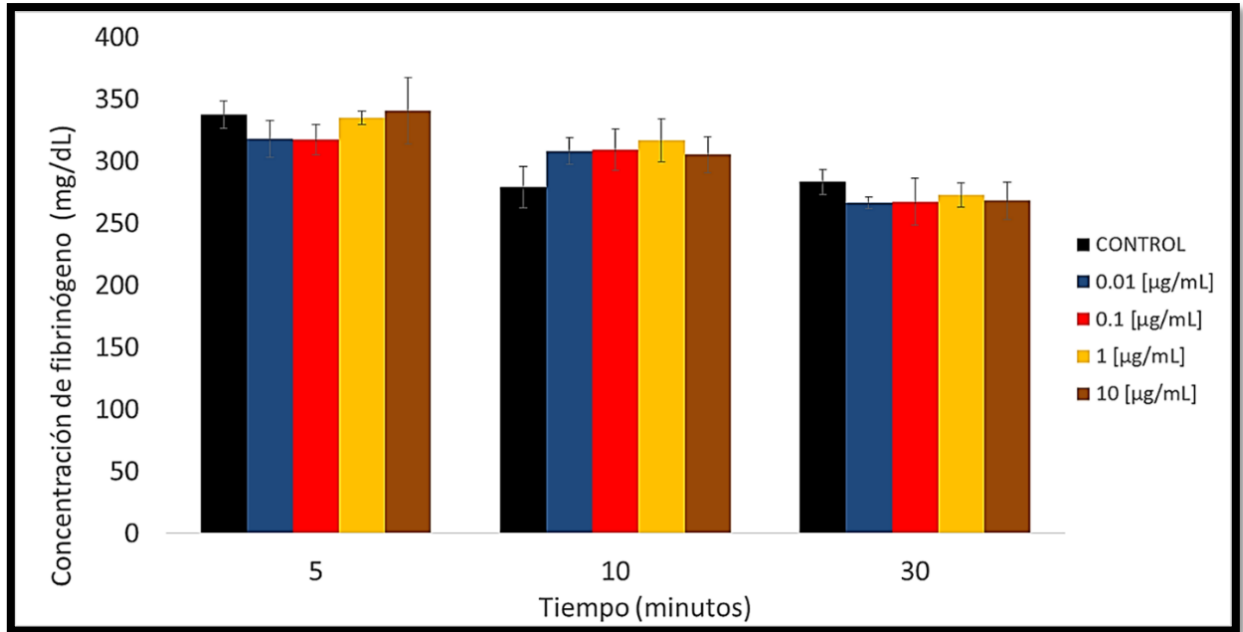


Figura 28. Efecto de NP de CdS-Dex sobre el fibrinógeno en plasma sanguíneo. Tiempo de exposición: 5, 10 y 30 minutos. Cada barra representa la media  $\pm$  DS de dos experimentos independientes.  $n=4$ . \* $p < 0.05$  con respecto al grupo control.

### 7.6 Efecto de las NP de CdS-Dex sobre plaquetas y la agregación plaquetaria.

Cuando observamos una ligera variación sobre los niveles del fibrinógeno (fig. 28), analizamos que, estos sugerían que no se afectaba la coagulación sanguínea, pero el que estos resultados no fueran significativos; podrían tener una relación con la activación de plaquetas. Esto debido a que, el fibrinógeno además de ser considerado un factor de la coagulación también es una glicoproteína que se encuentra presente en los gránulos alfa ( $\alpha$ ) de las plaquetas. Así que, a continuación, en la figura 29, podemos observar el efecto de estas NP de CdS-Dex sobre plaquetas tratadas a concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  a 30 minutos de tiempo de exposición. Las NP causaron agregación plaquetaria entre 36 y 40% a



partir de la concentración de 0.01 hasta 100  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$ ), comparado con el grupo control. En el caso de la concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  este efecto incrementó hasta 57%, significativo con respecto al grupo control. Es un hallazgo interesante, ya que como hemos descrito anteriormente, las plaquetas son esenciales para el normal desarrollo de la hemostasia y cumplen un papel importante en los desórdenes tanto trombóticos como hemorrágicos.

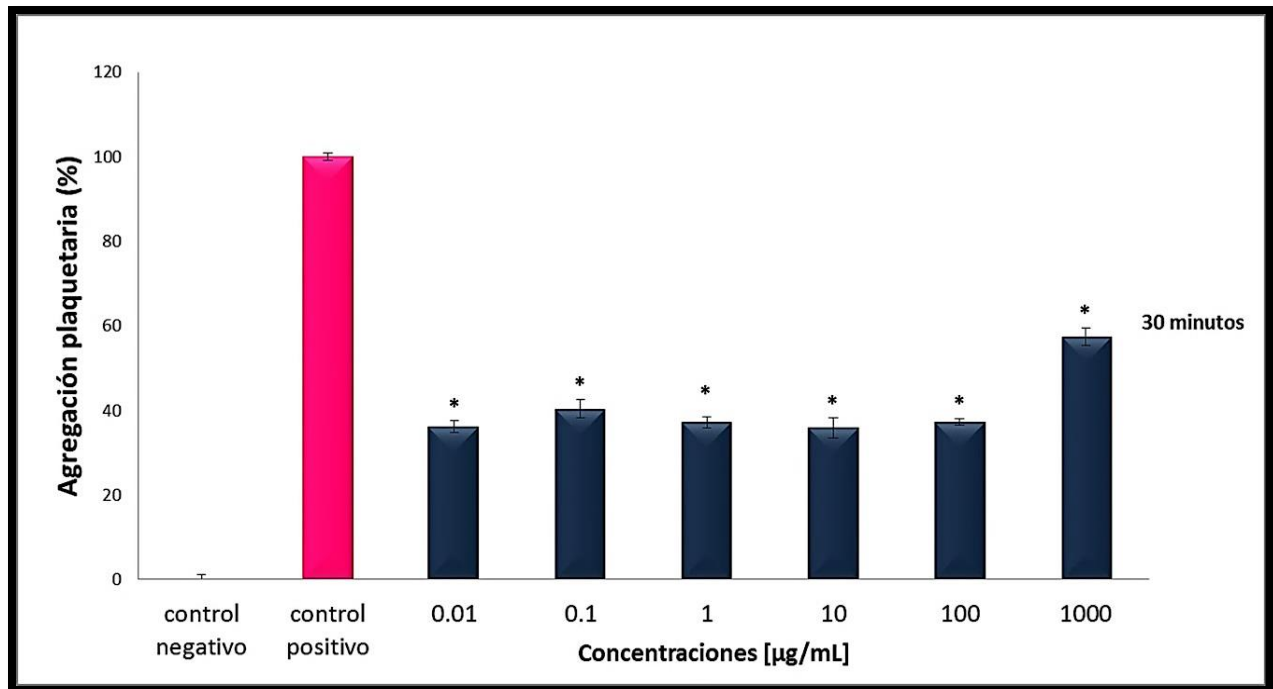


Figura 29. Efecto de NP de CdS-Dex sobre plaquetas: agregación plaquetaria. Tiempo de exposición: 30 minutos. Cada barra representa la media  $\pm$  DS de dos experimentos independientes.  $n=5$ . \* $p < 0.05$  con respecto al grupo control.

### 7.7 Identificación de la captación de NP de CdS-Dex en plaquetas, por medio de microscopia confocal de fluorescencia.

En la figura 30-1, podemos observar microfotografías tomadas con un microscopio confocal de fluorescencia, en ellas se muestra el efecto de las NP de Cds-Dex sobre plaquetas. En el inciso a, tenemos el control de plaquetas sin tratamiento para mostrar la apariencia “normal” de plaquetas no agregadas observadas en visible y fluorescencia. En el inciso b, se muestra el control de agregación plaquetaria sin emisión de fluorescencia, esta sería la apariencia de plaquetas que se han activado y comienzan a agregarse para formar un tapón plaquetario.

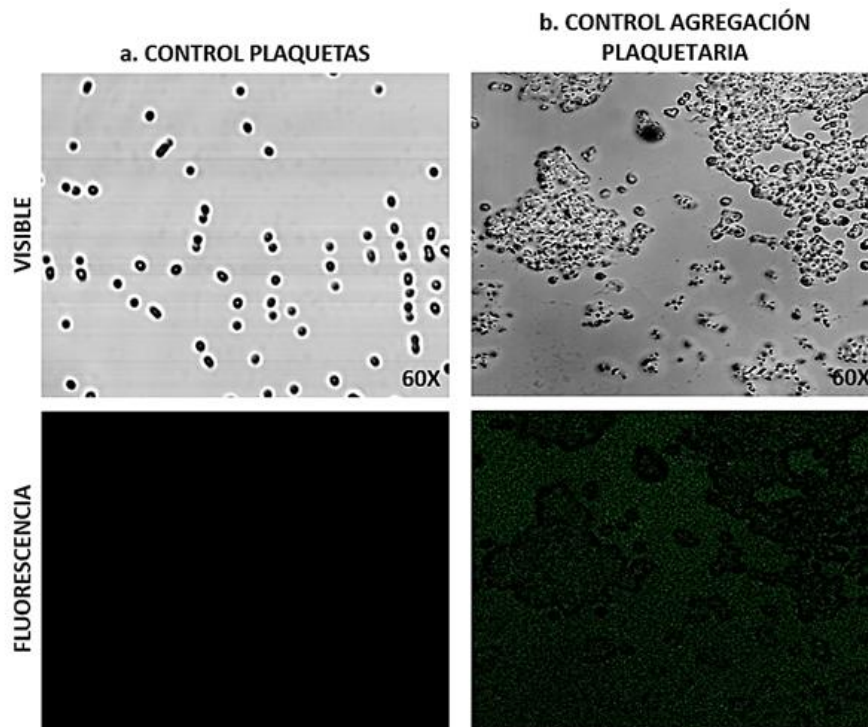
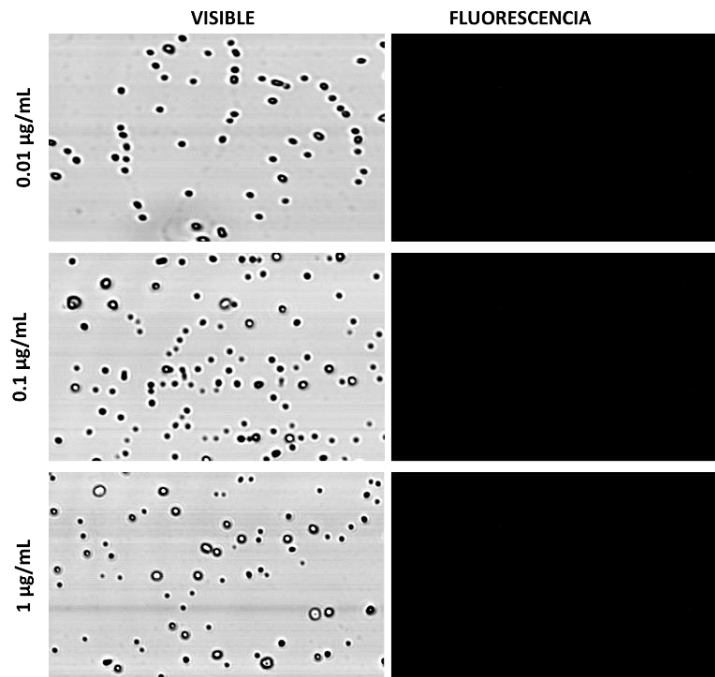


Figura 30-1. Fotografías de plaquetas y agregación plaquetaria tomadas con microscopio confocal de fluorescencia. a. Control de plaquetas sin tratamiento visible/fluorescencia. b. Control de agregación plaquetaria visible/fluorescencia. 60X + 3 Z (aumentos).

En la figura 30-2, podemos observar fotografías tomadas con un microscopio confocal de fluorescencia, en ellas se muestra el efecto de las NP de CdS-Dex sobre plaquetas. En el inciso a, tenemos el control de plaquetas sin tratamiento para mostrar la apariencia “normal” de plaquetas no agregadas observadas en visible y fluorescencia. En el inciso b, se muestra el control de agregación plaquetaria, esta sería la apariencia de plaquetas que se han activado y comienzan a agregarse para formar un tapón plaquetario. En el inciso a, podemos observar dos columnas, una en visible y la otra en fluorescencia y 3 filas de fotografías con plaquetas tratadas con NP de CdS-Dex a diferentes concentraciones de 0.01 a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En el inciso b, podemos observar dos columnas, una en visible y la otra en fluorescencia y 3 filas de fotografías con plaquetas tratadas con NP de CdS-Dex a concentraciones de 10 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En estas figuras, podemos observar el efecto de agregación plaquetaria causado por las NP de CdS-Dex, el cual se relaciona con lo cuantificado anteriormente. Sin embargo, también pudimos observar que la captación de estas NP en plaquetas se da de manera concentración dependiente. A partir de las concentraciones de 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ya se observa la fluorescencia emitida por las NP de CdS-Dex. Aunque esta intensidad es mayor a la concentración de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo que nos indicaría que las NP de CdS-Dex han sido captadas por las plaquetas. Con los resultados del efecto de las NP de CdS-Dex sobre plaquetas pudimos observar que, las NP de CdS-Dex causan agregación plaquetaria menor al 40% en concentraciones bajas desde 0.01 hasta 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y mayor al 50% sólo a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

a.



b.

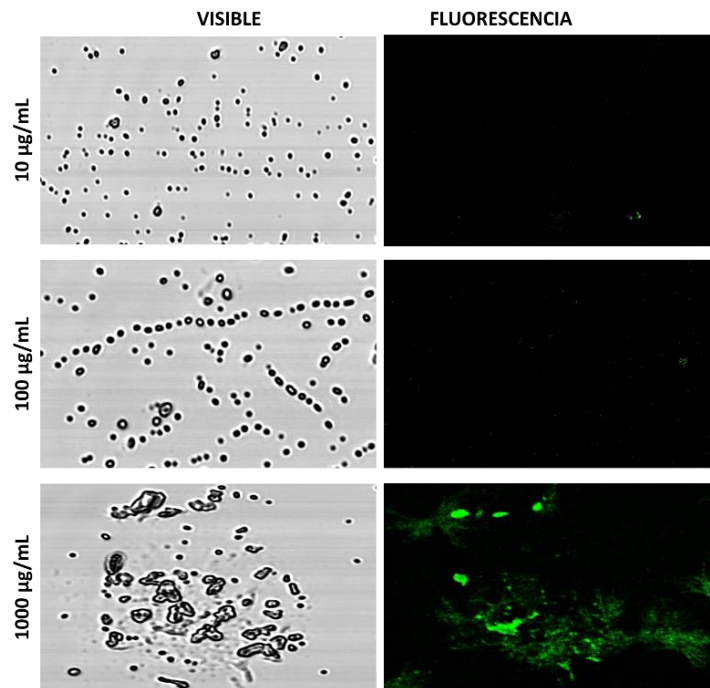


Figura 30-2. Fotografías de plaquetas y agregación plaquetaria tomadas con microscopio confocal de fluorescencia. a. Plaquetas tratadas a 0.01, 0.1 y 1 µg/mL en visible/fluorescencia. b. Plaquetas tratadas a 10, 100 y 1000 µg/mL en visible/fluorescencia. 60X + 3Z (aumentos).

### **7.8 Identificación de la agregación plaquetaria por medio del análisis topográfico en microscopia de fuerza atómica.**

En la figura 31, se observan las imágenes de reconstrucción 3D analizadas por AFM. En el inciso A) se muestra control de plaquetas sanas sin tratamiento: con morfología hexagonal, semiplanas, carente de núcleo, tamaño aproximado de entre 3-4  $\mu\text{m}$  y con bordes definidos. En el inciso B) observamos el control de agregación plaquetaria inducida con colágena [0.19 mg/mL], donde es posible observar plaquetas sin morfología aparente, tamaño irregular aproximado de entre 2 y 3  $\mu\text{m}$  y sin bordes definidos. A continuación, en los incisos C, D y E podemos observar las plaquetas tratadas a concentraciones de 0.01, 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ . En las microfotografías podemos observar que carecen de bordes definidos y morfología similar a agregados plaquetarios como el control positivo descrito anteriormente. Estos resultados sugieren que, luego de la activación, las plaquetas sufren una serie secuencial de cambios morfológicos: pueden tornarse de forma esférica irregular para poder formar un tapón plaquetario, adhesión por filopodios (proyecciones citoplasmáticas delgadas) que pueden ser cortos y largos, y finalmente, la pérdida completa de la morfología como parte de la consolidación completa de la adhesión/agregación plaquetaria (Li, Delaney, O'Brien & Du, 2010). También, estos hallazgos nos permiten relacionar con los resultados cuantitativos obtenidos en el ensayo de agregación plaquetaria y en combinación con las imágenes confocal de fluorescencia, en donde se observaban claramente la presencia de estas NP en plaquetas. Sin embargo, con el AFM se puede sugerir que, si bien estas NP causan agregación plaquetaria menor al 40% en bajas concentraciones, las características aquí observadas podrían dar constancia de que estas plaquetas se activan al interactuar con las NP y comienzan a agregarse en una especie similar a lo que sería el “tapón o mosaico plaquetario” como cuando existe una lesión vascular o alteración por un agente extraño.



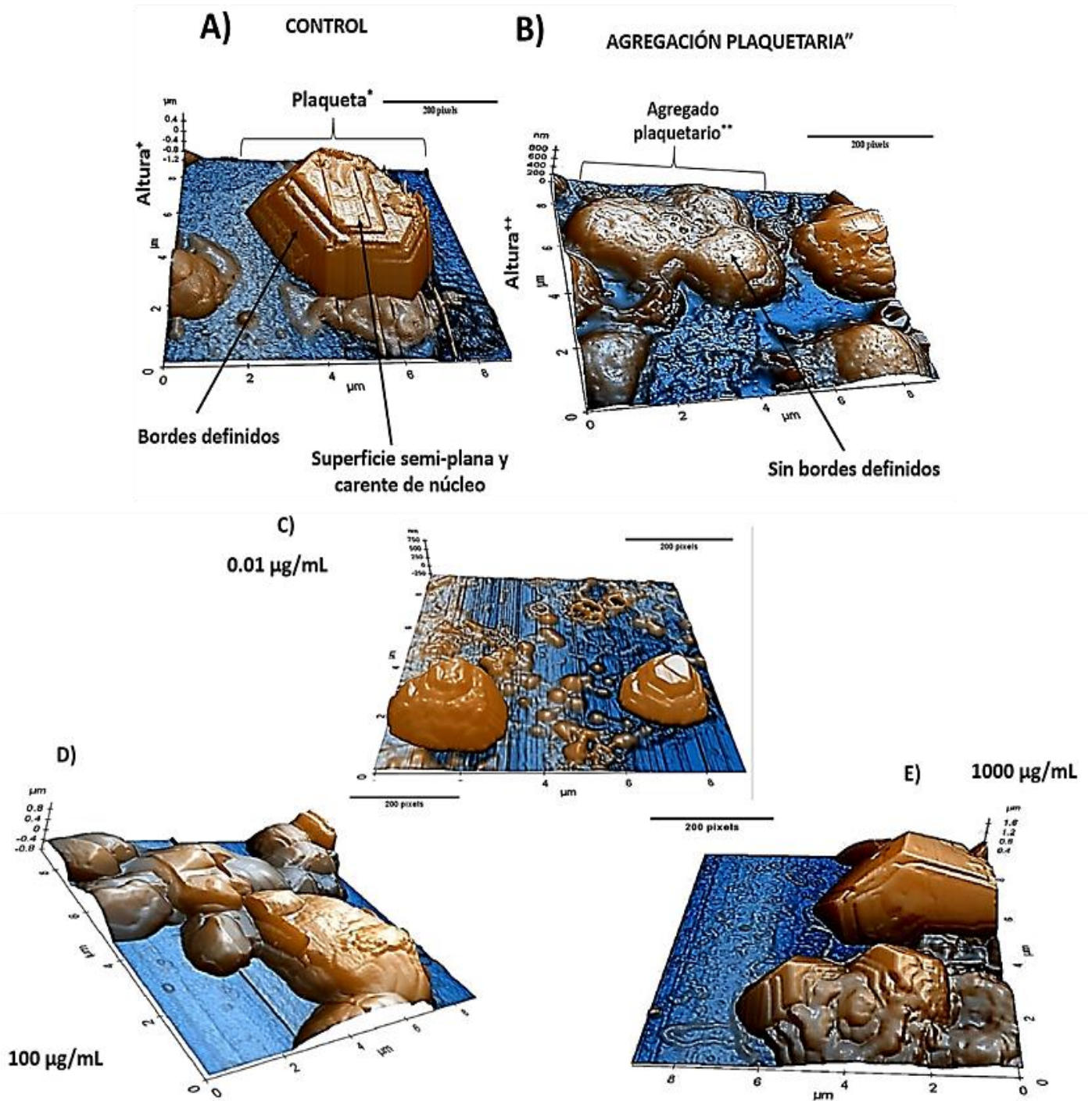


Figura 31. Análisis topográfico (3D) por AFM de plaquetas tratadas con NP de CdS-Dextrina. A) control de plaquetas sanas sin tratamiento: con morfología hexagonal, semiplanas, carente de núcleo, tamaño aproximado de entre 3-4  $\mu\text{m}$  y con bordes definidos. B) control de agregación plaquetaria inducida por colágena [0.19 mg/mL]: sin morfología aparente, tamaño irregular aproximado de entre 2 y 3  $\mu\text{m}$  y sin bordes definidos C), D) y E): Plaquetas tratadas con NP de CdS-Dextrina a concentraciones de 0.01, 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. AFM: microscopía de fuerza atómica; NPs: Nanopartículas; CdS-Dex: Sulfuro de cadmio-dextrina.

### 7.9 Efecto de las NP de CdS/Dex. sobre eritrocitos a 30 minutos de exposición.

En la Figura 32, se muestra el efecto de NP de CdS-Dex sobre eritrocitos tratados con las diferentes concentraciones (0, 01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los eritrocitos se incubaron durante 30 minutos. Se observó que las NP de CdS-Dex produjeron hemólisis (5%) en todas las concentraciones ( $p < 0.05$ ), comparado con el grupo control de hemólisis (eritrocitos tratados con NaCl 35 mM).

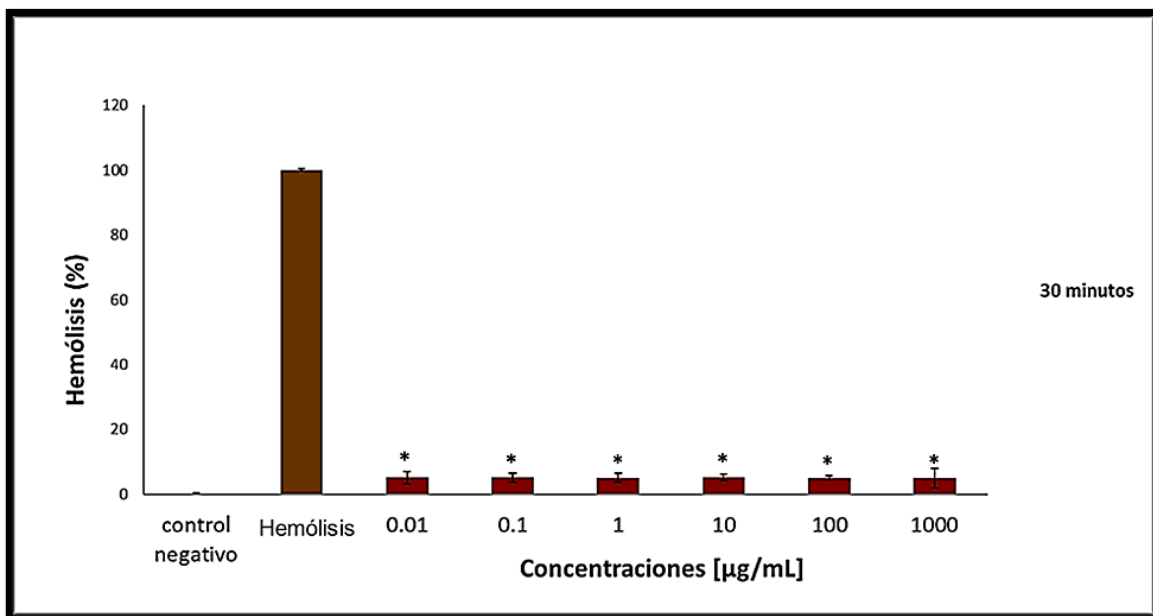
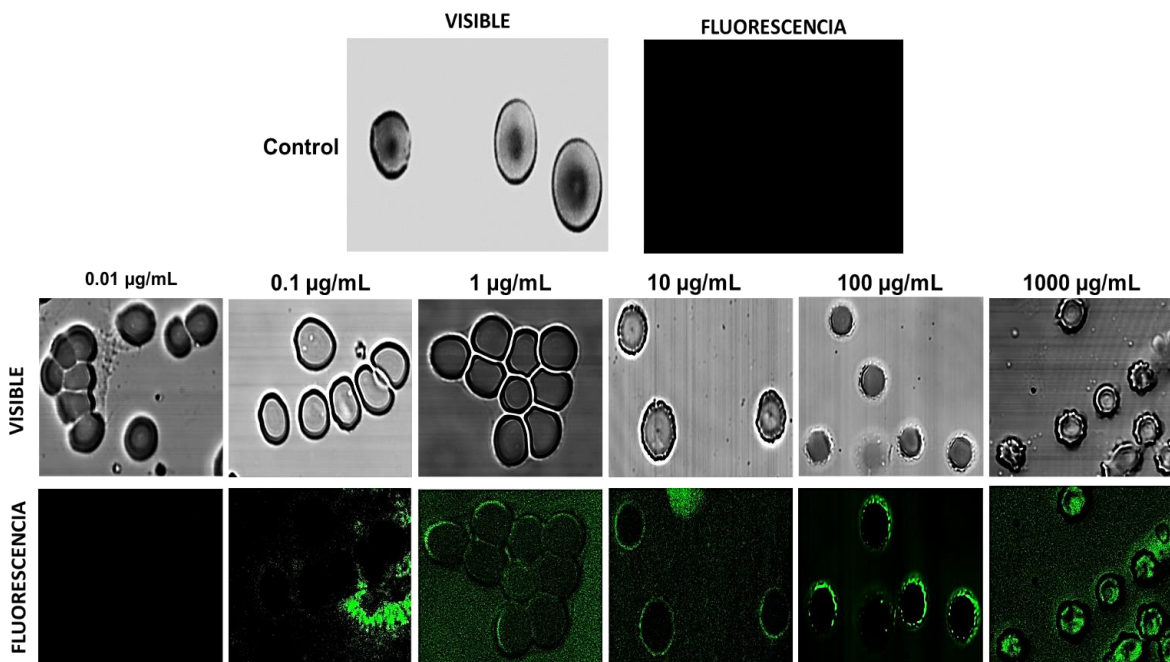


Figura 32. Efecto de NP de CdS-dex sobre la integridad de los eritrocitos. Los eritrocitos se trataron con NP de CdS-dextrina a 0, 01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 30 min. Los eritrocitos control se consideraron como células sanas sin tratamiento y el grupo de hemólisis fueron células preincubadas con NaCl 35 mM. Los resultados se expresan como el porcentaje de hemólisis en comparación con el grupo de hemólisis. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE de al menos tres experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  en comparación con el grupo de hemólisis.

### 7.10 Determinación de la captación y localización de NP de CdS-Dex en eritrocitos de ratas Wistar, por microscopía confocal de fluorescencia.

En la figura 33 se observan eritrocitos tratados con NP de CdS-dex a 0,01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 30 minutos. Los eritrocitos no tratados se observan con la morfología característica de eritrocitos sanos (bicóncavos). Cabe destacar que no se detectó fluorescencia dentro de las células, lo que sugiere que no tienen autofluorescencia. Los eritrocitos tratados con 0,01, 0,1 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NP de CdS-dextrina mostraron una fluorescencia mínima y no hubo una captación e internalización por parte de las células. Por lo contrario, los eritrocitos tratados con 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mostraron una fluorescencia a su alrededor; esto aumentó de acuerdo a la concentración de NP. Estos hallazgos sugieren que, los eritrocitos no lograron captar las NP de CdS-dextrina.



**Figura 33. Visualización en microscopía fluorescente de eritrocitos tratadoss con NP de CdS/dextrina. Los eritrocitos se incubaron durante 30 min a diferentes concentraciones (0,01, - 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se utilizó la técnica de frotis en seco y se analizaron usando un microscopio de epifluorescencia confocal. La fluorescencia verde muestra la presencia de NP alrededor de los eritrocitos.**



### **7.11 Identificación de hemólisis por medio del análisis topográfico en microscopia de fuerza atómica.**

En la figura 34, se muestran imágenes obtenidas por AFM de eritrocitos en reconstrucción 3D tratados con NP de CdS-Dex con concentraciones de 0.1, 1, y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 30 min. El inciso A, corresponde al control negativo: eritrocitos no tratados, con características típicas de una célula sanguínea sana, con morfología ovalada, bicóncava con una depresión central. En las siguientes imágenes marcadas con los incisos B, C y D, corresponden a eritrocitos tratado con 0.01, 1 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NP de CdS-Dex, respectivamente. Los eritrocitos se observan con una morfología redonda, semi planos, con grietas en su superficie y bordes no definidos. En el caso del eritrocito tratado con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NP de CdS-Dex, además de su carencia de morfología definida, se observa la presencia de abultamientos que lo hacen verse rugoso en su superficie. Por último, observamos el eritrocito tratado con 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , de morfología no definida, aplanado, con bordes rugosos, carencia de depresión central y alteraciones en su superficie. En todas las concentraciones, los eritrocitos se observaron carentes de depresión central.

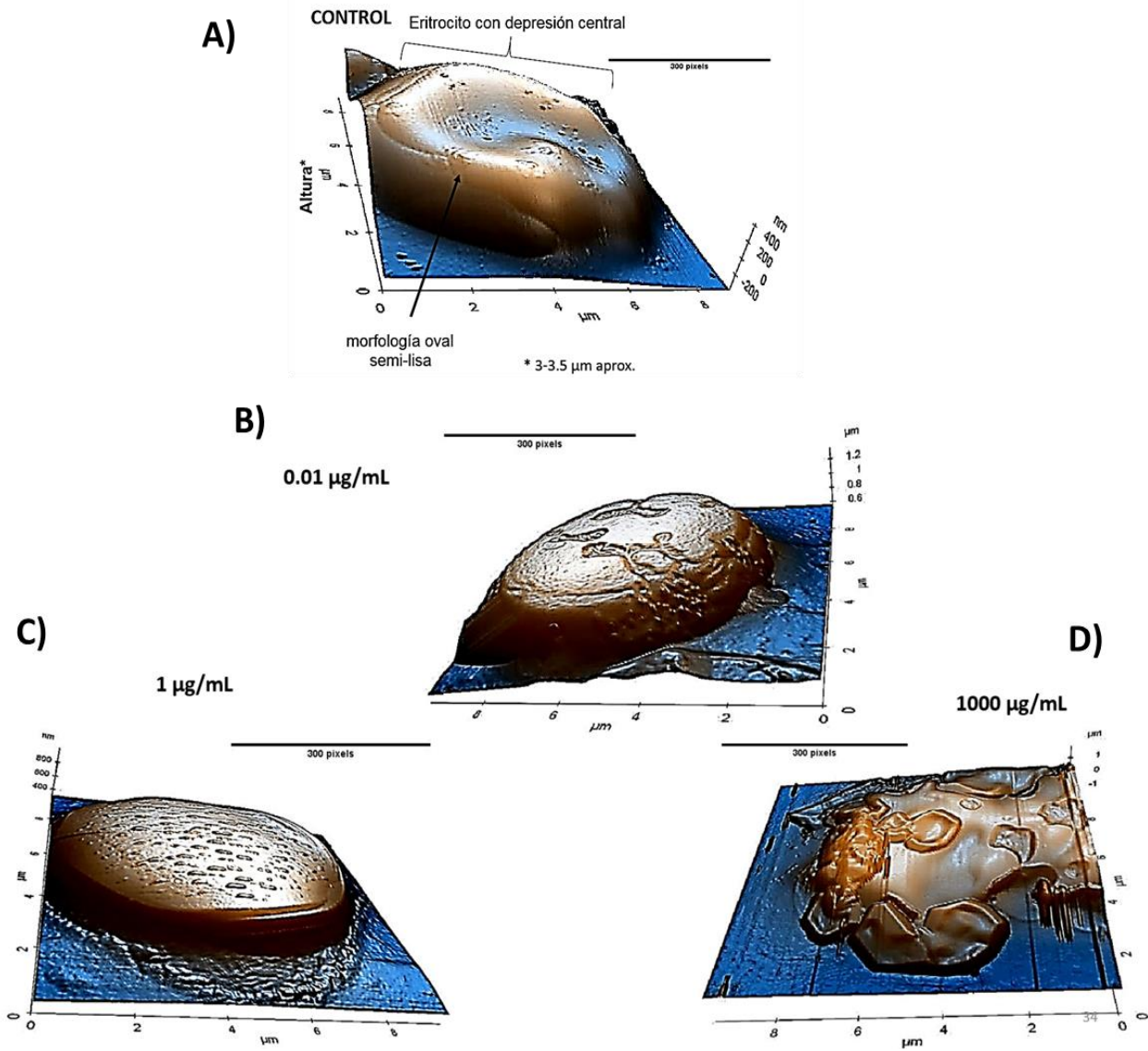


Figura 34. Imágenes en AFM reconstrucción en 3D de eritrocitos tratados con las NP de CdS-Dex. AFM: microscopía de fuerza atómica; NP: Nanopartículas; CdS-Dex: Sulfuro de cadmio-dextrina.

### **7.12 Efecto de la interacción de NP de CdS-Dex con eritrocitos de sangre de rata, por microscopía de fuerza atómica (AFM).**

En la figura 35 se muestra imágenes obtenidas por AFM de eritrocitos en reconstrucción 3D tratados con NP de CdS-Dex con concentraciones de 0.1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 60 min. Las dos primeras imágenes corresponden al control negativo: eritrocitos no tratados, con características típicas de una célula sanguínea sana, con morfología ovalada, bicóncava con una depresión central. Al lado derecho, se observa el control positivo: eritrocitos que se les indujo hemólisis tratándolos con NaCl (35 mM), con características típicas de una membrana destruida en totalidad, la célula muestra una pérdida de su morfología, sin bordes definidos con evidente salida de contenido celular. A continuación, podemos observar eritrocitos tratados con 0.01 hasta 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NP de CdS-Dextrina, los eritrocitos se observaron con una membrana intacta, pero hubo una pérdida de biconcavidad, aumento de tamaño y mayor presencia de artefactos en su superficie, que se acumularon en mayor cantidad conforme se aumentó la concentración de NP de CdS-Dex. Haciendo un análisis con respecto a la evaluación de hemólisis que reveló que tan sólo un 5% de ellos sufrieron lisis, este análisis topográfico no mostró evidencia de ruptura de la membrana en ninguno de los estudios topográficos.

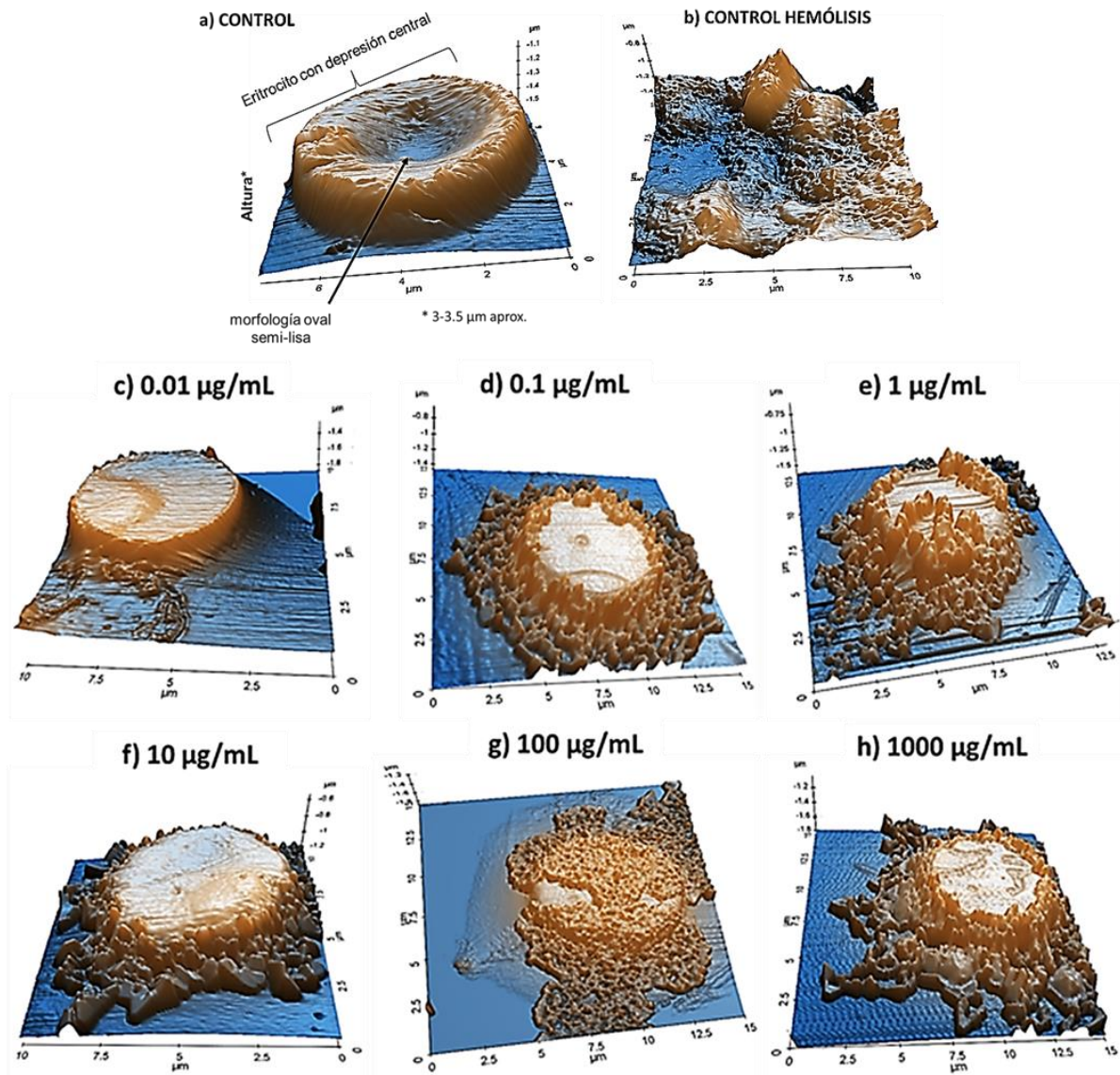


Figura 35. Análisis topográfico en AFM de eritrocitos. a) morfología de eritrocitos intactos: normocitos (discocitos). b) eritrocito hemolizado. c-e) morfología de los eritrocitos: anisocitosis y planocitos; d-g) estomatocito: la alteración eritrocitaria más incidente bajo el efecto de NP de CdS-dex Tiempo de exposición: 60 min.

### 7.13 Determinación del potencial $\zeta$ en eritrocitos tratados con NP de CdS-dextrina asociado a la integridad de la membrana celular.

En la figura 36, podemos observar el potencial  $\zeta$  obtenido en eritrocitos sanos y eritrocitos tratados con NP de CdS-dextrina. El potencial  $\zeta$  de la membrana celular de las células vivas está determinado, entre otros factores, por la organización y las interacciones intermoleculares de sus componentes (proteínas y lípidos). Así que en eritrocitos tratados con concentraciones de 0.1 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , no se observó cambios significativos en el potencial  $\zeta$ . Sin embargo, se mantuvo oscilando entre los valores normales comparados con el grupo control. Esto puede ser un indicativo del hecho de que las NP de CdS-dextrina no afectaron la integridad de las membranas de los eritrocitos por lo que podemos sugerir que no estaría afectado su funcionalidad.

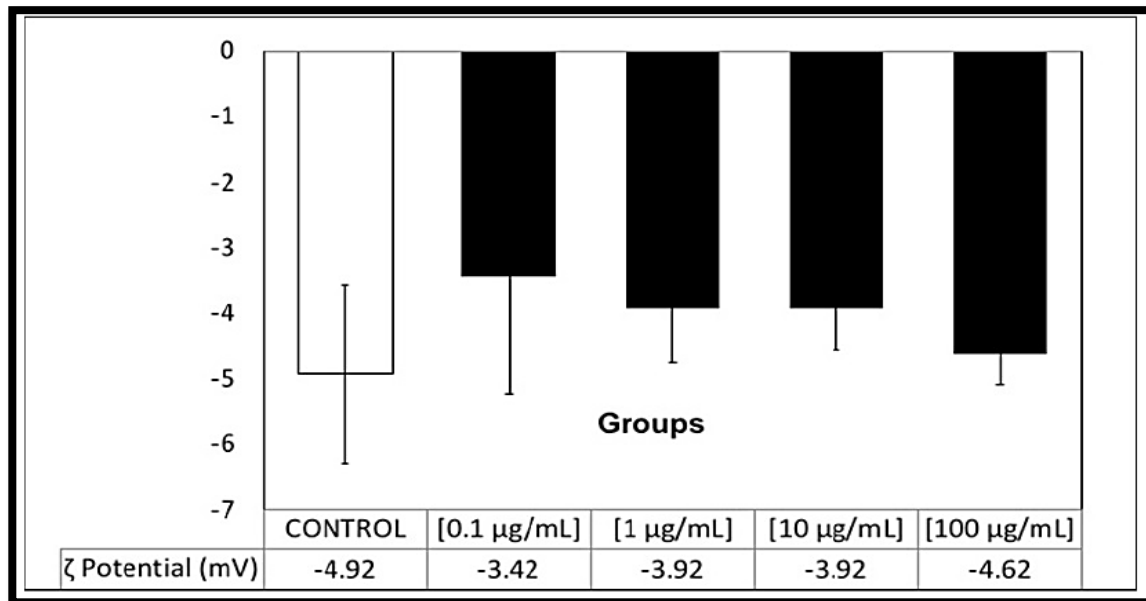


Figura 36. Potencial zeta de los eritrocitos tratados con NP de CdS/dextrina. Los eritrocitos sanos se consideraron grupo control. Tratamiento: NP de CdS/dextrina a 0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$  durante 30 min. Se determinó el potencial  $\zeta$  de eritrocitos de dos experimentos independientes. Los datos se presentan como la media  $\pm$  DE. \*  $p < 0,05$  en comparación con el grupo de control.

### 7.14 Acoplamiento molecular de CdS-dextrina/eritrocito

En la figura 37 observamos el sistema hipotético creado para obtener un posible modo de unión entre las esferas de CdS cubiertas con dextrinas y la proteína principal en la membrana de los eritrocitos, el transportador de glucosa GLUT1. Debido a la falta de estructuras moleculares de NP de CdS con dextrinas, solo una dextrina de cada tamaño se acopló con el transportador GLUT1. Se realizaron 50 corridas de acoplamiento independientes utilizando la estructura GLUT1 y dos dextrinas de diferente tamaño: 6 y 12 azúcares. Las dextrinas se acoplaron en la misma región del transportador GLUT1. Los residuos de GLUT1 involucrados en el sitio de unión potencial de las dextrinas reportados por autodock vina fueron: 37, 38, 41, 58, 61, 62, 65, 66, 296, 299 a 304, 355 a 366, 423, 424, 426 a 432 (números de residuos con respecto al PDB original).



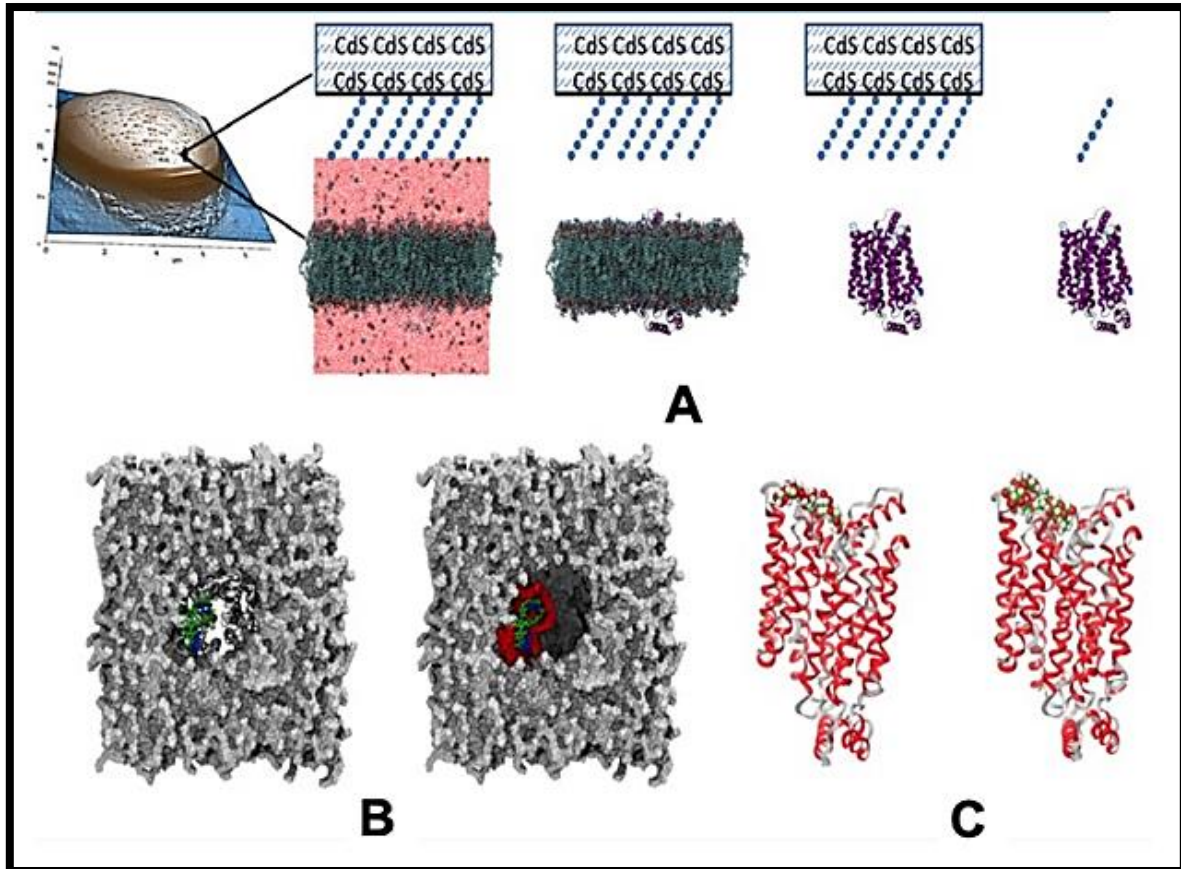


Figura 37. Transportador de glucosa hipotético GLUT1 unido a dextrinas. A) Representación esquemática del procedimiento utilizado en este trabajo. B) Superficie molecular de la membrana con una estructura representativa de ambas dextrinas (6 azúcares en barras azules y 12 azúcares en barras verdes) con GLUT1 en el centro de la imagen. La mayoría de los resultados de acoplamiento se unieron a un lado de la superficie GLUT1 (en rojo). C) Representación de dibujos animados de GLUT 1 con 6 y 12 azúcares (izquierda y derecha, respectivamente).

### 7.15 Efecto de la interacción de las NP de CdS-Dex sobre la viabilidad celular en células Raw 264.7.

En la figura 38, podemos observar los resultados del efecto de la interacción de NP de CdS-Dex sobre la viabilidad de células RAW 264.7 tratadas a concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 24 h. En la primera columna podemos observar la viabilidad celular de células sin tratamiento. A partir de las concentraciones de 0.01 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no se observó efecto sobre la viabilidad de las células RAW 264.7. En la concentración de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observó un aumento de células vivas con respecto al grupo control, hasta en un 10 % ( $p < 0.05$ ).

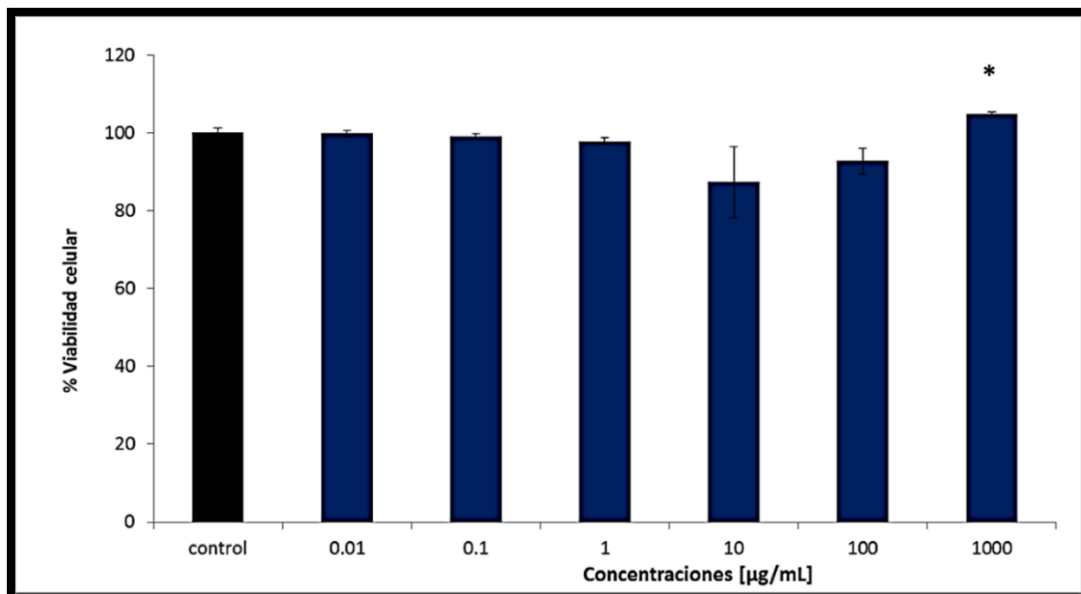


Figura 38. Efecto de NP de CdS-Dex sobre la viabilidad celular de RAW 264.7. Tratamiento 24 horas. Cada barra representa la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes.  $n=4$ . \* $p < 0.05$  con respecto al grupo control.



### **7.16 Efecto de la captación celular de NP de CdS-Dex en macrófagos RAW 264.7 estudiado por microscopía confocal de fluorescencia.**

En la figura 39, se muestran microfotografías de células RAW 264.7 en dos modalidades (visible y fluorescencia) tomadas con microscopio confocal a 60 X con 3 aumentos. Las células fueron tratadas con concentración de 0.01 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NP de CdS-Dex, y la presencia de las NP es evidente por la fluorescencia de color verde, que no es observada en la imagen control de fluorescencia. De derecha a izquierda, les muestro las imágenes de ambos controles de células sin tratamiento en visible y fluorescencia. Se observan con morfología característica de células RAW 264.7 adherida y en cultivo y sin autofluorescencia. En la siguiente columna las imágenes en visible, continuando con la columna de fluorescencia. Como podemos observar a partir de la primera fila de células tratadas con NP de CdS-dex desde 0.01 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  podemos observar la presencia de estas NP por el efecto de la fluorescencia que los caracteriza. Se observan en la membrana celular, alojarse en citoplasma e incluso llegar hasta núcleo y nucléolos. La fluorescencia en color verde fue más intenso en células tratadas con 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como era de suponer. Sin embargo, podemos observar que en concentraciones desde 1 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en visible los cambios morfológicos observados son mayores con respecto a las otras concentraciones de 0.01 y 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Estas imágenes obtenidas sugieren que los macrófagos RAW 264.7 captan e internalizan a las NP de CdS-Dex de manera eficiente.

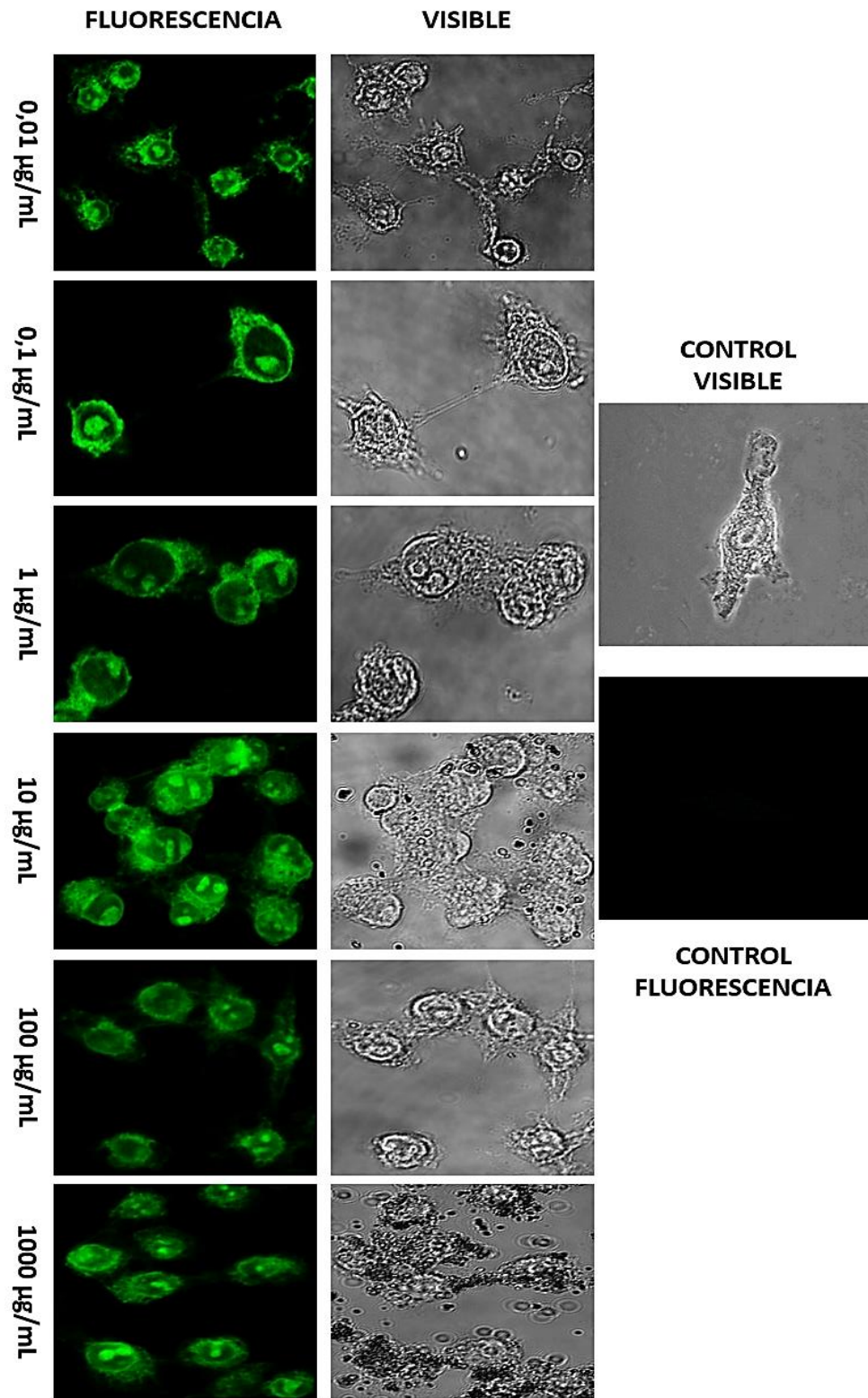


Figura 39. Imágenes de células RAW 264.7 tomadas con microscopio confocal de fluorescencia. visible/fluorescencia. 60X + 3 Z (aumentos).

### **7.17 Efecto de NP de CdS-Dex sobre la producción de óxido nítrico (NO) inducida en macrófagos RAW 264.7.**

En la figura 40, Se observan células RAW 264.7 tratadas con NP de CdS-Dex a diferentes concentraciones (0.01, 0,1, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). De izquierda a derecha, podemos observar el control negativo (0% de NO). Después, la columna que corresponde al control positivo (células tratadas con LPS). A continuación, observamos el efecto de la interacción de NP de CdS-dex sobre la producción de NO en macrófagos desde la concentración de 0.01 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A partir de la concentración de 0.01 hasta la de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la producción de NO es de hasta más de 60% con respecto al grupo control negativo ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, a la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  este efecto fue mucho mayor hasta 70% de NO. Aunque, en la concentración de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  el efecto de producción de NO por los macrófagos RAW 264.7 superó el 100%, con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). Se ha reportado que macrófagos peritoneales tratados con nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  a concentración de 50 mg/Kg durante 24 y 72 horas, no producen un aumento en los niveles de NO lo que indica que no existe una activación de macrófagos, ya que el aumento de óxido nítrico es considerado el segundo mensajero en una respuesta inflamatoria (Park & Park 2009). Con base en nuestros resultados podríamos sugerir que, la producción de NO por los macrófagos es un efecto de la interacción con NP de CdS-Dex y se da de manera concentración dependiente.

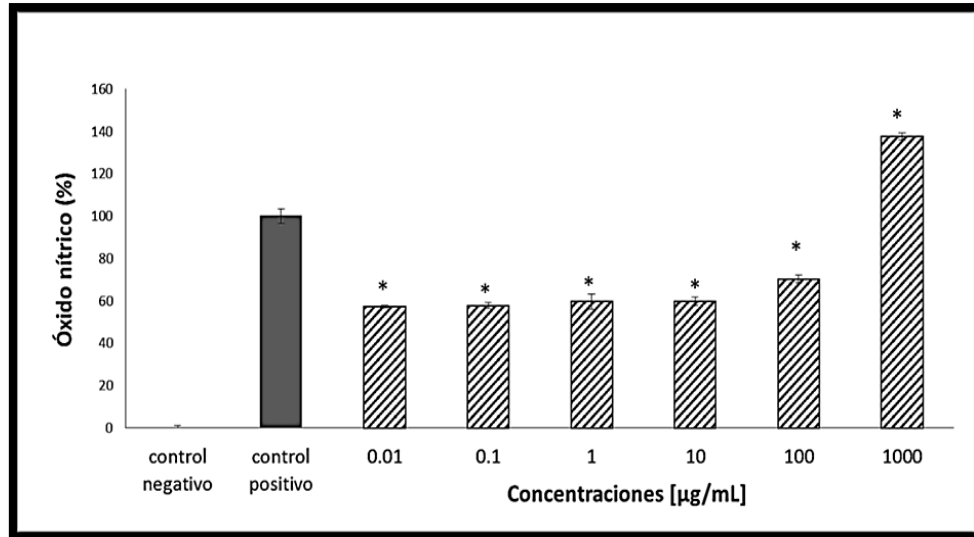
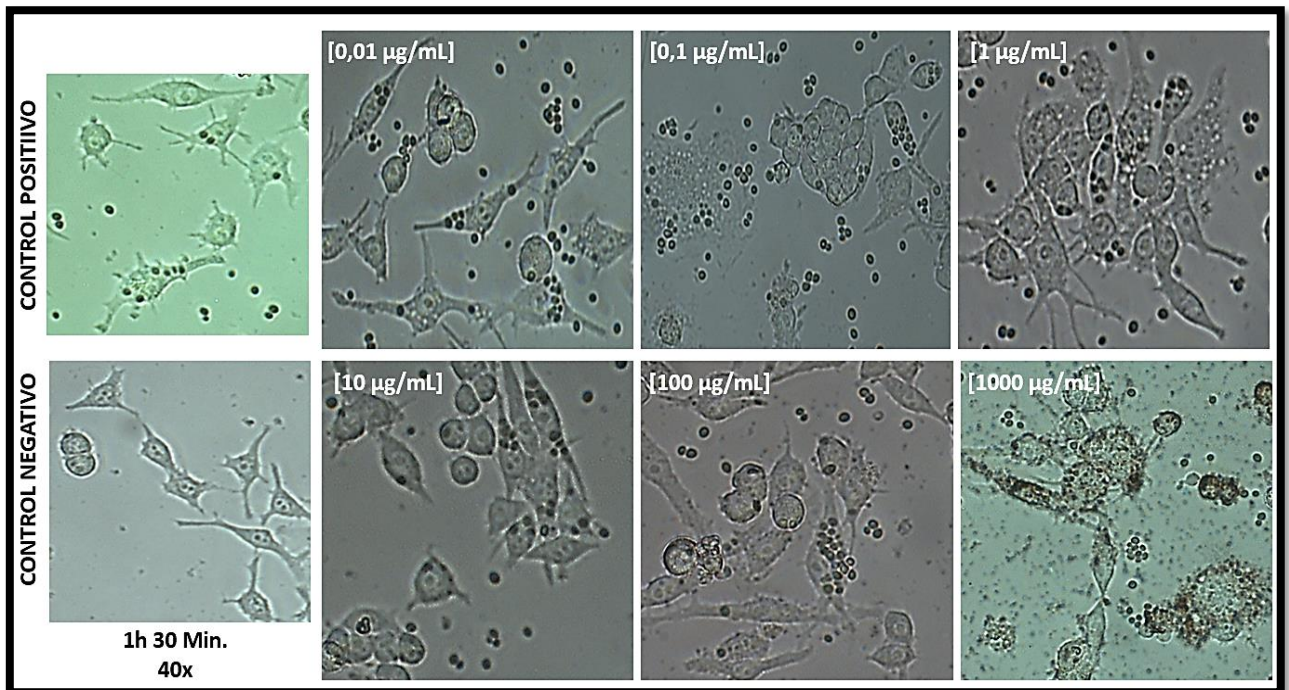


Figura 40. Efecto de NP de CdS-Dex sobre la producción de NO en macrófagos RAW 264.7. Tratamiento 24 horas. Cada barra representa la media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes. n=4. \* $p < 0.05$  con respecto al grupo control negativo.

### 7.18 Efecto de la interacción de NP de CdS-Dex con macrófagos RAW 264.7 sobre la fagocitosis de levaduras.

En la figura 41, podemos observar el efecto de la interacción de las NP de CdS-Dex sobre macrófagos y en presencia de levaduras. De izquierda a derecha en la primera columna les mostramos el control positivo de células sin tratamiento y cultivadas con levaduras, en su interior se observan levaduras ya fagocitadas. A continuación, observamos el control negativo que son células sin tratamiento y sin levaduras. En las siguientes columnas, se observan las microfotografías de células tratadas con 0.01 hasta 1000  $\mu\text{g/mL}$  de NP CdS-Dex y en presencia de levaduras. Como podemos observar en todas las concentraciones se observan levaduras fagocitadas por los macrófagos. Sin embargo, el efecto fagocítico aumenta de manera concentración dependiente, siendo mayor este efecto en la concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Lo cual

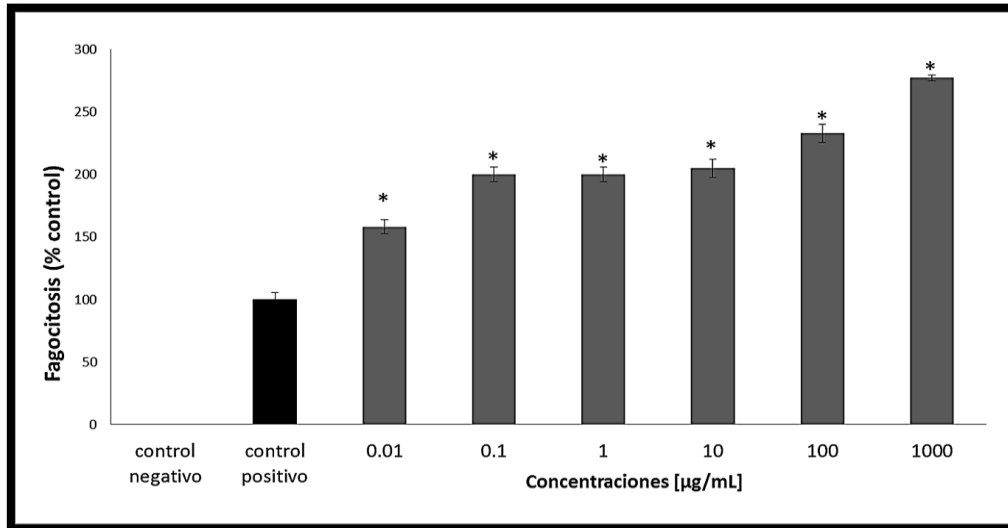
puede indicarnos que la interacción con NP de CdS-Dex podría ser la causa del aumento de la fagocitosis de levaduras por los macrófagos RAW 264.7.



**Figura 41. Visualización en microscopio de luz visible (40X) de células RAW 264.7 en presencia de levaduras y tratados con NP de CdS-dex. Diferentes concentraciones (0,01 a 1000 µg/mL) durante 60 minutos.**

Para tener más claro este efecto, cuantificamos las levaduras de cada muestra como se observa en la figura 42. Con este resultado, cuantificamos lo observado en las microfotografías antes mencionadas y se da de manera concentración dependiente. Siendo evidente este efecto a la concentración de 1000 µg/mL.

Nuestros resultados sugieren que los macrófagos aumentan su capacidad fagocítica con respecto al aumento de la concentración de nanopartículas, siendo mayor a 1000  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ).



**Figura 42. Efecto fagocítico de macrófagos inducido por NP de CdS-Dex. Tratamiento 24 horas. Cada barra representa la media  $\pm$  DS de dos experimentos independientes.  $n=4$ . \* $p < 0.05$  con respecto al grupo control.**



## 8. DISCUSIÓN

La sangre es un fluido biológico único en el que cada componente juega un papel distinto en la efectividad y funcionamiento en el organismo. Este fluido biológico es el de primer contacto con las NP administradas vía sistémica. En el momento en que las NP llegan al sistema sanguíneo, entran en contacto directo con los eritrocitos, células endoteliales y proteínas plasmáticas, donde pueden afectar la estructura intrincada y las funciones críticas de estos componentes sanguíneos (Ritz, *et.al.*, 2015). Sin embargo, a pesar de los intensos estudios preclínicos y clínicos sólo unas pocas NP han llegado a ensayos clínicos o al mercado (Danhier, Ansorena, Silva, Coco and Le Breton, 2013; Caracciolo, Farokhzad and Mahmoudi, 2017). La principal causa de que no haya avance en la comercialización de nanomateriales es la falta de comprensión de los mecanismos y efectos de la interacción que ocurre entre las NP y el entorno biológico y fisiológico (Caracciolo, Farokhzad and Mahmoudi, 2017). Las interacciones NP con los componentes sanguíneos son, no sólo inevitables sino también enfáticamente peligrosas y la hemocompatibilidad debe ser una de las principales preocupaciones en el diseño y desarrollo de NP con aplicaciones terapéuticas.

Hablando desde el punto de vista de las NP, las diferentes interacciones pueden provocar transformaciones de fase, agregación de partículas, reconstrucción de superficies y disolución. Todos estos procesos logran una influencia significativa en su reactividad, biodisponibilidad y farmacocinética (Maynard, Warheit, Philbert, 2011) afectando su persistencia y provocado que cause efectos tóxicos (Liu and Hurt, 2010; S. Elzey and Grassian, 2010; Pelaz, *et.al.*, 2013). Es decir, la aglomeración extracelular de NP, o la aglomeración que ocurre antes o durante la exposición en modelos *in vitro* o *in vivo* tiene un impacto significativo en los efectos biológicos observados y sobre su toxicidad dependiente del tamaño (G.J. Oostingh, *et.al.*, 2011; Jiang, Oberdorster and Biswas, 2009).

La investigación realizada atendió a las necesidades de comprender y visualizar los posibles efectos de las NP de CdS-dextrina. Considerando que una vez que entran en contacto con la sangre, las proteínas se adsorben en la superficie de las NP formando una corona de proteínas (Cedervall, *et.al.*, 2007), al adsorberse las proteínas plasmáticas de manera instantánea en la superficie de las NP, lo que influye significativamente en su interacción con los componentes sanguíneos. Este efecto conduce a una patología denominada como la coagulopatía inducida por NP, y se ha convertido en una seria preocupación, ya que según varios estudios se ha reportado un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular debido a complicaciones trombóticas inducidas por NP. En estas investigaciones han encontrado que las NP pueden alterar el sistema de coagulación y provocar un cambio en el equilibrio hemostático, lo que da como resultado afecciones graves que ponen en peligro la vida, como trombosis venosa profunda (TVP) y coagulopatía intravascular diseminada (CID) (Sun, Lv, Bai, Yang, Zhou, Li, and Yang, 2018). Por tanto, las NP de CdS-Dex podrían causar complicaciones vasculares, por lo que requeríamos conocer si esto ocurre y si es dependiente de concentración.

La albúmina es una proteína de 69 kDa que representa más de la mitad de la composición del suero en el cuerpo. Hace tiempo que está bien establecido que la hipoalbuminemia es un poderoso marcador de pronóstico en la población general y en muchos entornos patológicos, principalmente como resultado de la desnutrición y la inflamación (Arques, 2018). En el desarrollo de la experimentación se encontró que el efecto de la interacción de las NP de CdS-Dex con albúmina, era la formación de la corona de proteínas tras 30 minutos de incubación y este efecto se ve en aumento conforme aumenta la concentración de NP. Estos resultados sugieren que la superficie de las NP de CdS-Dex tuvieron mayor reactividad biológica con la albúmina como ha sido reportado por otros investigadores (Ge, *et.al.*, 2011). Habrá que considerar que esta formación de la corona de proteínas de albúmina en específico, es importante porque podría desencadenar eventos trombóticos vasculares. No obstante, las NP de CdS-Dex no han demostrado tener efectos secundarios en los modelos *in vivo* ensayados tanto en dosis únicas como en dosis repetidas. Lo que sugiere que, las NP probablemente no estén adsorbiéndose cuando son administradas por vía I.V., al evitar



esta adsorción de proteínas puede representar una ventaja importante, ya que evitaría la aglomeración y desencadenar eventos trombóticos. Ya se ha descrito en otros estudios con NP de oro, que pueden influir en los cambios conformacionales en la estructura de la albúmina de suero bovino (BSA) de manera dosis dependiente (Wangoo, Suri and Shekhawat, 2008). Por lo que, resulta interesante notar que las propiedades físicoquímicas de las NP y de ciertas proteínas juegan un papel importante para la formación de la corona de proteínas (Lacerda, et al., 2009). Esto se sustenta en estudios con otros nanomateriales como fullerenos de carbono 60, que sugieren que la albúmina no sufre ningún cambio conformacional ya que no se adsorbe a estas NP (Shufang, Kai, Zhijuan and Xibao, 2012).

También, se sabe que la albúmina es la proteína plasmática más abundante y se adsorbe rápidamente a las NP (Vu, 2019). Por lo que, la adsorción de una proteína en la superficie de la NP también depende sobre la afinidad de la proteína hacia la superficie de la NP y su capacidad para ocupar completamente la superficie del nanomaterial. Como se demostró en un estudio en el que utilizaron NP de platino de hierro (FePt) en el que la albúmina de suero humano (ASH) y la transferrina se adsorben con mayor afinidad a la superficie de estas NP (Jiang, 2009).

En otro estudio, se observó que la albúmina de suero bovino (BSA) se adsorbe en NP con superficie de óxido de aluminio superficie formando una especie de monocapa utilizando hasta un 30-36% de su carga negativa para unirse y que incluso el reemplazo de moléculas de BSA adicionales del medio se unen a esta monocapa como dímeros (Rezwan, Meier, Rezwan, Vörös, Textor and Gauckler, 2004). En este sentido es posible sugerir que la albúmina es afín a las NP de CdS-Dex, ya que esta afinidad puede darse dependiendo de su composición química y la carga de su superficie (potencial Z) (Albanese and Chan, 2011; Walkey, Olsen, Guo, Emili and Chan, 2011; Alexis, Pridgen, Molnar and Farokhzad, 2008).

Para tener más claro este fenómeno, la corona de proteínas es de naturaleza dinámica y como podemos darnos cuenta la composición varía en función de las propiedades fisicoquímicas de las NPs. En un estudio, se evaluó la formación de la corona de proteínas una vez que NPs de poli (lactida-co-glicólido) (PLGA) se incubaron con diferentes concentraciones de suero fetal bovino (FBS) y suero humano (Partikel, Korte, Mulac, Humpf, and Langer, 2019). La corona de proteínas se identificó a través de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), con un ensayo de proteínas de Bradford, se determinó el potencial zeta y se realizó un análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas/espectrometría de masas (LC-MS / MS); los resultados que obtuvieron, revelaron que el entorno fisiológico afecta críticamente la adsorción de proteínas en NPs de PLGA con importante impacto en la interacción. En condiciones comparables, la cantidad de proteína que forma la corona de proteínas depende del tipo de suero utilizado y es dependiente de la concentración sérica. En las NP de PLGA incubadas con FBS o suero humano, hubo una clara diferencia en la composición de la corona de proteína que se identificó mediante SDS-PAGE y LC-MS/MS.

No obstante, en el caso del suero humano, se observó un cambio considerable en la composición de la corona de proteínas que conduce a una concentración dependiente de adsorción de proteínas abundantes junto con una adsorción de proteínas de alta afinidad con menor abundancia (Partikel, Korte, Mulac, Humpf, and Langer, 2019). Sin duda alguna, tener el control de la formación de la corona de proteínas es una tarea desafiante. Con los datos obtenidos en la presente investigación, es posible destacar la necesidad de diseñar nanomateriales óptimos que permitan una predicción de la interacción de NPs-proteínas y, por lo tanto, la biodistribución y efecto secundario en el organismo.

Las NP de CdS-dextrina fueron evaluadas con base al cambio de potencial Z, este parámetro es un indicativo de estabilidad coloidal debido a la repulsión de partículas electrostáticas (Casals, Pfaller, Duschl, Oostingh and Puntès, 2010). En el análisis realizado encontró que, a concentraciones de entre 0.01 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y en presencia de albúmina el potencial Z es bajo, lo que indica que no hay repulsión y se forma la

corona de proteínas. De manera general, se sabe que la adsorción de proteínas séricas en NPs cargadas negativamente conduce a una disminución del potencial zeta que depende en gran medida de la concentración y la identidad de la proteína unida (Monopoli, et.al., 2011; Schäffler, et. al., 2013). Esta adsorción de proteínas es en efecto la base de toda la hemocompatibilidad, ya que las proteínas plasmáticas adsorbidas recubren eficazmente las NP y previenen el contacto directo de las células sanguíneas. El proceso de adsorción de proteínas es proceso dinámico y es la causa de la activación del sistema del complemento y la cascada de coagulación, entre otros (Vauthier, Persson, Linder and Cabane, 2011; Cavadas, González-Fernández and Franco, 2011).

Por otra parte, la hemostasia es un delicado equilibrio entre procoagulante, anticoagulante y vías fibrinolíticas en respuesta a un trauma para prevenir la pérdida de sangre. La coagulación sanguínea es activada en respuesta a una lesión para liberar factor tisular o por activación en respuesta a un agente extraño que puede alterar las vías extrínsecas o intrínsecas de la coagulación que dan como resultado una cascada de reacciones enzimáticas (Fröhlich, 2016; Gorbet and Sefton, 2004; Vogler and Siedlecki, 2009). Ambas vías convergen en la vía común a través de la ruptura enzimática de protrombina en trombina para activar la conversión de fibrinógeno en monómeros de fibrina para formar una red de malla y un tapón plaquetario que da como resultado un coágulo estable (Fröhlich, 2016; Gorbet and Sefton, 2004; Vogler and Siedlecki, 2009). Por lo tanto, la trombogenicidad es la propensión de un material a inducir la coagulación sanguínea parcial o completa mediante la oclusión de un vaso sanguíneo por la formación de un trombo (una mezcla de glóbulos rojos, plaquetas agregadas, fibrina y otros elementos celulares). El tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) y el tiempo de protrombina (TP) son ensayos que miden las vías intrínsecas y extrínsecas de la cascada de coagulación, y carecen de los componentes celulares (por ejemplo, plaquetas) y factores de coagulación presentes en sangre total (Park, et.al., 2009). Los tiempos prolongados de aPTT y PT son insensibles a pequeños cambios en coagulación, y no siempre predicen estados protrombogénicos (Park, et.al., 2009). Asimismo, se sabe que el fibrinógeno, es afín a nanomateriales como NP de oro (AuNP) (5-100 nm) con las que tiene fuertes

interacciones que provocan cambios en la conformación de esta proteína (Lacerda, *et.al.*, 2010; Dobrovolskaia, *et.al.*, 2009). Sin embargo, algunos nanomateriales han demostrado que pese a ser funcionalizados, como por ejemplo las NP de oro con polifosfato (10-50 nm) tienen efecto en la coagulación sanguínea y activan la vía intrínseca provocando efectos procoagulantes rápidos que reducen los tiempos de coagulación (Szymusiak, *et.al.*, 2016) No obstante, NP con la misma composición de oro, pero diferente funcionalización (quitosan sulfonado y pirimidina) y tamaño (10 y 13 nm) modificados con quitosano sulfonado, demostraron que afectan la coagulación prolongando el tiempo, inhiben la agregación plaquetaria y causan antitrombogenicidad al interactuar con trombina y fibrina (Tian, Zhao, Zheng, Zhang and Jiang, 2014; Ehmann, *et.al.*, 2015).

Los resultados obtenidos del efecto de las NP de CdS-dextrina sobre los tiempos de coagulación arrojaron que, las vías de coagulación son activadas de manera que no alteran los tiempos de coagulación tanto para el tiempo de tromboplastina parcial activada, como para los tiempos de protrombina. Sin embargo, esta “activación normal”, se corroboró con la concentración de fibrinógeno la cual no mostró diferencia significativa con respecto al control. Estos hallazgos pueden sugerir que nuestras NP no están alterando el sistema de coagulación. Ya que se sabe que, en recientes estudios, se han encontrado respuestas inflamatorias por la interacción de NP con fibrinógeno e incluso mostraron un aumento de la trombogenicidad y la adherencia de las plaquetas a la superficie de la partícula (Lin, Lin, Yang, Hung and Fang, 2018). Los mecanismos de acción y posibles efectos clínicos de las interacciones NP-plaquetas son extremadamente diversos y específicos de cada caso (Matus, Vilos, Cisterna, Fuentes and Palomo, 2018). Además, la adsorción de componentes del plasma puede modificar el tamaño, estado de agregación y composición interfacial de los nanomateriales y, por lo tanto, debe considerarse cuidadosamente al evaluar las interacciones y toxicidades de las NP en la sangre.

Estos estudios nos sugieren que, el diseño ideal de las NP destinadas para administración de fármacos, depende de muchos factores como la composición del nanomaterial, su tamaño y funcionalización. A pesar de esto, una parte muy importante a tomar en cuenta para el diseño de estos nanomateriales sería reducir su aclaramiento en el torrente sanguíneo para extender los tiempos de circulación sistémica y así aumentar la eficacia al liberar el fármaco en el sitio blanco. Cuando la tasa de depuración sanguínea es rápida, se minimiza la interacción de las partículas con los componentes sanguíneos. Un aumento en el tiempo de circulación aumenta proporcionalmente la duración del contacto con los componentes del sistema de coagulación. Esto puede amplificar los efectos adversos de esta interacción, como la activación de la cascada de coagulación, y oclusión parcial o completa de un vaso sanguíneo. Los estudios para evaluar la propensión de las NP a inducir la activación y/o agregación plaquetaria, sus efectos sobre el tiempo de coagulación del plasma y la tendencia a iniciar la trombosis vascular son útiles para evaluar la trombogenicidad de estos nanomateriales. Sin embargo, existen pocas evaluaciones de las interacciones NP en la sangre y su influencia en la coagulación sanguínea, pruebas que son básicas e integrales para su diseño, para su aplicación segura y eficaz.

En la regulación para mantener un equilibrio hemostático en el organismo, las plaquetas juegan un papel muy importante. Las plaquetas, previenen la pérdida de sangre por lesión vascular, pueden inducir trombosis arterial, y tienen funciones adicionales en la defensa inmunitaria, la cicatrización de heridas (Nieswandt, Pleines, and Bender, 2011; Li, Yang, Dunn, Gross and Smyth, 2011; Nurden, Nurden, Sanchez, Andia and Anitua, 2008). En un sistema vivo, las plaquetas normalmente no interactúan con las superficies internas de los vasos sanguíneos, pero responde a estímulos externos y físicos y se adhieren rápidamente cuando la pared del vaso es alterada. La mayoría de las NP aunque no están destinados a uso sistémico pueden, debido a su capacidad para atravesar barreras epiteliales, alcanzar la circulación sistémica e interferir con la función fisiológica de las plaquetas aumentando el riesgo de enfermedad cardiovascular y trombosis vascular (Pope CA III, *et.al.*, 2002; Radomski, *et.al.*, 2005; Gaffney, *et.al.*, 2015).

Las propiedades fisicoquímicas de las NP, es uno de los determinantes clave de las interacciones NP con las plaquetas. Entre los diferentes nanosistemas que se aplican en biomedicina, los dendrímeros se destacan en términos de su capacidad para inducir la agregación plaquetaria; varios tipos de dendrímeros, incluida la poliamiodamina (PAMAM), polipropilenimina (PPI), triazina y dendrímeros de carbosilano, causan la formación de trombos (Caminade and Majoral, 2018). Los dendrímeros PAMAM específicamente se han estudiado extensamente por su hemotoxicidad y sus efectos sobre las plaquetas. También, se sabe que estos dendrímeros de PAMAM pueden causar una condición letal, diseminada, similar a la coagulación intravascular como se demostró en un estudio *in vivo* (Greish, *et.al.*, 2012). Además, en otro estudio, se demostró que los dendrímeros PAMAM con un grupo amino terminal se unen y alteran la morfología de las plaquetas y conducen a un mayor número y tamaño de los agregados plaquetarios (Jones, *et.al.*, 2012). Como la mayoría de las membranas celulares, la superficie de las plaquetas está cargada negativamente y puede interactuar fácilmente con NP catiónicas. Así que, las plaquetas también pueden interactuar con NP catiónicas, como en el caso de nanomateriales con carga positiva que alteran la morfología plaquetaria y por lo tanto su activación. El mismo estudio demostró que este nanomaterial pero con carga neutra y otros aniónicos no causaban efecto alguno sobre la integridad y funcionamiento plaquetario (Jones, *et.al.*, 2012). Lo que confirma, que el efecto de los nanomateriales sobre las plaquetas puede depender más que del tipo de su tamaño, que de su carga superficial.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto, demostraron que, las NP de CdS-dextrina causaron agregación plaquetaria y cambios morfológicos en las plaquetas a partir de bajas concentraciones de 0.01 µg/mL. Sin embargo, para aseverar que estas NP causaron la activación y daño en la función e integridad de las plaquetas tendrían que evaluarse otros factores que confirmen o corroboren los hallazgos expuestos. Es posible sugerir que, no son niveles elevados para considerarse un riesgo; sin embargo, estudios en este campo de la investigación han revelado que la acumulación excesiva de plaquetas propicia a un evento patógeno crucial y por lo que puede considerarse como la principal responsable del desarrollo agudo de complicaciones isquémicas y

enfermedades vasculares. Por ejemplo, en un estudio se encontró que NP de sílice induce la agregación plaquetaria y lo hace a través de diferentes mecanismos, como la regulación de la expresión de la proteína P selectina y liberación de NO de la superficie plaquetaria (Corbalan, Medina, Jacoby, Malinski and Radomski, 2012).

Se han sugerido diferentes efectos causados por NP, incluidas las interacciones con la membrana del eritrocito, captación celular, internalización y estrés oxidativo. El mecanismo más destacado por el cual ocurre este fenómeno es la interacción directa de las NPs con la membrana de los eritrocitos que puede provocar lesiones, perjudiciales, cambios morfológicos y distorsiones citoesqueléticas (Chen, Fang, Ling, Ding, Kang, and Huang, 2015).

En este trabajo de tesis, se evaluaron los efectos *in vitro* de las NP de CdS-dextrina en eritrocitos de rata y se demostró que las NP de CdS-dextrina causaron sólo un 5 % de hemólisis y cambios significativos en su morfología. Sin embargo, es importante destacar que las NP de CdS-dextrina si bien causaron efecto sobre la integridad de los eritrocitos, la hemólisis fue posterior a 30 minutos de exposición. Aunque, con el bajo porcentaje que se observó de hemólisis se puede sugerir que pudo deberse a la manipulación de los eritrocitos y no por un efecto directo de las NP de CdS-dextrina. El efecto hemolítico de algunos nanomateriales radica en el mecanismo relacionado a la interacción directa de las NP con la membrana de los eritrocitos lo que puede provocar lesiones, perjudiciales cambios morfológicos y distorsiones citoesqueléticas (Chen, Fang, Ling, Ding, Kang and Huang, 2015).

Tal como se describe en un estudio con NP de plata (Ag), las cuales tienen efecto hemolítico. Su actividad hemolítica se atribuyó principalmente a interacciones directas NP-células, donde las partículas se unen a restos biológicos como proteínas y fosfolípidos en la membrana de los eritrocitos, que conduce a la desnaturalización y deterioro del funcionamiento de la membrana. Además, las NP de plata, son aniónicas en su superficie, lo que indica que tienen interacciones fuertes con cationes biológicos en el eritrocito membrana, contribuyendo aún más a la hemólisis (Das, Tripathy and Adhikary, 2018).



Existen varios estudios en los que se ha demostrado que las NP no son hemocompatibles debido a la toxicidad que causan en eritrocitos (Sang-Jun Park, *et. al.*, 2017; Tsatsakis, *et. al.*, 2019). Como ejemplo se hace referencia al estudio en el que las nanopartículas de oro de 30 nm de tamaño produjeron hemólisis, en este estudio destacan que el efecto hemolítico no se observó con nanopartículas más pequeñas (5,10, 20 nm) (Cenni and Baldini, 2008). Por el contrario, existen reportes de nanopartículas como las de plata en las que se demostró que a pesar de su tamaño (1-3 nm) causaron una mayor actividad hemolítica de hasta un 60 % (Aseichev and Sergienko, 2014). Algunos nanomateriales han recurrido a diferentes recubiertas como agentes pasivantes que puedan disminuir su toxicidad al interactuar con glóbulos rojos humanos. En un estudio se expusieron los glóbulos rojos fueron expuestos a tres formas diferentes de puntos cuánticos de grafeno (GQD) (sin recubierta, hidroxilados y carboxilados) a diferentes concentraciones (0, 500, 750, y 1000 mg/mL) y tiempos de incubación (0, 1, 2, 3 o 4 h) (Kim, Nafiujjaman, Nurunnabi, Lee, and Park, 2016). Las características reológicas de los glóbulos rojos fueron analizadas mediante difracción de rayos X y agregometría de láser de microfluidos. En general, se observó que el porcentaje de hemólisis y las alteraciones reológicas de los glóbulos rojos no fueron significativas a una concentración menor de 500 mg/mL. También, se observó que los GQD carboxilados tenían una actividad hemolítica más sustancial y causaban cambios abruptos en la deformabilidad y agregación de los glóbulos rojos comparados con los GQD no recubiertos o hidroxilados a concentraciones > 750 mg/mL. Estos hallazgos indican que las evaluaciones hemorreológicas podrían utilizarse para estimar el grado de toxicidad causado por los nanomateriales y obtener información útil sobre su seguridad al interactuar con células. Las NP de CdS tienen una recubierta de dextrina (agente pasivante) que, de acuerdo con los resultados obtenidos, no ha causado toxicidad significativa en eritrocitos (5 % hemólisis) y deformabilidad.

El aspecto morfológico y su influencia en la hemocompatibilidad, ya se ha descrito anteriormente. Este aspecto ha sido estudiado por algunos investigadores, en los que se ha demostrado que las nanopartículas como las de TiO<sub>2</sub> de diferentes tamaños (20 y 200 nm), causaron deformación de la membrana de los eritrocitos a una



concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , siendo el efecto más marcado con las de menor tamaño (Pretorius, Du and Bester, 2016). Este tipo de estudios han sugerido la capacidad de interacción de las NP en la superficie membranal de los eritrocitos. En otro estudio, se informó que los eritrocitos tratados con nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  de un tamaño de 30 nm a una concentración de 1 mg/mL producían alteraciones morfológicas y adhesión de eritrocitos; mientras que, los eritrocitos tratados con nanopartículas de  $\text{ZrO}_2$  de diferentes tamaños (80-100 nm) y nanopartículas de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (15-60 nm) a una concentración de 2 mg/mL produjeron cambios superficiales en los eritrocitos, tales como, grietas y se perdió la morfología bicóncava normal. Asimismo, los eritrocitos tratados con  $\text{Al}_2\text{O}_3$  presentaban vesículas en la membrana eritrocitaria y sugirieron que los cambios producidos eran irreversibles (Shi-Qiang, *et.al.*, 2008).

Otro factor que se ha tomado en cuenta para los estudios sobre efecto hemolítico es el tiempo al que se expongan los eritrocitos con NP. Sin embargo, en un estudio se informó que la actividad hemolítica no depende del tiempo transcurrido porque la hemólisis es completada en un tiempo de 5 minutos (Pathak et al., 2014). En el presente estudio realizado sobre los eritrocitos tratados con NPs de CdS-dextrina (3-5 nm) se observó que provocaron cambios morfológicos en la membrana eritrocitaria a concentraciones de 0,1 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cuando se incubaron durante 30 min. Las alteraciones que se observaron fueron pérdida de biconcavidad, grietas y pequeños bultos en la superficie de la membrana. Sin embargo, en los eritrocitos tratados durante 60 minutos, además de las alteraciones antes mencionadas, se observó que existía una aglomeración de las nanopartículas en la superficie celular con todas las concentraciones estudiadas. Las imágenes de AFM y las mediciones topográficas probaron que las NP de CdS-dextrina producían alteraciones morfológicas similares a las ya reportadas, dado a su pequeño tamaño podrían tener una mayor superficie para interactuar con la membrana eritrocitaria.

La carga de las células depende directamente de la composición de la membrana celular y del estado fisiológico de la célula; por lo que, los cambios en el potencial  $\zeta$  pueden reflejar cambios morfológicos y/o funcionales (Kozelskaya, *et.al.*, 2016;

Furusawa and Uchiyama, 1998). Los cambios en el potencial  $\zeta$  de la membrana se han asociado con la presencia de ciertos materiales en algunas células, incluidos los eritrocitos. Como se demostró en el estudio de Bondar *et al.*, 2012 donde se evaluó el efecto de diferentes nanopolímeros y su influencia sobre el potencial  $\zeta$  en células de adenocarcinoma cervical (HeLa), adenocarcinoma de mama (MCF-7) y eritrocitos, como indicativo biofísico de la composición fisiológica de las células. Se demostró que la interacción de las células con poli-L-lisina (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y polietilenimina (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) modificó el potencial  $\zeta$  de la membrana celular volviéndola catiónica, y se asociaba con una reducción en la viabilidad y efecto apoptótico. Por otro lado, se ha observado que los eritrocitos expuestos a nanocápsulas de mono laurato de glicerol no produjeron toxicidad ya que lo asociaron a que no hubo cambios significativos en el potencial  $\zeta$  de la membrana del eritrocito (Bondar *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en la experimentación, mostraron que la exposición de eritrocitos con NP de CdS-Dex en concentraciones de 0.01 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 30 minutos no produjo cambios en el potencial  $\zeta$ . Aunque se observaron cambios morfológicos del eritrocito, probablemente no ocurran cambios en la integridad de la membrana. Por tanto, en base a otros estudios reportados similares al realizado, es posible sugerir que la interacción de las NP de CdS-Dex/eritrocitos probablemente no afecte la funcionalidad, ya que no observamos cambios en la carga neta de la superficie celular, al menos un tiempo de exposición corto.

Una de las principales estrategias para mejorar la hemocompatibilidad de las NP es la modificación de la superficie que puede alterar la química y las propiedades de la superficie que entra en contacto directo con la sangre. Esto a menudo puede enmascarar la toxicidad inherente de las NP, extender su vida media en circulación y drásticamente cambiaría sus interacciones con las células sanguíneas (Pleskova, Kriukov, Gorshkova and Boryakov, 2019). Tal como se demuestra en un estudio de la interacción de NP funcionalizadas de polietilenglicol unido covalentemente (PEG) a NP de óxido con eritrocitos, plaquetas y leucocitos para determinar si la PEGilación mejoraba la hemocompatibilidad de las NP. Sus resultados mostraron que, además de

observar una reducción del efecto hemolítico tras la exposición a NP de óxido de hierro PEGilado, confirmaron que esta modificación en la carga de la superficie provocaba la ausencia de daño en la membrana de los eritrocitos (Herrmann, *et.al.*, 2011). Sin embargo, un interesante estudio realizado por He *et al*, demostró un efecto negativo inesperado en NP de oro PEGiladas y su influencia en la función de los eritrocitos. Este estudio sugiere que, aunque estas NP no indujeron hemólisis, si alteraron la morfología de los eritrocitos y con esto se afectaba la capacidad de suministro de oxígeno a través de la interacción con los eritrocitos (He, Liu and Du, 2014). Considerando esta información es posible proponer que los cambios morfológicos o efectos hemolíticos de las NP de CdS-dextrina, van a depender de cada NP en cuestión. Ya que, aunque tengan agentes pasivantes que eviten su toxicidad, no pueden evitar que afecten la superficie de la membrana de los eritrocitos. Lo que a su vez se puede traducir como parte del daño a la integridad y funcionalidad eritrocitaria.

En estudios previos con NP de CdS-dextrina se ha demostrado que son captados por células y son internalizados eficientemente y distribuidos homogéneamente dentro de las células no sanguíneas, y que la captación ha sido dependiente de la dosis (Gonzalez De La Cruz, *et. al.*, 2019). Se sabe que hay nanomateriales que no pueden atravesar la membrana, tal es el caso de los PC carboxilados de un tamaño de 625 nm que fueron evaluados en células de médula ósea humana durante 1, 3, 6 y 24 horas de tiempo de exposición. Se demostró que estos PC se internalizan fácilmente, pero su localización es sólo en el citoplasma y en la superficie celular, sin llegar a penetrar hasta el núcleo (Agulla, *et. al.*, 2014). Los eritrocitos se han utilizado para la liberación de agentes de contraste mediante el uso de nanopartículas magnéticas, lo anterior se ha logrado mediante la apertura temporal de poros en la membrana eritrocitaria para que puedan atravesar las nanopartículas y puedan permanecer dentro de estas células una vez que se cierran los poros membranales (Kundrotas, *et.al.*, 2019). Esta metodología ha demostrado ser estable, versátil y segura. Sin embargo, no existen informes que indiquen que los eritrocitos sean capaces de internalizar nanomateriales por sí mismos.

En este estudio, se evaluó la capacidad del eritrocito para captar NP de CdS-dextrina utilizando concentraciones de 0.1 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ , después de la exposición durante 30 min. El análisis se realizó por microscopía confocal, en donde se pudo observar que las NP solo rodeaban a los eritrocitos en la superficie, sin ser captados al interior del eritrocito. Estos hallazgos se correlacionaron con los estudios de AFM, donde se demostró que las NP permanecían en la superficie celular. Se ha informado que una célula es capaz de internalizar nanopartículas a través de mecanismos activos de internalización: endocitosis, macropinocitosis, fagocitosis y pinocitosis (siendo esta última, la más común). Se sabe que a través de estos mecanismos las NP son encapsuladas en forma de vesículas y se transportan de manera selectiva, y se estima que el tamaño, la carga superficial de las NP, así como la maquinaria de transporte (Takeuchi, et al., 2014) pueden estar involucrados en cada mecanismo. Sin embargo, se sabe que el eritrocito al no tener la maquinaria de una célula normal, como la endocitosis o cualquier otro mecanismo de transporte, es quizás una limitante para que pueda internalizar las NP.

Por otra parte, el análisis de acoplamiento molecular sugiere que los cambios en la forma del eritrocito pueden ser debidas a interacciones moleculares entre la dextrina que recubre el centro de CdS y la superficie celular. La representación esquemática obtenida del acoplamiento molecular muestra que la dextrina se puede unir al transportador de glucosa GLUT1. Tal como lo muestran Galochkina *et al* 2019, el puente de sal formado por los residuos K38 y E299 es clave para la absorción de glucosa. Los resultados obtenidos de acoplamiento pueden dar una explicación a los cambios morfológicos de los eritrocitos ya que la interacción de la dextrina puede alterar el movimiento natural conformacional del transportador GLUT1, y con esto producir una disminución de la absorción de glucosa. Aunque el potencial  $\zeta$  no mostró cambios en el eritrocito que pudiesen indicar un cambio funcional del mismo, por técnicas de AFM se mostró que las NP si permanecen en la superficie celular y que se asocian con un cambio morfológico de la célula. Por lo que, el análisis de acoplamiento molecular sugiere que podría haber modificaciones en componentes importantes de la membrana celular que lleve a cambios funcionales del eritrocito. Con base en la

información antes mencionada, se sugiere que los eritrocitos son células sensibles al efecto de algunos nanomateriales y como resultado de tal interacción se puede producir alteraciones membranales y morfológicas. El tipo de célula y las características de su membrana puede influir en la interacción con algún tipo de nanomaterial (Park, Lee, Patel, Ma, Lee, Jo and Im, 2017). En resumen, los resultados demostraron que, las NP de CdS-dextrina producen ligera hemólisis y cambios morfológicos importantes en la membrana del eritrocito. Sin embargo, no es posible sugerir que estos cambios pudieran desencadenar efectos en el funcionamiento de la célula.

Está claro que las NP al ser administradas de manera sistémica en el organismo, se distribuyen libremente, aunque en el torrente sanguíneo lo hacen por tiempo limitado. Esto debido a que pueden ser fagocitados por macrófagos residentes en tejidos. Dependiendo de la ruta que sigan, las NP llegan a acumularse en órganos específicos. Al tener resultados que respaldan el hecho de que nuestras NP logran internalizarse y distribuirse en las células y que han causado ciertas modificaciones morfológicas en eritrocitos, es importante destacar lo observado al exponer macrófagos RAW 264.7 con las NP de CdS-Dex. Ya que estos hallazgos proporcionan nuevos conocimientos sobre el comportamiento detallado de un tipo de nanomaterial al interactuar dentro del organismo.

Para continuar con la comprensión de las interacciones de las NP y las células, se ha reportado que células RAW 264.7 tratadas con nanopartículas de Fe a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , aumentan la proliferación de células en hasta un 37% comparado con el grupo control. Aunque a concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la proliferación celular disminuye detiene, pero se mantiene la viabilidad celular (Zhang et al., 2019). También, algunos estudios han reportado que células RAW 264.7 tratadas con nanopartículas lipídicas de 212.8 nm a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y monitoreadas a 5 horas de incubación, disminuyeron la viabilidad significativamente dependiente del tiempo de exposición, e incluso causaron apoptosis tras 2 horas de incubación (Liang et al., 2019). En otros estudios, células RAW 264.7 tratadas con nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  de diferentes

tamaños (1–5  $\mu\text{m}$  y 14 nm) y nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  (30 nm y 1  $\mu\text{m}$ ) a concentraciones de (0.0052, 0.052, 0.52, 5.2, 52, y 520  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) por 24 h; se observó que, los diferentes tipos de nanopartículas disminuían notablemente la viabilidad celular de manera concentración dependiente. No obstante, destacaron que en el caso de las nanopartículas de  $\text{nSiO}_2$  (14 nm) exhibió una disminución particularmente clara con respecto a la viabilidad de células tratadas con  $\text{mSiO}_2$  (1-5  $\mu\text{m}$ ) (Kim et al., 2009). Esto sugiere que, el efecto sobre la viabilidad celular en macrófagos tratados con diferentes nanopartículas podría depender del tipo de nanomaterial utilizado, así como de la concentración y tiempo de exposición.

Existen algunos reportes en los que células RAW264.7 tratadas con nanopartículas de poly-(D,L-lactide-co-glycolide (PLGA) a concentraciones de 10, 30, 100, 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y a diferentes tiempos de 10min, 30min, 1, 2, 3, 4, and 24 h entran a las células y permanecen en citoplasma y núcleo. Sin embargo, se observó que la intensidad de fluorescencia se aumentaba dependiente de la concentración de nanopartículas y con respecto al tiempo de exposición (XIONG, Zhao, Heng, Ng & Loo, 2011). En el estudio realizado con las NP de CdS-Dex se observó que fueron captadas por los macrófagos desde concentraciones de 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , aumentando la internalización de NP conforme se incrementaron las concentraciones, siendo más evidente esta intensidad a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En otro estudio realizado sobre células RAW 264.7, tratadas con nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  Aerosil1200 (12 nm) a concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 1, 3 y 6 h, se observó que la exposición de macrófagos RAW 264.7 a estas nanopartículas desencadenó la aparición de vesículas por una doble membrana que sugiere pueden ser autofagosomas y también la presencia de vacuolas más grandes que se asemejan a autolisosomas encapsulando restos celulares. También, se observaron nanopartículas en la membrana celular y en el citoplasma se observaron pequeños agregados de nanopartículas (Marquardt, C., Fritsch-Decker, S., Al-Rawi, M., Diabaté, S. & Weiss, C., 2017). Contrastando los resultados antes expuestos con los obtenidos en el presente estudio, podría sugerirse que lo observado en la

concentración de 1000 µg/mL, puede corresponder a autofagosomas como resultado de la captación de nanopartículas de CdS-Dex por los macrófagos.

La fagocitosis de NP por algunas células del sistema inmune, es considerado un evento que los investigadores usan a favor, tratando de diseñar nuevas formas de administrar fármacos a través de esta interacción con NPs (Yong, Song, Kim, Ain and Kim, 2017). En el estudio realizado, se encontró que, el efecto fagocítico aumenta de manera concentración dependiente, siendo mayor este efecto en la concentración de 1000 µg/mL; lo cual puede indicar que la interacción con NPs de CdS-Dex podrían estar induciendo el aumento de la fagocitosis de levaduras. Se sabe que, algunas NPs pueden inducir la activación de células del sistema inmune (Blanco, Shen and Ferrari, 2015). Algunos autores sugieren que, la respuesta de los macrófagos es dependiente del tamaño de algunos nanomateriales. Es decir, sugieren que nanomateriales pequeños (< 10 nm), pueden ser fagocitados de manera efectiva por los macrófagos (Kou & Babensee, 2011). Esto podría relacionarse con lo observado en los resultados obtenidos en la concentración de 1000 µg/mL, en donde claramente se observaron puntos cafés en los macrófagos y que podrían no corresponder a las levaduras fagocitadas.

Las propiedades fisicoquímicas de las NP tienen una influencia pertinente en su hemocompatibilidad. No podemos descartar que la carga superficial, tamaño y funcionalización debe ser considerado como parte esencial al diseñar y sintetizar nanomateriales. Así como dentro del alcance de la investigación y el desarrollo, es fundamental ver cada NP recién diseñada como un caso individual sin conferir ninguna característica de partículas similares. Se considera que, algunos cambios leves en la NP, puede generar un nuevo perfil toxicológico y debe evaluarse desde cero. Los resultados de esta investigación amplían la importancia de evaluar la hemocompatibilidad de NP desde todos los ángulos celulares disponibles, hasta comprender los alcances toxicológicos. Sin embargo, considero que el valor de comprender las interacciones NP-células sanguíneas va más allá de mejorar el diseño de novedosas NP. Es fundamental que todas estas nuevas tecnologías involucren

estudios basados en las interacciones NP-sangre. Ya que se podría abrir la posibilidad de prevenir, diagnosticar y tratar infecciones, basándonos en las interacciones NP-sangre.



## 9. Conclusión general.

- La interacción de NP de CdS-Dex tiene efectos sobre componentes sanguíneos.

### 9.1 Conclusiones particulares.

Las NP de CdS-dex inducen la formación de la corona de proteína al interactuar con albúmina y se da de manera concentración dependiente. Siendo más evidente el efecto a la concentración de 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Las NP de CdS-dex modifican el Potencial Z ( *$\zeta$ -potential*) al interactuar con albúmina por lo que se asocia a la confirmación de la formación de la corona de proteína.

Las NPs de CdS-Dex si ocasionaron diferencias en el tiempo de tromboplastina dependiente de la concentración y tiempo de exposición. Esto sugiere que pueden estar activando la vía intrínseca.

Las NPs de CdS-Dex causaron un efecto en el tiempo de protrombina concentración y tiempo de exposición dependiente a partir de 5 minutos (0.01 y 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) hasta 30 minutos (0.1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ ). Lo cual puede indicar que a mayor concentración y tiempo de exposición, comienza a activarse la vía extrínseca y desencadenar la cascada de coagulación.

Las NPs de CdS-Dex no alteran la concentración de fibrinógeno en sangre de manera significativa.

Las NPs de CdS-Dex causaron ligera hemólisis e indujeron cambios morfológicos en la membrana del eritrocito. Aunque no fueron captadas.

Las NPs de CdS-Dex causaron agregación plaquetaria de manera concentración dependiente a partir de 0.01  $\mu\text{g/mL}$  y modificaron la morfología de la plaqueta.

Las NP de CdS-Dex no produjeron disminución de la viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 a concentraciones de 0.001 hasta 100  $\mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, se observó proliferación celular a la concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

Las NP de CdS-Dex fueron captadas por macrófagos y se observaron en todo el interior de la célula, hasta nucleolos.

La interacción de NP de CdS-Dex con macrófagos causó como efecto la producción de NO en todas las concentraciones a partir de 0.01  $\mu\text{g/mL}$ , siendo mayor el efecto observado en la concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

La interacción de NP de CdS-Dex con macrófagos, produjo un aumento de fagocitosis de levaduras en todas las concentraciones desde 0.01  $\mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, este efecto fagocítico fue mayor a la concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

## 10. Perspectivas

Evaluar el efecto de NP de CdS-Dex para establecer si generan la activación de plaquetas cuantificando la activación de la proteína GPIIb/IIIa mediante Western blot o citometría de flujo.

Evaluar el efecto de NP de CdS-Dex para demostrar si influyen en la activación por medio de la cuantificación de la expresión de IL-10, TNF- $\alpha$  y óxido nítrico por ELISA.

Evaluar si las NP de CdS-Dex inducen captación en células endoteliales y daño endotelial la cuantificación de especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y la expresión de VCAM-1 en células endoteliales HUVEC.

Evaluar si las NP de CdS-Dex inducen la activación del complemento mediante la cuantificación del complejo terminal C unido a vitronectina (SC5b-9) mediante ELISA.

## 11. Referencias

- Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (2009). Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced drug delivery reviews*, 61(6), 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009>
- Agulla, J., Brea, D., Argibay, B., Novo, M., Campos, F., Sobrino, T., Blanco, M., Castillo, J., & Ramos-Cabrer, P. (2014). Quick adjustment of imaging tracer payload, for in vivo applications of theranostic nanostructures in the brain. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 10(4), 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.12.004>
- Akeuchi, Y. T., Uzuki, H. S., Asahara, H. S., Eda, J. U., Abata, I. Y., Tagaki, K. I., & Aito, S. S. (2014). *Encapsulation of Iron Oxide Nanoparticles into Red Blood Cells as a Potential Contrast Agent for Magnetic Particle Imaging*. 37–43. doi:10.14326/abe.3.37
- Albanese, A., & Chan, W. C. (2011). Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity. *ACS nano*, 5(7), 5478–5489. <https://doi.org/10.1021/nn2007496>
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., & Farokhzad, O. C. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*, 5(4), 505–515. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- Alyautdin, R., Khalin, I., Nafeeza, M. I., Haron, M. H., & Kuznetsov, D. (2014). Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier. *International journal of nanomedicine*, 9, 795–811. <https://doi.org/10.2147/IJN.S52236>
- An, X., Guo, X., Sum, H., Morrow, J., Gratzer, W., & Mohandas, N. (2004). Phosphatidylserine binding sites in erythroid spectrin: location and implications for membrane stability. *Biochemistry*, 43(2), 310–315. <https://doi.org/10.1021/bi035653h>
- Anderson, J.M. (2001). *Biological Responses to Materials. Annual Review of Materials Research*, 31(1), 81–110. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.31.1.81>
- Angiolillo, D.J., & Ferreiro, J.L. (2010). *Inhibición del receptor plaquetario P2Y12 de adenosina difosfato plaquetario: efectos beneficiosos y limitaciones de las estrategias terapéuticas actuales y perspectivas futuras. Revista Española de Cardiología*, 63(1), 60–76. [https://doi.org/10.1016/s0300-8932\(10\)70010-5](https://doi.org/10.1016/s0300-8932(10)70010-5)
- Arques S. (2018). Human serum albumin in cardiovascular diseases. *European journal of internal medicine*, 52, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.04.014>
- Aseichev, A.V., Azizova, O. A., Beckman, E. M., Skotnikova, O. I., Dudnik, L. B., Shcheglovitova, O. N., & Sergienko, V. I. (2014). Effects of gold nanoparticles on

erythrocyte hemolysis. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 156(4), 495–498.  
<https://doi.org/10.1007/s10517-014-2383-6>

Austin, S.K. (2017). Haemostasis. *Medicine (United Kingdom)*, 45(4), 204–208.  
<https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.01.013>

Avsievich, T., Popov, A., Bykov, A., & Meglinski, I. (2019). Mutual interaction of red blood cells influenced by nanoparticles. *Scientific reports*, 9(1), 5147.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-41643-x>

Axson, J. L., Stark, D. I., Bondy, A. L., Capracotta, S. S., Maynard, A. D., Philbert, M. A., Bergin, I. L., & Ault, A. P. (2015). Rapid Kinetics of Size and pH-Dependent Dissolution and Aggregation of Silver Nanoparticles in Simulated Gastric Fluid. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces*, 119(35), 20632–20641.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03634>

Baccarelli, A., Martinelli, I., Zanobetti, A., Grillo, P., Hou, L. F., Bertazzi, P. A., Mannucci, P.M., & Schwartz, J. (2008). Exposure to particulate air pollution and risk of deep vein thrombosis. *Archives of internal medicine*, 168(9), 920–927.  
<https://doi.org/10.1001/archinte.168.9.920>

Barshtein, G., Livshits, L., Shvartsman, L. D., Shlomai, N. O., Yedgar, S., & Arbell, D. (2016). Polystyrene Nanoparticles Activate Erythrocyte Aggregation and Adhesion to Endothelial Cells. *Cell biochemistry and biophysics*, 74(1), 19–27.  
<https://doi.org/10.1007/s12013-015-0705-6>

Bergmeier, W., & Stefanini, L. (2018). Platelets at the Vascular Interface. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*, 2(1), 27–33.  
<https://doi.org/10.1002/rth2.12061>

Biju, V., Mundayoor, S., Omkumar, R. V., Anas, A., & Ishikawa, M. (2010). Bioconjugated quantum dots for cancer research: present status, prospects and remaining issues. *Biotechnology advances*, 28(2), 199–213.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.11.007>

Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology*, 33(9), 941–951.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.3330>

Bondar, O. V., Saifullina, D. V., Shakhmaeva, I. I., Mavlyutova, I. I., & Abdullin, T. I. (2012). Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. *Acta naturae*, 4(1), 78–81.

Brash, J. L. (2018). *Blood compatibility of nanomaterials. Drug Delivery Nanosystems for Biomedical Applications*, 13–31. doi:10.1016/b978-0-323-50922-0.00002-x

Brass, L.F., Tomaiuolo, M., Welsh, J., Poventud-Fuentes, I., Zhu, L., Diamond, S.L., & Stalker, T.J. (2019). Hemostatic thrombus formation in flowing blood. En *Platelets* (4a ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813456-6.00020-5>

Britto, F.M., & Castro, G.R. (2012). Nanotecnología, hacia un nuevo portal científico-tecnológico. *Química Viva*, 11.

Brook, R.D., Rajagopalan, S., Pope, C.A., 3rd, Brook, J. R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A. V., Holguin, F., Hong, Y., Luepker, R. V., Mittleman, M. A., Peters, A., Siscovick, D., Smith, S. C., Jr, Whitsel, L., Kaufman, J. D., & American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, and Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism (2010). Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 121(21), 2331–2378. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3181d8e311>

Broos, K., Feys, H. B., De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K., & Deckmyn, H. (2011). Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews*, 25(4), 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2011.03.002>

Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17–MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>

Caminade, A. M., & Majoral, J. P. (2018). Which Dendrimer to Attain the Desired Properties? Focus on Phosphorhydrazone Dendrimers. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(3), 622. <https://doi.org/10.3390/molecules23030622>

Caracciolo, G., Farokhzad, O. C., & Mahmoudi, M. (2017). Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona. *Trends in Biotechnology*, 35(3), 257–264. doi:10.1016/j.tibtech.2016.08.011

Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G. J., & Puntjes, V. (2010). Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS nano*, 4(7), 3623–3632. <https://doi.org/10.1021/nn901372t>

Cavadas, M., González-Fernández, A., & Franco, R. (2011). Pathogen-mimetic stealth nanocarriers for drug delivery: a future possibility. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 7(6), 730–743. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.006>

Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K. A., & Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2050–2055. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608582104>

Cenni, E., Granchi, D., Avnet, S., Fotia, C., Salerno, M., Micieli, D., Sarpietro, M. G., Pignatello, R., Castelli, F., & Baldini, N. (2008). Biocompatibility of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles conjugated with alendronate. *Biomaterials*, 29(10), 1400–1411. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.022>

Chen, K. L., & Bothun, G. D. (2013). Nanoparticles Meet Cell Membranes: Probing Nonspecific Interactions using Model Membranes. *Environmental Science & Technology*, 48(2), 873–880. doi:10.1021/es403864v

Chen, L. Q., Fang, L., Ling, J., Ding, C. Z., Kang, B., & Huang, C. Z. (2015). Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. *Chemical research in toxicology*, 28(3), 501–509. <https://doi.org/10.1021/tx500479m>

Chen, L. Q., Fang, L., Ling, J., Ding, C. Z., Kang, B., & Huang, C. Z. (2015). Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. *Chemical research in toxicology*, 28(3), 501–509. <https://doi.org/10.1021/tx500479m>

Chen, X., & Schluesener, H. J. (2008). Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology letters*, 176(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.004>

Choimet, M., Hyoung-Mi, K., Jae-Min, O., Tourrette, A., & Drouet, C. (2016). Nanomedicine: Interaction of biomimetic apatite colloidal nanoparticles with human blood components. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 145, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.038>

Clemetson K. J. (2012). Platelets and primary haemostasis. *Thrombosis research*, 129(3), 220–224. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.11.036>

Cooley, M., Sarode, A., Hoore, M., Fedosov, D. A., Mitragotri, S., & Sen Gupta, A. (2018). Influence of particle size and shape on their margination and wall-adhesion: implications in drug delivery vehicle design across nano-to-micro scale. *Nanoscale*, 10(32), 15350–15364. <https://doi.org/10.1039/c8nr04042g>

Corbalan, J. J., Medina, C., Jacoby, A., Malinski, T., & Radomski, M. W. (2012). Amorphous silica nanoparticles aggregate human platelets: potential implications for vascular homeostasis. *International journal of nanomedicine*, 7, 631–639. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28293>

Corbalan, J. J., Medina, C., Jacoby, A., Malinski, T., & Radomski, M. W. (2012). Amorphous silica nanoparticles aggregate human platelets: potential implications for vascular homeostasis. *International journal of nanomedicine*, 7, 631–639. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28293>

Daleke D. L. (2008). Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Current opinion in hematology*, 15(3), 191–195. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3282f97af7>



Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Pr at, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 161(2), 505–522. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>

Das, B., Tripathy, S., Adhikary, J., Chattopadhyay, S., Mandal, D., Dash, S. K., Das, S., Dey, A., Dey, S. K., Das, D., & Roy, S. (2017). Surface modification minimizes the toxicity of silver nanoparticles: an in vitro and in vivo study. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 22(6), 893–918. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1468-x>

Das, P., Ganguly, S., Agarwal, T., Maity, P., Ghosh, S., Choudhary, S., ... Das, N. C. (2019). *Heteroatom doped blue luminescent carbon dots as a nano-probe for targeted cell labeling and anticancer drug delivery vehicle*. *Materials Chemistry and Physics*, 237, 121860. doi:10.1016/j.matchemphys.2019.121860

de la Cruz Gonz alez, G, Rocío Gómez Cancino, P. Rodríguez-Fragoso, Paola Jaimes-Chavez, Ana L. Barbosa-Rayos; J. Reyes Esparza and Lourdes Rodríguez Fragoso. Disposition and Biocompatibility of Dextrin-coated cadmium sulfide nanoparticles after a single dose and multiple doses in rats. *Indian J. Pharm Sci* 2019; 81 (5): 876-884. doi:10.36468/pharmaceutical-sciences.582

de la Cruz Gonz alez, G., Rodríguez-Fragoso, P., Reyes-Esparza, J., Rodríguez-López, A., Gómez-Cansino, R., & Rodriguez-Fragoso, L. (2018). Interaction of Nanoparticles with Blood Components and Associated Pathophysiological Effects. *Unraveling the Safety Profile of Nanoscale Particles and Materials - From Biomedical to Environmental Applications*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69386>

Dobrovolskaia, M. A., & McNeil, S. E. (Eds.). (2013). *Handbook of immunological properties of engineered nanomaterials* (Vol. 1). World Scientific.

Dobrovolskaia, M. A., Aggarwal, P., Hall, J. B., & McNeil, S. E. (2008). Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Molecular pharmaceuticals*, 5(4), 487–495. <https://doi.org/10.1021/mp800032f>

Dobrovolskaia, M. A., Patri, A. K., Zheng, J., Clogston, J. D., Ayub, N., Aggarwal, P., Neun, B. W., Hall, J. B., & McNeil, S. E. (2009). Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 5(2), 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.08.001>

Du, V. X., Huskens, D., Maas, C., Al Dieri, R., de Groot, P. G., & de Laat, B. (2014). New insights into the role of erythrocytes in thrombus formation. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 40(1), 72–80. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363470>

Egners, A., Erdem, M., & Cramer, T. (2016). The Response of Macrophages and Neutrophils to Hypoxia in the Context of Cancer and Other Inflammatory Diseases. *Mediators of inflammation*, 2016, 2053646. <https://doi.org/10.1155/2016/2053646>



Agusquiaguirre, S. P., Igartua, M., Hernández, R. M., & Pedraz, J. L. (2012). Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 14(2), 83–93. <https://doi.org/10.1007/s12094-012-0766-6>

Ehmann, H. M., Breitwieser, D., Winter, S., Gspan, C., Koraimann, G., Maver, U., Sega, M., Köstler, S., Stana-Kleinschek, K., Spirk, S., & Ribitsch, V. (2015). Gold nanoparticles in the engineering of antibacterial and anticoagulant surfaces. *Carbohydrate polymers*, 117, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.116>

Ekstrand-Hammarström, B., Hong, J., Davoodpour, P., Sandholm, K., Ekdahl, K. N., Bucht, A., & Nilsson, B. (2015). TiO<sub>2</sub> nanoparticles tested in a novel screening whole human blood model of toxicity trigger adverse activation of the kallikrein system at low concentrations. *Biomaterials*, 51, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.031>

Elzey, S., Grassian, V.H. (2010). Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments. *J Nanopart Res* 12, 1945–1958. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9783-y>

Ferdous, Z., Beegam, S., Tariq, S., Ali, B. H., & Nemmar, A. (2018). The in Vitro Effect of Polyvinylpyrrolidone and Citrate Coated Silver Nanoparticles on Erythrocytic Oxidative Damage and Eryptosis. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 49(4), 1577–1588. <https://doi.org/10.1159/000493460>

Fernández-Tresguerres Jesús A., Carmen Ariznavarreta Ruiz, Victoria Cachofeiro, Daniel P. Cardinali, Eduardo Escrich Escriche, Pablo E. Gil-Loyzaga, Vicente Lahera Juliá, Francisco Mora Teruel, Marta Romano Pardo, J. Tamargo Menéndez. . (2010). *Fisiología Humana. 4ta Edición*. Madrid, España: Mcgraw-Hill.

Fornaguera, C., Calderó, G., Mitjans, M., Vinardell, M. P., Solans, C., & Vauthier, C. (2015). Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies. *Nanoscale*, 7(14), 6045–6058. <https://doi.org/10.1039/c5nr00733j>

Fröhlich E. (2016). Action of Nanoparticles on Platelet Activation and Plasmatic Coagulation. *Current medicinal chemistry*, 23(5), 408–430. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160106151428>

Furusawa, K., & Uchiyama, K. (1998). Collaborative studies of zeta-potential measurements and electrophoretic measurements using reference sample. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 140(1-3), 217–226. doi:10.1016/s0927-7757(97)00280-x

Gaffney, A. M., Santos-Martinez, M. J., Satti, A., Major, T. C., Wynne, K. J., Gun'ko, Y. K., Annich, G. M., Elia, G., & Radomski, M. W. (2015). Blood biocompatibility of surface-

bound multi-walled carbon nanotubes. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 11(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.07.005>

Galochkina, T., Ng Fuk Chong, M., Challali, L., Abbar, S., & Etchebest, C. (2019). New insights into GluT1 mechanics during glucose transfer. *Scientific reports*, 9(1), 998. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37367-z>

Gao, X., Du, C., Zhuang, Z., & Chen, W. (2016). Carbon quantum dot-based nanoprobes for metal ion detection. *Journal of Materials Chemistry C*, 4(29), 6927–6945. doi:10.1039/c6tc02055k

Ge, C., Du, J., Zhao, L., Wang, L., Liu, Y., Li, D., Yang, Y., Zhou, R., Zhao, Y., Chai, Z., & Chen, C. (2011). Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(41), 16968–16973. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105270108>

Geekiyange, N. M., Balanant, M. A., Sauret, E., Saha, S., Flower, R., Lim, C. T., & Gu, Y. (2019). A coarse-grained red blood cell membrane model to study stomatocyte-discocyte-echinocyte morphologies. *PloS one*, 14(4), e0215447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215447>

Gerard J. Tortora, & Derrickson, B. (2009). *Principles of Anatomy and Physiology: Organization, support and movement, and control systems of the human body; vol. 2: maintenance and continuity of the human body*. John Wiley.

Gobbo, O. L., Sjaastad, K., Radomski, M. W., Volkov, Y., & Prina-Mello, A. (2015). Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Theranostics*, 5(11), 1249–1263. <https://doi.org/10.7150/thno.11544>

Gómez-Cansino R, Reyes-Esparza JA, Rodríguez-Fragoso P, González de la Cruz G and Rodríguez-Fragoso L. Long Exposure to CdS-Dextrin Nanoparticles Induces an Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Effect in Rats. *Journal of Materials Science & Nanotechnology* 2017;5(1): 2-10. ISSN: 2348-9812 <https://doi.org/10.15744/2348-9812.5.105>

Gonzales, R., Auclair, C., Voisin, E., Gautero, H., Dhermy, D., & Boivin, P. (1984). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer research*, 44(9), 4137–4139.

Gorbet, M. B., & Sefton, M. V. (2004). Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*, 25(26), 5681–5703. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.023>

Gov, N. S., & Safran, S. A. (2005). Red blood cell membrane fluctuations and shape controlled by ATP-induced cytoskeletal defects. *Biophysical journal*, 88(3), 1859–1874. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.045328>

Greish, K., Thiagarajan, G., Herd, H., Price, R., Bauer, H., Hubbard, D., Burckle, A., Sadekar, S., Yu, T., Anwar, A., Ray, A., & Ghandehari, H. (2012). Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles. *Nanotoxicology*, 6(7), 713–723. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.604442>

Greish, K., Thiagarajan, G., Herd, H., Price, R., Bauer, H., Hubbard, D., Burckle, A., Sadekar, S., Yu, T., Anwar, A., Ray, A., & Ghandehari, H. (2012). Size and surface charge significantly influence the toxicity of silica and dendritic nanoparticles. *Nanotoxicology*, 6(7), 713–723. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.604442>

Griess, P. (1879). *Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“*. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 12(1), 426–428. doi:10.1002/cber.187901201117

Gu, Z., Aimetti, A. A., Wang, Q., Dang, T. T., Zhang, Y., Veiseh, O., Cheng, H., Langer, R. S., & Anderson, D. G. (2013). Injectable nano-network for glucose-mediated insulin delivery. *ACS nano*, 7(5), 4194–4201. <https://doi.org/10.1021/nn400630x>

Gupta, A., Korte, T., Herrmann, A., & Wohland, T. (2020). Plasma membrane asymmetry of lipid organization: fluorescence lifetime microscopy and correlation spectroscopy analysis. *Journal of lipid research*, 61(2), 252–266. <https://doi.org/10.1194/jlr.D119000364>

Gutiérrez-Sancha I., Reyes-Esparza J, Rodríguez-Fragoso P, García-Vázquez F, Rodríguez-Fragoso L (2015) Bright Green Emitting Maltodextrin Coated Cadmium Sulfide Quantum Dots as Contrast Agents for Bioimaging: A Biocompatibility Study. *Int J Nanomed Nanosurg* 1(2). <http://dx.doi.org/10.16966/2470-3206.107>

Hadjidemetriou, M., & Kostarelou, K. (2017). Nanomedicine: Evolution of the nanoparticle corona. *Nature nanotechnology*, 12(4), 288–290. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.61>

Hajipour, M. J., Santoso, M. R., Rezaee, F., Aghaverdi, H., Mahmoudi, M., & Perry, G. (2017). Advances in Alzheimer's Diagnosis and Therapy: The Implications of Nanotechnology. *Trends in biotechnology*, 35(10), 937–953. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.002>

He, K., Liang, X., Wei, T., Liu, N., Wang, Y., Zou, L., Lu, J., Yao, Y., Kong, L., Zhang, T., Xue, Y., Wu, T., & Tang, M. (2019). DNA damage in BV-2 cells: An important supplement to the neurotoxicity of CdTe quantum dots. *Journal of applied toxicology : JAT*, 39(3), 525–539. <https://doi.org/10.1002/jat.3745>

He, Z., Li, C., Zhang, X., Zhong, R., Wang, H., Liu, J., & Du, L. (2018). The effects of gold nanoparticles on the human blood functions. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup2), 720–726. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1468769>

He, Z., Liu, J., & Du, L. (2014). The unexpected effect of PEGylated gold nanoparticles on the primary function of erythrocytes. *Nanoscale*, 6(15), 9017–9024. <https://doi.org/10.1039/c4nr01857e>

He, Z., Liu, J., & Du, L. (2014). The unexpected effect of PEGylated gold nanoparticles on the primary function of erythrocytes. *Nanoscale*, 6(15), 9017–9024. <https://doi.org/10.1039/c4nr01857e>

Herrmann, I. K., Uner, M., Hasler, M., Roth-Z'Graggen, B., Aemisegger, C., Baulig, W., Athanassiou, E. K., Regenass, S., Stark, W. J., & Beck-Schimmer, B. (2011). Iron

core/shell nanoparticles as magnetic drug carriers: possible interactions with the vascular compartment. *Nanomedicine (London, England)*, 6(7), 1199–1213. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.33>

Hirsh, S. L., McKenzie, D. R., Nosworthy, N. J., Denman, J. A., Sezerman, O. U., & Bilek, M. M. (2013). The Vroman effect: competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 103, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.039>

Holinstat M. (2017). Normal platelet function. *Cancer metastasis reviews*, 36(2), 195–198. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9677-x>

<https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>

<https://osha.europa.eu/it/tools-and-publications/publications/e-facts/e-fact-73-nanomaterials-in-the-healthcare-sector-occupational-risks-and-prevention>

Huang, J., & MacKerell, A. D., Jr (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *Journal of computational chemistry*, 34(25), 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>

Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human & experimental toxicology*, 34(12), 1318–1321. <https://doi.org/10.1177/0960327115603588>

Ilinskaya, A. N., & Dobrovolskaia, M. A. (2013). Nanoparticles and the blood coagulation system. Part I: benefits of nanotechnology. *Nanomedicine (London, England)*, 8(5), 773–784. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.48>

Ingle, A. P., Duran, N., & Rai, M. (2014). Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(3), 1001–1009. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5422-8>

Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in immunology*, 5, 514. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>

Jamieson, T., Bakhshi, R., Petrova, D., Pocock, R., Imani, M., & Seifalian, A. M. (2007). Biological applications of quantum dots. *Biomaterials*, 28(31), 4717–4732. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.014>

Jiang, J., Oberdörster, G. & Biswas, P. (2009). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res* 11, 77–89. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9446-4>

Jiang, S., Lin, Y., Yao, H., Yang, C., Zhang, L., Luo, B., Lei, Z., Cao, L., Lin, N., Liu, X., Lin, Z., & He, C. (2018). The role of unfolded protein response and ER-phagy in quantum dots-induced nephrotoxicity: an in vitro and in vivo study. *Archives of toxicology*, 92(4), 1421–1434. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2169-0>

Jiang, X., Weise, S., Hafner, M., Röcker, C., Zhang, F., Parak, W. J., & Nienhaus, G. U. (2010). Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by

transferrin binding. *Journal of the Royal Society, Interface*, 7 Suppl 1(Suppl 1), S5–S13. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0272.focus>

Jiskoot, W., van Schie, R. M., Carstens, M. G., & Schellekens, H. (2009). Immunological risk of injectable drug delivery systems. *Pharmaceutical research*, 26(6), 1303–1314. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9855-9>

Jones, C. F., Campbell, R. A., Franks, Z., Gibson, C. C., Thiagarajan, G., Vieira-de-Abreu, A., Sukavaneshvar, S., Mohammad, S. F., Li, D. Y., Ghandehari, H., Weyrich, A. S., Brooks, B. D., & Grainger, D. W. (2012). Cationic PAMAM dendrimers disrupt key platelet functions. *Molecular pharmaceutics*, 9(6), 1599–1611. <https://doi.org/10.1021/mp2006054>

Jurk, K., & Kehrel, B. E. (2005). Platelets: physiology and biochemistry. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 31(4), 381–392. <https://doi.org/10.1055/s-2005-916671>

Kahner, B. N., Shankar, H., Murugappan, S., Prasad, G. L., & Kunapuli, S. P. (2006). Nucleotide receptor signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 4(11), 2317–2326. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02192.x>

Kaur, S., Raggatt, L. J., Batoon, L., Hume, D. A., Levesque, J. P., & Pettit, A. R. (2017). Role of bone marrow macrophages in controlling homeostasis and repair in bone and bone marrow niches. *Seminars in cell & developmental biology*, 61, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.08.009>

Ke, P. C., Lin, S., Parak, W. J., Davis, T. P., & Caruso, F. (2017). A Decade of the Protein Corona. *ACS nano*, 11(12), 11773–11776. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08008>

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

Kim, H. W., Ahn, E.-K., Jee, B. K., Yoon, H.-K., Lee, K. H., & Lim, Y. (2008). Nanoparticulate-induced toxicity and related mechanism in vitro and in vivo. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(1), 55–65. <http://doi.org/10.1007/s11051-008-9447-3>

Kim, J., Heo, Y.-J., & Shin, S. (2016). Haemocompatibility evaluation of silica nanomaterials using hemorheological measurements. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 62(2), 99–107. <https://doi.org/10.3233/ch-151953>

Kim, J., Lee, H., & Shin, S. (2015). Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. *Journal of Cellular Biotechnology*, 1(1), 63–79. <https://doi.org/10.3233/jcb-15007>

Kim, J., Nafiujjaman, M., Nurunnabi, M., Lee, Y. K., & Park, H. K. (2016). Hemorheological characteristics of red blood cells exposed to surface functionalized graphene quantum dots. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 97, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.034>



Kim, J., Nafiujjaman, M., Nurunnabi, M., Lee, Y. K., & Park, H. K. (2016). Hemorheological characteristics of red blood cells exposed to surface functionalized graphene quantum dots. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 97, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.09.034>

Konduru, N. V., Molina, R. M., Swami, A., Damiani, F., Pyrgiotakis, G., Lin, P., Andreozzi, P., Donaghey, T. C., Demokritou, P., Krol, S., Kreyling, W., & Brain, J. D. (2017). Protein corona: implications for nanoparticle interactions with pulmonary cells. *Particle and fibre toxicology*, 14(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0223-3>

Kong, H., , Xia, K., , Ren, N., , Cui, Y., , Liu, R., , Li, Q., , Lv, M., , Shi, J., , Yan, Q., , Cui, Z., , Fan, C., , Zhu, Y., , & Wang, L., (2018). Serum protein corona-responsive autophagy tuning in cells. *Nanoscale*, 10(37), 18055–18063. <https://doi.org/10.1039/c8nr05770b>

Kou, P. M., & Babensee, J. E. (2011). Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 96(1), 239–260. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32971>

Kozelskaya, A. I., Panin, A. V., Khlusov, I. A., Mokrushnikov, P. V., Zaitsev, B. N., Kuzmenko, D. I., & Vasyukov, G. Y. (2016). Morphological changes of the red blood cells treated with metal oxide nanoparticles. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 37, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.08.012>

Krajewski, S., Pucek, R., Panacek, A., Avci-Adali, M., Nolte, A., Straub, A., Zboril, R., Wendel, H. P., & Kvitek, L. (2013). Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta biomaterialia*, 9(7), 7460–7468. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.016>

Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles-based drug delivery systems. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 75(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>

Kundrotas, G., Karabanovas, V., Pleckaitis, M., Juraleviciute, M., Steponkiene, S., Gudleviciene, Z., & Rotomskis, R. (2019). Uptake and distribution of carboxylated quantum dots in human mesenchymal stem cells: cell growing density matters. *Journal of nanobiotechnology*, 17(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0470-6>

Kwaan, H. C., & Samama, M. (2019). *Clinical thrombosis*. CRC Press.

Lacerda, S. H., Park, J. J., Meuse, C., Pristiniski, D., Becker, M. L., Karim, A., & Douglas, J. F. (2010). Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. *ACS nano*, 4(1), 365–379. <https://doi.org/10.1021/nn9011187>

Lacerda, S. H., Park, J. J., Meuse, C., Pristiniski, D., Becker, M. L., Karim, A., & Douglas, J. F. (2010). Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. *ACS nano*, 4(1), 365–379. <https://doi.org/10.1021/nn9011187>

- Lan, L., Yao, Y., Ping, J., & Ying, Y. (2017). Recent advances in nanomaterial-based biosensors for antibiotics detection. *Biosensors & bioelectronics*, *91*, 504–514. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.007>
- Lang, E., & Lang, F. (2015). Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Seminars in cell & developmental biology*, *39*, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.01.009>
- Lang, K. S., Lang, P. A., Bauer, C., Duranton, C., Wieder, T., Huber, S. M., & Lang, F. (2005). Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, *15*(5), 195–202. <https://doi.org/10.1159/000086406>
- Lee, T. H., Kim, S. U., Yu, S. L., Kim, S. H., Park, D. S., Moon, H. B., Dho, S. H., Kwon, K. S., Kwon, H. J., Han, Y. H., Jeong, S., Kang, S. W., Shin, H. S., Lee, K. K., Rhee, S. G., & Yu, D. Y. (2003). Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood*, *101*(12), 5033–5038. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2548>
- Lee, Y. K., Choi, E. J., Webster, T. J., Kim, S. H., & Khang, D. (2014). Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *International journal of nanomedicine*, *10*, 97–113. <https://doi.org/10.2147/IJN.S72998>
- Li, C., Zhang, P., Hao, Y., He, D., Shen, Y., & Lu, R. (2018). Expression and significance of quantum dots in RAW 264.7 macrophages. *Oncology letters*, *16*(5), 5997–6002. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9362>
- Li, S. Q., Zhu, R. R., Zhu, H., Xue, M., Sun, X. Y., Yao, S. D., & Wang, S. L. (2008). Nanotoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to erythrocyte in vitro. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, *46*(12), 3626–3631. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.012>
- Li, S., Guo, Z., Zhang, Y., Xue, W., & Liu, Z. (2015). Blood Compatibility Evaluations of Fluorescent Carbon Dots. *ACS applied materials & interfaces*, *7*(34), 19153–19162. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b04866>
- Li, Z., Delaney, M. K., O'Brien, K. A., & Du, X. (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *30*(12), 2341–2349. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207522>
- Liang, W. L., Xiao, L., Gu, H. W., Li, X. J., Li, Y. S., Zhang, W. K., & Tang, H. B. (2019). Solid lipid nanoparticle induced apoptosis of macrophages via a mitochondrial-dependent pathway in vitro and in vivo. *International journal of nanomedicine*, *14*, 3283–3295. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200395>
- Lin, M. H., Lin, C. F., Yang, S. C., Hung, C. F., & Fang, J. Y. (2018). The Interplay Between Nanoparticles and Neutrophils. *Journal of biomedical nanotechnology*, *14*(1), 66–85. <https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2459>

Lin, Y. C., Tsai, L. W., Perevedentseva, E., Chang, H. H., Lin, C. H., Sun, D. S., Lugovtsov, A. E., Priezhev, A., Mona, J., & Cheng, C. L. (2012). The influence of nanodiamond on the oxygenation states and micro rheological properties of human red blood cells in vitro. *Journal of biomedical optics*, 17(10), 101512. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.10.101512>

Liu, J., & Hurt, R. H. (2010). Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental science & technology*, 44(6), 2169–2175. <https://doi.org/10.1021/es9035557>

Liu, S., Sui, Y., Guo, K., Yin, Z., & Gao, X. (2012). Spectroscopic study on the interaction of pristine C60 and serum albumins in solution. *Nanoscale research letters*, 7(1), 433. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-433>.

Liu, W., Rose, J., Plantevin, S., Auffan, M., Bottero, J. Y., & Vidaud, C. (2013). Protein corona formation for nanomaterials and proteins of a similar size: hard or soft corona. *Nanoscale*, 5(4), 1658–1668. <https://doi.org/10.1039/c2nr33611a>

Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I., & Lomize, A. L. (2012). OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic acids research*, 40(Database issue), D370–D376. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr703>

Lourenço, A., Casimiro, T., & Bonifácio, V. D. (2014). Reborn water-soluble CdTe quantum dots. *Talanta*, 125, 319–321. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.03.022>

Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., & Dawson, K. A. (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14265–14270. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805135105>

Mancuso, M. E., & Santagostino, E. (2017). Platelets: much more than bricks in a breached wall. *British journal of haematology*, 178(2), 209–219. <https://doi.org/10.1111/bjh.14653>

Marquardt, C., Fritsch-Decker, S., Al-Rawi, M., Diabaté, S., & Weiss, C. (2017). Autophagy induced by silica nanoparticles protects RAW264.7 macrophages from cell death. *Toxicology*, 379, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.01.019>

Matus, M. F., Vilos, C., Cisterna, B. A., Fuentes, E., & Palomo, I. (2018). Nanotechnology and primary hemostasis: Differential effects of nanoparticles on platelet responses. *Vascular pharmacology*, 101, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.11.004>

Mayer, A., Vadon, M., Rinner, B., Novak, A., Wintersteiger, R., & Fröhlich, E. (2009). The role of nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology*, 258(2-3), 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.01.015>

Maynard, A. D., Warheit, D. B., & Philbert, M. A. (2011). The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. *Toxicological sciences : an official*



*Journal of the Society of Toxicology*, 120 Suppl 1(Suppl 1), S109–S129. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq372>

Megido, L., Díez, P., & Fuentes, M. (2018). Nanoproteomics approaches in biomarker Discovery: The critical role of protein corona on nanoparticles as drug carriers. *Nanotechnologies in Preventive and Regenerative Medicine; Uskokovic, V., Uskokovic, PD, Eds*, 225-239.

Mehri, R., Mavriplis, C., & Fenech, M. (2018). Red blood cell aggregates and their effect on non-Newtonian blood viscosity at low hematocrit in a two-fluid low shear rate microfluidic system. *PLoS one*, 13(7), e0199911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199911>

Michelson, A. D. (2013). Platelets. -Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney.

Monopoli, M. P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Bombelli, F. B., & Dawson, K. A. (2011). Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 133(8), 2525–2534. <https://doi.org/10.1021/ja107583h>

Moroz, V. V., Chernysh, A. M., Kozlova, E. K., Borshegovskaya, P. Y., Bliznjuk, U. A., Rysaeva, R. M., & Gudkova, O. Y. (2010). Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: atomic force microscope research. *Journal of critical care*, 25(3). <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2010.02.007>

Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*, 8(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>

Mühlebach, S., Borchard, G., & Yildiz, S. (2015). Regulatory challenges and approaches to characterize nanomedicines and their follow-on similars. *Nanomedicine (London, England)*, 10(4), 659–674. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.189>

Mukherjee, S., & Das, U. (2011). Quantum dots: An optimistic approach to novel therapeutics. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 7(2), 59–64.

Munro N. (2009). Hematologic complications of critical illness: anemia, neutropenia, thrombocytopenia, and more. *AACN advanced critical care*, 20(2), 145–154. <https://doi.org/10.1097/NCI.0b013e3181a0d6ea>

Mura, S., & Couvreur, P. (2012). Nanotheranostics for personalized medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 64(13), 1394–1416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.06.006>

Murray, P. J. (2017). Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology*, 79(October), 541–566. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>

Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Nakazato, Y., Arimori, A., Isobe, M., Tochigi, S., Kondoh, S., Hirai, T., Akase, T., Yamashita, T., Yamashita, K., Yoshida, T., Nagano, K., Abe, Y., Yoshioka, Y., Kamada, H., Imazawa, T., Itoh, N., Kondoh, M., ... Tsutsumi, Y. (2012). Amorphous nanosilicas induce consumptive coagulopathy after

systemic exposure. *Nanotechnology*, 23(4), 045101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/4/045101>

Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., & Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials*, 8(7), 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>

Nemmar, A., Zia, S., Subramaniyan, D., Al-Amri, I., Al Kindi, M. A., & Ali, B. H. (2012). Interaction of diesel exhaust particles with human, rat and mouse erythrocytes in vitro. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 29(1-2), 163–170. <https://doi.org/10.1159/000337597>

Neun, B. W., & Dobrovolskaia, M. A. (2011). Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 697, 215–224. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_23)

Nieswandt, B., Pleines, I., & Bender, M. (2011). Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 9 Suppl 1, 92–104. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04361.x>

Nurden, A. T., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I., & Anitua, E. (2008). Platelets and wound healing. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 3532–3548.

Oostingh, G. J., Casals, E., Italiani, P., Colognato, R., Stritzinger, R., Ponti, J., Pfaller, T., Kohl, Y., Ooms, D., Favilli, F., Leppens, H., Lucchesi, D., Rossi, F., Nelissen, I., Thielecke, H., Puentes, V. F., Duschl, A., & Boraschi, D. (2011). Problems and challenges in the development and validation of human cell-based assays to determine nanoparticle-induced immunomodulatory effects. *Particle and fibre toxicology*, 8(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-8>

Oslakovic, C., Cedervall, T., Linse, S., & Dahlbäck, B. (2012). Polystyrene nanoparticles affecting blood coagulation. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 8(6), 981–986. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.12.001>

Park MS, Martini WZ, Dubick MA, Salinas J, Butenas S, Kheirabadi BS, Pusateri AE, Wang J, Vos JA, Guymon, CH, Wolf SE, Mann KG, Holcomb JB. (2009). Thromboelastography as a Better Indicator of Postinjury Hypercoagulable State Than Prothrombin Time or Activated Partial Thromboplastin Time. *J Trauma*, 67, 266-276.

Park, E. J., & Park, K. (2009). Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicology letters*, 184(1), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.10.012>

Park, S. J., Lee, J., Patel, D. S., Ma, H., Lee, H. S., Jo, S., & Im, W. (2017). Glycan Reader is improved to recognize most sugar types and chemical modifications in the Protein Data Bank. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 33(19), 3051–3057. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx358>

Park, S. J., Lee, J., Patel, D. S., Ma, H., Lee, H. S., Jo, S., & Im, W. (2017). Glycan Reader is improved to recognize most sugar types and chemical modifications in the

Protein Data Bank. *Bioinformatics* (Oxford, England), 33(19), 3051–3057. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx358>

Partikel, K., Korte, R., Mulac, D., Humpf, H. U., & Langer, K. (2019). Serum type and concentration both affect the protein-corona composition of PLGA nanoparticles. *Beilstein journal of nanotechnology*, 10, 1002–1015. <https://doi.org/10.3762/bjnano.10.101>

Patel, U., Rajasingh, S., Samanta, S., Cao, T., Dawn, B., & Rajasingh, J. (2017). Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. *Drug discovery today*, 22(1), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.08.006>

Pathak, D., Kumar, P., Kuppusamy, G., Gupta, A., Kamble, B., & Wadhvani, A. (2014). Physicochemical characterization and toxicological evaluation of plant-based anionic polymers and their nanoparticulated system for ocular delivery. *Nanotoxicology*, 8(8), 843–855. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.834996>

Pelaz, B., Charron, G., Pfeiffer, C., Zhao, Y., de la Fuente, J. M., Liang, X. J., Parak, W. J., & Del Pino, P. (2013). Interfacing engineered nanoparticles with biological systems: anticipating adverse nano-bio interactions. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 9(9-10), 1573–1584. <https://doi.org/10.1002/smll.201201229>  
Pino, P. del, Pelaz, B., Zhang, Q., Maffre, P., Nienhaus, G. U., & Parak, W. J. (2014). *Protein corona formation around nanoparticles – from the past to the future. Mater. Horiz.*, 1(3), 301–313. doi:10.1039/c3mh00106g

Pleskova, S. N., Kriukov, R. N., Gorshkova, E. N., & Boryakov, A. V. (2019). Characteristics of quantum dots phagocytosis by neutrophil granulocytes. *Heliyon*, 5(3), e01439. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01439>

Pope, C. A., 3rd, Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., & Thurston, G. D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*, 287(9), 1132–1141. <https://doi.org/10.1001/jama.287.9.1132>

Pretorius, E., du Plooy, J. N., & Bester, J. (2016). A Comprehensive Review on Eryptosis. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 39(5), 1977–2000. <https://doi.org/10.1159/000447895>

Promega Corporation · 2800 Woods Hollow Road · Madison, WI 53711-5399 USA  
Toll Free in USA 800-356-9526 · [www.promega.com](http://www.promega.com). Printed in USA. Part# TB229.

Quintili, M. (2012). Nanociencia y Nanotecnología... un mundo pequeño. *Cuadernos del Centro de Estudios en Diseño y Comunicación. Ensayos*, (42), 125-155.

Rabolli, V., Lison, D., & Huaux, F. (2016). The complex cascade of cellular events governing inflammasome activation and IL-1 $\beta$  processing in response to inhaled particles. *Particle and fibre toxicology*, 13(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0150-8>

Radomska, A., Leszczyszyn, J., & Radomski, M. W. (2016). The Nanopharmacology and Nanotoxicology of Nanomaterials: New Opportunities and Challenges. *Advances*

*in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*, 25(1), 151–162. <https://doi.org/10.17219/acem/60879>

Radomski, A., Jurasz, P., Alonso-Escolano, D., Drews, M., Morandi, M., Malinski, T., & Radomski, M. W. (2005). Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *British journal of pharmacology*, 146(6), 882–893. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706386>

Radomski, A., Jurasz, P., Alonso-Escolano, D., Drews, M., Morandi, M., Malinski, T., & Radomski, M. W. (2005). Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *British journal of pharmacology*, 146(6), 882–893. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706386>

Ran, Q., Xiang, Y., Liu, Y., Xiang, L., Li, F., Deng, X., Xiao, Y., Chen, L., Chen, L., & Li, Z. (2015). Eryptosis Indices as a Novel Predictive Parameter for Biocompatibility of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles on Erythrocytes. *Scientific reports*, 5, 16209. <https://doi.org/10.1038/srep16209>

Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 2(1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>

Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., & Nann, T. (2008). Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature methods*, 5(9), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1248>

Reyes-Esparza, J., Martínez-Mena, A., Gutiérrez-Sancha, I., Rodríguez-Fragoso, P., de la Cruz, G. G., Mondragón, R., & Rodríguez-Fragoso, L. (2015). *Synthesis, characterization and biocompatibility of cadmium sulfide nanoparticles capped with dextrin for in vivo and in vitro imaging application*. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1). doi:10.1186/s12951-015-0145-x

Rezwan, K., Meier, L. P., Rezwan, M., Vörös, J., Textor, M., & Gauckler, L. J. (2004). Bovine serum albumin adsorption onto colloidal Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles: a new model based on zeta potential and UV-vis measurements. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 20(23), 10055–10061. <https://doi.org/10.1021/la048459k>

Ritz, S., Schöttler, S., Kotman, N., Baier, G., Musyanovych, A., Kuharev, J., Landfester, K., Schild, H., Jahn, O., Tenzer, S., & Mailänder, V. (2015). Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. *Biomacromolecules*, 16(4), 1311–1321. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00108>

Ritz, S., Schöttler, S., Kotman, N., Baier, G., Musyanovych, A., Kuharev, J., Landfester, K., Schild, H., Jahn, O., Tenzer, S., & Mailänder, V. (2015). Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. *Biomacromolecules*, 16(4), 1311–1321. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00108>

Rodríguez-Fragoso L., et al. (2018). Interaction of Nanoparticles with Blood Components and Associated Pathophysiological Effects. Unraveling the Safety Profile of Nanoscale Particles and Materials - From Biomedical to Environmental Applications. INTECH. 37-60. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69386>.

Ronald Hoffman, Edward J. Benz, Jr., Leslie E. Silberstein, Helen Heslop, John Anastasi, J. W. (2008). *Hematology: Basic Principles and Practice* (J. W. Ronald Hoffman, Edward J. Benz, Jr., Leslie E. Silberstein, Helen Heslop, John Anastasi (ed.); ilustrada). Elsevier Health Sciences.

Rybicki, A. C., Heath, R., Lubin, B., & Schwartz, R. S. (1988). Human erythrocyte protein 4.1 is a phosphatidylserine binding protein. *The Journal of clinical investigation*, 81(1), 255–260. <https://doi.org/10.1172/JCI113303>

Saikia, J., Mohammadpour, R., Yazdimamaghani, M., Northrup, H., Hlady, V., & Ghandehari, H. (2018). Silica Nanoparticle-Endothelial Interaction: Uptake and Effect on Platelet Adhesion under Flow Conditions. *ACS Applied Bio Materials*, 1(5), 1620–1627. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00466>

Sanchez, F., & Sobolev, K. (2010). Nanotechnology in concrete – A review. *Construction and Building Materials*, 24(11), 2060–2071. doi:10.1016/j.conbuildmat.2010.03.014

Sánchez, J. T., Rodríguez, V. V., & Duart, J. M. M. (2005). Nanociencia y nanotecnología: la tecnología fundamental del siglo XXI. *Revista iberoamericana de física*, 1(1), 19-22.

Sarmah, D., Saraf, J., Kaur, H., Pravalika, K., Tekade, R. K., Borah, A., Kalia, K., Dave, K. R., & Bhattacharya, P. (2017). Stroke Management: An Emerging Role of Nanotechnology. *Micromachines*, 8(9), 262. <https://doi.org/10.3390/mi8090262>

Schäffler, M., Semmler-Behnke, M., Sarioglu, H., Takenaka, S., Wenk, A., Schleh, C., Hauck, S. M., Johnston, B. D., & Kreyling, W. G. (2013). Serum protein identification and quantification of the corona of 5, 15 and 80 nm gold nanoparticles. *Nanotechnology*, 24(26), 265103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/26/265103>

Senzel, L., Gnatenko, D. V., & Bahou, W. F. (2009). The platelet proteome. *Current opinion in hematology*, 16(5), 329–333. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32832e9dc6>

Seeliger, D., & de Groot, B. L. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of computer-aided molecular design*, 24(5), 417–422. <https://doi.org/10.1007/s10822-010-9352-6>

Shinohara, N., Zhang, G., Oshima, Y. *et al.* Kinetics and dissolution of intratracheally administered nickel oxide nanomaterials in rats. *Part Fibre Toxicol* 14, 48 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0229-x>

Shinto, H., Fukasawa, T., Yoshisue, K., Tezuka, M., & Orita, M. (2014). *Cell membrane disruption induced by amorphous silica nanoparticles in erythrocytes, lymphocytes, malignant melanocytes, and macrophages. Advanced Powder Technology*, 25(6), 1872–1881. doi:10.1016/j.appt.2014.09.002

Shvedova, A. A., Kagan, V. E., & Fadeel, B. (2010). Close encounters of the small kind: adverse effects of man-made materials interfacing with the nano-cosmos of biological



systems. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, 63–88.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105819>

Sims, P. J., & Wiedmer, T. (2001). Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thrombosis and haemostasis*, 86(1), 266–275.

Sperling, C., Fischer, M., Maitz, M. F., & Werner, C. (2009). Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes. *Biomaterials*, 30(27), 4447–4456.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.044>

Sriram, K., Intaglietta, M., & Tartakovsky, D. M. (2014). Non-Newtonian flow of blood in arterioles: consequences for wall shear stress measurements. *Microcirculation (New York, N. Y. : 1994)*, 21(7), 628–639. <https://doi.org/10.1111/micc.12141>

Stocker, T. J., Ishikawa-Ankerhold, H., Massberg, S., & Schulz, C. (2017). Small but mighty: Platelets as central effectors of host defense. *Thrombosis and haemostasis*, 117(4), 651–661. <https://doi.org/10.1160/TH16-12-0921>

Strojan, K., Leonardi, A., Bregar, V. B., Križaj, I., Svete, J., & Pavlin, M. (2017). Dispersion of Nanoparticles in Different Media Importantly Determines the Composition of Their Protein Corona. *PloS one*, 12(1), e0169552.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169552>

Sun, H., Lv, L., Bai, Y., Yang, H., Zhou, H., Li, C., & Yang, L. (2018). Nanotechnology-enabled materials for hemostatic and anti-infection treatments in orthopedic surgery. *International journal of nanomedicine*, 13, 8325–8338.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S173063>

Surendiran, A., Sandhiya, S., Pradhan, S. C., & Adithan, C. (2009). Novel applications of nanotechnology in medicine. *The Indian journal of medical research*, 130(6), 689–701.

Surendiran, A., Sandhiya, S., Pradhan, S. C., & Adithan, C. (2009). Novel applications of nanotechnology in medicine. *The Indian journal of medical research*, 130(6), 689–701.

Szebeni, J., & Haima, P. (2013). Hemocompatibility of medical devices, blood products, nanomedicines and biologicals. *TECOmedical Clinical & Technical Review; TECOmedical: Sissach, Switzerland*.40p.

Szymusiak, M., Donovan, A. J., Smith, S. A., Ransom, R., Shen, H., Kalkowski, J., Morrissey, J. H., & Liu, Y. (2016). Colloidal Confinement of Polyphosphate on Gold Nanoparticles Robustly Activates the Contact Pathway of Blood Coagulation. *Bioconjugate chemistry*, 27(1), 102–109.  
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00524>

Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., Landfester, K., Schild, H., Maskos, M., Knauer, S. K., & Stauber, R. H. (2013). Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature nanotechnology*, 8(10), 772–781.  
<https://doi.org/10.1038/nnano.2013.181>

Tenzer, S., Docter, D., Rosfa, S., Wlodarski, A., Kuharev, J., Rekik, A., Knauer, S. K., Bantz, C., Nawroth, T., Bier, C., Sirirattanapan, J., Mann, W., Treuel, L., Zellner, R., Maskos, M., Schild, H., & Stauber, R. H. (2011). Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS nano*, 5(9), 7155–7167. <https://doi.org/10.1021/nn201950e>

Thasneem, Y. M., Sajeesh, S., & Sharma, C. P. (2011). Effect of thiol functionalization on the hemo-compatibility of PLGA nanoparticles. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 99(4), 607–617. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33220>

Thibodeau GA, Patton KT (2012) Structure and Function of the Body. Fourteenth edition. Mosby, St Louis MO. Elsevier Health Sciences.

Tian, Y., Zhao, Y., Zheng, W., Zhang, W., & Jiang, X. (2014). Antithrombotic functions of small molecule-capped gold nanoparticles. *Nanoscale*, 6(15), 8543–8550. <https://doi.org/10.1039/c4nr01937g>

Tokumasu, F., Nardone, G. A., Ostera, G. R., Fairhurst, R. M., Beaudry, S. D., Hayakawa, E., & Dvorak, J. A. (2009). Altered membrane structure and surface potential in homozygous hemoglobin C erythrocytes. *PloS one*, 4(6), e5828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005828>

Tortora G, Derrickson B (2009) Principles of Anatomy and Physiology: Organisation, Support and Movement and Control Systems of the Human Body. Volume 2. Twelfth edition. John Wiley and Sons, Hoboken NJ.

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>

Tsatsakis, A., Stratidakis, A. K., Goryachaya, A. V., Tzatzarakis, M. N., Stivaktakis, P. D., Docea, A. O., Berdiaki, A., Nikitovic, D., Velonia, K., Shtilman, M. I., Rizos, A. K., & Kuskov, A. N. (2019). In vitro blood compatibility and in vitro cytotoxicity of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 127, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.041>

Vauthier, C., Persson, B., Lindner, P., & Cabane, B. (2011). Protein adsorption and complement activation for di-block copolymer nanoparticles. *Biomaterials*, 32(6), 1646–1656. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.026>

Venkatesan, B., Tumala, A., Subramanian, V., & Vellaichamy, E. (2016). Data on synthesis and characterization of chitosan nanoparticles for in vivo delivery of siRNA-Npr3: Targeting NPR-C expression in the heart. *Data in brief*, 8, 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.05.074>

Verma, A., & Stellacci, F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 6(1), 12–21. <https://doi.org/10.1002/smll.200901158>

- Vogler, E. A., & Siedlecki, C. A. (2009). Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials*, 30(10), 1857–1869. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.041>
- Vu, V.P., Gifford, G.B., Chen, F. *et al.* Immunoglobulin deposition on biomolecule corona determines complement opsonization efficiency of preclinical and clinical nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* 14, 260–268 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0344-3>
- Walensky L D, Mohandas N, Lux S E. In: Blood, Principles and Practice of Hematology. 2nd edition. Handin RI, Lux SE, Stossel TP, editors. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. pp. 1726–1744.
- Walker, N. J., & Bucher, J. R. (2009). A 21st century paradigm for evaluating the health hazards of nanoscale materials. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 110(2), 251–254. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp106>
- Walkey, C. D., Olsen, J. B., Guo, H., Emili, A., & Chan, W. C. (2012). Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *Journal of the American Chemical Society*, 134(4), 2139–2147. <https://doi.org/10.1021/ja2084338>
- Walton, B. L., Lehmann, M., Skorzewski, T., Holle, L. A., Beckman, J. D., Cribb, J. A., Mooberry, M. J., Wufsus, A. R., Cooley, B. C., Homeister, J. W., Pawlinski, R., Falvo, M. R., Key, N. S., Fogelson, A. L., Neeves, K. B., & Wolberg, A. S. (2017). Elevated hematocrit enhances platelet accumulation following vascular injury. *Blood*, 129(18), 2537–2546. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-746479>
- Wang, K., Gao, Z., Gao, G., Wo, Y., Wang, Y., Shen, G., & Cui, D. (2013). Systematic safety evaluation on photoluminescent carbon dots. *Nanoscale research letters*, 8(1), 122. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-122>
- Wang, Y., Andrews, M., Yang, Y., Lang, S., Jin, J. W., Cameron-Vendrig, A., Zhu, G., Rehemian, A., & Ni, H. (2012). Platelets in thrombosis and hemostasis: old topic with new mechanisms. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*, 12(2), 126–132. <https://doi.org/10.2174/1871529x11202020126>
- Wang, Y., Zheng, J., Zhang, Z., Yuan, C., & Fu, D. (2009). CdTe nanocrystals as luminescent probes for detecting ATP, folic acid and l-cysteine in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 342(1–3), 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.04.020>
- Wangoo, N., Suri, C. R., & Shekhawat, G. (2008). *Interaction of gold nanoparticles with protein: A spectroscopic study to monitor protein conformational changes. Applied Physics Letters*, 92(13), 133104. doi:10.1063/1.2902302
- Watson R (2005) *Anatomy and Physiology for Nurses*. Twelfth edition. Elsevier, London.Elsevier Health Sciences.
- Whitesides G. M. (2003). The 'right' size in nanobiotechnology. *Nature biotechnology*, 21(10), 1161–1165. <https://doi.org/10.1038/nbt872>
- Wu, E. L., Cheng, X., Jo, S., Rui, H., Song, K. C., Dávila-Contreras, E. M., Qi, Y., Lee, J., Monje-Galvan, V., Venable, R. M., Klauda, J. B., & Im, W. (2014). CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations. *Journal of computational chemistry*, 35(27), 1997–2004. <https://doi.org/10.1002/jcc.23702>



- Wu, G., Jiang, C., & Zhang, T. (2018). *FcγRIIB receptor-mediated apoptosis in macrophages through interplay of cadmium sulfide nanomaterials and protein corona. Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 140–148. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.08.025
- XIONG, S., Zhao, X., Heng, B.C., Ng, K.W. & Loo, J.S.-C. (2011), Cellular uptake of Poly-(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles synthesized through solvent emulsion evaporation and nanoprecipitation method. *Biotechnology Journal*, 6: 501–508. <https://doi.org/10.1002/biot.201000351>.
- Yan, Y., Gause, K. T., Kamphuis, M. M., Ang, C. S., O'Brien-Simpson, N. M., Lenzo, J. C., Reynolds, E. C., Nice, E. C., & Caruso, F. (2013). Differential roles of the protein corona in the cellular uptake of nanoporous polymer particles by monocyte and macrophage cell lines. *ACS nano*, 7(12), 10960–10970. <https://doi.org/10.1021/nn404481f>
- Yeaman M. R. (2010). Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(4), 525–544. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0210-4>
- Yong, S. B., Song, Y., Kim, H. J., Ain, Q. U., & Kim, Y. H. (2017). Mononuclear phagocytes as a target, not a barrier, for drug delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 259, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.024>
- Zaidi, A., & Green, L. (2019). Physiology of haemostasis. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 20(3), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2019.01.005>
- Zhang H. (2016). Erythrocytes in nanomedicine: an optimal blend of natural and synthetic materials. *Biomaterials science*, 4(7), 1024–1031. <https://doi.org/10.1039/c6bm00072j>
- Zhang, L., Tan, S., Liu, Y., Xie, H., Luo, B., & Wang, J. (2019). In vitro inhibition of tumor growth by low-dose iron oxide nanoparticles activating macrophages. *Journal of biomaterials applications*. 33(7):935–945. <https://doi.org/10.1177/0885328218817939>
- Zhang, Q., Kawasumi, K., Segawa, Y., Itami, K., & Scott, L. T. (2012). Palladium-catalyzed C-H activation taken to the limit. Flattening an aromatic bowl by total arylation. *Journal of the American Chemical Society*, 134(38), 15664–15667. <https://doi.org/10.1021/ja306992k>
- Zhang, X. D., Wu, D., Shen, X., Liu, P. X., Yang, N., Zhao, B., Zhang, H., Sun, Y. M., Zhang, L. A., & Fan, F. Y. (2011). Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 6, 2071–2081. <https://doi.org/10.2147/IJN.S21657>
- Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., Chen, C., & Zhao, Y. (2011). Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 7(10), 1322–1337. <https://doi.org/10.1002/smll.201100001>

Zhao, Y., Sun, X., Zhang, G., Trewyn, B. G., Slowing, I. I., & Lin, V. S. (2011). Interaction of mesoporous silica nanoparticles with human red blood cell membranes: size and surface effects. *ACS nano*, 5(2), 1366–1375. <https://doi.org/10.1021/nn103077k>

Zhao, Z. X., Wang, H. C., Qin, X., Wang, X. S., Qiao, M. Q., Anzai, J., & Chen, Q. (2009). Self-assembled film of hydrophobins on gold surfaces and its application to electrochemical biosensing. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 71(1), 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.01.011>

## Effect of Cadmium Sulfide Quantum Dots Capped with Dextrin on Erythrocyte *In Vitro*

Anahi Rodríguez-López<sup>1</sup>, Jorge Reyes-Esparza<sup>1</sup>, Gerardo González De la Cruz<sup>2</sup>, Patricia Rodríguez-Fragoso<sup>2</sup>, César Millán-Pacheco<sup>1</sup> and Lourdes Rodríguez-Fragoso<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62210, Mexico.

<sup>2</sup>Departamento de Física, CINVESTAV - I.P.N. Apartado Postal 14-740, 07000, Ciudad de Mexico, México.

### \*Correspondence:

Lourdes Rodríguez-Fragoso, M.D. and Ph.D., Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

Received: 20 February 2020; Accepted: 15 March 2020

**Citation:** Anahi Rodríguez-López, Jorge Reyes-Esparza, Gerardo González De la Cruz, et al. Effect of Cadmium Sulfide Quantum Dots Capped with Dextrin on Erythrocyte *In Vitro*. Nano Tech Appl. 2020; 3(1): 1-8.

### ABSTRACT

Erythrocytes are sensitive to the effects of interaction with external agents and pathogens, which results in biochemical and morphological changes. This study evaluated the effects of CdS-dextrin nanoparticles on the biocompatibility, morphology and  $\zeta$ -potential of erythrocytes *in vitro*. Blood was obtained from healthy male Wistar rats and erythrocytes were obtained by centrifugation. Hemolysis and topographical analyses were done using spectrophotometry and AFM, respectively. Determination of  $\zeta$ -potential and molecular docking were also performed. CdS-dextrin quantum dots were evaluated at 0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . CdS-dextrin quantum dots produced hemolysis (5%) with all concentrations used. Morphological changes included loss of biconcavity, and surface cracks were observed with 0.1 and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  during 30 min of exposure. When erythrocytes were incubated for 60 minutes this resulted in loss of concavity, increased size, and the presence of surface accumulations, which increased in a concentration dependent manner. The  $\zeta$ -potential values did not change, regardless of the concentration of quantum dots. The analysis of CdS-dextrin quantum dots uptake showed that they did not enter the cell, though green fluorescence surrounding the erythrocytes was observed. The molecular docking revealed that dextrin of quantum dots might be interacting with glucose transporter GLUT1. Therefore, the interaction of CdS-dextrin quantum dots with erythrocytes induce minimal hemolysis but important morphological changes. It is not clear if these changes could be associated with functional changes. These preliminary findings provide evidence that nanomaterials can interact with erythrocytes and might cause associated pathophysiological processes following human exposure.

### Keywords

Erythrocytes, Cadmium sulfide, Hemolysis,  $\zeta$ -potential, Quantum dots.

### Introduction

The multiple advantages and biomedical applications of quantum dots (QDs) are well known nowadays [1,2]. However, their clinical use is still restricted because it has been shown they can be potentially toxic to humans. One of the great current challenges in nanomedicine is to produce small enough nanomaterials, capable of effectively entering the body and accessing the white site [3-5], but make them safe.

The use of quantum dots for theranostic purposes most often requires the intravascular route and, once they enter the

bloodstream, they must contact all blood components. Erythrocytes are blood cells that are continually exposed to aggression during their life span, which results in constant biochemical and morphological changes [6-8]. While it has been reported that some nanomaterials are safe for these cells [9-11], it is well known that their interaction with nanomaterials has variegated effects depending on the nanomaterial employed. Some nanomaterials can induce hemolysis (immediate destruction of erythrocytes), which is dependent on the concentration and exposure time [12-14]. A nanoparticle can be prevented from producing hemolysis with surfactants [15] and coatings [16]. However, hemolysis is not the only alteration so far associated to nanomaterial/erythrocyte interaction. Some nanoparticles induce alterations that can lead to erythrocyte stress and their premature immediate death, which will trigger various pathophysiological effects associated with the

deficient compensation of erythropoiesis and the consecutive loss of its presence in the blood [17-20].

Our research group has evaluated CdS-dextrin QDs in recent years using different *in vitro* and *in vivo* models [21]. It has been previously reported that they can enter the cell and reach the nucleus. Experiments with animals report they can go through biological barriers, have important tissue delivery and can remain in tissues for prolonged periods of time after a single dose [22]. An important feature is that they are biocompatible and only produce organ-selective toxicity following administration for prolonged periods of time [23]. All these properties make them ideal for use with theragnostic purposes. However, because we have only assessed their intraperitoneal use in animal models, we do not know if they could interact with some blood components after coming into direct contact. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of CdS-dextrin nanoparticles on biocompatibility, morphology and  $\zeta$ -potential of erythrocytes *in vitro*.

## Material and Methods

### Reagents

The sodium chloride and potassium chloride reagents were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Phosphate-buffered saline (PBS) came from GIBCO® by life technologies™ (New York, USA). The cadmium sulfide quantum dots capped with dextrin were prepared according to previously reported procedure [21].

### Animal handling and blood collection

Healthy male Wistar rats (20) were housed in light and temperature controlled ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) rooms. They had free access to water and standard pellets (Rodent chow diet, USA) ad libitum. All experimental procedures followed the Institutional Guides for practice in animals and Welfare Act Public Laws of Morelos State (Mexico) and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [24]. Animals were sacrificed under anesthesia, and then blood was drawn from the heart and collected in tubes with 3.2% sodium citrate (Becton Dickinson Co. New Jersey, USA). Erythrocytes were obtained according with the following method.

### Preparation of erythrocytes

Erythrocytes were prepared following the method previously described by Nemmar et al. [25]. Briefly, the collected male Wistar rats' blood was mixed by inversion. Then, the erythrocytes were separated by centrifuging at 1000 rpm for 15 minutes. They were washed 4 times by suspending them in 0.9% NaCl, followed by centrifugation at 1200 g for 10 mins. Then, they were separated by centrifuging at 1000 rpm for 15 minutes. The resulting supernatant was collected for the hemolysis assay, topographical analysis, localization and determination of  $\zeta$ -potential.

### Hemolysis assay

The hemolytic assay used in the present study followed the method previously described by Neun and Dobrovolskaia, [26]. Briefly, for every assay,  $1 \times 10^7$  erythrocytes were resuspended with KCl

150mM + Tris 3mM buffer and incubated with CdS-dextrin QDs at concentrations of 0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . After 30 minutes of exposure, the supernatant was collected, transferred in a 96 well, and the amount of hemoglobin was measured at a wavelength of 550 nm in a spectrophotometer (Multimode Plate Reader VICTOR x3 PerkinElmer, Massachusetts, USA). For positive control we used NaCl 35mM buffer.

### Topographical analysis of erythrocytes by AFM

Erythrocytes were prepared according to the above method. Cells were treated with CdS-dextrin QDs at different concentrations (0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and incubated again for 30 and 60 min. After this time, approximately 10  $\mu\text{L}$  aliquots were taken and dry smears were performed on slides. An XE-Bio Atomic Force Microscope (Park Systems Co., Suwan, Korea) was used to obtain topographic images of the erythrocytes. We used XEP and XEI software from Park Systems to analyze the data. PPP-NCHR silicon nitride cantilevers with nominal spring constant of 42 N/m from nanosensors were used in non-contact mode. DNP-S-D silicon nitride cantilevers with nominal spring constant of 0.06 N/m (Bruker, USA) were used in Contact mode. The DNP-S-D cantilevers were calibrated using the Thermal Method routine built into the XEI software. Topographic representations were obtained at  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Images are 256 pixels x 256 pixels and were taken at a frequency between 1.5 and 3.5 Hz. Scans performed in Contact mode were carried out at load forces lower than 1 nN. The images shown correspond to one typical sample.

### Determination of the zeta-potential ( $\zeta$ -potential) in erythrocytes

The  $\zeta$ -potential assay was performed using a Zetasizer Nano-ZS90 device (Malvern Instrument Inc., Westborough, USA). Isolated erythrocytes were washed and resuspended in 10% phosphate-buffer, pH 7.5. Cells were incubated and treated with CdS-dextrin QDs at different concentrations (0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) during 30 min. Afterwards,  $\zeta$ -potential was determined using a Zetasizer, which is based on the Lasser-Doppler microelectrophoresis technique [27].  $\zeta$ -potential was indirectly measured by monitoring particle speed using a laser, which enables the measuring of electrophoretic motility of erythrocytes. The results were analyzed using the Dispersion Technology Software 6.2 (Malvern Instrument Inc., Westborough, USA).

### Fluorescent microscopic visualization of CdS-dextrin QDs in erythrocytes

The erythrocytes employed to verify selective uptake ( $1 \times 10^7$ ) were cultured for 10 min, washed with PBS and then incubated with CdS-dextrin QDs 0.1, 1, 10, 1 and 00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  during 30 min. The cells were seeded on slides by smearing and allowed to dry- Then they were placed above the objective on a confocal microscope. CdS-dextrin QDs were excited with a 488 nm laser, and their signals were collected from 515 nm. Slices were observed under fluorescence microscopy and analyzed using the Image-Pro Insight 9 software (Digital Imaging Systems, Bourne End, UK).

### Molecular docking of interaction CdS-dextrin/erythrocyte

We used human glucose transporter GLUT1 (PDB ID: 4PYP) in



this study. GLUT1 was embedded on a membrane with 75/25 of 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and cholesterol, respectively. GLUT1 orientation followed the Orientations of Protein in Membrane (OPM) database [28]. The GLUT1 system was built using charmm-gui server [29]. Salt concentration was 0.15 M KCl. The complete system was equilibrated with Gromacs 2019.2 following inputs proposed by the charmm-gui server using charmm36 parameters. The last structure after equilibration was used as a receptor for docking studies. We performed 50 independent blind docking runs of GLUT1 over the extracellular region (as reported on the OPM database) using Autodock vina 1.12 [30]. A grid box of 45x45x23Å with a 0.375 Å spacing was used. 6 and 12 dextrans were built using charmm-gui server by employing the glycan reader & model option. Both glycans were solvated and equilibrated with NAMD 2.12 using inputs provided by charmm-gui. Both systems were prepared on Pymol 2.3.0 using Autodock Vina. Plugin images were created by using Maestro [31] and VMD [32].

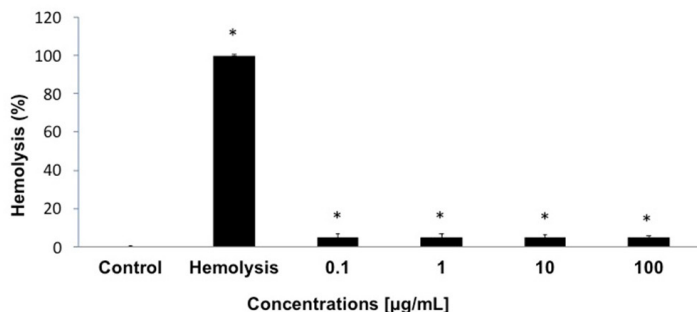
### Statistical analysis

The data are represented as the mean  $\pm$  SD of three different experiments. The data were processed by T-test (for independent groups) using SPSS 10.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software.

## Results

### Effect of CdS-dextrin QDs on the integrity of erythrocytes after 30 minutes of exposure

Figure 1 shows the effect of different concentrations (0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{g/mL}$ ) of CdS-dextrin QDs on the integrity of erythrocytes. Cells were incubated during 30 minutes with nanomaterial. It was observed that the CdS-dextrin QDs produced 5% hemolysis under all concentrations ( $p < 0.05$ ). These results indicate that CdS-dextrin QDs produce minimal lysis of erythrocytes.

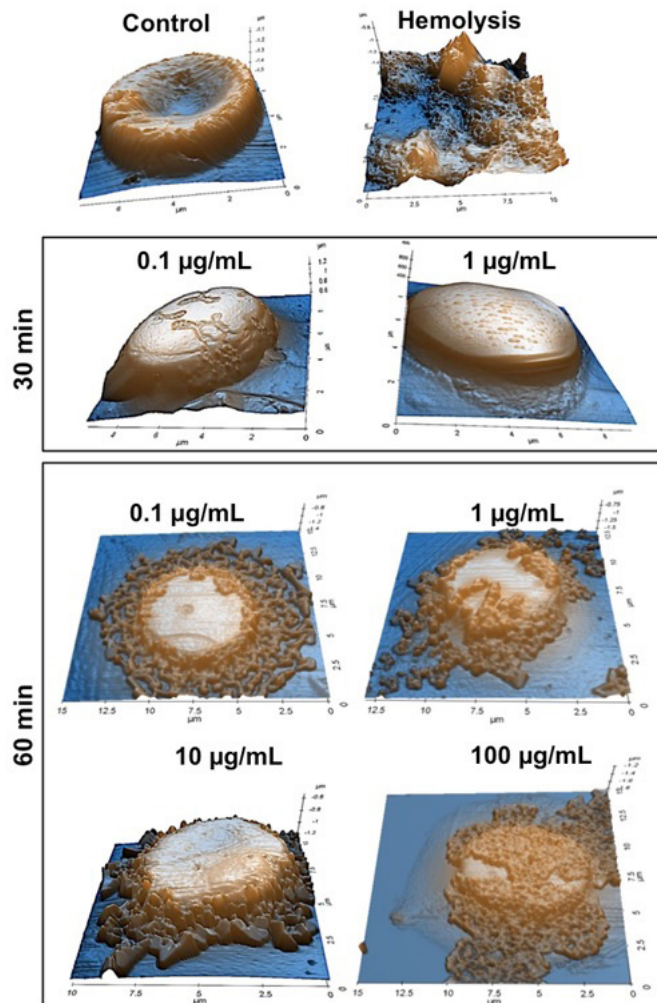


**Figure 1:** Effect of CdS/dextrin QDs on integrity of erythrocytes. Erythrocytes were treated with CdS-dextrin QDs at 0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{g/mL}$  during 30 min. Control erythrocytes were considered as healthy cells not exposed to QD and hemolysis group were cells preincubated with NaCl 35mM. Results are expressed as the percentage of hemolysis as compared with hemolysis group. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiment. \*  $p < 0.05$  as compared with hemolysis group.

### Effect of CdS-dextrin QDs on morphology and size of erythrocytes after 30 minutes of exposure

Figure 2 shows AFM images of erythrocytes treated with CdS-

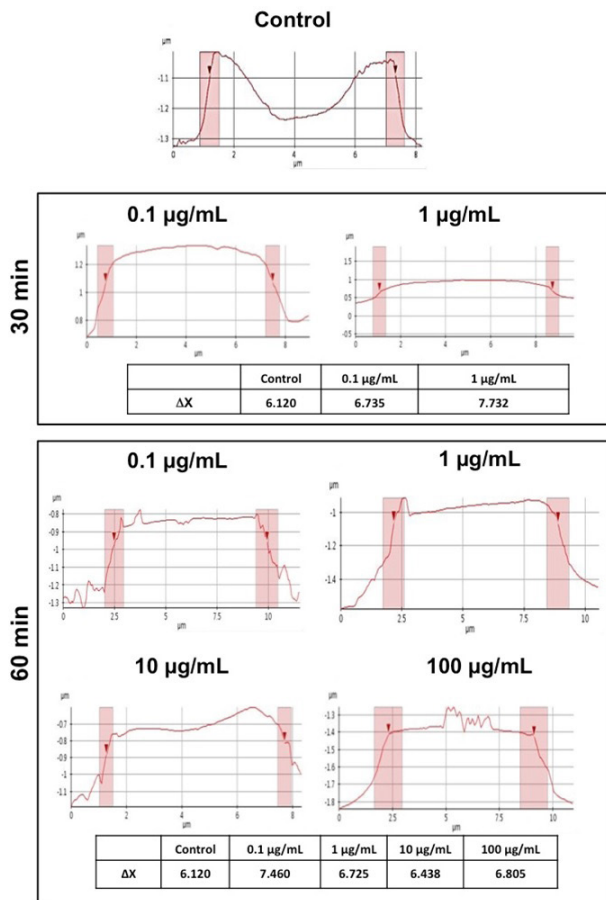
dextrin QDs during 30 and 60 min. The first two images correspond to untreated erythrocytes (control group) and erythrocytes treated with NaCl 35mM (hemolysis). First there is a 3D image of a healthy erythrocyte with oval morphology, biconcave with a central depression. Next to it is a hemolyzed erythrocyte. The cell shows a loss of its morphology due to the rupture of its membrane and the output of cellular content.



**Figure 2:** Representative AFM images showing the surface morphology of erythrocytes. Outer surface images were recorded in air tapping-mode AFM, images of typical circular, biconcave rat erythrocytes are shown in control group (height 3D image) and loss of morphology in hemolysis group. Erythrocytes treated with CdS-dextrin QDs at 0.1, and 1,  $\mu\text{g/mL}$  during 30 min showed alterations in their morphology. Erythrocytes treated with CdS-dextrin QDs at 0.1, 1, 10 and 100  $\mu\text{g/mL}$  during 60 min showed loss of concavity, an apparent size increase, and the presence of surface accumulations. The image is representative of two experiments.

Erythrocytes treated with 0.1  $\mu\text{g/mL}$  CdS-dextrin QDs during 30 min show a corpulent morphology and undefined edges, flat, with cracks on the surface and lacking a central depression, as shown in the 3D reconstruction. In the case of erythrocytes treated with 1  $\mu\text{g/mL}$  of CdS QDs during 30 min, the cells showed defined and smooth edges, increased in width, flatness and lack of a central depression, as well as “artifacts” that made the surface

look rough, suggesting these could be nanoparticles (see image). Interestingly, erythrocytes treated with concentrations of 0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{g/mL}$  during 60 min showed significant changes. The erythrocyte itself was intact and there was no rupture of its membrane, but there was a loss of concavity, an increased size, and the presence of surface accumulations, which increased alongside QD concentration. Although the hemolysis analysis revealed 5% of it, the AFM analysis showed no evidence of hemolysis with any QD concentration. This discrepancy in the results may indicate that the observed hemolysis might be due to sample manipulation. Interestingly, a topographical analysis showed loss of biconcavity in those erythrocytes treated with CdS-dextrin QDs. However, there was no increase in the size of erythrocytes at any concentration or under any time of exposure (see  $\Delta X$  values, Figure 3).

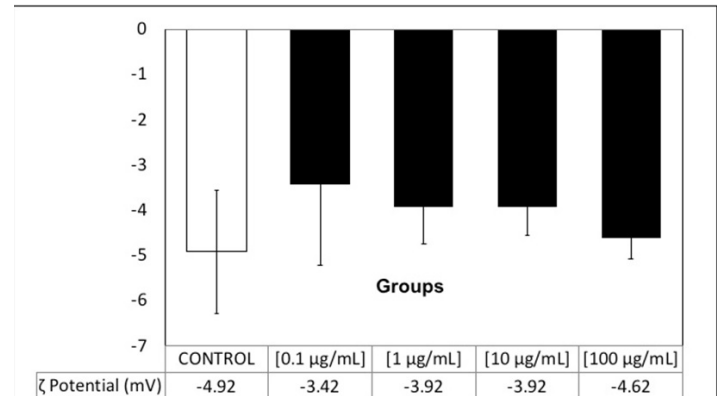


**Figure 3:** Topographic height-AFM images of erythrocytes treated with CdS-dextrin QDs at 0.1 and 1  $\mu\text{g/mL}$  during 30 min or 0.1, 1, 10 and 100  $\mu\text{g/mL}$  during 60 min.  $\Delta X$  shows that the size of erythrocytes did not change regardless of QD concentration and exposure time. The image is representative of two experiments.

#### Determination of the $\zeta$ -potential in erythrocytes treated with CdS-dextrin QDs as a measure of cell membrane integrity

In Figure 4, we can see the  $\zeta$ -potential recorded in healthy erythrocytes and erythrocytes treated with CdS-dextrin QDs. The net  $\zeta$ -potential on cell membrane of live cells is determined, among other factors, by the organization and intermolecular interactions of its components (proteins and lipids). In erythrocytes treated

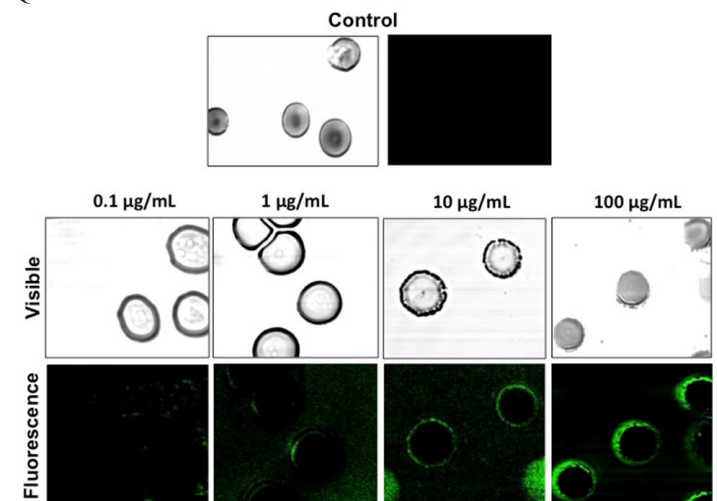
with concentrations of 0.1 to 100  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\zeta$ -potential was close to the control values- That is, it was indicative of the fact that the CdS-dextrin QDs did not affect the  $\zeta$ -potential of the erythrocyte membranes.



**Figure 4:** The zeta potential of erythrocytes after exposure to CdS/dextrin QDs. Healthy erythrocytes were taken as the control group. Erythrocytes were treated with CdS/dextrin QDs at 0.1, 1, 10 and 100  $\mu\text{g/mL}$  during 30 min.  $\zeta$ -potential of erythrocytes was detected in independent duplicates. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  as compared with control group.

#### In vitro cellular uptake and localization of CdS-dextrin QDs in erythrocytes

Erythrocytes were incubated with 0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{g/mL}$  of CdS-dextrin QDs for 30 min and then washed to remove any unbound nanoparticles (Figure 5). Untreated erythrocytes showed the usual morphology for these cells, including the presence of biconcave morphology. There was no fluorescence detected inside of cells. Erythrocytes treated with 0.1 and 1  $\mu\text{g/mL}$  CdS-dextrin QDs showed minimal fluorescence, and there was no clear uptake by the cells. Interestingly, erythrocytes treated with 10 and 100  $\mu\text{g/mL}$  showed green fluorescence surrounding them; this increased alongside the concentration of quantum dots. These findings show that, at times, erythrocytes were unable to uptake CdS-dextrin QDs.

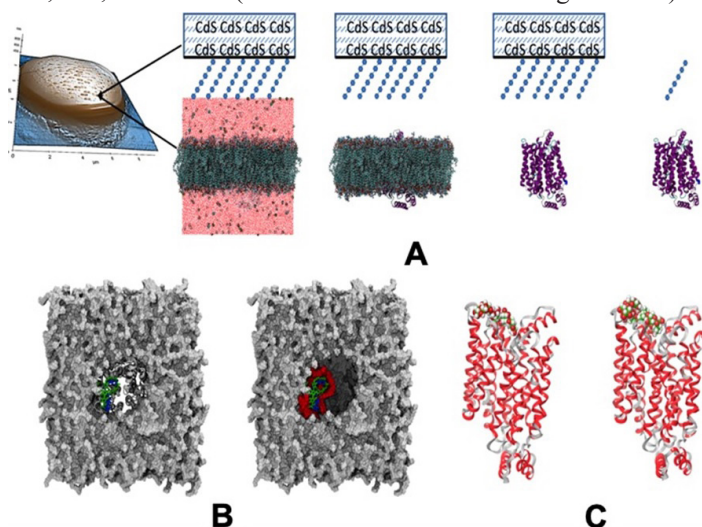


**Figure 5:** Fluorescent microscopic visualization of CdS/dextrin QDs in erythrocytes. Erythrocytes were treated for 30 min with CdS/dextrin QDs (0.1 – 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Cells were seeded on slides by smearing and allowed

to dry, then analyzed using confocal epifluorescence microscope. Green fluorescence shows the presence of QDs surrounding the erythrocytes.

### Molecular docking of CdS-dextrin/erythrocyte

A hypothetical system was created to get a possible binding mode between CdS spheres covered with dextrans and the main protein on the erythrocyte membrane, glucose transporter GLUT1. Due to the lack of molecular structures of CdS spheres with dextrans, only one dextrin of each size was docked with GLUT1 transporter. 50 independent docking runs were performed using the GLUT1 structure and two dextrans of different size: 6 and 12 sugars (Figure 6A panel). Dextrans were docked on the same region of GLUT1 transporter (Figure 6 B and C panels). GLUT1 residues involved in the potential binding site of dextrans reported by autodock vina were: 37, 38, 41, 58, 61, 62, 65, 66, 296, 299 to 304, 355 to 366, 423, 424, 426 to 432 (residue numbers as on the original PDB).



**Figure 6:** Hypothetical glucose transporter GLUT1 bound to dextrans. A) Schematic representation of the procedure used on this work. B) Membrane molecular surface with one representative structure of both dextrans (6 sugars on blue sticks and 12 sugars on green sticks) with GLUT1 on the center of the image. Most of the docking results bound to one side of GLUT1 surface (in red). C) GLUT 1 cartoon representation with 6 and 12 sugars (left and right, respectively).

### Discussion

QD applications have increased in recent years. However, even with their potential utility, their toxicity is still closely associated with size, composition, loading and coating, among other characteristics. Here we evaluate the *in vitro* effects of the interaction of CdS-dextrin QDs with rat erythrocytes and show that CdS-dextrin QDs may cause important morphological changes without modifying the  $\zeta$ -potential in the erythrocyte and or inducing cell death.

Previous studies have shown that the exposure of erythrocytes to QDs is associated with toxicity [32,33]. Gold nanoparticles of 30 nm in size produced hemolysis, and no such effect was observed with smaller nanoparticles (5.10, 20 nm) [34]. Contrary to the above, another study with silver nanoparticles showed that smaller

nanoparticles (1-3 nm) produced greater hemolytic activity (60%) [35], suggesting that hemolysis induction is independent of size. Likewise, 3.2 nm gold nanoparticles coated with polyethylene glycol produced minimal hemolysis (<5%) with concentrations of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , but nanoparticles not coated produced greater hemolysis (70%) at concentrations of 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [36]. Reports from other studies using QDs coated with different materials or drugs have shown a reduction in the hemolytic effect [37,38] suggesting that size and coating could help reduce the hemolytic effect of certain nanomaterials. In the present work the erythrocytes were exposed to CdS-dextrin QDs for 30 min and we observed minimal hemolysis (<5%), even at the concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The nanoparticles used in the present study have the characteristic of being small in size (3-5 nm) and are also coated with dextrin. Which suggests that as with nanomaterials, the small size and dextrin coating could be protecting the core of CdS and thus be more biocompatible with erythrocytes.

It is suggested that erythrocytes are cells sensitive to the effect of some nanomaterials and as a result of such interaction membrane and morphological alterations of the erythrocyte can occur [39]. It has been reported that  $\text{TiO}_2$  nanoparticles of a size of 20 and 200 nm, produced deformation of the erythrocyte membrane at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the effect being more marked with those of smaller size [40]. In another study, it was reported that erythrocytes treated with  $\text{SiO}_2$  nanoparticles of a size of 30 nm at a concentration of 1 mg/mL produced morphological alterations and adhesion of erythrocytes; while erythrocytes treated with  $\text{ZrO}_2$  nanoparticles (80-100 nm) and  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nanoparticles (15-60 nm) at a concentration of 2 mg/mL produced surface cracks and the biconcavity was lost. Additionally, erythrocytes treated with  $\text{Al}_2\text{O}_3$  presented vesicles on the erythrocyte membrane and the changes produced were irreversible [41]. In our study, we observed that erythrocytes treated with CdS-dextrin QDs (3-5 nm) caused morphological changes in the erythrocyte membrane at concentrations of 0.1 and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  after 30 min of exposure. The alterations that were observed were loss of biconcavity, cracks and small lumps on the surface of the membrane. However, in the erythrocytes treated for 60 minutes, in addition to the aforementioned alterations, it was observed that there was an agglomeration of the nanoparticles on the cell surface with all the concentrations studied. The AFM images and topographic measurements showed evidence that CdS-dextrin QDs produced morphological alterations similar to those already reported, given their small size they could have a larger surface area to interact with the erythrocyte membrane.

The charge of the cell membrane depends directly on the composition of the cell membrane and the physiological state of the cell, so changes in the  $\zeta$ -potential may reflect morphological and/or functional changes [42,43]. Changes in the  $\zeta$ -potential of membrane have been associated by the presence of certain materials in some cells, including erythrocytes. As demonstrated in the study by Bondar et al., [44] where the effect of different polymers on the  $\zeta$ -potential in cervical adenocarcinoma cells (HeLa), breast adenocarcinoma (MCF-7) and erythrocytes was evaluated, as a



biophysical indicative of the physiological composition of cells. It was shown that the interaction of the cells with poly-L-lysine (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and polyethyleneimine (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) modified the  $\zeta$ -potential of the cell membrane towards positivity which was associated with a reduction in viability and presence of apoptosis. On the other hand, it has been observed that erythrocytes exposed to nanocapsules of glycerol monolaurate did not induce toxicity and this correlated with no changes in the  $\zeta$ -potential of the erythrocyte [45]. Our results showed that the exposure of erythrocytes with CdS-dextrin QDs at concentrations of 0.01 to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 30 minutes did not produce changes in  $\zeta$ -potential. Although we observe morphological changes of the erythrocyte, there are probably no changes in membrane integrity. Therefore, based on other studies we can suggest that the interaction of the CdS-dextrin QDs/erythrocytes probably does not affect the functionality, since we do not observe changes in the net charge of the cell surface, at least a short exposure time.

Previous studies with CdS-dextrin QDs have been shown to be easily internalized and distributed homogeneously inside non-blood cells, and that uptake has been dose-dependent manner [22]. It is known that there are nanomaterials that cannot reach the cell nucleus, such is the case of carboxylated QDs (625 nm) that were evaluated in human bone marrow cells for 1, 3, 6 and 24 hours, where it was shown that QDs were easily internalized but were located only in the cytoplasm and on the cell surface, without reaching the nucleus [46]. The erythrocytes have been used for the delivery of contrast agents through the use of magnetic nanoparticles, the above has been achieved through the temporary opening of pores in the erythrocyte membrane so that they can cross the nanoparticles and can remain within these cells a once the pores close [47]. This methodology has proved to be stable, versatile, safe and easy to manufacture. However, there are no reports indicating that erythrocytes are capable of internalizing nanomaterials by themselves. In this study, the ability of the erythrocyte to capture CdS-dextrin QDs was evaluated using concentrations of 0.1 to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , after exposure for 30 min. By confocal microscopy it was possible to observe that QDs only surrounded the erythrocytes, that is, the erythrocyte was unable to internalize CdS-dextrin QDs. These findings correlated with the AFM studies, where it was shown that QDs remained on the cell surface. It has been reported that a cell internalizes nanoparticles through active internalization mechanisms: endocytosis, macropinocytosis, phagocytosis and pinocytosis (this being the most common). These mechanisms encapsulate NPs in selectively transported vesicles, and it is estimated that size, surface charge of NPs, as well as transport machinery [48] are involved in each mechanism. However, it is known that erythrocyte does not have endocytosis mechanisms or active transport due to its limited metabolism, perhaps that may be the reason why it cannot internalize QDs.

The molecular docking analysis suggests that changes in the shape of the erythrocyte may be due to molecular interactions between the dextrin that covers the core of CdS and the cell surface. The schematic representation obtained from molecular docking shows that dextrin can bind to the GLUT1 glucose transporter. As

Galochkina et al show, the salt bridge formed by residues K38 and E299 are key to glucose absorption [49]. Our coupling results can give an explanation to the morphological changes of the erythrocytes since the interaction of dextrin can alter the natural conformational movement of the GLUT1 transporter, and with this produce a decrease in glucose absorption. Although the potential  $\zeta$  did not show changes in the erythrocyte that could indicate a functional change thereof, by AFM techniques it was shown that the QDs do remain on the cell surface and are associated with a morphological change of the cell. Therefore, the molecular docking analysis suggests that there could be modifications in important components of the cell membrane that lead to functional changes of the erythrocyte.

## Conclusion

The results showed that the CdS-dextrin QDs produce minimal hemolysis but induce notable morphological changes of erythrocytes. However, it is not clear whether these changes could be associated with functional changes. Therefore, further studies are necessary to clarify this matter and assess whether the interaction of the CdS-dextrin QDs/erythrocyte can trigger associated pathophysiological effects *in vivo*.

## Acknowledgements

The authors are grateful to M. Sci. Arturo Galvan Hernández at Institute of Physical Science (UNAM) for his technical assistance in obtaining AFM images and to Q.F.B Xochitl Alvarado Affantrager at the National Laboratory of Advanced Microscopy (UNAM) for her technical assistance in obtaining confocal microscopy images.

## References

1. Volkov Y. Quantum dot in nanomedicine: recent trends, advances and unresolved issues. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 468: 419-427.
2. Devi P, Saini S, Kim KH. The advanced role of carbon quantum dots in nanomedical applications. *Biosens Bioelectron.* 2019; 141: 111158.
3. Huang H, Lovell JF. Advanced Functional Nanomaterials for Theranostics. *Adv Funct Mater.* 2017; 27.
4. Mitragotri S, Anderson DG, Chen X, et al. Accelerating the Translation of Nanomaterials in Biomedicine. *ACS Nano.* 2015; 9: 6644-6654.
5. Nag OK, Delehanty JB. Active Cellular and Subcellular Targeting of Nanoparticles for Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 2019; 11: 543-543.
6. Ahmad IZ, Kuddus M, Tabassum H, et al. Advancements in Applications of Surface Modified Nanomaterials for Cancer Theranostics. *Curr Drug Metab.* 2017; 18: 983-999.
7. Cluitmans JCA, Chokkalingam V, Janssen AM, et al. Alterations in Red Blood Cell Deformability during Storage: A Microfluidic Approach. *Biomed Res Int.* 2014; 764268.
8. Schaeffer EK, West RJ, Conine SJ, et al. Multiple physical stresses induce  $\gamma$ -globin gene expression and fetal hemoglobin production in erythroid cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2014; 52: 214-224.



9. Zhang H. Erythrocytes in nanomedicine: an optimal blend of natural and synthetic materials. *Biomaterials. Sci.* 2016; 4: 1024-1031.
10. Kim J, Heo YJ, Shin S. Haemocompatibility evaluation of silica nanomaterials using hemorheological measurements. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016; 62: 99-107.
11. Li S, Guo Z, Zhang Y, et al. Blood Compatibility Evaluations of Fluorescent Carbon Dots. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015; 7: 19153-19162.
12. Barshtein G, Livshits L, Shvartsman LD, et al. Polystyrene Nanoparticles Activate Erythrocyte Aggregation and Adhesion to Endothelial Cells. *Cell Biochem Biophys.* 2016; 74: 19-27.
13. Ekstrand-Hammarström B, Hong J, Davoodpour P, et al. TiO<sub>2</sub> nanoparticles tested in a novel screening whole human blood model of toxicity trigger adverse activation of the kallikrein system at low concentrations. *Biomaterials.* 2015; 51: 58-68.
14. Zeng H, Changjian L, Zhang X, et al. The effects of gold nanoparticles on the human blood functions. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018; 46: 720-726.
15. Chen LQ, Fang L, Ling J, et al. Nanotoxicity of Silver Nanoparticles to Red Blood Cells: Size Dependent Adsorption, Uptake, and Hemolytic Activity. *Chem Res Toxicol.* 2015; 28: 501-509.
16. Thasneem YM, Sajeesh S, Sharma CP. Effect of thiol functionalization on the h6mo-compatibility of PLGA nanoparticles. *J Biomed Mater Res.* 2011; 99: 607-617.
17. Ran Q, Xiang Y, Liu Y, et al. Eryptosis Indices as a Novel Predictive Parameter for Biocompatibility of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles on Erythrocytes. *Sci Rep.* 2015; 5: 16209.
18. Ferdous Z, Beegam S, Tariq S, et al. The *in Vitro* Effect of Polyvinylpyrrolidone and Citrate Coated Silver Nanoparticles on Erythrocytic Oxidative Damage and Eryptosis. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 49: 1577-1588.
19. Lang E, Lang F. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 39: 35-42.
20. Lang KS, Lang PA, Bauer C, et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem.* 2015; 15: 195-202.
21. Jorge Reyes-Esparza, Alberto Martínez-Mena, Ivonne Gutiérrez-Sancha, et al. Synthesis, characterization and biocompatibility of cadmium sulfide nanoparticles capped with dextrin for *in vivo* and *in vitro* imaging application. *J Nanobiotechnology.* 2015; 13: 2-14.
22. Gerardo Gonzalez De La Cruz, Rocío Gómez-Cansino, Patricia Rodríguez-Fragoso, et al. Disposition and Biocompatibility of Dextrin-coated cadmium sulfide nanoparticles after a single dose and multiple doses in rats. *Indian J Pharm Sci.* 2019; 81: 876-884.
23. Gómez-Cansino R, Rodríguez-Fragoso L. Long Exposure to CdS-Dextrin Nanoparticles Induces an Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Effect in Rats. *J Mater Sci Nanotechnol.* 2017; 5: 105.
24. <https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>.
25. Nemmar A, Zia S, Subramaniyan D, et al. Interaction of diesel exhaust particles with human, rat and mouse erythrocytes *in vitro*. *Cell Physiol Biochem.* 2012; 29: 163-170.
26. Neun B, Dobrovolskaia MA. Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties *in vitro*. *Nano Lett.* 2011; 697: 215-224.
27. Tokumasu F, Nardone GA, Ostera GR, et al. Altered membrane structure and surface potential in homozygous hemoglobin C erythrocytes. *PLoS One.* 2009; 4: e5828.
28. Lomize MA, Pogozheva ID, Lomize AL, et al. OPM database and PPM web server: Resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 370-376.
29. Wu EL, Dávila-Contreras EM, Im W. CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations. *J Comput Chem.* 2014; 35: 1997-2004.
30. Jing Huang, Alexander D MacKerell Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem.* 2013; 34: 2135-2145.
31. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010; 31: 455-461.
32. Sang-Jun Park, Jumin Lee, Dhilon S Patel, et al. Glycan Reader is improved to recognize most sugar types and chemical modifications in the Protein Data Bank. *Bioinformatics.* 2017; 33: 3051-3057.
33. A Tsatsakis, A K Stratidakis, A V Goryachaya, et al. *In vitro* blood compatibility and *in vitro* cytotoxicity of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles. *Food Chem Toxicol.* 2019; 127: 42-52.
34. Cenni E, Baldini N. Biocompatibility of poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles conjugated with alendronate. *Biomaterials.* 2008; 29: 1400-1411.
35. Aseichev A, Sergienko VI. Effects of Gold Nanoparticles on Erythrocyte Hemolysis. *Bull Exp Biol Med.* 2014; 156: 495-498.
36. Barrios-Gumiela A, Gómez R, De la Mata J, et al. Effect of PEGylation on the biological properties of cationic carbosilane dendronized gold nanoparticles. *Int J Pharm.* 2020; 573: 118867.
37. Sun C, Lee J, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60: 1252-1265.
38. SN Pleskova, EE Pudovkina, ER, ER Mikheeva, et al. Interactions. Interactions of Quantum Dots with Donor Blood Erythrocytes *In Vitro*. *Bull Exp Biol Med.* 2014; 156: 384-388.
39. Chen YC, Hsieh WY, Lee WF, et al. Effects of surface modification of PLGA-PEG-PLGA nanoparticles on loperamide delivery efficiency across the blood-brain barrier. *J Biomater Appl.* 2011; 27: 909-922.
40. Pretorius E, Du Plooy JN, Bester J. A Comprehensive Review on Eryptosis. *Cell Physiol Biochem.* 2016; 39: 1977-2000.
41. Shi-Qiang L, Rong-Rong Z, Hong Z, et al. Nanotoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to erythrocyte *in vitro*. *Food and Chem Toxicol.* 2008; 46: 3626-3631.
42. Kozelskaya AI, Vasyukov Y, AV Panin, et al. Morphological changes of the red blood cells treated with metal oxide

- 
- nanoparticles. *Toxicol in Vitro*. 2016; 37: 34-40.
43. Furusawa K, Uchiyama K. Collaborative studies of zeta-potential measurements and electrophoretic measurements using reference sample. *Colloids Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*. 1998; 140: 217-226.
  44. Mokrushnikov PV, Panin LE, Zaitsev BN. The action of stress hormones on the structure and function of erythrocyte membrane. *Gen Physiol Biophys*. 2015; 34: 311-321.
  45. Bondar OV, Saifullina DV, Shakhmaeva II, et al. Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. *Acta Naturae*. 2012; 4: 78-81.
  46. Agulla J, Brea D, Argibay B, et al. Quick adjustment of imaging tracer payload, for *in vivo* applications of theranostic nanostructures in the brain. *Nanomedicine*. 2014; 10: 851-858.
  47. Kundrotas G, Karabanovas V, Pleckaitis M, et al. Uptake and distribution of carboxylated quantum dots in human mesenchymal stem cells: cell growing density matters. *J Nanobiotechnology*. 2019; 17: 39.
  48. Takeuchi Y, Suzuki H, Sasahara H, et al. Encapsulation of iron oxide nanoparticles into red blood cells as a potential contrast agent for magnetic particle imaging. *Adv Biom Eng*. 2014; 3: 37-43.
  49. Kapur A, Medina S, Wang W, et al. Enhanced Uptake of Luminescent Quantum Dots by Live Cells Mediated by a Membrane-Active Peptide. *ACS Omega*. 2018; 3: 17164–17172.
  50. Tatiana Galochkina, Matthieu Ng Fuk Chong, Lylia Challali, et al. New insights into GluT1 mechanics during glucose transfer. *Sci Rep*. 2019; 9: 998.