

**EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE PUNTOS DE CARBONO (CD) EN LAS  
LINEAS CELULARES TUMORALES U-87 Y MCF-7**

**YOLY CAROLINA RODRIGUEZ ROJAS**

**Trabajo Dirigido**

**Tutores**

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



**Universidad del  
Rosario**



**ESCUELA  
COLOMBIANA  
DE INGENIERÍA  
JULIO GARAVITO**

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que todo, quiero agradecer a Dios por acompañarme, alentarme y darme fuerzas para culminar mi pregrado. Él es mi inspiración para ser cada día mejor y es quien me ayuda a entender que cada cosa que sucede en mi vida tiene un propósito especial.

Agradezco a mi familia por ser mi apoyo incondicional en estos 5 años de la carrera. Gracias por su confianza en mí y por el amor en momentos difíciles. Gracias a mi hermano Rafael Humberto Rodríguez Rojas por alentarme a ser mejor y por sus consejos. Gracias a Gladys Rojas por su disposición a ayudarme cuando lo necesitaba. Personalmente quiero agradecer a David Leyva por sus consejos, su paciencia y apoyo emocional.

Quiero agradecer a la Universidad del Rosario y a la Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito, por el apoyo brindado a lo largo de la carrera, por su calidad educativa y por todos los conocimientos impartidos. Especialmente agradezco a mis tutores, la Doctora Diana Consuelo Rodríguez Burbano y el Doctor Alejandro Oyono Ondo Méndez, por dirigir mi trabajo de grado. Gracias por su paciencia, amabilidad, confianza, dedicación, y conocimiento. Gracias por permitirme aprender de ustedes y de lo que es la investigación.

## Tabla de Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. GLIOBLASTOMA MULTIFORME .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. TRATAMIENTOS CONVENCIONALES DE GLIOBLASTOMA .....</b>	<b>7</b>
1.2.1. LA CIRUGÍA COMO TRATAMIENTO DE GLIOBLASTOMA .....	8
1.2.2. LA QUIMIOTERAPIA COMO TRATAMIENTO DE GLIOBLASTOMA .....	8
1.2.3. LA RADIOTERAPIA COMO TRATAMIENTO DE GLIOBLASTOMA .....	8
<b>1.3. NANOMEDICINA EN TRATAMIENTOS DE CÁNCER.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4. PUNTOS DE CARBONO .....</b>	<b>9</b>
1.4.1. SÍNTESIS DE PUNTOS DE CARBONO.....	10
1.4.2. PUNTOS DE CARBONO EN TRATAMIENTOS DE CÁNCER .....	10
1.4.3. PUNTOS DE CARBONO EN RADIOTERAPIA.....	11
1.4.4. ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS PUNTOS DE CARBONO EN CÉLULAS CANCEROSAS .....	11
<b>1.5. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD .....</b>	<b>13</b>
1.5.1. ENSAYO MTT .....	14
1.5.2. ENSAYO AZUL TRIPÁN .....	14
1.5.3. LÍNEAS CELULARES A EVALUAR.....	14
<b>1.6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. GENERAL.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. ESPECÍFICOS .....</b>	<b>16</b>
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. SÍNTESIS DE PUNTOS DE CARBONO .....</b>	<b>17</b>
3.1.1. SÍNTESIS DE PUNTOS DE CARBONO POR REACCIÓN MICROONDAS	17
3.1.2. PURIFICACIÓN DE LOS PUNTOS DE CARBONO.....	18
<b>3.2. IMPACTO DE LOS PUNTOS DE CARBONO SINTETIZADOS SOBRE LA     CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES U-87 Y MCF-7.....</b>	<b>19</b>
3.2.1. ENSAYO MTT .....	20
3.2.2. ENSAYO DE EXCLUSIÓN AZUL TRIPÁN .....	21
<b>3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. SÍNTESIS DE PUNTOS DE CARBONO A PARTIR DE ACIDO CÍTRICO POR     REACCIÓN MICROONDAS .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2. EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LOS PUNTOS DE CARBONO     SINTETIZADOS SOBRE LA CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES U87 Y MCF-     7 .....</b>	<b>23</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>31</b>
<b>7. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS.....</b>	<b>32</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. FLUORESCENCIA DE CARBON-DOTS CON DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA DE EXCITACIÓN (NM) [32].	9
FIGURA 2. REDUCCION MTT EN CÉLULAS VIVAS POR REDUCTASA MITOCONDRIAL A SAL DE FORMAZAN [57].	14
FIGURA 3. MICROONDAS PARA SÍNTESIS DE PUNTOS DE CARBONO.	17
FIGURA 4. SOLUCIÓN FINAL OBTENIDA DESPUÉS DE PROCEDIMIENTO SINTÉTICO Y DE PURIFICACIÓN Y ANTES DEL PROCESO DE SECADO.	18
FIGURA 5. DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE PUNTOS DE CARBONO.	19
FIGURA 6. CAJA DE 96 POZOS PARA ENSAYO MTT.	20
FIGURA 7. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ÁCIDO CÍTRICO.	22
FIGURA 8. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ETANOL.	22
FIGURA 9. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL DIMETILFORMAMIDA.	22
FIGURA 10. SOLUCIÓN RESULTANTE DE LA SÍNTESIS DE LOS PUNTOS DE CARBONO (ÁCIDO CÍTRICO, ETANOL Y DIMETILFORMAMIDA) BAJO RADIACIÓN CON LUZ UV ( $\lambda_{EXC} = 365$ NM).	23
FIGURA 11. A. PUNTOS DE CARBONO OBTENIDOS DESPUÉS DE SECADO; B. PUNTOS DE CARBONO BAJO RADIACIÓN CON LUZ UV ( $\lambda_{EXC} = 365$ NM); C. PUNTOS DE CARBONO EN PROCESO DE DISPERSIÓN CON MEDIO DMEM BAJO RADIACIÓN CON LUZ UV ( $\lambda_{EXC} = 365$ NM).	23
FIGURA 12. CAJA X 96 POZOS PARA ENSAYO MTT CON LAS DOS LÍNEAS CELULARES AL AGREGAR DMSO (DISOLVENTE DE LOS CRISTALES DE FORMAZAN) GENERA UN COLOR VIOLETA.	24
FIGURA 13. PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LÍNEA CELULAR U87 EVALUADO POR ENSAYO MTT.	25
FIGURA 14. PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LÍNEA CELULAR MCF-7 EVALUADO POR ENSAYO MTT.	25
FIGURA 15. PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LÍNEA CELULAR U87 EVALUADO POR ENSAYO AZUL TRIPÁN.	26
FIGURA 16. PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LÍNEA CELULAR MCF-7 EVALUADO POR ENSAYO AZUL TRIPÁN.	27

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1: VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE TRATAMIENTOS CONVENCIONALES DE GLIOBLASTOMA.....	7
TABLA 2. PRINCIPALES APLICACIONES DE LOS CD EN TRATAMIENTOS DE CÁNCER. ....	10
TABLA 3. RESUMEN DE ALGUNAS APLICACIONES DE LOS PUNTOS DE CARBONO EN LA RADIOTERAPIA GBM.....	11
TABLA 4. RESUMEN DE REVISIÓN LITERARIA, EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE PUNTOS DE CARBONO EN LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS.....	13

## 1. INTRODUCCIÓN

*En este apartado se presentará generalidades del cáncer, hablando a detalle del cáncer de cerebro (glioblastoma U87). Adicionalmente, se presentan los puntos de carbono como tratamiento adyacente en radioterapia. Finalizando con efectos citotóxicos de los puntos de carbono en líneas celulares cancerosas.*

El cáncer también denominado tumor maligno o neoplasia maligna, se designa a un extenso grupo de patologías que pueden originarse en cualquier tejido humano. Una característica condicionante de esta enfermedad es el crecimiento descontrolado de células que se extienden de su lugar de origen [1]. La propagación del foco canceroso a otros órganos o tejidos diferentes de aquel en el que inicia se le conoce como metástasis, siendo esta la principal causa de muertes por cáncer [2]. Según la Organización Mundial de la Salud, a nivel global se registraron 19'292.789 de nuevos casos de cáncer en el 2020. Encabezando las principales causas de muerte se informó un número de 9'958.133 de muertes en solo el 2020 [3].

En la actualidad existen varios tipos de tratamientos contra el cáncer, siendo su aplicación dependiente de la estadificación del tumor y la reserva funcional del doliente. Estadificación se refiere al tipo de cáncer y su grado de avance. La reserva funcional hace caso a la tolerancia que puede llegar a tener un organismo frente a la cirugía, quimioterapia o radioterapia como tratamiento contra el cáncer [4]. Es común la ablación del tumor como primer tratamiento; no obstante, en algunas ocasiones extirpar completamente el tejido tumoral en una cirugía es una ardua tarea [5]. Al finalizar el procedimiento quirúrgico incluso una sola célula madre de cáncer residual puede transformarse en una nueva neoplasia maligna, razón por la cual se requieren tratamientos complementarios, como la quimioterapia y/o la radioterapia, después de un procedimiento quirúrgico.

La quimioterapia fue definida por el químico Paul Ehrlich en 1900 como el uso de productos químicos para enfermedades. El objetivo de este tratamiento es transportar un fármaco a diferentes partes del cuerpo por medio de los vasos sanguíneos o sistema linfático para destruir las células cancerosas. En 1960 la quimioterapia tuvo resultados positivos al ser aplicada junto con la cirugía y/o la radioterapia para tratar un estancamiento tumoral del 33% debido a la presencia de metástasis hasta ahora no apreciadas después de la radioterapia y cirugía [6]. No obstante la quimioterapia se ha utilizado como único tratamiento especialmente en pacientes con reserva funcional baja, como es el caso de las adultos mayores. La administración de fármacos conducen efectos secundarios, los cuales principalmente se deben a la dosis vía intravenosa, dado a su naturaleza hidrófoba [7].

La radioterapia (RT) es un tipo de terapia que hace uso de la radiación ionizante de Rayos x para la eliminación de tumores [8]. Fotones de Rayos x penetran la materia, incitando a la ionización de átomos, donde se producen rupturas de enlaces químicos; generando efectos dañinos al tejido receptor [9]. A pesar de ser un tratamiento menos invasivo que la cirugía y en la mayoría de los casos mostrar una mayor tolerancia por parte de los pacientes que la quimioterapia, persisten limitaciones. Una posible consecuencia de la irradiación del tejido canceroso puede ser la afectación por exposición de estas energías ionizantes al tejido sano circundante. Como el tejido objetivo, el tejido sano puede enfrentarse a un daño en el ADN al exponerse a esta irradiación de alta energía. La respuesta al daño de ADN define la supervivencia celular, la muerte celular o en algunos casos la inestabilidad

genómica. Con el fin de hacer más eficiente este tipo de terapia, estudios han reportado el desarrollo de agentes radiosensibilizadores efectivos y seguros que incrementen la dosis de radiación en el espacio intracelular para mejorar la radioterapia tumoral, minimizando el daño al tejido circundante sano [10].

### 1.1. Glioblastoma Multiforme

Los tumores cerebrales son un formidable problema de cáncer que ha experimentado pocos avances terapéuticos [11]. En el 2020 dejó 251.329 muertes a nivel global [12]. El glioblastoma (GBM) de linaje astrocítico, es la neoplasia maligna del cerebro más común en los adultos. La gran mayoría de pacientes que presentan esta enfermedad tienen un promedio de vida de 12-18 meses [13]. Este tipo de tumor prevalece en personas con un rango de edad de 55-60 años, sin embargo puede ocurrir a cualquier edad. Según la OMS el glioblastoma es uno de los tipos de cáncer más letales que se han encontrado (grado IV). En el GBM prevalecen las células cancerosas madres, las cuales se regeneran de una forma eficaz y llegan a ser un impedimento para las terapias [14]. Se ha detectado una importante resistencia en esta clase de tumor, pues la terapia a la que se somete el paciente ayuda a la supervivencia, mas no a erradicar este tumor [15]. Este pronóstico se debe a la recidiva de los tumores después del tratamiento inicial con resección quirúrgica máxima, radioterapia y quimioterapia.

### 1.2. Tratamientos convencionales de glioblastoma

Hoy en día los tratamientos de glioblastoma se han caracterizado por buscar estrategias que incrementen la supervivencia de los pacientes que la padecen. Esto en simultáneo con la reducción de efectos secundarios independientemente del tratamiento convencional. Se ha identificado que las terapias practicadas de forma individual no tienen la misma efectividad que el combinar las terapias. Los tratamientos más utilizados contra el cáncer de cerebro glioblastoma son: la cirugía, quimioterapia y radioterapia (Tabla 1).

**Tabla 1: Ventajas y desventajas de tratamientos convencionales de glioblastoma.**

<b>Tratamientos de glioblastoma mas comunes</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Cirugía	Disminución de carga tumoral inmediata. Mejora de los síntomas.	Células madres cancerosas residuales.
Radioterapia	Detiene la proliferación de las células cancerosas.	Efectos secundarios por radiación a tejido sano.
Quimioterapia	Medicamentos dirigidos.	Frecuente resistencia los fármacos.

### **1.2.1. La cirugía como tratamiento de glioblastoma**

La ablación es el principal tratamiento que se ve involucrado al tratar glioblastoma. Este tratamiento tiene como fin disminuir inmediatamente la carga tumoral, mejorando los síntomas y déficit neurológicos relacionados con la neoplasia [16]. Existe una correlación entre la magnitud extirpada y la supervivencia. Sin embargo, el GBM es un tumor localmente invasivo que no se puede curar por completo con la cirugía provocando recaída de aproximadamente en el 80% de los casos [17]. La mediana de supervivencia cuando solo se trata con cirugía es de 4 meses [18].

### **1.2.2. La quimioterapia como tratamiento de glioblastoma**

La quimioterapia utilizada en glioblastoma ha adoptado problemas al ser este tipo de cáncer resistente a los medicamentos [19]. En algunos casos la quimioterapia es implementada durante la cirugía para reforzar el tratamiento y tener una menor probabilidad de recurrencia. En otros casos cuando reinciden células cancerosas se lleva a cabo quimioterapia vía intravenosa. En investigaciones se han encontrado agentes biológicos característicos de las células cancerosas como las señales celulares de glioblastoma que envía al cuerpo provocando nueva vascularización para nutrir el tumor. Ese distintivo permite la aplicación de medicamentos dirigidos, lo que proporciona el enfoque a anomalías específicas [14].

### **1.2.3. La radioterapia como tratamiento de glioblastoma**

La radioterapia ha tenido un papel crucial en terapias contra glioblastoma. En las últimas décadas se han visto avances en la capacidad de la RT moderna para administrar dosis de radiación maximizando la eficacia limitando la toxicidad a tejido sano[20]. La radiosensibilidad es un objetivo importante para mejorar la respuesta del paciente con GBM; por lo cual muchos estudios buscan desarrollar múltiples estrategias, entre estas se encuentran distintas nanopartículas con alto número atómico, lo cual permite que haya una mejor respuesta en el tratamiento en relación con el efecto Compton al irradiar al material [21–23]. Dado al escaso margen del efecto terapéutico y toxicidad, se ha estudiado técnicas que aumenten la radiosensibilidad para evitar la radiación a tejido sano.

## **1.3. Nanomedicina en tratamientos de cáncer**

La nanomedicina es una disciplina de la nanotecnología que se ha enfocado en la creación o innovación de diferentes aplicaciones biomédicas, aprovechando las propiedades únicas que exhiben los nanomateriales[24]. Los nanomateriales cuentan con propiedades físicas y químicas asociadas a su tamaño y dado al estudio que se les ha dado se han desarrollado nanodispositivos como lo son las nanopartículas [25]. Las nanopartículas son estructuras con dimensiones similares en tamaño a muchas moléculas biológicas. Las características biomiméticas frente a biomoléculas y la alta relación superficial (volumen y la posibilidad de modular sus propiedades introduciendo heteroátomos como: dopantes o su funcionalización), convierten a las NPs en objeto de estudio en el área de la medicina [26].

Gracias al impacto que han tenido las nanopartículas en los últimos años, se ha adquirido un amplio conocimiento, llevando al desarrollo de aplicaciones biomédicas para la

prevención, el diagnóstico y el tratamiento de diferentes patologías [27]. Uno de los campos en donde más se está observando la aplicación de la nanomedicina es en los tratamientos contra el cáncer. Las aplicaciones en cáncer se centran en las propiedades fisicoquímicas de las NP, que tienen la capacidad de administrar distintos agentes terapéuticos (biológicos y quimioterapéuticos) [28].

Las nanopartículas son de interés investigativo para la mejora de la radioterapia. Se ha identificado un aumento de la radiosensibilidad en diferentes nanopartículas, dado al incremento de la dosis de radiación en el espacio intracelular. Además, presentan la capacidad de cargar medicamentos, entre otras funciones [29]. Uno de los nanomateriales con más estudios para radioterapia son las nanopartículas de oro. Estas NP son adaptables a diferentes tamaños y formas; además, cuentan con un alto número atómico. Las NP de oro se pueden utilizar distintas estrategias para la funcionalización de la superficie y adaptar ligando que ayuden a facilitar la detección de células cancerosas para la radioterapia. Se ha demostrado que NP de oro mejoran los efectos de la radioterapia ocasionando muerte celular de tumores de glioblastoma multiforme. Sin embargo, las NP de oro presentan una síntesis difícil de ser escalonada a producciones industriales. Por otro lado, aunque es inerte y biocompatible a nanoescala puede ser inestable a radiaciones de alta energía [30].

#### 1.4. Puntos de carbono

Los puntos de carbono, también conocidos por *Carbon Dots* (CD) son nanocristales generalmente esféricos con un diámetro menor a 10 nm. Se identifican por sus propiedades fotoluminiscentes y particularidad en emitir fluorescencia. Los CD se han destacado desde hace más de 10 años, cuando se realizó su primera síntesis al mostrar ventajas en relación a su biocompatibilidad, baja toxicidad, propiedades ópticas y químicas [31]. La fluorescencia de los CD se puede observar bajo irradiación de luz ultravioleta. La emisión de los CD depende de la longitud de onda de excitación y el rango de los colores emitidos en función de la excitación desde el rojo y más comúnmente el azul y verde se puede observar en la Figura 1 [32].

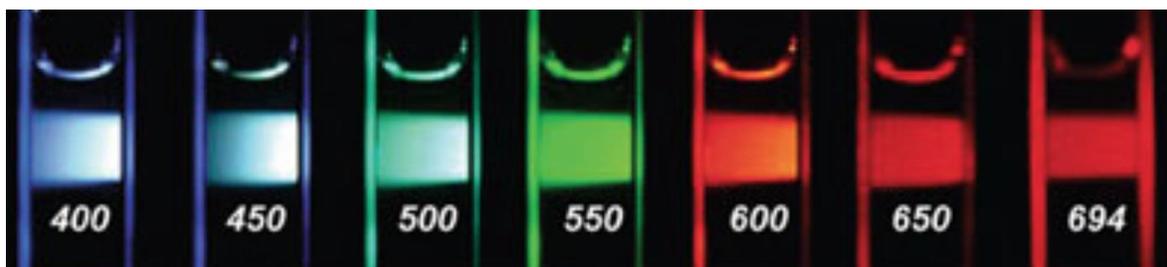


Figura 1. Fluorescencia de Carbon-Dots con diferentes longitudes de onda de excitación (nm) [32].

Estas propiedades fluorescentes se deben a defectos por oxidación, pasivación superficial y los heteroátomos presentes [33]. Los CD son partículas con peso reducido y tienen una gran elasticidad. El mecanismo de fluorescencia de los CD según la literatura se debe a las diferentes rutas de síntesis, precursores o modificaciones [32]. Los CD se destacan por presentar estabilidad acuosa, propiedades electrónicas, facilidad de síntesis y modificación de la superficie [34].

### 1.4.1. Síntesis de Puntos de Carbono

Se han encontrado numerosas rutas para generar CD a partir de diversos precursores como moléculas orgánicas simples y productos naturales [31]. Las formas de sintetizar CD se pueden clasificar en dos métodos. El primer método es el *Top-Down*, que se puede identificar por su producción específica, originado de un sistema de mayor tamaño hasta llegar a los CD [35]. La electroquímica, la oxidación química y la irradiación con láser son tres de los métodos empleados principalmente [34]. El segundo método es de *bottom-up*, este consiste en el auto ensamblaje de una partícula pequeña (precursores orgánicos) a un sistema de un mayor tamaño. El microondas, hidrotermal, descomposición termal, ondas ultrasónicas.

Los CD pueden tener diferentes funciones a través de la modificación de la superficie por medio de la funcionalización o pasivación [36]. Diferentes estudios han enfatizado que la síntesis por microondas (*Bottom-up*) ha sido una de las mejores técnicas, que se destaca por sus ventajas a comparación de otros métodos *bottom up* [37]. La energía que es suministrada por la onda, la toma el material de forma molecular, dando como resultado un calentamiento uniforme y selectivo y así brinda una técnica eficiente [38].

### 1.4.2. Puntos de carbono en tratamientos de cáncer

Hoy en día una de las aplicaciones en las que más se ve la presencia de CD gracias a su potencial, es en terapias contra el cáncer. Las primeras aplicaciones de los puntos de carbono se centran en el bioetiquetado y la bioimagen, debido a las propiedades ópticas de los CD. Sin embargo, se ha venido estudiando distintas formas de aprovechar la capacidad que tienen los CD en funcionalización o doparlos de su superficie para mejores resultados en tratamientos contra el cáncer. Algunos estudios han querido dilucidar los mecanismos fotofísicos de los CD en donde se demostró que los estados superficiales de los CD son la fuente subyacente de las propiedades luminiscentes; pero aclaran que para que puedan visualizarse estas propiedades se debe lograr funcionalizar las nanopartículas de carbono por reacciones químicas [39]. En la Tabla 2 se pueden identificar principales aplicaciones de los CD en tratamientos en cáncer.

**Tabla 2. Principales aplicaciones de los CD en tratamientos de cáncer.**

Tratamiento de cáncer	Aplicación	Referencia
Cirugía	Agente teranóstico	[40]
Quimioterapia	Vehículo para mayor efectividad en administración de fármacos	[41]
Radioterapia	Agente térmico, radiosensibilizador y bioimagen	[10] [41] [42]

### 1.4.3. Puntos de carbono en radioterapia

Actualmente a pesar de que la radioterapia es uno de los tratamientos más eficientes contra los tumores sólidos (glioblastoma), tiene dos limitantes urgentes. La primera es que no logra localizar con alta definición el tumor, no focaliza el tumor, lo que deriva daños en tejidos sanos. La segunda es por la resistencia adquirida dentro de las células cancerosas de tumores como el glioblastoma, desencadenando procesos de reparación molecular que conduce a la radioresistencia [43]. Las propiedades fotoluminiscentes de los CD pueden ser moduladas por medio de heteroátomos como dopantes o funcionalización de su superficie. Las propiedades ópticas de los CD lo hacen ideal para el desarrollo de nanoplateformas teranóstico. Otra característica es que los CD pueden ser dopados con heteroátomos que cumplan con el requisito de un alto número atómico y garantizar mayor efectividad [44]. En la literatura se reporta que los CD son partículas generadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que ocasiona rupturas oxidativas en el ADN de las células cancerosas[45]. En la Tabla 3 se puede observar resultados de algunos estudios de CD en radioterapia.

**Tabla 3. Resumen de algunas aplicaciones de los puntos de carbono en la radioterapia GBM.**

<b>Aplicación</b>	<b>Método de síntesis</b>	<b>Dopante</b>	<b>Funcionalización</b>	<b>Referencia</b>
MR	Microondas	Magnesio	NINGUNO	[46]
Radioterapia	Hidrotermal	Gadolinio	NINGUNO	[43]
Terapia fotodinámica	Hidrotermal	NINGUNO	NINGUNO	[47]
Imagen	Hidrotermal	Polietilenimina ramificada (PEI)	NUNGUNO	[48]
Terapia fotodinámica	Hidrotermal	Magnesio	NINGUNO	[49]

### 1.4.4. Estudio de la citotoxicidad de los puntos de carbono en células cancerosas

La toxicidad en las células puede ser causada por diversos agentes químicos y físicos, afectando la tasa de proliferación y la viabilidad celular, siendo estos indicadores fundamentales para conocer la salud a nivel tisular [50]. Es importante el identificar la respuesta citotóxica que han tenido diferentes CD en líneas celulares cancerosas. De esta manera, se determinara correctamente el efecto que tienen los CD en las líneas celulares cancerosas al implementar los CD en radioterapia. Se hizo una revisión de literatura para estudiar el efecto citotóxico que tienen los CD en líneas celulares cancerosas. Para la revisión de literatura se tuvo en cuenta parámetros como: tiempo de evaluación de la citotoxicidad en 24 horas, que se presente el precursor, el reactor para la síntesis de los CD, evaluación de la citotoxicidad en células cancerosas (en su mayoría glioblastoma) y que los ensayos de citotoxicidad evalúen el efecto de los CD sin modificaciones.

Estudio titulado: Síntesis verde de puntos de carbono fluorescentes a partir de especias para imágenes in vitro e inhibición del crecimiento de células tumorales, (2018). En este estudio se utiliza reactor hidrotermal para la síntesis de CD. En esta oportunidad se quiere evaluar la citotoxicidad de CD a base de la canela, chile rojo, cúrcuma y pimienta negra en células de glioblastoma humano (Línea celular cancerosa LN-229) y en células renales humanas (HK-2) por 24 h. Los productos orgánicos mencionados anteriormente llaman la atención por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Por otro lado, se evaluó la citotoxicidad del CD de ácido cítrico, pero este se evaluó como control, ya que se hallaron diferentes estudios que presentan la baja citotoxicidad de este compuesto. Las concentraciones que se utilizaron fueron de 100-2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los resultados de esta investigación confirmaron un alto porcentaje de viabilidad de las células cancerosas y no cancerosas frente a CD de ácido cítrico. Los cuatro CD a base de especias exhiben una citotoxicidad diferencial en células humanas cancerosas. El porcentaje de viabilidad de LN229 se vio afectado al ser expuestas a los CD a estudiar en concentraciones superiores a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Porcentajes menores al 50% se vieron en LN229 en concentraciones superiores a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CD de pimienta negra. En las células sanas se ven porcentajes superiores al 75%. Concluyendo que se deben hacer más estudios para comprender el mecanismo de acción de las nanoestructura de los CD [51].

Estudio titulado: Síntesis verde de puntos de carbono y evaluación de sus actividades farmacológicas, (2020). En este estudio se sintetizan CD por el método de microondas. Los precursores de este experimento fueron desechos orgánicos de cascara de granada y sandía. Los solventes fueron hidróxido de sodio y polietilenglicol (PEG). Se evaluó por ensayo MTT la citotoxicidad de las líneas celulares cancerosas MCF-7 y HepG2 frente a las CD. Las concentraciones de CD que se utilizaron en las líneas celulares cancerosas fueron 50, 150, 250, 350 y 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los resultados del ensayo MTT muestran una viabilidad celular (MCF-7 Y HepG2) decreciente a medida que aumentan las concentraciones de los CD. Se concluye que los CD sintetizados a partir de desechos orgánicos de granada y sandía poseen buenas propiedades citotóxicas [52].

Estudio titulado: Los puntos de carbono que se unen a la actina se dirigen selectivamente a las células del glioblastoma sin afectar las células normales, (2021). En esta investigación se informa de la curcumina y su potencial en múltiples cánceres. Al encontrar fallas por su baja solubilidad, se piensa en los CD como una estrategia para exhibir una excelente solubilidad, lo cual se confirmó. Para la síntesis se utilizó un reactor hidrotermal. El precursor fue curcumina y etilendiamina en proporción 1:2 y se disolvió en etanol. En este estudio se evaluó la viabilidad (MTT) celular de glioblastoma frente a puntos de carbono de curcumina (CurCD) en concentraciones de 31-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24 horas. Los resultados de este trabajo mostraron que el tratamiento con CurCD en las líneas celulares cancerígenas de cerebro GBM provocó una gran cantidad de células tumorales en concentraciones de 250-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las CurCD emiten un color azul bajo irradiación UV. Concluyen que las CurCD demuestran actividades antiproliferativas, apoptóticas y antimigratorias en las células GBM [53].

Estudio titulado: Puntos de carbono fluorescentes de Tsingtao cerveza para imágenes de células cáncer de mama y administración de fármacos. Investigadores divulgan un hallazgo de la presencia de puntos de carbono fluorescente en cerveza Tsingtao. Afirman el tamaño medio de los CD de 2.5 nm. Para la obtención de CD se describe un método de agitación para eliminación de gas y luego se concentraron por evaporación rotatoria. Recalcan la alta

solubilidad y excelentes propiedades fluorescentes bajo excitación de luz ultravioleta. Se realiza ensayo de MTT para evaluar la citotoxicidad de estos CD en líneas celular cancerosa MCF-7. Los resultados obtenidos mostraron un alto porcentaje de viabilidad de las células MCF-7; sin embargo se disminuye la viabilidad cuando la concentración es mayor a  $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Por ultimo, se concluye que los CD cuentan con asombrosas propiedades fluorescentes. Los CD de cerveza Tsingtao no impone ninguna toxicidad significativa a las células y podrían tener potencial en aplicaciones biomédicas[54].

Estudio titulado: Síntesis verde de puntos de carbono derivados del aceite de nuez y una investigación de sus actividades citotóxicas y apoptogénicas hacia las células cancerosas, (2018). Este estudio presenta una síntesis de puntos de carbono por método hidrotermal. El precursor fue aceite de nuez. Se midió la citotoxicidad por MTT de estos CD en líneas celulares MCF-7. Los resultados presentados afirman el rendimiento fluorescente. Se demostró que los CD de nuez son agentes citotóxicos extremadamente potentes especialmente en línea celular MCF-7 y PC-3. Se concluye el efecto citotóxico y apoptóticas de los CD en las líneas celulares cancerosas [55].

**Tabla 4. Resumen de revisión literaria, evaluación del efecto citotóxico de puntos de carbono en líneas celulares cancerosas.**

Precursor	Disolvente	Metodo de síntesis	Linea celular	Modificación superficial	Efecto citotoxico	Ref
Acido Citrico	Agua ultrapura	Hidrotermal	LN-229	Ninguno	NO	[51]
Cascara de granada y sandia	NaOH y polietilenglicol	Microondas	MCF-7 y HepG2	Ninguno	SI	[52]
Curcumina	Etanol	Hidrotermal	Cu	Ninguno	>250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	[53]
Cerveza Tsingtao	No especifica	pirolisis	MCF-7	Ninguno	NO	[54]
Aceite de nuez	No especifica	Hidrotermal	MCF-7	Ninguno	SI	[55]

### 1.5. Evaluación de la citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad en células cancerosas se han utilizado para evaluar la toxicidad de los CD y la inhibición del crecimiento celular en presencia de CD. Es importante determinar el comportamiento biológico *In vitro* de los CD para conocer correctamente la biocompatibilidad de estos. Los ensayos de viabilidad celular se fundamentan en las diversas funciones celulares como lo es: la actividad enzimática, la adherencia celular, la permeabilidad de la membrana celular, la producción de ATP, entre otras [56]. Los ensayos se pueden también clasificar a su conformación, respondiendo a ensayos de exclusión de color, fluorescencia y colorimetría. A la hora de seleccionar el método es crucial considerar el tipo de interacción que va a comprender [56].

### 1.5.1. Ensayo MTT

El ensayo de viabilidad celular con Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), es una técnica con un compuesto carcinógeno, fácilmente metabolizable por células vivas. El tetrazolio es un colorante (color amarillo), lo que lleva a que sea un ensayo colorimétrico. Este compuesto es sensible a la luz por lo que se debe adecuar el área de trabajo para no tener ninguna irregularidad en el resultado [57]. Este ensayo determina la viabilidad celular o citotoxicidad en función de la capacidad que tienen las células para reducir el colorante (tetrazolio) por acción de la enzima SDH (succinato deshidrogenasa), complejo proteico de la membrana interna de la mitocondria [58] (Figura 2). La evaluación de este ensayo se establece específicamente por la cantidad de cristales de formazán producidos por las células vivas, resultando un color violeta de acuerdo a la viabilidad celular[59].



Figura 2. Reduccion MTT en células vivas por reductasa mitocondrial a sal de formazan [57].

### 1.5.2. Ensayo Azul Tripán

El ensayo azul Tripán (AT) se utiliza para conocer el porcentaje de viabilidad celular frente a parámetros de estudio. Las células tienen una membrana plasmática compuesta por agrupaciones lipídicas y proteicas que delimitan el medio extracelular e intracelular. La membrana es un filtro muy selectivo que controla el paso de lo que entra y sale de la célula. El ensayo se identifica como ensayo por exclusión porque las membranas de las células vivas excluyen el azul Tripán a diferencia de las células muertas que acogen un color azul por el ingreso del colorante. Este método es ampliamente utilizado por la velocidad y su precisión de adquisición [60].

### 1.5.3. Líneas celulares a evaluar

U87 es una línea celular de glioblastoma primario humano de alto potencial maligno; ampliamente utilizada en investigaciones del cáncer de cerebro. La MCF-7 es una línea celular de cáncer de mama de bajo potencial maligno, comúnmente es utilizada en diferentes estudios biológicos, en los cuales se ha trabajado para contrarrestar la gravedad de la enfermedad del cáncer. Las líneas celulares U87 y MCF-7 son células adherentes con morfología epitelial [61][62].

## 1.6. Planteamiento del problema

El cáncer de cerebro glioblastoma es una de las neoplasias malignas humanas más letales. Uno de los tratamientos que representa una mayor eficiencia para el glioblastoma es la radioterapia. Pero esta radiación ionizante no pasa de ser solo paliativa debido a la radioresistencia del tumor [63]. Siendo uno de los factores biológicos más significativos que impiden que la radioterapia sea eficiente.

Distintos estudios han estado trabajando en la búsqueda de estrategias para optimizar la respuesta de la radioterapia en pacientes con resistencia al tratamiento, mediante el uso de nanotecnología. En los puntos de carbono se ha encontrado un potencial crecimiento en tratamientos contra el cáncer, especialmente en la radioterapia. Diferentes investigaciones han encontrado en los puntos de carbono cuentan con propiedades fisicoquímicas ideales. A través de la introducción de heteroátomos, como dopantes o la funcionalización de la superficie se pueda alcanzar radioresistencia ideal para los tratamientos de glioblastoma. Sin lugar a duda, algunas de esos heteroátomos pueden ser dopados para que el CD pueda ser una especie atómica de alto número atómico. Por otro lado, estudios reportan que los CD en distintas ocasiones son generadores de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual repercute inmediatamente en rupturas oxidativas en el ADN de las células cancerosas[64].

En busca de estrategias que optimicen la radioterapia, se consideran a los puntos de carbono como una de las mejores opciones para encontrar radiosensibilidad y hacerle frente a las células cancerosas de glioblastoma. Uno de los parámetros más importantes para determinar correctamente los efectos de los CD que se piensan exponer en la línea celular cancerosa de glioblastoma, es el nivel de citotoxicidad. Cuando se habla de la toxicidad de los puntos de carbono, los resultados *in vitro* e *in vivo* reportados en la literatura son inconsistentes. De hecho, muy recientemente una investigación afirmó que la toxicidad de los puntos de carbono está determinada principalmente por el protocolo de síntesis al igual que del precursor[51]. Es aquí en donde radica la importancia de ensayos de citotoxicidad como indispensable etapa para ver el efecto citotóxico.

Los puntos de carbono basados en ácido cítrico se han seleccionado porque han sido ampliamente estudiados en la literatura y se ha informado que son biocompatibles y tienen una baja citotoxicidad[51]. Las líneas celulares que se seleccionen debe ser una de glioblastoma (U87) para identificar respuesta citotóxica frente a CD y una línea de referencia de cáncer de bajo potencial como lo es la línea celular de cáncer de mama (MCF-7). El aporte de mi trabajo es identificar el efecto citotóxico que tienen los puntos de carbono a base de ácido cítrico para determinar la correcta aplicación de los CD frente a células cancerosas de glioblastoma en radioterapia.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. General**

Estudiar el efecto de los puntos de carbono sobre la citotoxicidad en líneas celulares derivadas de glioblastoma (U-87) y en línea celular de cáncer de mama (MCF-7).

### **2.2. Específicos**

1. Sintetizar puntos de carbono a partir de ácido cítrico por reacción microondas.
2. Evaluar el impacto de los puntos de carbono sintetizados sobre la citotoxicidad en líneas celulares U-87 y MCF-7 por método MTT y Azul Tripán.

### 3. METODOLOGÍA

*En este apartado se presenta el paso a paso de la síntesis de los puntos de carbono. Posteriormente se explicarán los ensayos de citotoxicidad utilizados para evaluar el efecto citotóxico en las líneas celulares cancerosas U87y MCF-7.*

#### **Materiales**

Acido crítico y los disolventes orgánicos, incluidos N-N dimetilformamida (DMF), etanol 99%. El medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), alícuota de suero fetal bovino al 10% (SFB), alícuota de antibiótico al 1%, ACUTASSE (enzima proteolíticas y colagenolíticas), tetrazolio (MTT), Azul Tripán (AT), solución salina tamponada con fosfato (PBS), dimetil sulfóxido (DMSO). Todos los productos eran de calidad analítica y se utilizaron directamente sin purificación adicional.

#### **3.1. Síntesis de puntos de carbono**

La síntesis de los puntos de carbono incluye polimerización, descomposición y carbonización de las moléculas. Para la preparación de los CD fluorescentes se utilizó el método de reacción por microondas (*bottom up*), usando un reactor MONOWAVE 50 (Anton Para, Austria) [65] (Figura 3). El ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) se utilizó como precursor orgánico y como solventes se utilizó una mezcla 1:1 (vol:vol) Etanol 99% ( $CH_3CH_2OH$ ) y dimetilformamida ( $C_3H_7NO$ ).

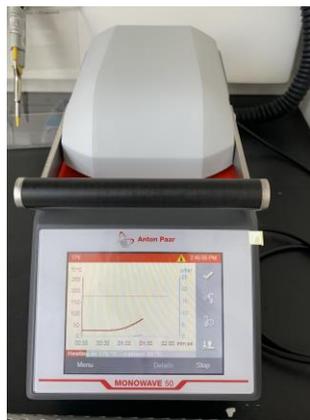


Figura 3. Microondas para síntesis de puntos de carbono.

#### **3.1.1. Síntesis de puntos de carbono por reacción microondas**

1 g de Ácido cítrico, precursor de carbono, se dispersó en una mezcla 1:1 (vol:vol) de etanol y N,N-dimetilformamida (volumen total=12 mL). Con el fin de adquirir una mezcla homogénea se lleva a baño ultrasónico (Elmasonic Easy, Elma, Alemania) aproximadamente por 3 min. La solución se transfiere al tubo del reacción y se somete a calentamiento por microondas a 175°C durante 5 minutos, utilizando método *As fast as posible* (AFAP). El método de reacción por microondas optimiza el tiempo de procesado [66]. Se confirmó la formación de especies fluorescentes basadas en carbono al exponer el producto de la reacción a irradiación de 365 nm.

### 3.1.2. Purificación de los puntos de carbono

La solución obtenida es centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos en mini centrifuga(Thermo Scientific mySPIIN12) y posteriormente filtrada con un filtro de  $0,20\mu\text{m}$  (Minisart NY 25, PTFE). Para mover las especies moleculares no reaccionadas, se realizó un proceso de diálisis usando agua destilada durante 24 horas. Finalmente, el producto obtenido es secado en un horno convencional (UM100, Memmert, Países Bajos) durante 24 horas a una temperatura de  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 4).



*Figura 4. Solución final obtenida después de procedimiento sintético y de purificación y antes del proceso de secado.*

Para conocer la masa adquirida de CD, se resta el tarro de vidrio sin CD a el tarro de vidrio con puntos de carbono después de secado. Para la futura manipulación de los puntos de carbono en ensayos de viabilidad, se dispersaron los CD resultantes de la síntesis en medio de cultivo DMEM. En la figura 5 se puede observar de una forma general paso a paso la adquisición de CD.

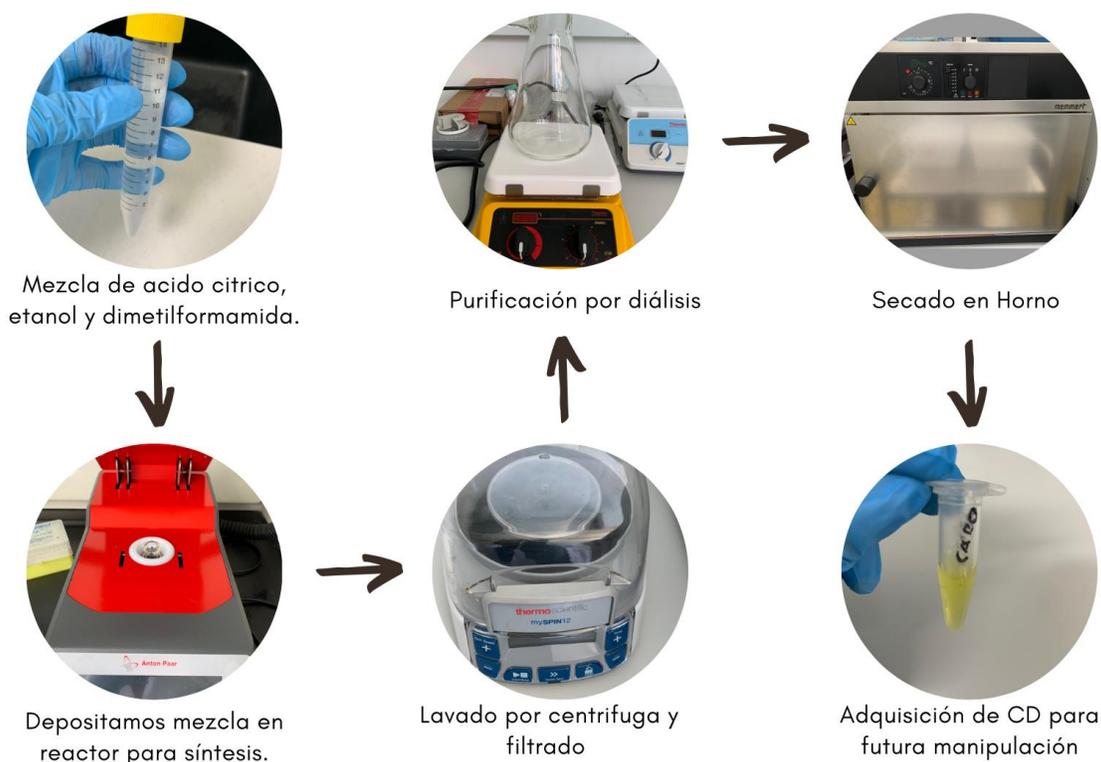


Figura 5. Diagrama del procedimiento experimental síntesis y purificación de puntos de carbono.

### 3.2. Impacto de los puntos de carbono sintetizados sobre la citotoxicidad en líneas celulares U-87 y MCF-7.

Las dos líneas celulares cancerosas U87 y MCF-7 se conservan congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido. Para el cultivo celular, se descongelan de forma rápida para asegurar una alta viabilidad y posteriormente se siembran las células en cajas Petri para permitir su adherencia celular. Su preservación es garantizada por la presencia de un medio de cultivo DMEM complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y antibiótico-antimicótico (Gibco) al 1%, que contiene reguladores esenciales; además ubicadas en una incubadora (Thermo Scientific) a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , y una atmósfera húmeda con  $\text{CO}_2$  al 5%.

Para identificar el efecto de los puntos de carbono en las líneas celulares U87 y MCF-7, se realizaron dos ensayos de viabilidad celular, MTT y Azul Tripán (exclusión) con dos replicas biológicas para MTT y una replica biológica para AT. Los CD obtenidos del proceso de purificación descritos en el numeral 3.1 son redispersados en medio de cultivo a una concentración de  $150 \text{ mg/mL}$ . La evaluación de la citotoxicidad de los CD en las líneas celulares mencionadas fue realizada en función de la concentración ( $50$ ,  $125$ ,  $250$  y  $500 \mu\text{g/mL}$ ) con un periodo de incubación de los CD con las células de 24 horas.

### 3.2.1. Ensayo MTT

Se utilizaron células con una confluencia superior al 70%. Se succionó el medio del cultivo y se realizaron lavados con PBS. Con el fin de despegar las células se añade 1 mL de Accutase (enzima que optimiza tiempo). Se llevó en un hemocitómetro al contador automático (CytoSmart) una mezcla de 10  $\mu\text{L}$  de Azul Tripán y 10  $\mu\text{L}$  de células (1:1 vol:vol). Para obtener el volumen necesario de células que se debe traspasar a cada pozo, se indica al contador automático el número de células a sembrar. Se utilizó una caja de 96 pozos para sembrar  $1 \times 10^4$  células por pozo frente a 200  $\mu\text{L}$  medio completo DMEM.

Las células permanecieron en incubadora por 24 horas esperando correcta adherencia. Se inoculan los puntos de carbono en los pozos tanto para U87 como para MCF-7. Se trabajaron cuatro concentraciones, un control negativo (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y control positivo con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Se aplicó la ecuación 1 para conocer el volumen de CD que se requería para la evaluación de viabilidad con las concentraciones establecidas.

$$V = \frac{(V1 * C1)}{CM} \quad (1)$$

Donde V1 es el volumen total por concentración, C1 es la concentración que se busca obtener de CD, CM es la concentración madre y V es el volumen necesario para obtener la concentración objetivo. En tubos Eppendorf se agrega el volumen de medio completo DMEM y se toma el volumen determinado de CD para cada concentración respectivamente. Se lleva a un agitador vórtex (HEIDOLPH, Alemania) para homogeneizar la solución. Para la inclusión de estos CD se succiona medio y se procede a añadir 200  $\mu\text{L}$  de la solución con CD a cada pozo respectivamente, por triplicado (figura 6).

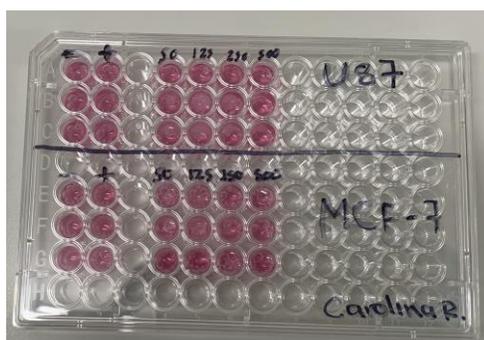


Figura 6. Caja de 96 pozos para ensayo MTT.

24 h después de la exposición con los puntos de carbono se procede a evaluar por MTT la actividad metabólica de las líneas celulares U87 y MCF-7. Se toman 10 mg de tetrazolio en polvo y se mezclan con 2 mL de PBS para llegar a una concentración de 5 mg/mL. Se agregó 20  $\mu\text{L}$  de esta solución en cada pozo. Se cubre la placa de pozos con aluminio (el ensayo de MTT es sensible a la luz). Posteriormente se ubica en una mesa de agitación (150 rms/5min). Se llevó a incubadora por 3 horas (temperatura 37°C). Pasado el tiempo se retiró el medio del cultivo y se disolvieron los cristales de formazan adicionando 200  $\mu\text{L}$  de DMSO. Se sitúa en la mesa de agitación para homogeneizar y se finaliza con el análisis de

absorbancia utilizando un lector de microplacas de 96 pozos Cytation. El índice de citotoxicidad se determinó en función del control negativo ( $0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### **3.2.2. Ensayo de exclusión Azul Tripán**

Se utilizaron platos de 12 pozos, en donde se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo. Se dejaron en incubadora por 24 horas (temperatura  $37^\circ\text{C}$ ). Transcurrido este periodo de tiempo se prepararon las concentraciones de CD en tubos falcón con el volumen necesario de medio completo DMEM. Se llevó a vórtex para dispersar los CD en el medio, se succiona el medio de los pozos y se agregó 1 mL de las concentraciones respectivamente. Las células se dejaron expuestas con los puntos de carbono y a las 24 horas se evaluó la citotoxicidad.

Para la evaluación de la citotoxicidad en tubos Eppendorf respectivamente marcados se transfiere el medio de cada pozo, se realizan lavados con PBS y se agrega Accutase para despegar las células (5 min aprox). Se confirmó en el microscopio que las células están suspendidas; posteriormente se agregó el medio que se había retirado (respectivamente) y se resuspendió para homogeneizar. Se tomaron  $10 \mu\text{L}$  de Azul Tripán (AT) en un micro pozo externo y se resuspende  $10 \mu\text{L}$  de células resuspendidas. Se toman  $10 \mu\text{L}$  de esta mezcla y se ponen en un hemocitómetro. Se lleva a conteo automático (CytoSmart, Holanda) para ver la viabilidad celular al exponerlas con CD. El índice de citotoxicidad se determinó usando las células sin exposición a puntos de carbono como control negativo.

### **3.3. Análisis estadísticos**

Para el análisis estadístico se tomaron los datos experimentales desarrollados de forma práctica. Se realizaron dos réplicas biológicas de tres réplicas experimentales de ensayos MTT para cada línea celular U87 y MCF-7; una réplica biológica con tres réplicas experimentales de U87 del ensayo de exclusión AT y una réplica biológica de tres réplicas experimentales de AT. Se normalizaron los datos con respecto al promedio de control negativo y se estableció la prueba de normalidad de los datos recopilados y se analizaron por medio de ANOVA (paramétricos) y por Mann Whitney (no paramétricos) al nivel  $p=0.05$ , utilizando el software GraphPad PRISM®.

## 4. RESULTADOS

En este apartado se describirán y presentaran los resultados de la síntesis de los puntos de carbono. Adicionalmente, se presentaran los resultado de los ensayos de viabilidad celular en líneas cancerosas U87 y MCF-7.

### 4.1. Síntesis de puntos de carbono a partir de ácido cítrico por reacción microondas

El método por microondas para la síntesis de puntos de carbono, es una de las técnica más utilizadas, garantizando efectividad a una alta velocidad. El microondas (*bottom up*) actúa con radiación electromagnética, donde las moléculas polares tienen la capacidad para absorber la radiación y convertirla en calor mediante calentamiento dieléctrico[67]. Para la síntesis de CD se utilizó como precursor orgánico de carbono el ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico), que presenta tres grupos carboxilo (-COOH), los cuales jugaron un rol en la generación de la fluorescencia emitida por los CD. Su estructura molecular se muestra en la Figura 7.

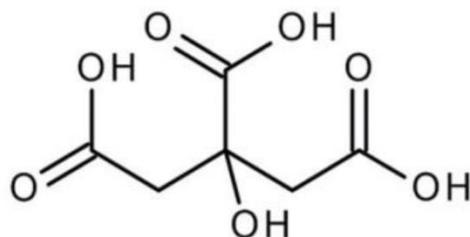


Figura 7. Estructura molecular del ácido cítrico.

Una mezcla de etanol 99% y N,N-dimetilformamida (1:1 vol:vol) fue utilizada como solvente para la reacción. El etanol es un tipo de disolvente común, con un punto de ebullición bajo que al superar su punto de ebullición, genera un incremento de presión en el reactor microondas, favoreciendo la formación de CD (Figura 8). El solvente N, N-dimetilformamida (DMF) es un compuesto orgánico ampliamente utilizado como fuente de carbono y fuente de hidrógeno [66] En el proceso de formación de los CD puede ser fuente de átomos de nitrógeno que pueden ser incluidos en la estructura de los CD, lo cual se traduce en la generación de centros activos para fluorescencia (Figura 9).

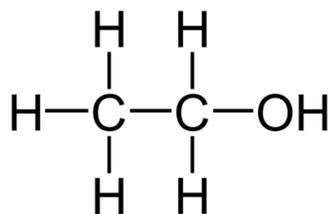


Figura 8. Estructura molecular del etanol.

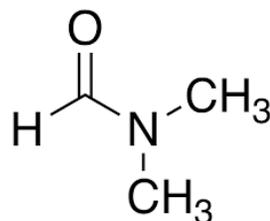


Figura 9. Estructura molecular del dimetilformamida.

El resultado de la síntesis fue expuesta a luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm emitiendo una fluorescencia azul, de esta forma confirmando la presencia de especies fluorescentes a base de carbono (Figura 10).



Figura 10. Solución resultante de la síntesis de los puntos de carbono (ácido cítrico, etanol y dimetilformamida) bajo radiación con luz UV ( $\lambda_{exc} = 365$  nm).

Posterior al proceso de secado se obtuvo una masa de 191.6 mg de CD (Figura 11A). Los puntos se dispersaron en 1.27 mL de DMEM (concentración 150 mg/mL). En la figura 11B y C se muestran los CD obtenidos después del proceso de secado y dispersos en DMEM respectivamente. Es importante mencionar que el proceso de dispersión de los CD en el medio requirió de constante agitación mecánica y control de la fluorescencia para asegurar la completa dispersión de los CD en el medio.

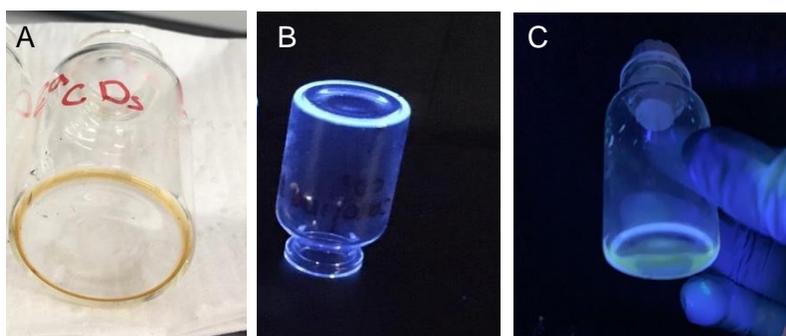


Figura 11. A. Puntos de carbono obtenidos después de secado; B. Puntos de carbono bajo radiación con luz UV ( $\lambda_{exc} = 365$  nm); C. Puntos de carbono en proceso de dispersión con medio DMEM bajo radiación con luz UV ( $\lambda_{exc} = 365$  nm).

#### 4.2. Evaluación del impacto de los puntos de carbono sintetizados sobre la citotoxicidad en líneas celulares U87 y MCF-7

La evaluación de la citotoxicidad de los CD se realizó por medio de dos ensayos: MTT y Azul Tripán. El ensayo de MTT Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, se fundamenta en conocer la viabilidad midiendo la actividad metabólica de las células;

específicamente evaluando la capacidad de reducción mitocondrial que convierte la sal de tetrazolio MTT a cristales de formazan por parte de las células vivas; esto es posible gracias a un complejo proteico de la membrana interna de la mitocondria (succinato deshidrogenasa), orgánulo de la célula encargado de la actividad metabólica. Para medir la viabilidad por medio de la absorbancia colorimétrica es importante disolver los cristales de formazan en DMSO y de esta forma obtener una medición homogénea, resultando un color violeta (Figura 12).

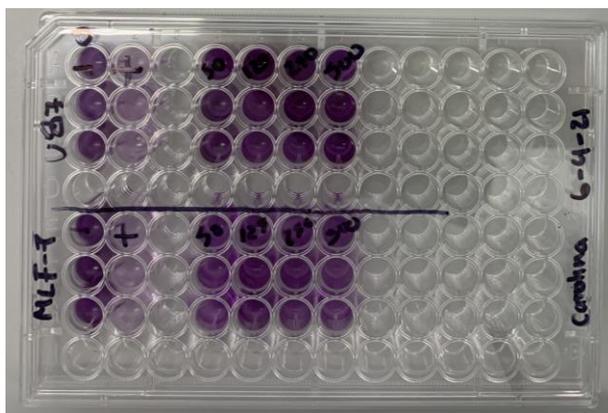


Figura 12. Caja x 96 pozos para ensayo MTT con las dos líneas celulares al agregar DMSO (disolvente de los cristales de formazan) genera un color violeta.

La absorbancia colorimétrica se toma a una excitación de longitud de onda de 560 nm. Al hacer la resta con el fondo de 670 nm y eliminar el ruido se obtienen los datos correspondientes de la absorbancia, la cual es proporcional a la actividad metabólica de las células. Estos datos pueden ir de 0 a 1, siendo 1 el numero que representa como el 100% de viabilidad y 0 el que representa la muerte celular, es decir, 0% de viabilidad. Estos porcentajes son en función de la actividad mitocondrial de la célula; lo que nos lleva a entender que si hay alta actividad metabólica, más alta es la viabilidad celular, pero si hay una baja actividad mitocondrial se estima que la célula este induciendo muerte celular.

En la figura 13 se observan los resultados del ensayo de MTT para medición de viabilidad celular de la línea U87 después de incubar en presencia de puntos de carbono por 24 horas. El porcentaje de viabilidad fue superior a 89% en concentraciones 50, 125, 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CD. Dentro de los resultados obtenidos se evidencia que en todos los casos se presenta una desviación estándar grande. Los resultado de las pruebas de normalidad para todas las condiciones dieron paramétricas ( $p > 0.05$ ). Se realizó la prueba ANOVA con el fin de analizar los datos obtenidos. Los resultados estadísticos no presentan diferencias significativas con el control negativo (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), pero si la presentan con el control positivo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )(\*) lo que da a entender que no hay un efecto citotóxico de los puntos de carbono en la línea celular U87. El calculo de los limites de la prueba de significancia se realizaron al nivel  $p=0.05$ .

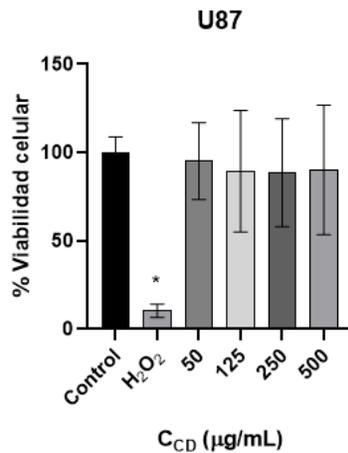


Figura 13. Porcentaje de viabilidad de línea celular U87 evaluado por ensayo MTT.

En la figura 14 se ve el porcentaje de viabilidad celular 24 horas después de inocular los puntos de carbono en el cultivo celular de la línea celular MCF-7 realizado por ensayo MTT. El porcentaje de viabilidad de las concentraciones de 50, 125 y 250 µg/mL de CDs se encontraron por encima del 76 %; estos valores reflejaron desviaciones estándar elevadas. La concentración de 500 µg/mL tuvo un porcentaje de viabilidad del 60% y desviación estándar de 17.79. En cuanto a los resultados, se realizó prueba de normalidad y se procedió a la prueba estadística ANOVA, donde se identificó que hay una diferencia significativa (\*) entre el peróxido de hidrogeno y las demás condiciones ( $p=0.001$ ); pero no se evidencia distinción entre las concentraciones y el control negativo.

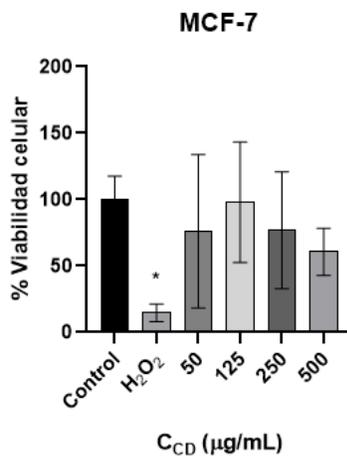


Figura 14. Porcentaje de viabilidad de línea celular MCF-7 evaluado por ensayo MTT.

El método AT se conoce como ensayo de exclusión, ya que la membrana de las células vivas son selectivas y no le permiten el ingreso al colorante AT a diferencia de las células

mueratas. De esta forma el ensayo de AT nos permitió determinar estimaciones del número de células vivas, células muertas, el total de las células y el porcentaje de viabilidad celular (U87 Y MCF-7). Los resultados de los ensayos de viabilidad celular por el método de Azul Tripán para las líneas celulares U87 y MCF-7 se muestra en la figura 14 y 15 respectivamente.

En la figura 15 se puede observar el porcentaje de viabilidad celular de U87 después del tratamiento con CD por 24 horas. En este ensayo se obtuvo alta viabilidad de la línea U87 en función de la concentración de CD, con un porcentaje superior al 98% para todas las concentraciones. Con respecto a el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), el cual es el control positivo, se obtiene una diferencia significativa con respecto al control negativo y a las cuatro concentraciones estudiadas. Después del análisis estadístico, los resultados confirmaron la baja toxicidad de las concentraciones de 50-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  frente al control y la diferencia significativa del peróxido de hidrogeno (\*) con relación a los demás datos ( $p=0.001$ ).

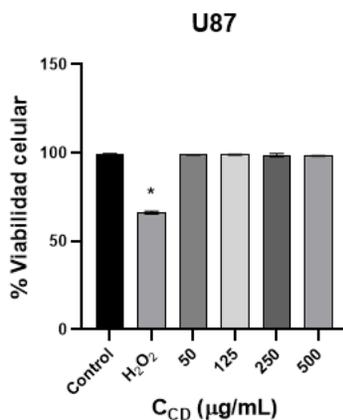


Figura 15. Porcentaje de viabilidad de línea celular U87 evaluado por ensayo Azul Tripán.

En la figura 16 se presenta el porcentaje de viabilidad celular de MCF-7 después de la exposición a los puntos de carbono por 24 h. En este ensayo se observa una baja citotoxicidad de los CD frente a la línea celular, pues el porcentaje de viabilidad de las MCF-7 por ensayo de AT en concentraciones 50, 125, 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CD fue superior a 90%. El peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) fue el control positivo en este caso, siendo el único que realmente tuvo una diferencia con respecto a las concentraciones estudiadas. Los resultados estadísticos se realizaron con la prueba ANOVA en donde se confirma la diferencia significativa del peróxido de hidrogeno (\*) con los demás datos ( $p=0.0011$ ), pero además identifica una diferencia significativa de la concentración 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con respecto a el control negativo y la concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

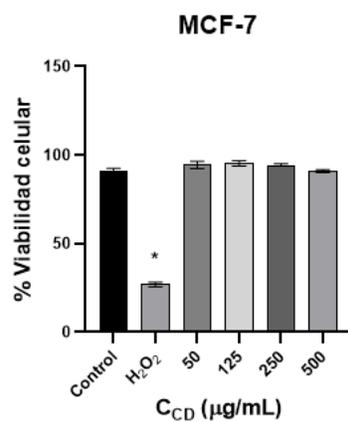


Figura 16. Porcentaje de viabilidad de línea celular MCF-7 evaluado por ensayo Azul Tripán.

## 5. DISCUSIÓN

Los ensayos de citotoxicidad son necesarios para evaluar la respuesta de fármacos o en este caso puntos de carbono frente a líneas celulares para identificar si un tratamiento es viable. En este trabajo se estudió el efecto de los puntos de carbono sintetizados a partir de ácido cítrico, etanol y N,N-dimetilformamida sobre la citotoxicidad evaluada por dos tipos de ensayos de viabilidad celular (MTT y Azul Tripán) en líneas celulares derivadas de glioblastoma (U87) y cáncer de mama (MCF-7).

En la síntesis de los puntos de carbono por microondas se destacó la eficiencia de este método al conducir a velocidades elevadas la reacción en comparación a otros métodos convencionales [68]. En la disolución de los puntos de carbono con medio se identificó un color verde-amarillo fluorescente. Esto se debe a que el medio cuenta con un compuesto llamado rojo fenol, el cual es un indicador de pH y ayuda a proteger el medio de la luz. Debido a sus propiedades es altamente fluorescente y es excluido del medio de cultivo en diferentes estudios para que no afecte resultados [69]. En el caso de este trabajo el rojo fenol no se eliminó, pues no era un inconveniente para los resultados, ya que no se determinaron mediciones de fluorescencia.

A lo largo de los años se han desarrollado diferentes estudios en los que se comprueba la baja toxicidad y la biocompatibilidad que caracterizan a los puntos de carbono; pero de igual manera se ha identificado que la toxicidad puede variar bajo distintos parámetros como: el precursor, origen del precursor, propiedades físico-químicas como lo es la conductividad eléctrica, elasticidad, reducido peso, entre otras [70]. Dicho lo anterior, uno de los parámetros más importantes para identificar si los puntos de carbono son adecuados para aplicaciones biomédicas, es evaluar la citotoxicidad que los CD inducen frente a las células. En esta oportunidad a las líneas celulares U87 y MCF-7 se les evaluó la viabilidad celular por medio del ensayo colorimétrico MTT y de exclusión Azul Tripán después de ser expuestas a diferentes concentraciones de CD por 24 horas. La prueba MTT es ampliamente utilizada para evaluar el potencial tóxico que tienen los puntos de carbono en líneas celulares objetivo, al igual que Azul Tripán para conocer la viabilidad celular. La importancia de evaluar estos parámetros en las células tumorales es encontrar la respuesta de las células a la exposición de las CD. Esto para determinar si los puntos de carbono son aptos como un nuevo tratamiento contra el cáncer o logran llegar a ser un agente complementario de un tratamiento ya existente como lo es la radioterapia, aprovechando así sus propiedades particulares.

Los resultados de MTT de la línea celular U87 registraron una alta viabilidad en las concentraciones 0, 50, 125, 250 y 500  $\mu\text{g/mL}$  de CD, ya que presentaron un porcentaje de viabilidad superior a el 89%. En cuanto a los estudios estadísticos que se realizaron, se confirma la baja citotoxicidad de las distintas concentraciones, además indicando que no existía una diferencia significativa entre las concentraciones. En este ensayo se puede analizar que al tener un control negativo con porcentaje de viabilidad cercano al de las concentraciones de CD, se puede decir que la presencia de puntos de carbono no tuvo efecto de citotoxicidad en las células.

Los resultados de MTT de la línea celular MCF-7 tuvieron mayor variabilidad en comparación de la línea U87. En MCF-7 se encontró que la concentración de 125  $\mu\text{g/mL}$

favorece la viabilidad con un 97%. Respecto a las concentraciones de 50 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se encontró una similitud con porcentajes de 76% de viabilidad ( $76\pm 57$ ); posicionando a la concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con el menor porcentaje de viabilidad siendo de 60% ( $60\pm 17$ ). En el análisis estadístico se encontró que la mayor toxicidad fue por parte del peróxido de hidrógeno, el cual tuvo una diferencia significativa respecto a las demás concentraciones ( $p=0.001$ ). No se registró diferencia significativa entre las concentraciones y el control negativo. De acuerdo con los resultados encontrados y entendiendo que existe una gran variabilidad entre los datos de las réplicas técnicas, se piensa en dos hipótesis la primera es que se le confiere a una falta de rigurosidad con los procedimientos experimentales con los cultivos celulares, es decir, una mala manipulación con la densidad de células sembrada por pozo. La segunda es que este tipo de ensayos no permiten medir la eficiencia de sembrado, ya que puede existir un efecto en que no todas las células sembradas se pudieron adherir. Lo cual podría explicar las inconsistencias en los valores de desviación estándar obtenidas.

Los resultados de AT de la línea celular U87 favorecieron la viabilidad en todas las concentraciones teniendo porcentajes superiores a 98%. El control positivo tuvo una mayor viabilidad con respecto al ensayo de MTT. Sin embargo, tuvo una gran diferencia con las demás concentraciones estudiadas. Los estudios estadísticos corroboran la diferencia significativa que tiene el peróxido de hidrógeno respecto a las concentraciones. Se analiza con estos resultados que la presencia de los puntos de carbono no afecta la viabilidad celular en el caso de la línea celular U87. Es importante mencionar una de las características que destacan a los glioblastoma, lo cual es su resistencia a la muerte y ante el estrés oxidativo que induce el  $\text{H}_2\text{O}_2$  las U87 pueden ser más resistentes que otro tipo de célula [71]. Esto lo podemos corroborar en el ensayo de AT y en el ensayo de MTT, encontrando una alta viabilidad en las dos pruebas de U87; por otra parte siendo superior la viabilidad de U87 que la de MCF-7 en los dos ensayos de citotoxicidad.

En el ensayo de AT de la línea celular MCF-7 se identifica porcentajes superiores a un 90% ( $94\pm 2$ ) de viabilidad en todas las concentraciones y una baja viabilidad celular con un 26% en el peróxido de hidrógeno. Respecto a los análisis estadísticos se confirma la citotoxicidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con respecto a las demás concentraciones, sin embargo, también se precisa una diferencia significativa entre el control negativo y la concentración 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , al igual que la concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Esto quiere decir que se obtuvo una viabilidad menor en el control negativo y en concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a comparación de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Con esto se piensa que al tener desviaciones estándar tan pequeñas cualquier diferencia que se encuentre en las medias va a resultar como una diferencia significativa. Lo que da a concluir que poca variabilidad en los datos que se están viendo diferencias estadísticamente significativas no necesariamente tiene una significancia biológica. Por lo que se puede decir que los puntos de carbono no son citotóxicos para las líneas U87 y MCF7.

Dado a la variabilidad de los resultados de MTT no es adecuado comparar los resultados de azul Tripán con los de MTT, pues en ambos casos se comportan de forma independiente. Primero el ensayo de viabilidad celular MTT es en función de la actividad metabólica y el ensayo de azul Tripán es en función de muerte celular. Segundo, el ensayo de MTT tuvo

dos replicas biológicas, por triplicado; el ensayo de azul Tripán tuvo una replica biológica, por triplicado. Por otro lado, los resultados de las dos replicas biológicas de MTT (U87) fueron significativamente diferentes. Esto quiere decir que al tener mas datos pero con errores estándar muy grandes, hacen que este ensayo sea mínimamente confiable. Si se comparan individualmente las respuestas a los ensayos en las dos líneas celulares, se ve una mayor viabilidad de las U87 en los dos ensayos que de la línea celular MCF-7. En cuanto a la literatura se evidencia que las dos líneas celulares utilizadas para este trabajo son unas de las líneas que mas se implementan en estudios biológicos en desarrollo a tratamientos[72].

## 6. CONCLUSIONES

Se obtuvieron puntos de carbono por medio de reacción microondas (*bottom up*) a partir de ácido cítrico, etanol y N,N-dimetilformamida. La fluorescencia emitida por los puntos fue de color azul bajo irradiación con luz ultravioleta de 365 nm. Se estudio el efecto de los puntos de carbono sobre la citotoxicidad en las líneas celulares U87 y MCF-7, en donde se vio una alta viabilidad de las dos líneas celulares frente a los CD en ensayo de Azul Tripán y baja citotoxicidad en las dos líneas celulares en ensayo MTT.

En relación a la literatura encontrada se puede decir que los puntos de carbono cuentan con características especiales que los hacen óptimos para aplicaciones medicas. En especial según lo estudiado se ven los puntos de carbono como una propuesta novedosa en la radioterapia. Su baja citotoxicidad evidenciada en este trabajo, su facilidad para modular propiedades superficiales y su biocompatibilidad hacen que los CD sean potencialmente investigados.

Los alcances de este trabajo se vieron afectados por la disponibilidad de laboratorios debido a la situación que se esta viviendo de salud publica a nivel global. Por este motivo no se realizaron más replicas biológicas, reduciendo la posibilidad de resultados mas objetivos.

## **7. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS**

Las recomendaciones para un futuro trabajo, primero es el incluir diferentes tiempos de exposición con puntos de carbono, es decir, inocular puntos de carbono a línea celular en 24, 48 y 72 horas, pues solo evaluar la citotoxicidad en 24 horas no es representativo para un ensayo de este tipo; de esta forma adquirir resultados mas congruentes para dar una respuesta mayor seguridad en cuanto si los CD son realmente viables independiente del tiempo. Por otro lado, se recomienda hacer varias replicas biológicas con el mismo fin anteriormente explicado.

En cuanto a un futuro trabajo con puntos de carbono es interesante caracterizar los CD y someterlos a diferentes pruebas de verificación de la captación de células para ver su potencia como agente complementario en radioterapia.

Es importante realizar estudios de citotoxicidad en líneas celulares sanas, garantizando la viabilidad celular de tejido adyacente a las células cancerosas.

## REFERENCIAS

- [1] World Health Organization -cancer, (2018). [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1).
- [2] G.P. Gupta, J. Massagué, Cancer Metastasis: Building a Framework, *Cell*. 127 (2006) 679–695. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>.
- [3] International Agency for Research on Cancer, Estimated number of prevalent cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages, *Cancer Today*. 896 (2020) 2020. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=regions&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=2&statistic=5&prevalence=1&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&group\\_cancer=1&incl](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=regions&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=2&statistic=5&prevalence=1&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&incl).
- [4] P. bórquez, c. romero, El paciente oncológico geriátrico, *Rev. Chil. Cirugía*. 59 (2007). <https://doi.org/10.4067/s0718-40262007000600015>.
- [5] J. Wang, X. Wu, P. Shen, J. Wang, Y. Shen, Y. Shen, T.J. Webster, J. Deng, Applications of inorganic nanomaterials in photothermal therapy based on combinational cancer treatment, *Int. J. Nanomedicine*. 15 (2020) 1903–1914. <https://doi.org/10.2147/IJN.S239751>.
- [6] V.T. DeVita, E. Chu, A history of cancer chemotherapy, *Cancer Res*. 68 (2008) 8643–8653. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>.
- [7] H. Chen, Y. Zhao, Applications of Light-Responsive Systems for Cancer Theranostics, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 10 (2018) 21021–21034. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b01114>.
- [8] D. Khuntia, P. Brown, J. Li, M.P. Mehta, Whole-brain radiotherapy in the management of brain metastasis, *J. Clin. Oncol*. 24 (2006) 1295–1304. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.6185>.
- [9] J. Liu, K. Bi, R. Yang, H. Li, Z. Nikitaki, L. Chang, Role of DNA damage and repair in radiation cancer therapy: a current update and a look to the future, *Int. J. Radiat. Biol*. 96 (2020) 1329–1338. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1807641>.
- [10] J. Ruan, Y. Wang, F. Li, R. Jia, G. Zhou, C. Shao, L. Zhu, M. Cui, D.P. Yang, S. Ge, Graphene Quantum Dots for Radiotherapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 10 (2018) 14342–14355. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b18975>.
- [11] P.B. Dirks, Brain tumor stem cells: Bringing order to the chaos of brain cancer, *J. Clin. Oncol*. 26 (2008) 2916–2924. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.6792>.
- [12] GLOBOCAN, Estimated number of deaths in 2020, both sexes, all ages, brain cancer, *Int. Agency Res. Cancer*. 144 (2020) 100. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=population&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=31&type=1&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&group\\_cance](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=31&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cance)

- r.
- [13] C.J. Sherr, Principles of Tumor Suppression, *Cell*. 116 (2004) 235–246. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01075-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01075-4).
  - [14] J. Han, Y. Jun, S.H. Kim, H.H. Hoang, Y. Jung, S. Kim, J. Kim, R.H. Austin, S. Lee, S. Park, Rapid emergence and mechanisms of resistance by U87 glioblastoma cells to doxorubicin in an in vitro tumor microfluidic ecology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 14283–14288. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614898113>.
  - [15] A. Bradshaw, A. Wickremesekera, H.D. Brasch, A.M. Chibnall, P.F. Davis, S.T. Tan, T. Itinteang, Cancer Stem Cells in Glioblastoma Multiforme, *Front. Surg.* 3 (2016) 1203–1217. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2016.00048>.
  - [16] J.K. Park, T. Hodges, L. Arko, M. Shen, D. Dello Iacono, A. McNabb, N.O. Bailey, T.N. Kreisl, F.M. Iwamoto, J. Sul, S. Auh, G.E. Park, H.A. Fine, P.M.L. Black, Scale to predict survival after surgery for recurrent glioblastoma multiforme, *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 3838–3843. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.0582>.
  - [17] F. Hanif, K. Muzaffar, K. Perveen, S.M. Malhi, S.U. Simjee, Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment, *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 18 (2017) 3–9. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>.
  - [18] R. Rodríguez, K. Lombardo, G. Roldán, J. Silvera, R. Lagomarsino, Glioblastoma multiforme cerebral hemisférico: análisis de sobrevida de 65 casos tratados en el Departamento de Oncología del Hospital de Clínicas, desde 1980 a 2000, *Rev. Médica Del Uruguay.* 28 (2012) 250–261.
  - [19] X. Li, F. Shao, J. Sun, K. Du, Y. Sun, F. Feng, Enhanced Copper-Temozolomide Interactions by Protein for Chemotherapy against Glioblastoma Multiforme, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* (2019). <https://doi.org/10.1021/acsami.9b14849>.
  - [20] J. Mann, R. Ramakrishna, R. Magge, A.G. Wernicke, Advances in radiotherapy for glioblastoma, *Front. Neurol.* 8 (2018) 1–11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00748>.
  - [21] J. Choi, G. Kim, S. Bin Cho, H.J. Im, Radiosensitizing high-Z metal nanoparticles for enhanced radiotherapy of glioblastoma multiforme, *J. Nanobiotechnology.* 18 (2020) 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00684-5>.
  - [22] F. Kazmi, K.A. Vallis, B.A. Vellayappan, A. Bandla, D. Yukun, R. Carlisle, Megavoltage radiosensitization of gold nanoparticles on a glioblastoma cancer cell line using a clinical platform, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms21020429>.
  - [23] O. Grauer, M. Jaber, K. Hess, M. Weckesser, W. Schwindt, S. Maring, J. Wölfer, W. Stummer, Combined intracavitary thermotherapy with iron oxide nanoparticles and radiotherapy as local treatment modality in recurrent glioblastoma patients, *J. Neurooncol.* 141 (2019) 83–94. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-03005-x>.
  - [24] K. Chatterjee, S. Sarkar, K. Jagajjanani Rao, S. Paria, Core/shell nanoparticles in biomedical applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 209 (2014) 8–39. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.008>.
  - [25] C.G. Lizarazo-Salcedo, E.E. González-Jiménez, C.Y. Arias-Portela, J. Guarguati-Ariza, Nanomateriales: un acercamiento a lo básico, *Med. Segur. Trab. (Madr).* 64 (2018) 109–118.
  - [26] N. Sanvicens, M.P. Marco, Multifunctional nanoparticles - properties and prospects for their use in human medicine, *Trends Biotechnol.* 26 (2008) 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.005>.
  - [27] J. Yao, M. Yang, Y. Duan, Chemistry, biology, and medicine of fluorescent

- nanomaterials and related systems: New insights into biosensing, bioimaging, genomics, diagnostics, and therapy, *Chem. Rev.* 114 (2014) 6130–6178. <https://doi.org/10.1021/cr200359p>.
- [28] K.P.R. Chowdary, A. Srinivasa Rao, Nanoparticles as drug carriers, *Indian Drugs.* 34 (1997) 549–556. <https://doi.org/10.1533/9781908818195.29>.
- [29] N.D. Thorat, H. Townely, G. Brennan, A.K. Parchur, C. Silien, J. Bauer, S.A.M. Tofail, Progress in Remotely Triggered Hybrid Nanostructures for Next-Generation Brain Cancer Theranostics, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 5 (2019) 2669–2687. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01173>.
- [30] D. Kwatra, A. Venugopal, S. Anant, Nanoparticles in radiation therapy: A summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer, *Transl. Cancer Res.* 2 (2013) 330–342. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.06>.
- [31] R. Jelinek, *Carbon Quantum Dots. Synthesis, Properties and Applications*, 2017.
- [32] S. Sagbas, N. Sahiner, *Carbon dots: Preparation, properties, and application*, Elsevier Ltd., 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102509-3.00022-5>.
- [33] H. Zhu, X. Wang, Y. Li, Z. Wang, F. Yang, X. Yang, Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties, *Chem. Commun.* (2009) 5118–5120. <https://doi.org/10.1039/b907612c>.
- [34] P. Miao, K. Han, Y. Tang, B. Wang, T. Lin, W. Cheng, Recent advances in carbon nanodots: Synthesis, properties and biomedical applications, *Nanoscale.* 7 (2015) 1586–1595. <https://doi.org/10.1039/c4nr05712k>.
- [35] D.B. Shinde, V.K. Pillai, Electrochemical preparation of luminescent graphene quantum dots from multiwalled carbon nanotubes, *Chem. - A Eur. J.* 18 (2012) 12522–12528. <https://doi.org/10.1002/chem.201201043>.
- [36] A. Sharma, J. Das, Small molecules derived carbon dots: Synthesis and applications in sensing, catalysis, imaging, and biomedicine, *J. Nanobiotechnology.* 17 (2019) 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0525-8>.
- [37] J. Prado-Gonjal, E. Morán, E.J. Morán Prado-Gonjal, Síntesis asistida por microondas de sólidos inorgánicos Investigación Química Introducción, *An. Quím.* 107 (2011) 129–136.
- [38] E.E. González Jiménez, F. González, Síntesis por radiación con microondas de nanotubos de carbono, *Univ. Sci.* 13 (2008) 258–266.
- [39] L. Pan, S. Sun, A. Zhang, K. Jiang, L. Zhang, C. Dong, Q. Huang, A. Wu, H. Lin, Truly Fluorescent Excitation-Dependent Carbon Dots and Their Applications in Multicolor Cellular Imaging and Multidimensional Sensing, *Adv. Mater.* 27 (2015) 7782–7787. <https://doi.org/10.1002/adma.201503821>.
- [40] S. Pandey, G.R. Gedda, M. Thakur, M.L. Bhaire, A. Talib, M.S. Khan, S.M. Wu, H.F. Wu, Theranostic carbon dots ‘clathrate-like’ nanostructures for targeted photo-chemotherapy and bioimaging of cancer, *J. Ind. Eng. Chem.* 56 (2017) 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.06.008>.
- [41] T. V. De Medeiros, J. Manioudakis, F. Noun, J.R. Macairan, F. Victoria, R. Naccache, Microwave-assisted synthesis of carbon dots and their applications, *J. Mater. Chem. C.* 7 (2019) 7175–7195. <https://doi.org/10.1039/c9tc01640f>.
- [42] L. Cao, X. Wang, M.J. Meziani, F. Lu, H. Wang, P.G. Luo, Y. Lin, B.A. Harruff, L.M. Veca, D. Murray, S. Xie, Y. Sun, Geburt des Schwarzhändlers | DIE ZEIT Archiv | Ausgabe 20/1946, *Americal.* (1946) 11318–11319.
- [43] F. Du, M. Zhang, A. Gong, Y. Tan, J. Miao, Y. Gong, S. Zou, L. Zhang, L. Zhang, C. Wu, M. Sun, H. Ju, Engineered gadolinium-doped carbon dots for magnetic resonance imaging-guided radiotherapy of tumors, *Biomaterials.* 121 (2017) 109–

120. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.008>.
- [44] M. Tuerhong, Y. XU, X.B. YIN, Review on Carbon Dots and Their Applications, *Chinese J. Anal. Chem.* 45 (2017) 139–150. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60990-8](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60990-8).
- [45] S.D. Hettiarachchi, R.M. Graham, K.J. Mintz, Y. Zhou, S. Vanni, Z. Peng, R.M. Leblanc, Triple conjugated carbon dots as a nano-drug delivery model for glioblastoma brain tumors, *Nanoscale.* 11 (2019) 6192–6205. <https://doi.org/10.1039/C8NR08970A>.
- [46] Z. Ji, P. Ai, C. Shao, T. Wang, C. Yan, L. Ye, W. Gu, Manganese-Doped Carbon Dots for Magnetic Resonance/Optical Dual-Modal Imaging of Tiny Brain Glioma, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 2089–2094. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b01008>.
- [47] L. Zhang, Z. Lin, Y.X. Yu, B.P. Jiang, X.C. Shen, Multifunctional hyaluronic acid-derived carbon dots for self-targeted imaging-guided photodynamic therapy, *J. Mater. Chem. B.* 6 (2018) 6534–6543. <https://doi.org/10.1039/c8tb01957f>.
- [48] A. Kundu, J. Lee, B. Park, C. Ray, K.V. Sankar, W.S. Kim, S.H. Lee, I.J. Cho, S.C. Jun, Facile approach to synthesize highly fluorescent multicolor emissive carbon dots via surface functionalization for cellular imaging, *J. Colloid Interface Sci.* 513 (2018) 505–514. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.10.095>.
- [49] N. Irmania, K. Dehvari, G. Gedda, P.J. Tseng, J.Y. Chang, Manganese-doped green tea-derived carbon quantum dots as a targeted dual imaging and photodynamic therapy platform, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 108 (2020) 1616–1625. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34508>.
- [50] S.B. de M. Barros, *Toxicologia, Rev. Bras. Ciências Farm.* 38 (2002) 500–500. <https://doi.org/10.1590/s1516-93322002000400015>.
- [51] N. Vasimalai, V. Vilas-Boas, J. Gallo, M. de F. Cerqueira, M. Menéndez-Miranda, J.M. Costa-Fernández, L. Diéguez, B. Espiña, M.T. Fernández-Argüelles, Green synthesis of fluorescent carbon dots from spices for in vitro imaging and tumour cell growth inhibition, *Beilstein J. Nanotechnol.* 9 (2018) 530–544. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.51>.
- [52] H. Muktha, R. Sharath, N. Kottam, S.P. Smrithi, K. Samrat, P. Ankitha, Green Synthesis of Carbon Dots and Evaluation of Its Pharmacological Activities, *Bionanoscience.* 10 (2020) 731–744. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00741-1>.
- [53] A. Sharma, V. Panwar, J. Thomas, V. Chopra, H.S. Roy, D. Ghosh, Actin-binding carbon dots selectively target glioblastoma cells while sparing normal cells, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 200 (2021) 111572. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111572>.
- [54] Z. Wang, H. Liao, H. Wu, B. Wang, H. Zhao, M. Tan, Fluorescent carbon dots from beer for breast cancer cell imaging and drug delivery, *Anal. Methods.* 7 (2015) 8911–8917. <https://doi.org/10.1039/c5ay01978h>.
- [55] E. Arkan, A. Barati, M. Rahmanpanah, L. Hosseinzadeh, S. Moradi, M. Hajjalyani, Green synthesis of carbon dots derived from walnut oil and an investigation of their cytotoxic and apoptogenic activities toward cancer cells, *Adv. Pharm. Bull.* 8 (2018) 149–155. <https://doi.org/10.15171/apb.2018.018>.
- [56] Ö.S. Aslantürk, In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, *Genotoxicity - A Predict. Risk to Our Actual World.* (2018) 1–18. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>.
- [57] P. Brescia, P. Banks, Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer, *BioTek.* (2009) 3.

- [58] L. Florento, R. Matias, E. Tuaño, K. Santiago, F. Dela Cruz, A. Tuazon, Comparison of cytotoxic activity of anticancer drugs against various human tumor cell lines using in vitro cell-based approach, *Int. J. Biomed. Sci.* 8 (2012) 76–80.
- [59] K.E. Zakrzewska, A. Samluk, M. Wierzbicki, S. Jaworski, M. Kutwin, E. Sawosz, A. Chwalibog, D.G. Pijanowska, K.D. Pluta, Analysis of the cytotoxicity of carbon-based nanoparticles, diamond and graphite, in human glioblastoma and hepatoma cell lines, *PLoS One.* 10 (2015) 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122579>.
- [60] Y. Wang, P. Anilkumar, L. Cao, J.H. Liu, P.G. Luo, K.N. Tackett, S. Sahu, P. Wang, X. Wang, Y.P. Sun, Carbon dots of different composition and surface functionalization: Cytotoxicity issues relevant to fluorescence cell imaging, *Exp. Biol. Med.* 236 (2011) 1231–1238. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011132>.
- [61] ATCC, American Type Culture Collection U87, HTB-14, (2020) 17025. available: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-14.aspx>.
- [62] MCF-7, American Type Culture Collection ATCC (atcc® htb-22™), (2020) 17025.
- [63] S. Bao, Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, J.N. Rich, Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response, *Nature.* 444 (2006) 756–760. <https://doi.org/10.1038/nature05236>.
- [64] N. Kumar, S. Kumbhat, Carbon-Based Nanomaterials, *Essentials Nanosci. Nanotechnol.* (2016) 189–236. <https://doi.org/10.1002/9781119096122.ch5>.
- [65] Reactor de síntesis-Monowave 50-Anton-Paar, Donau Lab Ukr. (2019) 2021.
- [66] D. Gao, X. Liu, D. Jiang, H. Zhao, Y. Zhu, X. Chen, H. Luo, H. Fan, X. Zhang, Exploring of multicolor emissive carbon dots with novel double emission mechanism, *Sensors Actuators, B Chem.* 277 (2018) 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.031>.
- [67] E.H. Hong, K.H. Lee, S.H. Oh, C.G. Park, Synthesis of Carbon Nanotubes Using Microwave Radiation, *Adv. Funct. Mater.* 13 (2003) 961–966. <https://doi.org/10.1002/adfm.200304396>.
- [68] Q. Xiao, Y. Liang, F. Zhu, S. Lu, S. Huang, Microwave-assisted one-pot synthesis of highly luminescent N-doped carbon dots for cellular imaging and multi-ion probing, *Microchim. Acta.* 184 (2017) 2429–2438. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2242-z>.
- [69] A. Ettinger, T. Wittmann, *Fluorescence live cell imaging*, 1st ed., Elsevier Inc., 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420138-5.00005-7>.
- [70] J. Cigales Canga, Síntesis y caracterización de nanopartículas de carbono luminiscentes: Carbon Quantum Dots (CQDs), (2016) 70.
- [71] S. Xia, E.M. Rosen, J. Laterra, Sensitization of glioma cells to fas-dependent apoptosis by chemotherapy-induced oxidative stress, *Cancer Res.* 65 (2005) 5248–5255. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4332>.
- [72] R. Ahmad, G. Schettino, G. Royle, M. Barry, Q.A. Pankhurst, O. Tillement, B. Russell, K. Ricketts, Radiobiological Implications of Nanoparticles Following Radiation Treatment, *Part. Part. Syst. Charact.* 37 (2020). <https://doi.org/10.1002/ppsc.201900411>.

