



Artículo de investigación

# Evaluación de toxicidad de nanogeles termosensibles en modelo *in vivo*



## *Toxicity evaluation of thermosensitive nanogels in an in vivo model*

Alondra Montañez-Ríos<sup>1</sup> , Aracely Serrano-Medina<sup>2</sup> , Juan M. Irache<sup>3</sup> , Ana Luisa Martínez-López<sup>3</sup> , Ignacio Rivero<sup>4</sup> , José Manuel Cornejo-Bravo<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Calzada Universidad 14418, Parque industrial Internacional, Tijuana, Baja California, México, C.P. 22427.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Medicina y Psicología, Calzada Universidad 14418, Parque industrial Internacional, Tijuana, Baja California, México, C.P. 22427.

<sup>3</sup>NANO-VAC Research Group, Department of Chemistry and Pharmaceutical Technology, University of Navarra, Pamplona 31080, Spain.

<sup>4</sup>Tecnológico Nacional de México/I. T. Tijuana. Centro de Graduados e Investigación en Química, Blvd. Alberto Limón Padilla S/N, 22510 Tijuana, Baja California, México.

**Autor de correspondencia:** José Manuel Cornejo Bravo, Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Calzada Universidad 14418, Parque industrial Internacional, Tijuana, Baja California, México, C.P. 22427. E-mail: [jmcornejo@uabc.edu.mx](mailto:jmcornejo@uabc.edu.mx). ORCID 0000-0002-0013-8937.

Recibido: 6 de Septiembre del 2022

Aceptado: 27 de Septiembre del 2022

Publicado: 30 de Septiembre del 2022

**Resumen.** - Este estudio utiliza *C. elegans* para evaluar la toxicidad de los nanogeles (NG) copoliméricos de *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm) y metacrilato de 2-(dietilamino)etilo (DEAEM), preparados mediante polimerización en emulsión sin tensoactivo utilizando polietilenglicol monometil éter metacrilato (PEGMA) como estabilizador reactivo. Los nematodos ingirieron NG marcados con fluoresceína, como se demostró mediante microscopía de fluorescencia. Se utilizaron dos iniciadores diferentes, catiónicos y aniónicos para iniciar la síntesis de los NG. Los resultados demuestran que ambos tipos de NG afectan el tamaño y la reproductividad de los nematodos. *C. elegans* es un modelo pluricelular potencial para evaluar la toxicidad de los NG sensibles, evitando el uso de mamíferos para las evaluaciones.

**Palabras clave:** Nanogeles; *C. elegans*; NIPAAm; Toxicidad.

**Abstract.** - This study uses *C. elegans* to assess the toxicity of copolymeric nanogels (NG) of *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) and 2-(diethylamino)ethyl methacrylate (DEAEM), prepared by surfactant-free emulsion polymerization using polyethylene glycol monomethyl ether methacrylate (PEGMA) as a reactive stabilizer. Nematodes ingested fluorescein-labeled NG, as demonstrated by fluorescence microscopy. Two different initiators, cationic and anionic, were used to initiate the synthesis of the NG. The results indicate that both types of NG affect the size and reproducibility of nematodes. *C. elegans* is a potential multicellular model to evaluate the toxicity of sensitive NG, avoiding the use of mammals for evaluations.

**Keywords:** Nanogels; *C. elegans*; NIPAAm; Toxicity.

## 1. Introducción

Los nanogeles térmicamente sensibles (NG) exhiben un cambio en su transición de hinchamiento y contracción a una temperatura de transición crítica baja (LCST) [1]. Una alternativa de gran utilidad es poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) es el polímero termosensible más ampliamente estudiado con una LCST de 32 °C [2, 3]. Esta temperatura es cercana a la temperatura corporal por lo que los nanogeles y microgeles de NIPAAm tienen un gran potencial en aplicaciones biomédicas como liberación controlada de fármacos [4, 5], y portadores de genes [6, 7], así como materiales de terapia dirigida a patologías donde se genera un cambio en la temperatura [8–12] y materiales embólicos de vasos sanguíneos [13].

Una preocupación con el monómero y los polímeros de NIPAAm es su toxicidad. Se han realizado varios estudios para evaluar la toxicidad de NIPAAm y sus productos poliméricos en cultivos celulares [14]. Por ejemplo, Wadajkar *et. al* demostraron que los monómeros de NIPAAm son citotóxicos, mientras que las nanopartículas de PNIPAAm son compatibles a una concentración de 5 mg/mL o inferior para fibroblastos, células de músculo liso y células endoteliales, incluso cuando queda una pequeña cantidad del monómero en el material [15]. En cuanto a los estudios de toxicidad en animales, Malonne *et al.* estudiaron la toxicidad después de la administración oral de copolímeros de PNIPAAm a ratones; no encontraron toxicidad a 400 mg/kg de peso corporal [16]. En otro estudio, se evaluó el efecto de inyecciones intravítreas de PNIPAAm como adhesivo tisular en conejo. Los investigadores encontraron que PNIPAAm no era tóxico en este estudio [17].

La capacidad de administrar fármacos y material genético en las células depende de la carga superficial del nanomaterial. Se ha establecido que las nanopartículas catiónicas tienen la capacidad de penetrar en las células, presentando una mayor eficacia para la obtención de imágenes, la transferencia de genes y la administración de fármacos [18].

Las nanopartículas tienen la condición de mejorar la estabilidad y la solubilidad de las cargas encapsuladas, fomentando el transporte a través de membranas y prolongando los tiempos de circulación para aumentar la seguridad y la eficacia [19, 20].

Sin embargo, las nanopartículas con carga positiva presentan mayor citotoxicidad que las nanopartículas con carga negativa [21].

Como se observó anteriormente, la mayoría de las evaluaciones de toxicidad se realizan en cultivos celulares. Surgen preocupaciones sobre el número limitado de líneas celulares estudiadas en las evaluaciones de toxicidad considerando las diferencias en los mecanismos de absorción del material, la sensibilidad celular, etc. Es, por lo tanto, necesario utilizar un modelo pluricelular para una mejor predicción de la toxicidad de los nanomateriales en humanos.

Las diferencias entre especies no son el único factor que limita la traducción clínica, también la diversidad entre pacientes puede limitar el éxito de los nanomedicamentos [22].

Muchas de las primeras iteraciones de NP no pudieron superar estas barreras biológicas para la entrega, pero los diseños de NP más recientes han utilizado avances en estrategias de síntesis controlada para incorporar estructuras complejas,

fracciones biosensibles y agentes para mejorar la entrega [23, 24].

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) es un nematodo de vida libre de 1 mm de largo que fue postulado como modelo animal en 1965 por Sydney Brenner [25]. Existe una superposición sustancial entre *C. elegans* y los seres humanos con respecto a los genes y las vías bioquímicas [26]. Los análisis bioinformáticos sugieren que entre el 38% y el 40% de los genes del gusano son homólogos a los humanos [27]. En entornos de laboratorio, *C. elegans* ingiere *Escherichia coli* OP50 de la dieta bombeándolos a la boca y concentrándolos en la faringe antes de pasar al intestino [28, 29]. *C. elegans* es un organismo muy simple. Consta de cinco parejas de cromosomas autosómicos y una pareja de cromosomas sexuales, siendo su tamaño de 100 millones de pares de bases de nucleótidos; veinte veces mayor que el genoma de *E. coli* y sobre 1/30 parte del genoma humano [30, 31]. El hermafrodita adulto tiene exactamente 959 células somáticas [32].

Los factores genéticos y ambientales que afectan a *C. elegans* son similares a aquellos que afectan a humanos, principalmente estrés oxidativo, restricción calórica y reducción en la masa muscular (sarcopenia) [33].

El reflejo de bombeo permanente en la faringe de *C. elegans* se ha aplicado para estudiar la digestión, la absorción y la bioactividad de las nanoemulsiones [34, 35].

En este trabajo, estudiamos el efecto de la ingestión por parte de *C. elegans* de NG copoliméricos de NIPAAm y el monómero básico DEAEM preparado por polimerización en emulsión sin jabón utilizando una forma polimerizable de polietilenglicol como estabilizador (polietilenglicol monometil

metacrilato de éter) [36, 37]. Se utilizaron dos iniciadores para la síntesis de los NG, aniónico y catiónico.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Materiales

N-isopropilacrilamida (NIPAAm) (Tokio Chemical Industry CO., LTD) se purificó mediante recristalización en hexano, 2-(dietilamino) metacrilato de etilo (DEAEM) se purificó mediante destilación a presión reducida. El dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) se purificó pasándolo a través de una columna rellena con resina eliminadora de hidroquinona y metilhidroquinona (ALDRICH). Diclorhidrato de 2,2-azobis-(2-metilpropionamina) (AIBA), persulfato de amonio (APS) (ALDRICH), polietilenglicol-metil éter metacrilato (PEGMA) con un peso de 2.080 g/mol. El metacrilato de fluoresceína fue sintetizado en el laboratorio de Biofarmacia UABC. *C. elegans*, *E. coli* OP50 fueron proporcionados por la Universidad de Navarra España.

### 2.2. Síntesis de nanogeles

Se sintetizaron NG NIPAAm:PEGMA:DEAEM 47:41:12 w% utilizando EGDMA como reticulante (3% mol con respecto a NIPAAm). Se disolvió un total de 500 mg de monómero en 50 ml de agua MiliQ. La solución se desgasificó con nitrógeno durante 30 min y posteriormente se calentó a 85 °C durante 30 minutos. Se añadieron AIBA o APS (2% mol con respecto a NIPAAm). Se preparó un lote de nanogeles que contenían metacrilamida de fluoresceína (0,5% mol con respecto a NIPAAm) usando APS como iniciador. En todos los casos, la reacción se llevó a cabo durante 45 minutos. Después de eso, los nanogeles se sometieron a diálisis contra agua para su purificación durante 5 días. El diámetro hidrodinámico,  $D_h$ , se obtuvo por dispersión de

luz dinámica (DLS) usando el Zetasizer NanoNS (DTS1060; instrumental Malvern). El efecto de la temperatura sobre el tamaño de los nanogeles se evaluó de 20 a 50 °C.

### 2.3. Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo

Las imágenes de microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) de las MG se adquirieron con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, modelo JSM-7800F Prime. Con este fin, se esparció una gota de dispersión de micropartículas (0,4% en peso) sobre la superficie de una rejilla de cobre recubierta de carbón de malla 400. Se añadieron dos gotas de acetato de uranilo (2% en peso) a la rejilla. Las muestras se secaron en horno de vacío a 22°C durante 24 h. Las muestras secas se sujetaron a una varilla de muestras FESEM, se insertaron en la cámara de muestras y se observaron a 25 kV.

### 2.4. Preparación de placas con medios de crecimiento de nematodos (NGM).

Se preparó 1 L de agar para nematodos, con 3 g de NaCl, 27 g de agar bacteriológico, 2,5 g de pepsina, 965 mL de agua, 1g de CaCl<sub>2</sub>. Los medios se esterilizaron en autoclave. Posteriormente se adicionó 1 mL de colesterol (5 mg/mL), 1 g MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 M) 25 mL, nistatina 10 mL (5 mg/mL), ampicilina 1 mL (5 mg/mL).

### 2.5. Colocación de los NG

En el fondo de las placas se colocaron 250 uL de NG, se colocaron 3.75 mL de agar preparado, se dejó secar y se agregaron 250 uL de NG. El estudio se realizó por triplicado. Por otro lado, se preparó una placa de control sin NG.

### 2.6. Colocación de *C. elegans* en placas

Para las pruebas de toxicidad, los nematodos se sincronizaron con la etapa de desarrollo L1 utilizando el método de sincronización de cloro. Después de la eclosión de los gusanos (mínimo de 19 horas), se centrifugaron a 1400 rpm durante 4 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se tomaron 10 µL del sedimento en un portaobjetos para observar al microscopio y contar los gusanos. Se colocó el volumen de sedimento necesario para tener un mínimo de 400 nematodos por caja Petri. Las placas se resguardaron a 20 °C durante 1-2 días hasta su desarrollo, sin que las larvas superaran el estadio L4.

### 2.7. Ingestión de los nanogeles por *C. elegans*

Para determinar si las nanopartículas fueron ingeridas por gusanos, se cultivaron nematodos N2 sincronizados en placas NGM bacterianas OP50 con NG marcados con fluoresceína. Después del tratamiento durante 2 h, los nematodos se lavaron tres veces durante 30 s en medio M9 y luego se colocaron en portaobjetos preparados con almohadillas de agar al 2% frescas. Los nematodos fueron anestesiados con azida de sodio (1%).

La presencia de NG marcados con fluoresceína ingeridos por los gusanos se visualizó en un microscopio de fluorescencia (Axioimager M1, Zeiss, Alemania) con una cámara acoplada (AxioCam Icc3, Zeiss, Alemania) y una fuente fluorescente (HBO 100, Zeiss, Alemania). Las imágenes fueron capturadas con el software ZEN (Zeiss, Alemania).

### 2.8. Tinción rojo Nilo

Los gusanos L4 cultivados en diferentes condiciones (concentraciones de nanogeles) se recolectaron y lavaron con Triton X-100 al 0,01% en solución salina tamponada con fosfato (PBST) y se fijaron en isopropanol al 40% durante 3 min. La tinción se realizó mediante la adición de una solución de rojo Nilo (3  $\mu\text{g/ml}$ ) y la incubación (30 min) con balanceo suave a temperatura ambiente en la oscuridad. Los gusanos se lavaron en PBST y se montaron en una almohadilla de agarosa al 2% para visualización microscópica.

Se capturaron imágenes fluorescentes de gusanos teñidos con rojo Nilo en un estereomicroscopio Nikon SMZ18 (Nikon Instruments Inc., Japón) equipado con un sistema de epifluorescencia y una cámara digital a color refrigerada DS-F11C. Las imágenes se tomaron bajo un filtro GFP (Ex 480-500, DM 505; BA 535-550). El análisis de imágenes se realizó utilizando el programa ImageJ.

### 2.9. Estudio de tamaño de *C. elegans*

Al microscopio (Nikon SMZ18 Research Stereomicroscope) se tomaron al menos 30 fotos por placa para estudio luego de realizar la tinción correspondiente descrita anteriormente, luego de tomar las fotos se guardaron para estudiar el volumen y contenido de grasa del nematodo con el software ImagenJ-Win64.

### 2.10. Análisis estadístico

Todos los cálculos fueron analizados con IBM SPSS. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en condiciones similares. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  DE. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de  $p$  fue inferior a 0,05.

Se calcularon las medias y los errores estándar. Para las comparaciones de grupos en el estudio in vivo, los datos se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey-Kremer con el software estadístico NCSSTM 11 (NCSS, LCC. Kaysville, EE. UU.). EE.UU.). La diferencia se consideró significativa cuando  $p < 0,05$  o  $p < 0,001$ .

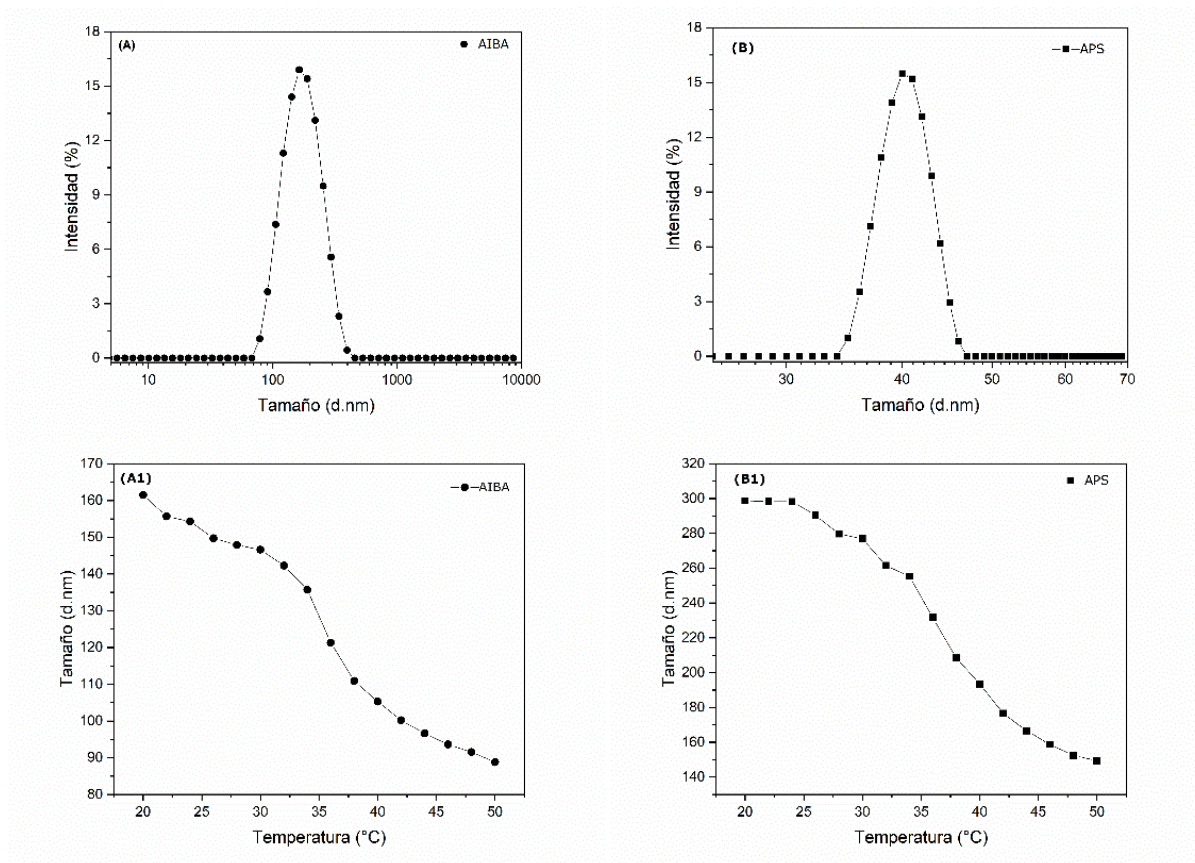
## 3. Resultados

### 3.1. Síntesis y caracterización de nanogeles

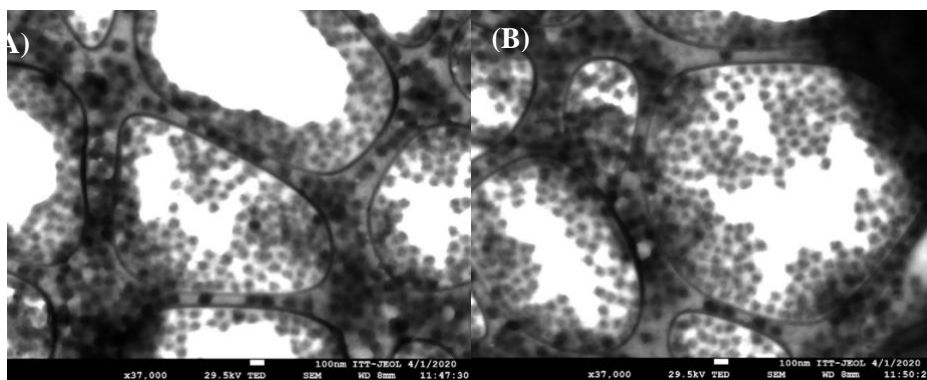
Los nanogeles se produjeron de manera eficiente con rendimientos superiores al 80%. La Figura 1. muestra la distribución de tamaño de los nanogeles iniciados con AIBA (A) y la distribución de tamaño iniciados con APS (B). Se observa un diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) de 150 nm, así como un índice de polidispersión de ( $PDI = 0,198$ ) para los NG iniciado con AIBA, mientras que para el NG iniciado con APS se obtiene un  $D_h$  de 160 nm y un ( $PDI = 0,194$ ) y una temperatura de transición similar de 36 °C. En las dos síntesis el tamaño de los nanogeles son óptimas ya que permite la evaluación de toxicidad en los nematodos, el índice de polidispersión es el adecuado nos dice que los NG se encuentran distribuidos de una forma uniforme. Los tamaños nanométricos de los NG se corroboran con microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) que se muestran en la (Figura 2).

La sensibilidad a la temperatura se presenta en la Figura 1. de 20 °C a 50 °C con una transición discontinua y un LCST así como su sensibilidad a la temperatura en agua AIBA (A1) y APS (B1). Ambos nanogeles presentan una temperatura de transición (LCST) de 36 °C ya conocida y estudiada pues por estudios anterior se sabe que NIPAAm tiene una LCST de 32 °C cercana a la

temperatura corporal, y la incorporación de monómeros hidrofílicos incrementa la LCST.



**Figura 1.** Distribución de tamaños de nanopartículas a 25 °C iniciadas con AIBA (A) o APS (B). Sensibilidad a la temperatura de los NGs con AIBA (A1) y APS (B1).

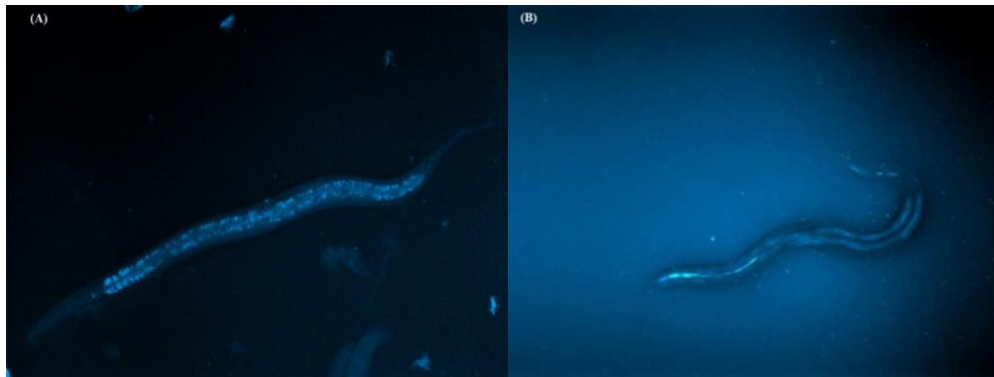


**Figura 2.** Imágenes de microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) de nanogeles iniciados con AIBA (A) y APS (B).

### 3.2. Ingestión de los nanogeles por *C. elegans*

En la Figura 3, se muestra la ubicación de los NGs marcados con fluoresceína en todo el tracto digestivo de *C. elegans*, lo que demuestra la

ingestión de materiales por parte del nematodo, teñido con rojo Nilo para observar el interior del nematodo.

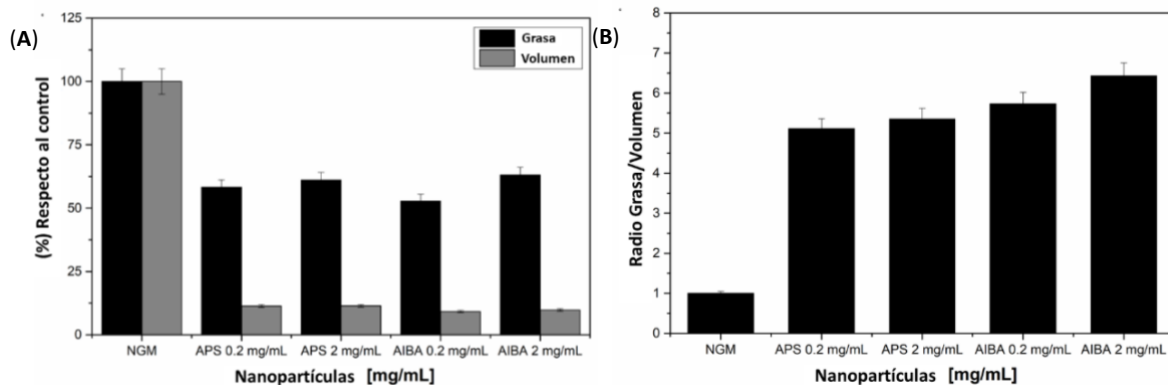


**Figura 3.** a) Muestra el control de la ingesta de NG por *C. elegans*, b) muestra la ingestión de NG marcado con fluoresceína por *C. elegans*.

### 3.3. Estudio de toxicidad.

En la Figura 4 se presentan los datos de toxicidad en *C. elegans*, se observó que en la gráfica (A) que los nematodos que ingirieron NG son más pequeños comparados con el control (NGM), pero también se observó que tienen mayor cantidad de grasa, esto nos lleva a los resultados de la gráfica (B) donde evaluamos la relación

grasa/volumen que nos indica que los nematodos son de tamaño pequeño, pero tienen un mayor volumen, esto comparando con el control, con lo que podemos concluir los nanogeles tienen efecto en el tamaño del nematodo teniendo un nematodo más pequeños pero aumentando su volumen generando un gusano más gordos.



**Figura 4.** Estudios de toxicidad con respecto al volumen y grasa en *C. elegans*, donde en la imagen A se muestra el volumen y grasa del nematodo en términos de porcentaje (%) y en la imagen B se muestra el radio de la grasa y volumen del nematodo comparado con el control (NGM).

#### 4. Discusiones

En microscopía de fluorescencia se observa que los nanogeles se distribuyen por todo el sistema gastrointestinal y digestivo del nematodo, lo que nos demuestra que *C. elegans* ingiere los biomateriales, ya que estos tienen un tamaño adecuado (120 a 180 nm) para poder ser ingerido por este tipo de nematodo. En estudios de toxicidad se concluyó que los nanogeles que se iniciaron con AIBA en comparación con APS tienen un mayor impacto en la grasa del nematodo, pero menor impacto en el volumen. La relación grasa-volumen indica que los nematodos alimentados con los nanogeles son pequeños, pero con gran cantidad de grasa, esto comparado con el control indica que los gusanos alimentados con los nanogeles son más grandes y gordos.

Los resultados indican que los nanogeles tienen cierto grado de toxicidad, lo que corrobora los resultados obtenidos en estudios previos usando cultivos celulares [5].

Se sabe que los materiales catiónicos interactúan con las membranas celulares (cargadas negativamente) provocando la ruptura de la membrana, seguida de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . La elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular induce la desgranulación y el estrés oxidativo. La

#### 7. Reconocimiento de autoría

*Alondra Montañez Rios*: Conceptualización; Metodología; Investigación; Escritura- Borrador original; Escritura: revisión y edición. *Aracely Serrano Medina*: Escritura (Revisión y Edición), Recursos, Supervisión, administración del proyecto, gestión de fondos. *Juan M.*

consecuencia de estos efectos es la citotoxicidad y la muerte celular [38].

Evaluar la toxicidad de nanomateriales sensibles utilizando el sistema *C. elegans* es una alternativa sólida para el desarrollo de biomateriales considerando que se utiliza un organismo vivo multicelular donde se puede estudiar el efecto sobre su funcionamiento y desarrollo.

#### 5. Conclusiones

El nematodo *C. elegans* demostró ser un modelo viable para evaluar la toxicidad de nanopartículas responsivas. Esto resulta en una alternativa robusta para el desarrollo de biomateriales considerando que se utiliza un organismo vivo multicelular donde se puede estudiar el efecto sobre su funcionamiento y desarrollo, en trabajos a futuros se plantea realizar estudios *in vitro* en las mismas condiciones y con los mismos materiales que este trabajo y poder comparar los efectos en los dos modelos, así como también se plantea poder realizar estudios de cargado y liberación de fármacos para futuros estudios *in vivo*.

#### 6. Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento de la 23<sup>a</sup> Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación de la UABC y a la universidad de Navarra (UNAV).

*Irache*: Metodología, validación, administración del proyecto, recursos, supervisión. *Ana L. Martínez López*: Metodología, Validación, administración del proyecto, recursos. *Ignacio Rivero*: Metodología, Validación, recursos. *Cornejo-Bravo*: Conceptualización, Análisis Formal, Visualización, Escritura (revisión y edición).



### Referencias

- [1] D. A. Castro-Vidal, D.A., C. Obeso-Vera, K.A. Suarez-Meraz, B.M. Lara-Molinero, A. Serrano-Medina, y J.M. "Thermal and pH Sensitive Nano/Microgels of N - Isopropylacrylamide and Carboxyalkyl Methacrylates", *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, vol. 11, núm. 1, pp. 123-132, 2016.
- [2] Z. Shakoori et al., "Fluorescent multi-responsive cross-linked P(N-isopropylacrylamide)-based nanocomposites for cisplatin delivery", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 43, núm. 8, pp. 1283-1291, 2017. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1313859>
- [3] A. Serrano-Medina, J. M. Cornejo-Bravo, y A. Licea-Claverie, "Synthesis of Ph and Temperature Sensitive, Core-Shell Nano/Microgels, By One Pot, Soap-Free Emulsion Polymerization", *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 369, núm. 1, pp. 82-90, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.12.045>
- [4] K. Naseem, M. Atiq, U. Rehman, y R. Huma, "A Review on Vinyl Acetic Acid Based Polymer Microgels for Biomedical and Other Applications", vol. 4037, núm. July, 2017. <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1327434>
- [5] A. Serrano-Medina, I. Oroz-Parra, V. E. Gomez-Resendiz, A. Licea-Navarro, A. Licea-Claverie, y J. M. Cornejo-bravo, "Temperature and pH Sensitive Core-Shell Nanogels as Efficient Carriers of Doxorubicin with Potential Application in Lung Cancer Treatment", vol. 4037, núm. April, 2017. <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1297938>
- [6] W. H. Blackburn, E. B. Dickerson, M. H. Smith, J. F. McDonald, y L. A. Lyon, "Peptide-Functionalized Nanogels for Targeted siRNA Delivery", *Bioconjug. Chem.*, vol. 20, núm. 5, pp. 960-968, 2009. <https://doi.org/10.1021/bc800547c>
- [7] Y. M. Zhou et al., "Deposition Transfection Technology Using a DNA Complex with A Thermoresponsive Cationic Star Polymer", *J. Control. Release*, vol. 123, núm. 3, pp. 239-246, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.08.026>
- [8] A. Aqil et al., "Magnetic Nanoparticles Coated by Temperature Responsive Copolymers for Hyperthermia", *J. Mater. Chem.*, vol. 18, núm. 28, pp. 3352-3360, 2008. <https://doi.org/10.1039/b804003f>
- [9] M. Ballauff y Y. Lu, "'Smart' Nanoparticles: Preparation, Characterization and Applications", *Polymer (Guildf.)*, vol. 48, núm. 7, pp. 1815-1823, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.02.004>
- [10] W. Leobandung, H. Ichikawa, Y. Fukumori, y N. A. Peppas, "Monodisperse Nanoparticles of Poly(Ethylene Glycol) Macromers and N-Isopropyl Acrylamide For Biomedical Applications", *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 87, núm. 10, pp. 1678-1684, 2002. <https://doi.org/10.1002/app.11612>
- [11] C. L. Lin, W. Y. Chiu, y C. F. Lee, "Thermal/pH-sensitive core-shell copolymer latex and its potential for targeting drug carrier

application", *Polymer (Guildf.)*, vol. 46, núm. 23, pp. 10092-10101, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.07.098>

[12] T. Hoare y R. Pelton, "with Physiological Swelling Activity", *Insulin*, pp. 733-740, 2008. <https://doi.org/10.1021/bm701203r>

[13] X. Li, X. Li, X. Shi, G. Qiu, y X. Lu, "Thermosensitive DEA/DMA copolymer nanogel: Low initiator induced synthesis and structural colored colloidal array's optical properties", *Eur. Polym. J.*, vol. 96, pp. 484-493, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.08.024>

[14] A. Mellati, M. Valizadeh Kiamahalleh, S. Dai, J. Bi, B. Jin, y H. Zhang, "Influence of polymer molecular weight on the in vitro cytotoxicity of poly (N-isopropylacrylamide)", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 59, pp. 509-513, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.043>

[15] A. S. Wadajkar, B. Koppolu, M. Rahimi, y K. T. Nguyen, "Cytotoxic evaluation of N-isopropylacrylamide monomers and temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide) nanoparticles", *J. Nanoparticle Res.*, vol. 11, núm. 6, pp. 1375-1382, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9526-5>

[16] H. Malonne et al., "Preparation of poly(N-isopropylacrylamide) copolymers and preliminary assessment of their acute and subacute toxicity in mice", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 61, núm. 3, pp. 188-194, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.05.007>

[17] L. H. Lima, Y. Morales, y T. Cabral, "Ocular Biocompatibility of Poly-N-Isopropylacrylamide (pNIPAM)", *J. Ophthalmol.*, vol. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5356371>

[18] P. Van De Wetering, E. E. Moret, N. M. E. Schuurmans-Nieuwenbroek, M. J. Van Steenberghe, y W. E. Hennink, "Structure-activity Relationships of Water-Soluble Cationic Methacrylate/methacrylamide Polymers For Nonviral Gene Delivery", *Bioconjug. Chem.*, vol. 10, núm. 4, pp. 589-597, 1999. <https://doi.org/10.1021/bc980148w>

[19] L. Kou, Y. D. Bhutia, Q. Yao, Z. He, J. Sun, y V. Ganapathy, "Transporter-Guided Delivery Of Nanoparticles To Improve Drug Permeation Across Cellular Barriers And Drug Exposure To Selective Cell Types", *Front. Pharmacol.*, vol. 9, núm. JAN, pp. 1-16, 2018. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00027>

[20] E. Blanco, H. Shen, y M. Ferrari, "Principles of Nanoparticle Design for Overcoming Biological Barriers To Drug Delivery", *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, núm. 9, pp. 941-951, 2015. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>

[21] E. Fröhlich, "The Role Of Surface Charge In Cellular Uptake And Cytotoxicity Of Medical Nanoparticles", *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 5577-5591, 2012. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>

[22] A. C. Anselmo y S. Mitragotri, "Nanoparticles in the Clinic: An Update", *Bioeng. Transl. Med.*, vol. 4, núm. 3, pp. 1-16, 2019. <https://doi.org/10.1002/btm2.10143>

- [23] H. R. Culver, J. R. Clegg, y N. A. Peppas, "Analyte-Responsive Hydrogels: Intelligent Materials for Biosensing and Drug Delivery", *Acc. Chem. Res.*, vol. 50, núm. 2, pp. 170-178, 2017.  
<https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00533>
- [24] J. R. Clegg et al., "Synthetic Networks With Tunable Responsiveness, Biodegradation, And Molecular Recognition For Precision Medicine Applications", *Sci. Adv.*, vol. 5, núm. 9, pp. 1-16, 2019.  
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aax7946>
- [25] P. Ferro, L. Katerine, G. Bustos, y A. Viviana, "Caracterización Fenotípica De La Cepa N2 De *Caenorhabditis Elegans* Como Un Modelo En Enfermedades Neurodegenerativas", pp. 69-78.
- [26] T. Wu, H. Xu, X. Liang, y M. Tang, "*Caenorhabditis Elegans* as a Complete Model Organism For Biosafety Assessments Of Nanoparticles", *Chemosphere*, vol. 221, pp. 708-726, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.021>
- [27] L. González-Moragas, A. Roig, y A. Laromaine, "*C. elegans* as a Tool For In Vivo Nanoparticle Assessment", *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 219, pp. 10-26, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.001>
- [28] G. M. Solis y M. Petrascheck, "Measuring *Caenorhabditis elegans* Life Span in 96 Well Microtiter Plates", núm. March, pp. 1-6, 2011.  
<https://doi.org/10.3791/2496>
- [29] J. S. Gutierrez Sánchez, H. S. Castro Cárdenas, S. E. Giraldo Quintero, Y. Y. Lozano Jiménez, y R. M. Sánchez Mora, "*Caenorhabditis Elegans* Como Modelo De Estudio De Enfermedades Neurodegenerativas", *Ámbito Investig.*, vol. 5, núm. 2, pp. 24-33, 2020.
- [30] M. Uno y E. Nishida, "Lifespan-regulating Genes in *C. Elegans*", *npj Aging Mech. Dis.*, vol. 2, núm. 1, 2016.  
<https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.10>
- [31] A. K. Corsi, B. Wightman, y M. Chalfie, "A Transparent Window Into Biology: A Primer On *Caenorhabditis Elegans*", *Genetics*, vol. 200, núm. 2, pp. 387-407, 2015.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- [32] A. Bansal, L. J. Zhu, K. Yen, y H. A. Tissenbaum, "Uncoupling Lifespan and Healthspan in *Caenorhabditis Elegans* Longevity Mutants", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, núm. 3, pp. E277-E286, 2015.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1412192112>
- [33] A. V. G. Bustos, M. G. Jiménez, y R. M. S. Mora, "The *Annona Muricata* Leaf Ethanol Extract Affects Mobility and Reproduction In Mutant Strain NB327 *Caenorhabditis Elegans*", *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 10, pp. 282-286, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.04.016>
- [34] D. Colmenares, Q. Sun, P. Shen, Y. Yue, D. J. McClements, y Y. Park, "Delivery of Dietary Triglycerides To *Caenorhabditis Elegans* Using Lipid Nanoparticles: Nanoemulsion-based delivery systems", *Food Chem.*, vol. 202, pp. 451-457, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.022>

[35] E. Sánchez, "Estudio De Un Modelo In Vivo De Los Mecanismos De Acción Implicados En La Actividad Biológica De Polifenoles." ' Evaluation Of Mechanisms of Action Involved In The Biological Activity Of Polyphenols Using An In Vivo Model.'", p. 31, 2017.

[36] L. Brannon-Peppas y J. O. Blanchette, "Nanoparticle and Targeted Systems for Cancer Therapy", Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 64, núm. SUPPL., pp. 206-212, 2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.033>

[37] M. J. Mitchell, M. M. Billingsley, R. M. Haley, M. E. Wechsler, N. A. Peppas, y R. Langer, "Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery", Nat. Rev. Drug Discov., vol. 20, núm. 2, pp. 101-124, 2021.  
<https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>

[38] T. L. Hwang, I. A. Aljuffali, C. F. Lin, Y. T. Chang, y J. Y. Fang, "Cationic Additives In Nanosystems Activate Cytotoxicity And Inflammatory Response Of Human Neutrophils: Lipid Nanoparticles Versus Polymeric Nanoparticles", Int. J. Nanomedicine, vol. 10, pp. 371-385, 2015.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S73017>

Derechos de Autor (c) 2022 Alondra Montañez-Ríos, Aracely Serrano-Medina, Juan M. Irache, Ana L. Martínez-López, Ignacio Rivero, José Manuel Cornejo-Bravo



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Usted es libre para compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia](#) - [Texto completo de la licencia](#)