

Marcadores Cuánticos para la Detección de Cáncer

Revisión

J. Douda*, P. A. Calva

UPIITA - Instituto Politécnico Nacional, México D.F. 07738, México

T. V. Torchynska

ESFM - Instituto Politécnico Nacional, México D.F. 07738, México

R. Peña Sierra

CINVESTAV, México D.F. 07738, México

J. M. de la Rosa Vázquez

ESIME - Instituto Politécnico Nacional, México D.F. 07738, México

(Recibido: 17 de octubre de 2008; Aceptado: 11 de noviembre de 2008)

En este trabajo se presenta el estado del conocimiento sobre puntos cuánticos (QDs) para la detección temprana de cáncer. También se discuten los métodos de síntesis de estructuras núcleo/coraza; encapsulamiento polimérico de las nanopartículas y métodos de conjugación con moléculas biológicas. Se analizan los métodos para mediciones ópticas de QDs con y sin bioconjugación y se reportan algunos resultados experimentales obtenidos por espectroscopia Raman y fotoluminiscencia. Finalmente, se propone una nueva metodología de preparación de híbridos de aplicación en clínica para un diagnóstico oportuno de cáncer.

Palabras clave: Puntos cuánticos; Anticuerpos; Antígenos; Cáncer; Nanopartículas; Polímeros

The current state of knowledge in the field of quantum dots and the perspective for QD applications for early cancer diagnostic are presented. Different methods of synthesise core-shell particles, their polymer encapsulation and the conjugation of QDs with biomolecules are discussed as well. Methods of optical study of QDs with and without conjugation to biomolecules are presented and discussed together with some experimental results of Raman Spectroscopy and photoluminiscence studies in these QDs. Finally, it is proposed a methodology for the preparation of hybrids based on the quantum dots with cancer antibodies and the analysis of their optical properties for early cancer diagnostics.

Keywords: Quantum dots; Antibodies, Antigens; Cancer; Nanoparticles; Polymers

1. Introducción

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, esta situación se ha tornado crítica y de no implantarse mejores estrategias de prevención, para el año 2030 se estima se presentarán mundialmente 11.8 millones de muertes por esa causa [1]. En 2006 los cánceres fueron la tercera causa de muerte en México, 63 888 personas fallecieron por éstos, el volumen representa el 12.9 % del total de muertes registradas [2].

El pronóstico del diagnóstico clínico del cáncer depende de la etapa en la cual se detecta la malformación. Por esta razón, mientras más temprano se detecta el cáncer, el tratamiento es más eficiente, especialmente para los cánceres mamario, cervicouterino y de ovario en las mujeres o de próstata y colorectal en los hombres [3].

Las técnicas empleadas actualmente para del diagnóstico de cánceres en clínica son: obtención de imágenes (Rayos X, Resonancia Magnética Nuclear, Colposcopia), biopsia de los tejidos y análisis bioanalítico de los fluidos corporales. Sin embargo, todos ellos, por lo regular, no son suficientemente sensibles y/o específicos para una detección temprana de la mayoría de los cánceres y sobre todo de los estados precancerígenos. Además, es difícil de

hacer el diagnóstico de los cánceres analizando únicamente las alteraciones morfológicas en las células y tejidos [4]. Algunos tumores sólidos solamente se detectan cuando su tamaño es de 1 cm o más de diámetro, lo que significa que su masa constituye millones de células y hay posibilidad de metástasis en otros órganos.

Al mismo tiempo los biomarcadores específicos de cánceres (proteínas derivadas de tumores) están presentes en concentraciones picomolares en la cera de los pacientes con cánceres. Por ejemplo, para el diagnóstico de cáncer de próstata se detecta el antígeno prostático específico (PSA) [5].

Por otro lado, los niveles de biomarcadores específicos de cáncer son muy bajos [6], lo que hace necesaria la preparación previa (fraccionamiento) de la muestras antes del análisis convencional. Todo esto exige que se propongan y desarrollen nuevos y mejores métodos de diagnóstico clínico. Aplicando los avances recientes en nanotecnología, los marcadores biológicos específicos pueden ser una herramienta más poderosa y rápida para el diagnóstico de cánceres especialmente en etapas precancerígenas [7].

Actualmente, en los análisis clínicos para producir las imágenes ópticas se utilizan unos materiales fluoróforos

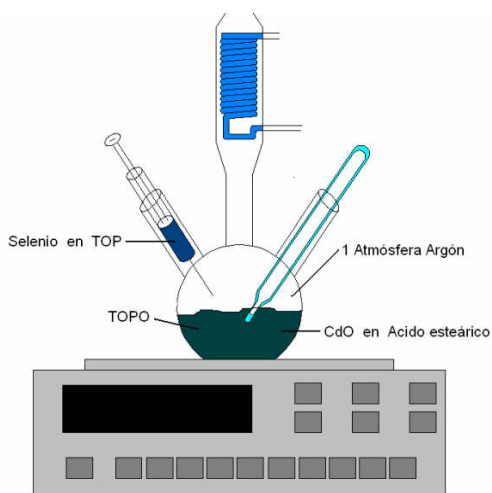


Figura 1. Arreglo experimental para la síntesis de QDs de CdSe/ZnS: síntesis típica del núcleo de CdSe.

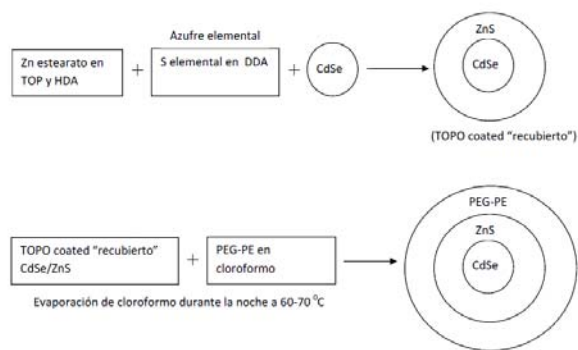


Figura 2. Esquema general de síntesis de los QDs de CdSe/ZnS : a) preparación de la coraza de ZnS sobre el núcleo de CdSe; encapsulamiento en polímero PEG-PE: 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi-poli(etilen glicol)].

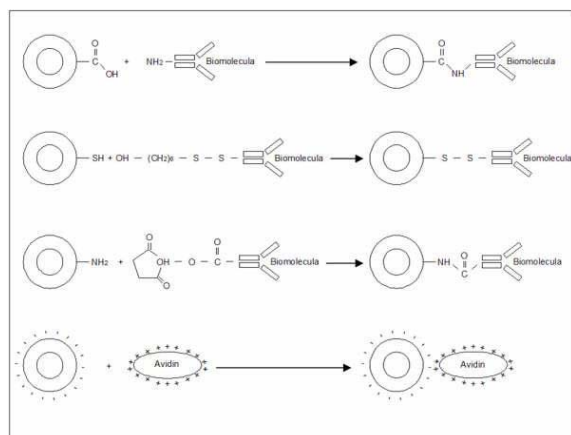


Figura 3. Esquema de reacciones químicas de bioconjugación por medio de diferentes grupos (en 3 primeras reacciones) y por atracción electrostática (reacción 4).

(por lo regular compuestos orgánicos, lantánidos, etc). Cuando un fluroforo se excita con un cuanto de energía específica (fotón), sus electrones cambian del nivel básico de energía a uno más alto. Durante este proceso el electrón pierde una parte de energía obtenida, generalmente debido a emisión de fonón y como resultado se emite un fotón de energía más baja. Debido a este proceso de emisión de luz, el electrón de un estado de energía elevada vuelve a su estado normal. Los fluoroforos se dividen en dos categorías amplias: endógenos (los que se usan directamente *in vivo*) y exógenos (los que se usan *in vitro*). Al segundo grupo pertenecen agentes contrastantes basados en nanopartículas [8].

La integración de la nanotecnología con la biología y la medicina producen mayores ventajas tanto en la biología molecular, la bioingeniería y la clínica para la terapia de algunas enfermedades [9]. El desarrollo de la tecnología de las nanopartículas coloidales de semiconductores, unidos con enlaces covalentes a las moléculas biológicas tales como los péptidos, proteínas y ácidos nucleicos es una ruta en la perspectiva de la síntesis de nuevos materiales [11-16], bioarreglos multiplejos [17, 18], detección óptica ultrasensible y producción de imágenes [5, 19-23].

Los puntos cuánticos (quantum dots, QDs) son cristales semiconductores tridimensionales en escalas de 1-10 nm, que producen luminiscencia de color diferente debido a los efectos de confinamiento cuántico. Los QDs pertenecen a una nueva clase de biomarcadores luminescentes, que superan las limitaciones de los marcadores orgánicos convencionales. La longitud de onda de la fluorescencia (color) depende del tamaño de la nanopartícula. Además, los QDs de semiconductores son extremadamente estables y pueden estar expuestos a ciclos de excitación y fluorescencia durante varias horas sin pérdida de su eficiencia. Algunas de las más importantes son: anchos específicos de excitación y estrechos espectros de emisión, resistencia a degradación metabólica, altos coeficientes de extinción y habilidad para ser conjugados con las biomoléculas [9]. Esto permite aplicarlos en áreas donde se necesita el monitoreo prolongado de biomoléculas lábiles. Recientemente, QDs de semiconductores están utilizando en estudios biológicos para producir imágenes luminescentes de células o reacciones bioquímicas, por ejemplo, la reacción antígeno-anticuerpo para el estudio de cánceres. Estas imágenes se producen de células biológicas bajo iluminación con luz ultravioleta (UV) o visible y se pueden observar a través del microscopio óptico.

2. Tipos de QDs

Las mejores propiedades fluorescentes tienen los biomarcadores cuánticos de los elementos de grupos II y VI de la Tabla Periódica (CdSe y CdTe), de los grupos III y V (InP y InAs), o sistemas de tres elementos (CdTeSe). Los avances de los estudios recientes hacen posible el control de los tamaños y formas de las partículas y de sus estructuras internas (núcleo-coraza) [24-26]. Los espectros de emisión de QDs pueden estar en varias regiones: desde

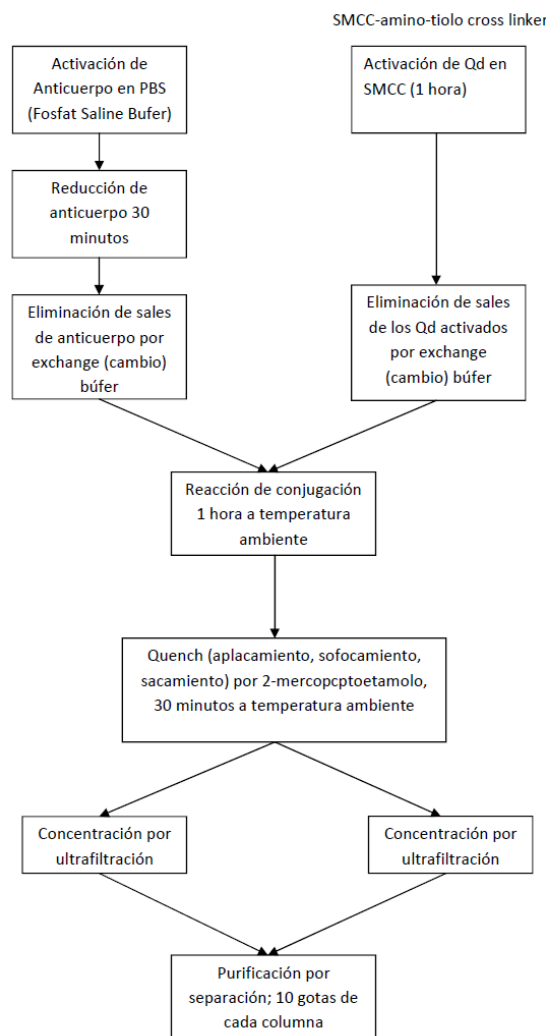


Figura 4. Etapas de bioconjugación aplicados para ligamiento de los anticuerpos de cáncer a los puntos cuánticos de CdSe/ZnS encapsulados en polímero.

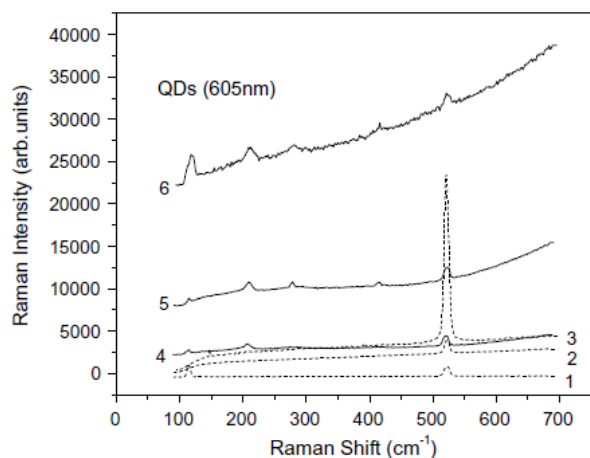


Fig. 5. Resultados de espectroscopia Raman para los puntos cuánticos de núcleo-coraza de CdSe/ZnS, sin (1, 2, 3) y con bioconjugación (4, 5, 6) con anticuerpos de cáncer (Interleukina) [Tomado de Ref. 110].

el UV cercano hasta el infrarrojo cercano, lo que se puede lograr cambiando el tamaño y composición de los núcleos de los QDs [21, 27]. Para las aplicaciones biológicas los QDs se preparan en forma de soluciones acuosas coloidales estabilizados con moléculas orgánicas.

3. Métodos de preparación de QDs

Generalmente la preparación de nanopartículas para la producción de imágenes biomédicas ocurre a través de las siguientes etapas [4]:

a) *Síntesis del núcleo de QDs* por métodos que van desde el depósito de átomos en las fases sólidas hasta la síntesis coloidal en solución acuosa [28-31]. Sin embargo, debido a que el espectro de emisión de los QDs tiene menor anchura cuando las partículas son monodispersas en tamaño, los QDs de CdSe de mejor calidad se pueden preparar a partir de los precursores pirofóricos como $Cd(CH_3)_2$ y de Selenio elemental en trioctilfosfina (TOP)/óxido de trioctilfosfina (TOPO) o hexadecilamina (HDA) a temperaturas de 250-350° C [32, 33]. Más recientemente se demostró, que los QDs de CdSe o CdS se pueden formar a partir de otros precursores como CdO (Fig.1), $Cd(OAc)_2$ [34] y de $CdCO_3$ [35, 36]. Para los QDs de CdS también se reportan algunos métodos de síntesis a temperatura ambiente [37-40]. Otro método para la preparación de núcleos cubiertos de surfactante es el método de síntesis en microemulsión (de micelas inversas) agua/aceite para producir CdS [41-43], CdSe [4], CdMnS [45, 46], ZnSe [47], ZnS:Mn [48].

b) *Síntesis de la coraza para eliminar los defectos superficiales de los QDs y creación de las barreras de potencial* (Fig. 2a). La coraza previene la foto-corrosión y aumenta la eficiencia cuántica (el porcentaje de luz emitida respecto a la luz recibida durante la excitación) de partículas tipo núcleo-coraza de CdSe/ZnS QDs. La coraza se agrega térmicamente en forma de otro semiconductor, que tiene la banda prohibida más grande comparando con la de material del núcleo [49-51]. Por ejemplo, para obtener partículas homogéneas (en forma y tamaño) con estructura núcleo/coraza uno de los métodos más eficientes es nuevamente el método de síntesis en microemulsión [37-40, 52]. Recientemente Rosenthal et al., [53] describen los métodos de síntesis de QDs más utilizados, junto con consejos prácticos para llevarlos a cabo, así como los diferentes métodos instrumentales para la caracterización de las estructuras resultantes de los QDs núcleo-coraza biológicamente activos.

c) *Modificación de la superficie de los QDs núcleo-coraza* (Fig.2b). Para la aplicación de nanopartículas en soluciones y en agua es importante prevenir su agregación y coagulación. Con este propósito se utilizan varios agentes dispersantes tales como surfactantes, polímeros, grupos quelantes, etc. Particularmente, para aplicaciones biológicas de QDs, estos deben ser hidrosolubles. Para incrementar la solubilidad en agua se aplican métodos tales como el encapsulamiento de QDs en micelas de fosfolípidos, adición de ditiotreitolo, dendrones orgánicos

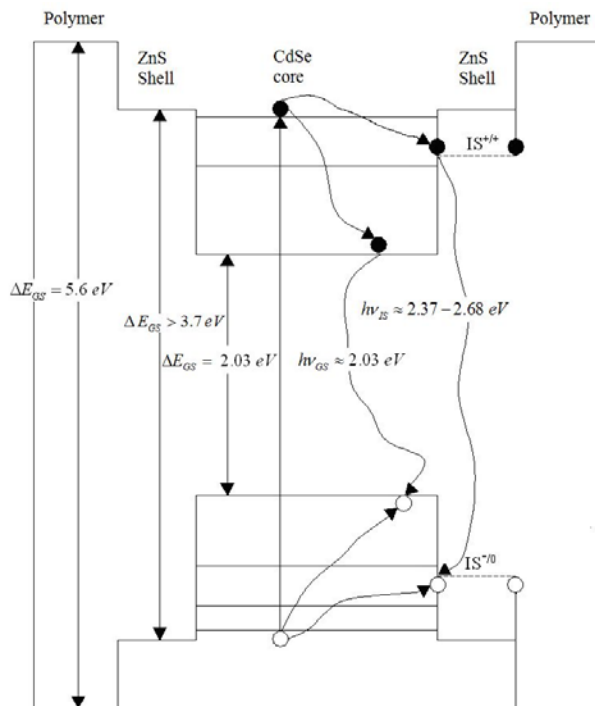


Figura 7. Diagrama de energía para los QDs CdSe/ZnS (con emisión a 605nm), que demuestra de que manera ocurre la recombinación de excitones en esta partícula y a que se deben los picos el espectro de fotoluminiscencia [Tomado de Ref. 113].

[54], ligandos oligoméricos [55-58] o agregación de poli(anhídrido maléico alt-1-tetradeceno) a la superficie de los QDs [19, 59]. También el Sílice y el ácido mercaptopropiónico (MPA) se usan con éxito para este propósito [19, 20, 32, 52, 54, 59] y además facilitan la siguiente etapa de bioconjugación con moléculas de interés. Últimamente se han publicado reportes sobre quitosano, que es un polímero natural y altamente eficiente para solubilizar partículas de QDs y facilitar la entrega intracelular de sus moléculas [60, 61].

Otra estrategia utilizada con el propósito de hacer QDs solubles en agua es el intercambio de ligandos hidrofóbicos en la superficie de los QDs por ligandos hidrofílicos [19]. Sin embargo, este método resulta ser menos eficiente, ya que puede causar la agregación de partículas y disminuir la fluorescencia [62].

Un método alternativo y que da buenos resultados es la aplicación de polímeros amfífilos, que contienen dos tipos de segmentos: hidrofóbicos (hidrocarburos) e hidrofílicos (como polietilenglicol o polímeros con grupos carboxílicos). Los segmentos hidrofóbicos reaccionan con las cadenas alquílicas de los ligandos en la superficie de los QDs, mientras que los segmentos hidrofílicos se quedan en la superficie y vuelven hidrosolubles a los QDs (Fig. 2b). Para este propósito se reportan el ácido acrílico modificado con octilamina, los fosfolípidos derivados de polietilenglicol (PEG) y copolímeros de bloque [55, 63-67].

Los trabajos más recientes se enfocan en la producción de partículas núcleo/coraza solubles en agua mediante procesos en una sola etapa a temperatura ambiente [68].

d) *Bioconjugación de los QDs* (Fig 3). La modificación de los nanosistemas con moléculas selectivas permite lograr el “reconocimiento” e interacción de los QDs con las células específicas y se llama bioconjugación [69-71]. Para su conjugación directa con las moléculas biológicas, los QDs deben tener grupos reactivos tales como amino (-NH₂), carboxilo (-COOH) o mercapto (-SH). De esta manera, los QDs pueden conjugarse con los ligandos bioafines tales como anticuerpos monoclonales, péptidos, enzimas, ácidos nucleicos o pequeñas moléculas-inhibidoras, formando híbridos inorgánico-orgánicos [72-75]. Algunas proteínas modificadas químicamente se absorben espontáneamente en la superficie de los QDs solubles en agua por un mecanismo de adsorción pasiva de ligamento covalente [10]. Otros mecanismos de atracción entre los QDs y las moléculas biológicas son la quelación multivalente o el auto-ensamblaje electrostático [70]. Recientemente se ha publicado un libro sobre las técnicas de bioconjugación y mecanismos de conjugación aplicados para diferentes grupos químicos [76]. Además en una revisión de Jamielson et., al., 2007 se resume un esquema de conjugación de QDs con biomoléculas para aplicaciones biológicas tales como [77]: aplicación de los ligandos bifuncionales como MPA, atracción hidrofóbica entre TOPO-QDs y los polímeros de ácido acrílico modificado, silanización con los compuestos de mercaptosilano, atracción electrostática entre las biomoléculas cargadas positivamente y los QDs cargados negativamente e incorporación de los QDs en micro- y nano-cuentas [78]. Las etapas generales de bioconjugación aplicadas a partículas de núcleo-coraza de CdSe/ZnS con anticuerpos de cáncer diferentes se muestran en la figura 4.

Sin embargo, la aplicación de uno u otro método de bioconjugación depende en gran medida de la aplicación y del medio en el que se utilizarán las QDs bioconjugados. En promedio, a un nanocrystal se le pueden conjugar unas tres moléculas de anticuerpos de cáncer [70]. En ocasiones la aplicación de los QDs bioconjugados se dificulta en algunos sistemas biológicos debido al cambio simultáneo de sus cargas y propiedades hidrodinámicas [79] con un aumento de la toxicidad de las partículas [80] o pérdida de su fluorescencia [60, 81-84]. Sin embargo, la toxicidad no tiene importancia si los QDs bioconjugados se van a utilizar *in vitro* (fuera de organismos vivos) para el análisis de fluidos corporales.

Los QDs bioconjugados son unas 20 veces más brillantes y 100 veces más estables bajo la fotoexcitación y tienen el espectro de emisión tres veces más agudo que los marcadores orgánicos convencionales [85]. Los híbridos inorgánico-orgánicos de QDs son una herramienta poderosa para el diagnóstico clínico de cánceres debido a su alta fluorescencia y estabilidad y su potencial para producir imágenes multicolores.

4. Investigaciones ópticas de QDs conjugados

Para las aplicaciones de los QDs en biología, medicina y electrónica es importante entender los factores que afectan sus propiedades ópticas, tales como sus longitudes de onda de emisión y su eficiencia cuántica [10]. Las nanopartículas emiten luz visible bajo la iluminación UV y la longitud de onda de emisión depende del diámetro de núcleo [39]. Generalmente, en el caso de nanoestructuras núcleo-coraza, el incremento en el espesor de la coraza de ZnS conlleva un incremento de absorción y de intensidad de fotoluminiscencia debido al mejoramiento de la eficiencia cuántica de las partículas [50]. Además, la intensidad de fotoluminiscencia (PL) para los QDs bioconjugados con proteínas invariablemente aumenta [21, 70] y el efecto es aún más pronunciado en caso de agregación adicional de moléculas de proteína-adaptadora [85].

Se ha observado que en la eficiencia cuántica de los QDs influyen condiciones ambientales: por ejemplo, los QDs con una capa inorgánica son sensibles al pH ácido y a cationes bivalentes. Como resultado se produce una drástica disminución de la intensidad de la fluorescencia. Por el contrario, en una solución básica la intensidad aumenta en 3 veces. Algunos estudios reportan, que la producción cuántica disminuye en un 10% después de la encapsulación de los QDs con MPA [86]. Esto, como ya se mencionó, puede remediarse agregando proteínas [21], o ditiotreitolo para su estabilización y bioconjugación [10, 56].

Los estudios de fotoluminiscencia muchas veces se llevan a cabo durante la formación de los nanocristales para el control de sus tamaños [87]. Este monitoreo permite identificar otros factores que influyen en la eficiencia cuántica como: la temperatura de producción de QDs [88], el disolvente utilizado y el desplazamiento de péptidos conjugados desde los QDs centrales (en el caso de aplicación de biomoléculas muy grandes) [89].

5. Aplicaciones biomédicas

La similitud de las dimensiones de los QDs con moléculas biológicas (proteínas y ácidos nucleicos) permite su aplicación como marcadores luminiscentes conjugados con diferentes moléculas biológicas. Los marcadores luminiscentes permiten observar los cambios producidos en las moléculas biológicas a través de la intensidad de la fotoluminiscencia. Los QDs pueden ser preparados de manera que emitan la luz a longitudes de onda precisas desde la región del ultravioleta cercano (UV) al infrarrojo cercano (IR) [90]. Además, los QDs permiten obtener imágenes multicolores, en las que se combinan varios colores e intensidades de FL para la codificación de genes, proteínas y otras moléculas pequeñas [17]. Muchos compuestos de interés biológico son modificados con QDs: secuencias específicas de genes [56, 91], mRNA [92], proteínas de plasma [63, 93, 94], proteínas de citoplasma [19, 61] y proteínas del núcleo celular [20, 26]. Hay reportes que indican que en un 95% de diferentes células

cancerígenas existen niveles elevados de telomerasa, una enzima que se considera el marcador universal de cánceres [7].

Se han aplicado bio-pruebas luminiscentes en donde los QDs poseen un uso potencial en el monitoreo de las funciones de células vivas [95-101], para observar el flujo sanguíneo [102], para producir imágenes de nudos linfáticos [79] o de células extraídas [103-105].

Tran *et al.*, 2002 [106] han desarrollado prototipos de arreglos de biosensores con fotoluminiscencia estable, en los cuales en unas películas de vidrio se inmovilizan los QDs, proteínas-adaptadoras y moléculas de anticuerpos. Estos autores proponen aplicar los biosensores a base de QDs para aplicaciones en el diagnóstico clínico. Hay otros estudios, que demuestran la formación de estructuras coloidales de QDs conjugados con anticuerpos en presencia de antígenos específicos de cáncer de 1 a 2 órdenes de magnitud más grandes que los constituyentes [107, 108].

En recientes reportes de nuestro grupo de investigación se han presentado resultados importantes del análisis de los espectros Raman (Fig. 5) y/o fotoluminiscencia (Fig. 6) de QDs de CdSe/ZnS comercialmente disponibles con y sin bioconjugación con anticuerpos específicos de cáncer [109-113].

En los espectros Raman hemos observado la aparición de picos en muestras bioconjugadas cuando se les compara con las muestras sin bioconjugación (Fig 5). Por ejemplo, para los QDs con fotoemisión a 605 nm, el espectro Raman presenta un solo pico sin biomolécula a 521 cm^{-1} conectado con el sustrato de silicio. Sin embargo, para los QDs conjugados con el anticuerpo Interleukina 10, aparece una variedad de picos en el espectro Raman conectados con el núcleo de CdSe [109,110].

También el proceso de bioconjugación se refleja en el espectro de fotoluminiscencia (Fig. 6). Para las CdSe/ZnS QDs con emisión de 605nm sin bioconjugación el espectro de fotoluminiscencia se puede deconvolucionar en tres picos sencillos a 2.05, 2.37 y 2.68 eV. El pico a 2.05 eV se debe a la emisión de excitones de estado basal en el núcleo de CdSe (Fig. 6a). Se discute en [111] la presencia de otros dos picos, por lo que para descartar el proceso de ionización térmica de excitones de núcleo de CdSe a coraza de ZnS o emisión de los excitones conectada con los estados excitados en CdSe el análisis de fotoluminiscencia se repite a temperatura de 10K. Sin embargo, a estas condiciones el espectro de fotoluminiscencia no presenta cambios mayores, por lo que se llega a la conclusión de que estos picos no se deben a los estados excitados del núcleo, ni a los defectos en la coraza de ZnS. Se asignan los picos a la presencia de los defectos en la interfase de CdSe/ZnS o ZnS/polymer (Fig.7) [112,113]. Sin embargo, el resultado más importante se observa para los mismos puntos cuánticos bioconjugados con el anticuerpo de Interleukina 10: el espectro de fotoluminiscencia cambia de intensidad y de ancho a la mitad de la altura (FWHM, full width at half maximum) y aparece como unico pico Gauseano a 2.05eV, 6 veces mas intenso, comparando con los QDs sin biomoléculas. Esto significa que la presencia

de biomoléculas amplifica la intensidad de emisión de excitones en núcleo de CdSe. De esta manera la comparación de los espectros de QDs sin y con bioconjugación permite detectar sin ambigüedades la bioconjugación [112, 113].

La comparación de las propiedades ópticas de QDs con y sin bioconjugación permite observar los diferentes espectros Raman y de fotoluminiscencia de QDs, además permite distinguir el tipo de biomoléculas aplicadas [108-110], lo cual resulta fundamental para el diagnóstico temprano de cáncer.

6. Conclusiones

Las características únicas de los QDs como fotoestabilidad, espectros estrechos de emisión, posibilidad de obtener las imágenes multicolores para distinguir entre varios biomarcadores al mismo tiempo, los hacen imprescindibles en el campo de aplicaciones biomédicas. Además, la estable y prolongada fluorescencia de los QDs bioconjugados permiten su aplicación para el diagnóstico del cáncer *in vitro*. La detección óptica de los marcadores específicos de cáncer bioconjugados con QDs para el diagnóstico temprano de cáncer es muy prometedora. Se espera aplicar los avances de esta tecnología para un diagnóstico de cáncer oportuno.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo a través de los Proyectos SIP-IPN 20080351 y 20090301 y el proyecto 058358 del CONACYT. Agradecemos a SIP-IPN, la Dirección y a la SEPI- UPIITA por el apoyo al Laboratorio de Materiales.

Referencias

- [1] OMS-Ten statistical highlights in global public health, www.who.int/whosis/whostat2007_10highlights.pdf.
- [2] <http://www.inegi.gob.mx/2008/>
- [3] A.M. Smith, S. Dave, S. Nie, L. True, and X. Gao, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 6(2), 231(2006).
- [4] A. Alaiya, M. Al-Mohanna, and S. Linder, *J. of Proteome Reseach*, 4, 1213(2005).
- [5] J. Hernandez, I. Thompson, *Cancer*, 101 (5), 894(2004).
- [6] W.E. Wright, M.A. Piatyszek, W.E. Rainey, W. Byrd, J.W. Shay, *Dev. Genet.*, 18, 173(1996).
- [7] C. Goessi, *Curr. Med. Chem.*, 10(8), 691(2003).
- [8] P. Sharma, S. Brown, G. Walter, S. Santra, B. Moudgil, *Adv. Colloid. Interface Sci.*, 123-126, 471(2006).
- [9] X. Gao, W.C.V. Chan, S. Nie, *Journal of Biomedical Optics*, 7(4), 532(2002).
- [10] C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic, and J.J. Storhoff, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 3795(2000).
- [11] J.J. Storhoff, and C.A. Mirkin, *Chem.Rev.*, 99, 1849(1999).
- [12] P. Alivisatos, K.P. Johnsson, X. Peng, T.E. Wilson, C.J. Loweth, M. Bruchez, and P.G. Schultz, *Nature (London)*, 382, 609(1996).
- [13] A.K. Boal, F. Ilhan, J.E. DeRouchey, T. Thurn-Albrecht, T.P. Russel, and V.M. Rotello, *Nature (London)*, 404, 746(2000).
- [14] M. Li, H. Schnablegger, and S. Mann, *Nature (London)*, 402, 393(1999).
- [15] A.C. Templeton, M.P. Wuelfing, and R.W. Murray, *Acc. Chem. Res.*, 33, 27(2000).
- [16] M. Han, X. Gao, J.Z. Zu, and S. Nie, *Nat. Biotechnol.*, 19, 631(2001).
- [17] S.R. Nicewarner-Pena, R.G. Freeman, B.D. Reiss, L. He, D.J. Pena, I.D. Walton, R. Cromer, C.D. Keating, and M.J. Natan, *Science*, 294, 137(2001).
- [18] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A.P. Alivisatos, *Science* 281, 2013(1998).
- [19] W.C. Chan, S. Nie, *Science* 281, 2016(1998).
- [20] H. Mattoussi, J.M. Mauro, E.R. Goldman, G.P. Anderson, V.C. Sundar, F.V. Mikulec, M.G. Bawendi, *J. Am Chem. Soc.* 122, 12142(2000).
- [21] E. Klarreich, *Nature (London)*, 413, 450(2001).
- [22] P. Mitchell, *Nat. Biotechnol.*, 19, 1013(2001).
- [23] S. Pradhan, S. Chen, S. Wang, J. Zou, S.M. Kauzlarich, and A.Y. Louie, *Langmuir* 22, 787(2006).
- [24] R.E. Bailey, S.M. Nie, *J. Am. Chem. Soc.*, 125(23), 7100(2003).
- [25] W.W. Yu, Y.A. Wang, X.G. Peng, *Chem. Mater.*, 15(22), 4300(2003).
- [26] M. Gutierrez, A. Henglein, *Ver Bunsenges Phys Chem Chem Phys*, 88, 649(1984).
- [27] K.L. Mittal, P. Kumar, *Handbook of microemulsion science and technology*. New York; Marcel Dekker, 1999.
- [28] M.P. Pileni, *Structure and reactivity in reverse micelles*. Amsterdam: Elsevier, 1989.
- [29] H.L. Rosano, M. Clausee, *Microemulsion systems*. New York, NY.; M. Dekker, 1987.
- [30] J.H. Fendler, *Membrane mimetic chemistry: characterizations and applications of micelles, microemulsions, monolayers, bilayers, vesicles, host-guest systems, and polyions*, New York, Wiley, 1982.
- [31] J.G. Brennan, T. Siegrist, P.J. Carrol, S.M. Stuczynski, P. Reynders, L.E. Brus, M.L. Steigerwald, *Chem. Mater.*, 2, 403(1990).
- [32] C.B. Murray, D.J. Norris, M.G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 8706(1993).
- [33] Q. Liu, X. Liu, Y. Zhu, D. Tang, *J. Colloid and Interface Science* 307, 563(2007).
- [34] L. Qu, Z. Peng, X. Peng, *Nano Lett.*, 1, 333(2001).
- [35] Z. Peng, X. Peng, *J. Am. Chem Soc.*, 123, 183(2001).
- [36] H. Li, W.Y. Shih, and W.H. Shih, *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 2013(2007).
- [37] T. Sugimoto, G.E. Dirige, A. Muramatsu, *J. Colloid and Interface Science*, 173, 257(1995).
- [38] A.R. Loukanov, C.D. Dushkin, K.I. Papazova, A.V. Kirov, M.V. Abrashev, E. Adachi, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 245, 9(2004).
- [39] M.J. Murcia, D.L. Shaw, H. Woodruff, C.A. Naumann, B.A. Young, and E.C. Long, *Chem. Mater.*, 18, 2219(2006).
- [40] T. Nakanishi, B. Ohtani, K. Uosaki, *J. Phys. Chem B.*, 102, 1571(1998).
- [41] B.H. Robinson, T.F. Towey, S. Zourab, A.J.V.G. Visser, A. Vanhoek, *Colloids Surf.* 61, 175(1991).
- [42] M. Tata, S. Banerjee, V.T. John, Y. Waguespack, G.L. McPeterson, *Colloids Surs A Physicochem Eng Asp.* 127, 39(1997).
- [43] D.L. Ou, A.N. Seddon, *Phys Chem Glasses* 39, 154(1998).
- [44] Q. Pang, B.C. Guo, J.N. Wang, S.H. Yang, J.Q. Wang, W.K. Ge, et al., *Chem J Chin Univ*, 25, 1593(2004).

- [45] Q. Pang, B.C. Guo, C.L. Yang, S.H. Yang, M.L. Gong, W.K. Ge, et al., *J Cryst Growth*, 269, 213(2004).
- [46] F.T. Quitlan, J. Kuther, W. Tremel, W. Knoll, S. Risbud, P. Stroeve, *Langmuir* 16, 4049(2000).
- [47] C.F. Hoener, K.A. Allan, A.J. Bard, A. Campion, M.A. Fox, T.E. Mallouk, et al, *J Phys Chem*, 96, 3812(1992).
- [48] A. Kortan, R. Hull, R. Opila, M. Bawendi, M. Steigerwald, P. Carroll, L. Brus, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 1327(1990).
- [49] B. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. Miculec, J. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. Jensen, M. Bawendi, *J. Phys. Chem. B.*, 101, 9463(1997).
- [50] R. Kho, Torres-Martínez, and R. Mehra, *J. Colloid and Interface Science* 227, 561(2000).
- [51] S. Santra, H. Yang, P.H. Holloway, J.T. Stanley, R.A. Mericle, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 1656(2005).
- [52] H.S. Yang, P.H. Holloway, S. Santra, *J. Chem. Phys.* 121, 7421(2004).
- [53] S.J. Rosenthal, J. McBridge, S.J. Pennycook, L.C. Feldman, *Surface Science Reports*, 62 (2007) 111-157.
- [54] B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou, A. Libchaber, *Science*, 298 (5599), 1759(2002).
- [55] S. Pathak, S.K. Choi, N. Arnhiem, M.E. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 4103(2001).
- [56] W.Z. Guo, Y.A. Wang, X.G. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 2293(2002).
- [57] S. Kim, M.G. Bawendi, *Science* 281, 2013(1998).
- [58] D. Gerion, F. Pinaud, S.C. Williams, W.J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, et. al., *J. Phys. Chem. B*, 105, 8861(2001).
- [59] M.A. Correa-Duarte, M. Giersig, L.M. Liz-Marzan, *Chem. Phys. Lett* 286, 497(1998).
- [60] S. Miyasaki, H. Yamaguchi, M. Takada, W.M. Hou, Y. Takeichi, H. Yasubuchi, *Acta Farm. Nordica* 2, 401(1990).
- [61] M. Hines, P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.*, 100, 468(1996).
- [62] X.Y. Wu, H.J. Liu, J.Q. Liu, et al., *Nature Biotechnol.*, 21 (1), 41(2003).
- [63] X.H. Gao, Y.Y. Cui, R.M. Levenson, L.V.K. Chung, S.M. Nie, *Nature Biotechnol.* 22 (8), 969(2004).
- [64] C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, et al., *Nano Lett.*, 4(4), 703(2004).
- [65] P. Sonar, K.P. Sreenivasan, T. Maddanimath, K. Vijayamohan, *Materials Research Bull.*, 41, 198(2006).
- [66] Y. Jin, Y. Zhu, X. Yang, H. Jiang, C. Li, *J. Colloid and Interface Science*, 301, 130(2006).
- [67] T.G. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Chap 8, Academic Press, London, 1996.
- [68] H. Mattoussi, J.M. Mauro, E.R. Goldman, T.M. Green, G.P. Anderson, V.C. Sundar, and M.G. Bawendi, *Phys. Stat. Sol. B*, 224, 277(2001).
- [69] E.R. Goldman, H. Mattoussi, P.T. Tran, G.P. Anderson, and J.M. Mauro, *Semiconductor Quantum Dots*, Eds. Fafard S, Huffaker D, Leon R, and Noetzel, *Materials Research Society Proc.*, Vol. 642, J2.8.1-J2.8.6, Pittsburgh 2001.
- [70] E.L. Wolf, *Nanophysics and Nanotechnology*, Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- [71] Y. Nishioka, H. Yoshino, *Adv. Drug Deliv. Res.* 47, 55(2001).
- [72] J.K. Vasir, M.K. Reddy, V.D. Labhasetwar, *Curr. Nanosci.*, 1, 47(2005).
- [73] M.C. Garnett, *Adv. Drug Deliv. Res.* 53, 171(2001).
- [74] C.W. Warren, N. Shumig, *Science*, 281, 2016(1998).
- [75] I.L. Medintz, H.T. Uyeda, E.R. Goldman, H. Mattoussi, *Nat Matter* 4, 435(2005).
- [76] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd Edition, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2008.
- [77] T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocock, M. Imani, A. M. Seifalian, *Biomaterials*, 28, 4717(2007).
- [78] J.F. Weng, J.C. Ren, *Curr. Med. Chem.* 13, 897(2006).
- [79] M.E. Akerman, W.C.W. Chan, P. Laakkonen, S.N. Bhatia, E. Ruostahiti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 12617(2002).
- [80] L. Dyadyusha, H. Yin, S. Jaiswal, T. Brown, J.J. Baumberg, F.R. Booy, et al., *Chem. Commun.*, 3201(2005).
- [81] Y.F. Chen, Z. Rosenzweig, *Anal. Chem.* 74, 5132(2002).
- [82] Y. Li, Q. Ma, X. Wang, X. Su, *Luminescence* 74, 5132(2007).
- [83] T.V. Torchynska, M. Dybiec, and S. Ostapenko, *Phys. Rev. B*, 72, 195341(2005).
- [84] C. Luccardini, C. Tribet, F. Vial, V. Marchi-Artzner, M. Dahan, *Langmuir*, 22, 2304(2006).
- [85] W.C.W. Chan, D.J. Maxwell, X.H. Gao, M.Y. Han, S.M. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 40(2002).
- [86] L. Qu, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 2049(2002).
- [87] L.F. Shi, Z. Rosenzweig, *Anal. Chem.* 79, 208(2007).
- [88] X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, et al., *Science* 307, 538(2005).
- [89] A.R. Clapp, I.L. Medintz, B.R. Fisher, G.P. Anderson, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 1242(2005).
- [90] Y. Xiao, P.E. Barker, *Nucleic Acids Res*, 32(3), e28(2004).
- [91] A. Matsuno, J. Itoh, S. Takekoshi, T. Nagashima, R.Y. Osamura, *J. Histochem. Cytochem*, 53(7) 833(2005).
- [92] A. Sukhanova, M. Devy, L. Venteo, et al., *Anal Biochem.*, 324(1), 60(2005).
- [93] M. Dahan, T. Laurence, F. Pinaud, et al., *Opt Lett.*, 26(11), 825(2001).
- [94] D.M. Willard, L.L. Carillo, J. Yung, A. Van Orden, *Nano Lett.*, 1, 469(2001).
- [95] R. Mahtab, J.P. Rogers, and C.J. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 909(1995).
- [96] X.H. Gao, L.L. Yang, J.A. Petros, F.F. Marshal, J.W. Simons, S.M. Nie, *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 36(2005).
- [97] F. Pinaud, X. Michalet, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, et al., *Biomaterials* 27, 1679(2006).
- [98] T. Pellegrino, L. Manna, S. Cudera, T. Liedl, D. Koktysh, A.L. Rogach, et al., *Nano Lett.*, 4, 703(2004).
- [99] J.O. Winter, T.Y. Liu, B.A. Korgel, C.E. Schmidt, *Adv. Matter* 13, 1673(2001).
- [100] J.K. Jaiswal, E.R. Goldman, H. Mattoussi, S.M. Simon, *Nat. Methods* 1, 73(2004).
- [101] D.R. Larson, W.R. Zipfel, R.M. Williams, S.W. Clark, M.P. Bruchez, F.W. Wise, et al., *Science* 300, 1434(2003).
- [102] S. Kim, Y.T. Lim, E.G. Soltesz, DeGrand, J. Lee, A. Nakayama, et al., *Nat Biotechnol.*, 22, 93(2004).

- [103] Y.T. Lim, S. Kim, A. Nakayama, N.E. Stott, M.G. Bawendi, J.V. Frangioni, *Mol. Imaging* 2, 50(2003).
- [104] D.R. Larson, W. Zipfel, S. Clark, M. Bruchez, F. Wise, W.W. Webb, *Biophys. J.*, 84, 23a(2003).
- [105] S. Maenosono, T. Okubo, and Y. Yamaguchi, *J. Nanopart. Res.*, 5, 5(2003).
- [106] T.P. Tran, E.R. Goldman, G.P. Anderson, J.M. Mauro, and H. Mattoussi, *Phys. Stat. Sol. (b)*, 1, 427(2002).
- [107] A.M. Smith, S. Dave, S. Nie, L. True, and X. Gao, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 6(2), 231(2006).
- [108] C.P. Soman, and T.D. Giorgio, *Am. Chem. Soc.*, Published on Web 03/12/2008.
- [109] T.V. Torchynska, A. Diaz Cano, M. Dybiec, S.S. Ostapenko, M. Moralez Rodriguez, S. Jiménez-Sandoval, Y. Vorobiev, C. Phelan, A. Zajac, T. Zhukov, T. Sellers, *phys. stat. solid. (c)*, 4 (2), 241(2007).
- [110] T.V. Torchynska, J. Douda, S.S. Ostapenko, S. Jiménez-Sandoval, C. Phelan, A. Zajac, T. Zhukov, T. Sellers, *J. Non-Crystal. Solids*, 354, 2885(2008).
- [111] T.V. Torchynska, J. Douda, P.A. Calva, S.S. Ostapenko, R. Peña Sierra, *J. Vac. Sci. Technol. B*, 27(2), 836(2009).
- [112] T.V. Torchynska, J. Douda, R. Peña Sierra, *phys. stat. solid. (c)*, 6 (S1), S143 (2009).
- [113] T.V. Torchynska, *Nanotechnology*, 20, 095401 (2009).