UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE TELECOMUNICACIÓN

CONTRIBUCIÓN A LAS TECNOLOGÍAS
HIPERTÉRMICAS MEDIADAS POR
NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIAS
ANTICANCERÍGENAS

TESIS DOCTORAL

Oscar Ernesto Simón Casanova Carvajal

Ingeniero en Electrónica

2018

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA
FOTÓNICA Y BIOINGENIERÍA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE
TELECOMUNICACIÓN
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

CONTRIBUCIÓN A LAS TECNOLOGÍAS
HIPERTÉRMICAS MEDIADAS POR
NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIAS
ANTICANCERÍGENAS

TESIS DOCTORAL

Autor:

Oscar Ernesto Simón Casanova Carvajal

Ingeniero en Electrónica

Director: José Javier Serrano Olmedo

Doctor Ingeniero de Telecomunicación

2018

LABORATORIO DE BIOINSTRUMENTACIÓN Y
NANOMEDICINA

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

CONTRIBUCIÓN A LAS TECNOLOGÍAS
HIPERTÉRMICAS MEDIADAS POR
NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIAS
ANTICANCERÍGENAS

TESIS DOCTORAL

Autor:

Oscar Ernesto Simón Casanova Carvajal

Ingeniero en Electrónica

Director: José Javier Serrano Olmedo

Doctor Ingeniero de Telecomunicación

2018

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE TELECOMUNICACIÓN

CONTRIBUCIÓN A LAS TECNOLOGÍAS
HIPERTÉRMICAS MEDIADAS POR
NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIAS
ANTICANCERÍGENAS

TESIS DOCTORAL

Oscar Ernesto Simón Casanova Carvajal

Ingeniero en Electrónica

2018

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA
FOTÓNICA Y BIOINGENIERÍA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE
TELECOMUNICACIÓN
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

CONTRIBUCIÓN A LAS TECNOLOGÍAS
HIPERTÉRMICAS MEDIADAS POR
NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIAS
ANTICANCERÍGENAS

TESIS DOCTORAL

Autor:

Oscar Ernesto Simón Casanova Carvajal

Ingeniero en Electrónica

Director:

José Javier Serrano Olmedo

Doctor Ingeniero de Telecomunicación

2018

TESIS DOCTORAL

CONTRIBUCIÓN A LAS TECNOLOGÍAS
HIPERTÉRMICAS MEDIADAS POR
NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIAS
ANTICANCERÍGENAS

Autor: Oscar Ernesto Simón Casanova Carvajal

Director: José Javier Serrano Olmedo

Tribunal nombrado por el Magfco. y Excmo. Sr. Rector de la
Universidad Politécnica de Madrid, el día 17 de Julio de 2018.

Presidente:

Secretario:

Vocal:

Vocal:

Vocal:

Suplente:

Suplente:

Realizado el acto de defensa y lectura de tesis el 20 de de Julio del
2018 en el salón de actos de la Escuela Técnica Superior de
Ingenieros en Telecomunicación de la Universidad Politécnica de
Madrid.

Calificación:

EL PRESIDENTE:

EL SECRETARIO

D/D^a.

D/D^a.

EL VOCAL

EL VOCAL

D/D^a.

D/D^a.

EL VOCAL

D/D^a.

LABORATORIO DE BIOINSTRUMENTACIÓN Y
NANOMEDICINA

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

CONTRIBUCIÓN A LAS TECNOLOGÍAS
HIPERTÉRMICAS MEDIADAS POR
NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIAS
ANTICANCERÍGENAS

TESIS DOCTORAL

Autor:

Oscar Ernesto Simón Casanova Carvajal

Ingeniero en Electrónica

Director: José Javier Serrano Olmedo Doctor Ingeniero de
Telecomunicación

2018

Agradecimientos

En esta memoria está plasmada parte del trabajo que he llevado a cabo durante los cuatro últimos años en el Laboratorio de Bioinstrumentación y Nanomedicina (LBN) del Centro de Tecnología Biomédica (CTB) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM). Me gustaría agradecer sinceramente a todas aquellas personas que han contribuido directa o indirectamente en la realización de este proyecto de investigación.

Estas palabras son un pequeño homenaje a todos aquellos que en mayor o menor medida me han ayudado e influido para alcanzar esta meta que hace algunos años veía lejana e incierta. A ellas están dedicadas estas líneas. Agradezco a Dios y a la Virgen por concederme el regalo de la vida y haberme guiado por el camino del bien colocando personas estupendas en mi vida que han contribuido para lograr ser la persona que soy hoy.

Mi agradecimiento profundo a mi Director de tesis el Dr. José Javier Serrano, quien me orientó y aconsejó a lo largo de todos estos años, por el tremendo apoyo recibido, consejos y tutorías. Muchas gracias amigo José Javier, sin ti esto no hubiese sido posible.

A mi familia, en especial a mis papás, Angela Maritza y Simón Oscar que proporcionaron la plataforma familiar para realizar una carrera universitaria: A ti madre de mi vida, que me has apoyado siempre, tus palabras, tu cariño e infinito amor, así como tu ejemplo de perseverar me fortaleció siempre durante momentos duros que se presentaron en este camino, siempre me animaste, por ello GRACIAS, te amo. A ti papá por siempre estar en todo momento aconsejándome, tu amor infinito hacia nosotros siempre es percibido, también GRACIAS papá, te amo. A ti Marian, mi niña bella que ahora te volviste una mujer profesional, trabajadora y una madre increíble, mil GRACIAS hermana. A mi abuela René y a todos mis tíos GRACIAS, en especial a Finool, Teresa, Marisol y José Luis, espero que me alcance el tiempo para devolverles tanto y, en especial a ti Doctora López, gracias por el apoyo, esto empezó hace muchos años en aquella conversación que tuvimos en casa de mi abuela Alejandrina, cuando yo para ese tiempo, estaba con dudas si abandonar Ingeniería Electrónica e incursionar en Medicina, todo empezó ese día millones de GRACIAS para ti.

A ti Daniel García amigo y compañero de tantos años, tus palabras de ánimo siempre estuvieron presentes en todo momento, hay que sentirse orgulloso de todos estos logros, para ti millones de GRACIAS. A mis amigos del laboratorio esos que la vida me puso para apoyarme en este camino, Cristina, Nazario, Nancy, Marcos, Michael, Andrés, Soledad, Laura, Francisco, Rodolfo, Carlos, y aquí no puede faltar Lorena que siempre ha estado en muchos de los momentos más difíciles, gracias por el apoyo y tus palabras, mil GRACIAS amiga. A la doctora Milagros Ramos y el Doctor Ricardo Martínez para ustedes mil GRACIAS por permitirme aprender de vuestro conocimiento. A todos mis amigos, mis primos y personas involucradas en este proyecto, las palabras no alcanzan para tanto, para ustedes mil GRACIAS. Para todos Dios los bendiga.

Dedicatoria

Este proyecto está dedicado a esas cinco personas indispensables en mi vida, quienes no necesitan ser nombradas, les dedico este trabajo de cuatro años de mi vida.

“Esta contribución es poco para lo que ustedes significan para mí”

LOS AMO INFINITAMENTE

Oscar Casanova

Resumen de la Tesis de Oscar Ernesto Simón Casanova Carvajal, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR en INGENIERÍA BIOMÉDICA

Madrid, 28 de junio de 2018.

CONTRIBUCIÓN A LAS TECNOLOGÍAS HIPERTÉRMICAS MEDIADAS POR NANOPARTÍCULAS PARA TERAPIAS ANTICANCERÍGENAS

Palabras clave:

Nanopartículas, Nanopartículas Magnéticas SPIONs, Magnetómetro por Gradiente Alternante (AGM), Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo (FFCR), ferrofluidos, Nanopartículas de Oro, cultivos celulares, glioblastoma.

RESUMEN:

Tras la fusión de la nanotecnología con la medicina y la bioingeniería, se crearon campos de investigación en nanomedicina y nanobioingeniería, lo que amplió la perspectiva de las investigaciones médicas y las nuevas fronteras emergentes. Estas investigaciones han permitido nuevos métodos de abordaje para encontrar soluciones a problemas biológicos humanos de larga data y el desarrollo y administración de diagnósticos, terapéuticos o farmacológicos. Para lograrlo, se han desarrollado nanopartículas, que son agentes miniaturizados, los cuales han dado paso a la nanomedicina. Por un lado, las nanopartículas de oro utilizadas en este estudio son *nanorods* (GNR) recubiertas con proteína G, un receptor común para anclar anticuerpos mecánicamente. El tipo de nanorod utilizado permitió elegir estas nanopartículas de oro, bastante comunes en aplicaciones biomédicas. En la realización de la investigación desarrollada juega un papel de la mayor importancia la hipertermia, la cual se refiere a la aplicación de calor para destruir células malignas por inducción de apoptosis a través de la desnaturalización de proteínas y la ruptura de membranas celulares, con la aplicación de las nanopartículas de oro se generó hipertermia óptica para mejorar la terapia *in-vitro*, así como también se realizaron avances considerables en aplicaciones *in-vivo* con modelos animales (ratones C57/BL6). En la hipertermia magnética, la conversión de energía electromagnética en calor generado por SPIONs sometidas a campos magnéticos alternos (HAC) se puede utilizar para causar la muerte de células tumorales. Estudios recientes han demostrado que la respuesta magnética, y por lo tanto la eficiencia de calentamiento de SPIONs, se reduce significativamente cuando estas nanopartículas se colocan en líquidos portadores viscosos y dentro de células vivas o tejidos biológicos. La mayor viscosidad del entorno biológico y la distribución espacial o la aglomeración de nanopartículas dentro de los orgánulos intracelulares influyen fuertemente en la eficacia de SPIONs para aumentar la temperatura del medio circundante. Estos factores que surgen de la interacción nano-bio hacen que la eficiencia del calentamiento en aplicaciones *in-vivo* sea menos eficiente y previsible que en los ferrofluidos ideales. Se realizaron avances considerables en ambas técnicas, en hipertermia óptica se investigó hasta obtener mejoras en la introducción de material dispersantes y biocompatible de luz como el sílice. Los resultados sugieren una mejora en todas las variables involucradas en el sistema como: potencia irradiada, tiempo de exposición al láser, concentración de nanopartículas de oro (*nanorods*) y mantenimiento de la tasa de mortalidad en células cancerígenas (CT2A) frente a líneas celulares consideradas sanas (MC3T3). En el caso de la hipertermia magnética se diseñó y construyó un sistema electrónico que permite generar formas de onda excitadoras distintas a las convencionales (sinusoidales), se realizaron ensayos de tolerancia a las nanopartículas que son empleadas en dicho sistema, así como se demostró el fenómeno físico existente cuando las SPIONs son fagocitadas por las células, aplicando un emulador del interior intracelular y utilizando materiales biocompatibles como la fibroína de seda de gusano.

Abstract of the thesis of Oscar Ernesto Simon Casanova Carvajal, presented as partial requirement to obtain the DOCTOR degree in BIOMEDICAL ENGINEERING.

Madrid, June 28th, 2017.

CONTRIBUTION TO HYPOTHERMAL TECHNIQUES MEDIATED BY NANOPARTICLES FOR ANTICANCER THERAPIES

Keywords:

Magnetic Nanoparticles SPIONs, Alternating Gradient Magnetometer (AGM), Fast Field Cycling Relaxometry (FFCR), ferrofluids, Gold Nanoparticles, cell cultures, glioblastoma.

Abstract:

After the fusion of nanotechnology with medicine and bioengineering, fields of research in nanomedicine and nanobioengineering were created, which broadened the perspective of medical research and emerging new frontiers. These investigations have allowed new methods of approach to find solutions to long-standing human biological problems and the development and administration of therapeutic or pharmacological diagnoses. To achieve this, nanoparticles have been developed, which are miniaturized agents, which have given way to nanomedicine. The gold nanoparticles used in this study are nanorods (GNR) coated with G protein, a common receptor for mechanically anchoring antibodies. In this research hyperthermia plays a role of greatest importance which refers to the application of heat to destroy malignant cells by induction of apoptosis through the denaturation of proteins and the rupture of cell membranes. The application of gold nanoparticles generated by optical hyperthermia improve *in-vitro* therapy, and considerable advances were made *in-vivo* for animal models. In magnetic hyperthermia, the conversion of electromagnetic energy into heat generated by SPIONs subjected to alternating magnetic fields (HAC) can be used to cause the death of tumour cells. Recent studies have shown that the magnetic response, and therefore the heating efficiency of SPIONs, are significantly reduced when these nanoparticles are placed in viscous carrier liquids and within living cells or biological tissues. The higher viscosity of the biological environment and the spatial distribution or agglomeration of nanoparticles within the intracellular organelles strongly influence the efficacy of SPIONs to increase the temperature of the surrounding medium. These factors that arise from the nanobio-interaction make the heating efficiency in *in-vivo* applications less efficient and predictable than in ideal ferrofluids. Considerable advances were made in both techniques, in optical hyperthermia it was included until obtaining improvements in the introduction of dispersant material and biocompatible light such as Silica. The results suggested a considerable improvement in all the variables involved in the system such as irradiated power, time of exposure to the laser, concentration of gold nanoparticles (nanorods) and maintaining the mortality rate in cancer cells (CT2A) against cell lines considered healthy (MC3T3). In the case of magnetic hyperthermia, an electronic system was designed and built to generate excitatory waveforms different from conventional ones (sinusoidal), tolerance tests were carried out on the nanoparticles that will be used in the system. Also, it was demonstrated the existing physical phenomenon when the SPIONs are phagocytized by the cells, applying an intracellular interior emulator using biocompatible materials such as worm silk fibroine.

INDICE

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	- 1 -
1 NANOMEDICINA Y NANOTECNOLOGÍA.....	- 1 -
1.1 TERAPIAS DE HIPERTERMIA Y CÁNCER.....	- 2 -
1.2 Hipertermia óptica y nanopartículas de oro.....	- 2 -
1.3 Hipertermia magnética	- 4 -
1.4 ESTADO DEL ARTE	- 7 -
CAPÍTULO II HIPÓTESIS, OBJETIVOS, METODOLOGÍA.....	- 19 -
2.1 HIPÓTESIS.....	- 19 -
2.2 OBJETIVOS	- 19 -
2.3 METODOLOGÍA	- 20 -
CAPÍTULO III DESARROLLO	- 21 -
3.1 EXPERIMENTOS CON MATERIALES INERTES.....	- 21 -
3.1.1 Hipertermia óptica.....	- 21 -
3.1.1.1 Materiales dispersantes de luz	- 21 -
3.1.1.1.1 Caracterización óptica de nanopartículas y micropartículas	- 26 -
3.1.1.2 Soluciones de fibroína de seda de gusano	- 33 -
3.1.1.3 Disoluciones de fibroína con nanopartículas de oro	- 33 -
3.1.2 Hipertermia Magnética.....	- 37 -
3.1.2.1.1 Caracterización de fluidos viscosos, las nanopartículas AGM y el relajómetro	- 37 -
3.1.2.1.2 Caracterización coloidal.....	- 39 -
3.1.2.1.3 Estudio del comportamiento magnético.....	- 40 -
3.1.2.1.4 Adaptación del equipo para ensayos <i>in-vitro</i> e <i>in-vivo</i> . Diseño del Módulo Físico	- 57 -
3.2 EXPERIMENTOS <i>IN-VITRO</i>	- 58 -
3.2.1 Hipertermia Magnética.....	- 58 -
3.2.1.1 Cultivos Celulares.....	- 58 -
3.2.1.2 Viabilidad celular	- 59 -
3.2.1.2.1 Viabilidad celular en los portamuestras PMMA-AGM	- 59 -
3.2.1.2.2 Adherencia celular en los portamuestras PMMA-AGM	- 60 -
3.2.1.2.3 Viabilidad celular después de la incubación con SPIONs.....	- 61 -
3.2.1.2.4 Localización intracelular de las SPIONs	- 62 -

3.2.1.2.5	Estudio de la magnetización (M) de las SPIONs libres y unidas a las células	- 63 -
3.2.1.2.6	Análisis Estadístico	- 64 -
3.2.1.2.7	Resultados	- 64 -
3.2.1.2.8	Influencia de la viscosidad del medio en la relajatividad (r_1) de las SPIONs	- 68 -
3.2.1.2.9	Influencia de la internalización celular de las SPIONs en la magnetización.....	- 69 -
3.2.1.2.10	Evaluación de la viabilidad celular en los portamuestras PMMA-AGM	- 69 -
3.2.1.2.11	Evaluación de la adherencia celular en los portamuestras PMMA-AGM	- 70 -
3.2.1.2.12	Evaluación de la viabilidad celular después de la incubación con SPIONs	- 71 -
3.2.1.2.13	Tiempo de vida celular fuera del incubador	- 72 -
3.2.1.2.14	Localización intracelular de las SPIONs.....	- 73 -
3.2.1.2.15	Análisis del magnetismo de las SPIONs dentro de las células NIH/3T3	- 74 -
3.2.1.3	Experimentos con osteoblastos de ratón cepa celular MC 3T3 y CT2A	- 76 -
3.2.1.3.1	Ensayos de control de la estructura de aislamiento térmico	- 77 -
3.2.1.3.2	Experimentos de citotoxicidad	- 78 -
3.2.2	Hipertermia Óptica	- 82 -
3.2.3	Soluciones con nanopartículas y micropartículas	- 82 -
3.2.3.1	Optimización de la técnica de hipertermia óptica con material dispersante	- 84 -
3.3	EXPERIMENTOS <i>IN-VIVO</i>	- 88 -
3.3.1	Hipertermia Óptica	- 88 -
3.3.1.1	Experimentos con glioblastoma murino de ratón CT-2A.....	- 88 -
3.3.1.1.1	Modelo de tumor de ratón	- 89 -
3.3.1.1.2	Histopatología.....	- 91 -
3.3.1.1.3	Inmunohistoquímica.....	- 92 -
3.3.1.1.4	Biofuncionalización de nanopartículas de oro con anticuerpo CD133..	- 93 -
3.3.1.1.5	Dispositivo y parámetros	- 94 -
3.3.1.1.6	Terapia de Hipertermia Óptica	- 94 -
3.3.1.1.7	Mediciones de temperatura	- 94 -
3.3.1.1.8	Adquisición de MRI.....	- 95 -
3.3.1.1.9	Estudios ultraestructurales.....	- 96 -
3.3.1.1.10	Resultados.....	- 97 -
CAPÍTULO IV DISCUSIÓN.....		- 105 -

4.....	- 105 -
4.1 HIPERTERMIA ÓPTICA	- 105 -
4.2 HIPERTERMIA MAGNÉTICA	- 107 -
CAPÍTULO V CONCLUSIONES.....	- 109 -
CAPÍTULO VI MEJORAS Y TRABAJOS FUTUROS.....	- 112 -
BIBLIOGRAFÍA	- 113 -
ANEXO 1	- 121 -

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.Comparativa de la eficiencia fototérmica de los <i>nanoshells</i> y los <i>nanorods</i> [61].....	- 8 -
Figura 2. A. Muestras de tumores de aproximadamente 1cm ³ después de someterlos a distintos métodos. B. Gráfica de la absorción respecto a la longitud de onda de <i>nanorods</i> (AuNRs), <i>nanoshells</i> (Au@Sio), nanocom y nanocom-Dox [64].....	- 9 -
Figura 3. Curva de temperatura ajustada a 20°C de una muestra de 500ul de NPs irradiada a 1W durante 30 min y 20 min posteriores.....	- 24 -
Figura 4. Fuente de laser 800 nanómetros.....	- 25 -
Figura 5. Curvas ajustadas a 20°C de la evolución de la temperatura en distintas muestras, poliestireno, sílice y agua a un volumen de 50μL de dispersante, y 450 μL de NRs a dos potencias 1 y 2W (500 μL total).	- 26 -
Figura 6. Ajuste lineal de absorbancia del polietileno.	- 29 -
Figura 7. Ajuste lineal de absorbancia de la sílice.	- 30 -
Figura 8. Ajuste logarítmico de la absorbancia de la sílice.....	- 30 -
Figura 9. Ajuste lineal de la absorbancia del polietileno + oro.....	- 31 -
Figura 10. Ajuste lineal de la absorbancia de la sílice + oro.....	- 32 -
Figura 11. Evolución de la temperatura de fibroínas respecto al tiempo, sometidas a 1W de potencia del láser durante 30 min y 20 min sin irradiar.	- 34 -
Figura 12. Evolución de la temperatura de fibroínas respecto al tiempo, sometidas a 2W de potencia del láser durante 30 min y 20 min sin irradiar con láser.	- 35 -
Figura 13. Caracterización óptica de películas de seda de fibroína a) Espectro de transmisión b) Espectro de absorción[82].	- 36 -
Figura 14. Variaciones máximas de temperaturas en las muestras de fibroínas con oro a 1 y 2W de potencia radiada. Media de las tres réplicas en cada medida y la barra de error es la desviación estándar.....	- 36 -
Figura 15. a) Patrón de difracción de Rayos X. b) Imagen representativa de TEM de NpSMs sintetizado.....	- 38 -
Figura 16. Caracterización coloidal de las NpSMs.	- 39 -
Figura 17. Fuente de tensión empleada.	- 42 -
Figura 18. Configuración del inversor en puente completo.	- 42 -
Figura 19. Foto del inversor desarrollado por el CEI-UPM.....	- 42 -
Figura 20. Señales de control de disparo transistores. Fase desplazada.....	- 43 -
Figura 21. Foto bobina actual.....	- 44 -
Figura 22. Simulación bobina f=800 kHz I=9A.....	- 44 -
Figura 23. Ilustración del equipo de medidas.....	- 45 -
Figura 24. Calorímetro.....	- 45 -
Figura 25. Termómetro de fibra óptica.	- 46 -
Figura 26. Sonda con resistencia para caracterización de la camisa.....	- 46 -
Figura 27. Corriente medida en la bobina de la onda más triangular posible (amarillo).....	- 49 -
Figura 28. Corriente medida en la bobina de la onda trapezoidal (amarillo)..	- 50 -

Figura 29. Corriente medida en la bobina de la onda más cuadrada posible.	- 50 -
Figura 30. Gráfica de un experimento para la caracterización.	- 51 -
Figura 31. P/I_0^2 en función de la frecuencia.	- 54 -
Figura 32. Datos del ensayo B con ajuste lineal.	- 54 -
Figura 33. Datos del ensayo C con ajuste lineal.	- 55 -
Figura 34. Gráfica de resultados experimentales y teóricos ensayo B.	- 56 -
Figura 35. Valor de R_{eq} respecto a la frecuencia de los ensayos A, B y C.	- 56 -
Figura 36. Diseño del recinto para cultivos celulares.	- 57 -
Figura 37. Prototipo del aislante térmico para ratones.	- 58 -
Figura 38. Células NIH/3T3 cultivadas en portamuestras PMMA-AGM y ubicadas en una placa multipocillo P24 para facilitar su almacenamiento y manipulación.	- 60 -
Figura 39. Microscopio de fluorescencia.	- 62 -
Figura 40. Curvas de magnetización como función del campo magnético (H) de SPIONs suspendidas en fluidos inertes con dos diferentes concentraciones de nanopartículas. A) 2.5 mg/ml y B) 10mg/ml.	- 65 -
Figura 41. Caracterización magnética de los fluidos inertes. Curvas de magnetización en función del campo (H) realizadas a temperatura ambiente de los fluidos inertes (agua deionizada y soluciones de fibroína a distintas viscosidades).	- 66 -
Figura 42. Curvas de magnetización normalizadas (M/M_s vs H) de SPIONs suspendidas en agua deionizada y SPIONs en sólido tomadas a temperatura ambiente. Las SPIONs fueron suspendidas a diferente concentración (2.5mg/ml y 10mg/ml).	- 66 -
Figura 43. Curvas de magnetización normalizadas (M/M_s vs H) de SPIONs suspendidas en agua desionizada y soluciones de fibroína a una concentración de 2.5 mg/ml. Las curvas de magnetización se llevaron a cabo también a las SPIONs en sólido y todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.	- 67 -
Figura 44. Perfiles de dispersión de la relajación magnética nuclear (NMRD). Medida de los perfiles de dispersión de la relajación magnética nuclear (NMRD) para diferentes intensidades de campo magnético en dispersiones de nanopartículas de óxido de hierro de 14 nm suspendidas en agua deionizada y soluciones de fibroína a distintas viscosidades y una concentración de 2mM.	- 68 -
Figura 45. Viabilidad celular en los portamuestras PMMA-AGM. A) Ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células NIH/3T3 incubadas durante 24, 48 y 72 horas en los portamuestras PMMA-AGM. B) Comparación de la viabilidad celular de los portamuestras PMMA-AGM y las placas multipocillos P24 a 24 horas. Los datos están expresados como la media $\pm$ SEM, el error estándar de la media, en inglés (Standar Error Medium) de n=4 experimentos independientes. * $p < 0.05$; (Test de ANOVA).	- 70 -
Figura 46. Adherencia celular en los portamuestras PMMA-AGM. Ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células 3T3 incubadas durante 24, 48 y 72 horas en los portamuestras PMMA-AGM. Los	

datos representan la cuantificación de la adherencia celular. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de n=3 experimentos independientes. *p<0.05; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).....	- 71 -
Figura 47. Viabilidad de células NIH/3T3 incubadas con SPIONs. Imágenes de microscopía de fluorescencia para el ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células 3T3 incubadas durante 24 horas con SPIONs de 14 nm a 0 (A), 1 mg/ml (B) y 2.5 mg/ml (C). Barra de escala= 50 μ m. (D) Representa la cuantificación de la viabilidad celular para cada condición. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de n=4 experimentos independientes. *p<0.05; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).....	- 72 -
Figura 48. Porcentaje de viabilidad celular respecto al tiempo de vida fuera de las condiciones ambientales óptimas de crecimiento celular. Ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células 3T3 incubadas con SPIONs durante 24 y posteriormente expuestas a condiciones ambientales externas durante 0.5, 1 y 2 horas. Los datos representan el porcentaje de viabilidad celular para en los diferentes tiempos. Cada valor indica la media $\pm$ SEM de n=4 experimentos independientes. *p<0.05; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).....	- 73 -
Figura 49. Localización intracelular de SPIONs de 14 nm de tamaño en células NIH/3T3. Imágenes de microscopía de fluorescencia de SPIONs de 14 nm sin recubrimiento. Las nanopartículas han sido incubadas en células NIH/3T3 durante 24h. Las SPIONs se muestran bajo transmisión de luz (A). Las células se tiñen con un marcador específico para lisosomas (B). Barra de escala= 50 μ m.....	- 74 -
Figura 50. Comparación del comportamiento magnético de SPIONs internalizadas en células NIH/3T3 y fuera del interior celular. Comportamiento magnético de SPIONs de 14 nm incubadas en células NIH/3T3 durante 24 horas. Se llevan a cabo las mediciones de las curvas de histéresis (M-H) cuando las SPIONs están internalizadas en los orgánulos celulares y posteriormente cuando son liberadas de las células. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de n=6 experimentos independientes. *p<0.05; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).....	- 75 -
Figura 51. Células incubadas durante 24 horas con SPIONs. A- grupo de control; B- [0,625] mg/ml; C- [1,25] mg/ml; D- [2,5] mg/ml; E- [5]mg/ml.....	- 79 -
Figura 52. Células incubadas durante 48 horas A-Grupo Control; B- [0,625] mg/ml; C- [1,25] mg/ml; D- [2,5] mg/ml; E- [5]mg/ml 48 horas con NPM.	- 79 -
Figura 53. Células incubadas durante 24 (A1; A2) y 48 (B1; B2) horas con una [10] mg/ ml de NPM.	- 79 -
Figura 54. Viabilidad de CT2A a 24 y 48h.	- 80 -
Figura 55. Viabilidad celular de MC3T3 a las 24 y 48 horas.	- 81 -
Figura 56. Diagrama de bloques resumen de la optimización de la técnica de hipertermia óptica.....	- 85 -
Figura 57. A Graficas de mortalidad celular en CT2A a 10 minutos de irradiación, 900 mWatt. B Graficas de mortalidad celular en MC3T3 a 10 minutos, 900 mWatt.	- 86 -

Figura 58. CT2A: 900 mW a 10 minutos. A. Grupo Control. B. Grupo Sílice. C. Grupo GNRs. D. Grupo GNRs más sílice.	- 86 -
Figura 59. Diagrama de barras de ensayos inertes de los diferentes grupos a 900 mW durante 10 minutos.....	- 88 -
Figura 60. Proliferación celular como se ve por tinción de H & E y MRI. Los paneles A, B representan imágenes ponderadas en T1 (gadolinio poscontraste) correspondientes al mismo tumor experimental CT-2A representado en B, C, respectivamente, que muestran la progresión tumoral a diferentes niveles rostro-caudal dos semanas después del implante celular. Observe que en A y B la señal hiperintensa está restringida al CP en el hemisferio derecho. El recuadro en D muestra una imagen mitótica cerca de un vaso sanguíneo neoformado. Barras de escala: A, B = 5 mm; C, D = 1 mm, inserción en D = 15µm.	- 90 -
Figura 61. Diagrama del resumen de la metodología.	- 91 -
Figura 62. Metodología para medir temperatura.	- 95 -
Figura 63. La proliferación celular como se ve por RMN y tinción de H & E. Los paneles A, B representan imágenes ponderadas en T1 (gadolinio poscontraste) correspondientes al mismo tumor experimental CT-2A representado en B, C, respectivamente, que muestran la progresión tumoral a diferentes niveles rostro-caudal, dos semanas después del implante celular. Observe que en A y B la señal hiperintensa está restringida al CP en el hemisferio derecho. El recuadro en D muestra una imagen mitótica cerca de un vaso sanguíneo neoformado. Barras de escala: A, B = 5 mm; C, D = 1 mm, inserción en D = 15µm.	- 97 -
Figura 64. Caracterización de tumores cerebrales inducidos por CT-2A. A. Secciones coronales de 1 mm de grosor a través del mismo cerebro de ratón con una masa tumoral hemorrágica CT-2A situada en el hemisferio cerebral derecho, 28 días después de la inyección de células CT-2A. La fotografía fue tomada después de la resonancia magnética (B) in vivo y la extracción del cerebro en el momento de la necropsia para la histología. B, los paneles representan imágenes ponderadas en T1 (gadolinio poscontraste) a diferentes niveles rostro-caudal correspondientes al mismo tumor experimental CT-2A representado en A, que muestra la progresión tumoral cuatro semanas después del implante celular. Observe en B una señal hiperintensa en el borde del tumor que indica que el borde del tumor está bien vascularizado y también una hipoatenuación en regiones centrales del tumor que sugiere necrosis. Barras de escala: A, B = 4 mm.	- 98 -
Figura 65. A. Imagen de microscopía electrónica de células tumorales CT-2A teñidas con osmio que ilustran el aspecto ultraestructural de las células tumorales en la zona de transición con el cuerpo estriado. Las células tumorales muestran pleomorfismo citológico con nucléolos prominentes, procesos delgados y heterocromatina característica. Observe las fibras mielínicas adyacentes del cuerpo estriado en el neurópulo circundante y el edema aparente, lo que sugiere una inflamación del tejido. B, Micrografía de luz que muestra la deposición intratumoral de B-GNR unida a las células tumorales	

como se revela por tinción inmunohistoquímica, capilares cercanos. En C y D, el producto de inmunorreacción parece etiquetar nanopartículas que se acumulan intracelularmente (flechas grandes). C y D, ilustran la ubicación subcelular de los complejos que forman el producto final de inmunorreacción B-GNR unidos a la membrana nuclear (C) y orgánulos intracelulares (D). E, es un aumento de potencia superior del producto de reacción mostrado en C que muestra la inmunorreactividad de B-GNR asociada con la membrana nuclear. Barras de escala: A = 15 μm ; B = 100 μm ; C = 5 μm ; D = 0,25 μm- 100 -

Figura 66. Caracterización inmunocitoquímica de tumores cerebrales inducidos en ratones C57BL / 6, 21 días después de la implantación de la línea celular CT-2A. Las micrografías claras A-C ilustran las células positivas Ki67 (A, B) y CD133 (C) en la masa tumoral. Observe en A que numerosos vasos sanguíneos intratumorales (asteriscos) se ven en la masa tumoral. También en B, las células positivas para ki67 exhiben un producto de inmunorreacción en el núcleo celular de las células que se organiza típicamente alrededor de un capilar. Además, ver en C punta del producto de inmunorreacción de CD133 restringido a células tumorales. El color amarillo en la parte inferior del lado izquierdo en C representa una región hemorrágica. D, ilustra la neoangiogénesis asociada a tumor mediante tinción de inmunofluorescencia doble para BrdU (núcleo celular, rojo) y Nestina (endotelio proliferante, verde). Como se informó previamente para los gliomas humanos, la inmunorreactividad de Nestin se encontró como un marcador en este estudio para el endotelio proliferativo en el modelo CT-2A. El recuadro en D, muestra detalles de un capilar proliferante anómalo. Barras de escala: A = 500 μm ; B = 200 μm ; C = 50 μm ; D = 100 μm ; Recuadro en D = 50 μm- 101 -

Figura 67. Volumen tumoral, expresado como un porcentaje del volumen total del cerebro, en ratones control (PBS + láser) y B-GNRs + láser (CD133-GNR), en la semana 1 y la semana 2 (períodos de tiempo después de la irradiación con láser). Los datos representan la media $\pm$ SEM de n = 3 experimentos independientes. La prueba t de Student reveló una diferencia significativa (p = 0,03) entre control y CD133-GNR en la semana 1. El grupo CD133-GNR alcanzó un mayor beneficio de significación ** en la semana 2 (p = 0,008). - 102 -

Figura 68. Imágenes de MRI de dos ratones elegidos al azar de ambos grupos: Control (A, B) y CD133-GNR para 'Semana 1' (A, C: tres semanas después del implante CT-2A) y 'Semana 2' (B, D: cuatro semanas después del implante CT-2A) postratamiento, respectivamente. Estas imágenes muestran una aparente desaceleración en la progresión del tumor en el grupo CD133-GNR.- 103 -

Figura 69. Modelo RC del sistema térmico.- 121 -

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen estado del arte hipertermia magnética.	- 11 -
Tabla 2. Concentraciones en las muestras irradiadas (NRs: <i>nanorods</i>).	- 22 -
Tabla 3. Experimentos de validación.	- 47 -
Tabla 4. Experimentos de la caracterización de la onda excitadora.	- 48 -
Tabla 5. Valores de los experimentos para los cálculos del modelo térmico. . -	51
-	
Tabla 6. Valor de la capacidad y conductancia térmica.	- 52 -
Tabla 7. Valores de la magnetización de las SPIONs suspendidas en fluidos inertes e internalizadas en cultivos celulares NIH/3T3.	- 76 -
Tabla 8. Concentraciones de NPM utilizadas.	- 77 -
Tabla 9. Relación de volúmenes para soluciones.	- 84 -

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

1 NANOMEDICINA Y NANOTECNOLOGÍA

La unión de la nanotecnología con la medicina y la bioingeniería permitió crear nuevos campos de investigación tanto en nanomedicina como en nanobioingeniería, lo que desarrolló la perspectiva de las investigaciones médicas y abrió nuevas fronteras. Estos desarrollos han permitido implementar nuevas metodologías para abordar soluciones a varios de los problemas biológicos humanos de vieja data, el desarrollo y la administración de diagnósticos terapéuticos o farmacológicos [1]. Se podría decir que sus objetivos fundamentales son el de transportar diversas cargas útiles para el diagnóstico nuevo y mínimamente invasivo, la administración dirigida de productos terapéuticos, la eficacia mejorada de una terapia y/o tratamiento existente y la monitorización en tiempo real del tratamiento establecido. Para ello se desarrollaron agentes miniaturizados como son las nanopartículas, lo que dio paso a la nanomedicina.

En los últimos años, la nanomedicina ha progresado rápidamente y se ha definido como el uso de materiales con dimensiones en el rango de escala nanométrica para un propósito de diagnóstico o terapéutico específico. Estos avances en nanotecnología han permitido el desarrollo de nanoestructuras de oro con propiedades ópticas que son útiles en aplicaciones biomédicas, como administración de fármacos, terapia de hipertermia y agentes de contraste de imagen debido a su biocompatibilidad y capacidad de ajuste óptico [2], [3]. Las nanopartículas de oro son muy atractivas para el diagnóstico y la terapia del cáncer, enfermedad considerada como la segunda causa de muerte en el mundo según la Organización Mundial de la Salud [4], porque el oro es casi un material inerte (alta resistencia a la corrosión), tiene baja toxicidad y es fácil anclar ligandos biocompatibles a su superficie [5].

Las nanopartículas de oro utilizadas en este estudio son *nanorods* (GNR) recubiertas con proteína G, un receptor común para anclar anticuerpos mecánicamente. El tipo de nanorod utilizado permitió elegir las nanopartículas de oro, bastante comunes en aplicaciones biomédicas [2], [6], [7], para facilitar la comparabilidad de los resultados obtenidos en el laboratorio con los de otros investigadores. Estas nanopartículas de oro con recubrimiento de PEG han sido muy eficientes en el desarrollo de las investigaciones puesto que son un material altamente biocompatible destinado especialmente para ensayos *in-vitro*.

1.1 TERAPIAS DE HIPERTERMIA Y CÁNCER

La hipertermia juega un papel muy relevante en la realización de esta investigación. Esta se refiere a la aplicación de calor para destruir células malignas por inducción de apoptosis a través de la desnaturalización de proteínas y la ruptura de membranas celulares [8], [9]. Existen diversas técnicas de hipertermia donde se usa una fuente de calor diferente en cada una, sin embargo, en hipertermia óptica la luz láser es la fuente utilizada principalmente. Esta luz láser es altamente confiable en este tipo de hipertermia debido a sus características de monocromaticidad, coherencia y colimación [10], utilizada en una región de infrarrojo cercano (o NIR) debido a la profunda penetración del tejido biológico por su muy baja absorción por molécula de agua y hemoglobina en esta región espectral[11]. Entre otras técnicas de hipertermia óptica, se encuentra la terapia fotodinámica [3], o la fotoquimioterapia, basada en el empleo de fotosensibilizadores químicos; el uso de nanotubos de carbono [12] también es efectivo, especialmente por sus características de absorción de la luz visible, la luz láser NIR y la irradiación de radiofrecuencia y su transformación en calor. También existe la terapia fototérmica (PTT)[13] que consiste en el uso de agentes fotoabsorbentes de cromóforos naturales o moléculas externas de colorantes añadidos, este proceso requiere altas energías de irradiación NIR, debido a la baja absorción de la sección transversal y el fotoblanqueo que es el cambio inducido mediante luz en el grupo químico responsable bajo radiación láser, desventajas resultantes en el uso de nanopartículas de oro en lugar de agentes absorbentes, que es la técnica aplicada posteriormente.

1.2 Hipertermia óptica y nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (GNP) se utilizan exclusivamente en PTT recientemente debido a las propiedades del oro de resistir a la corrosión, su baja toxicidad, su biocompatibilidad y la facilidad de conjugar ligandos biocompatibles con su superficie, lo que hace que sea útil tanto en imágenes de diagnóstico [14], donde los agentes de orientación pueden optimizar la administración tumoral y, en la herramienta terapéutica, debido a las características ópticas de los GNP, muy útiles para la aplicación de la hipertermia óptica, por sus propiedades altamente fotoestables, mayor sección transversal de absorción, alta conversión de luz en calor y su variabilidad de absorción óptica que puede ajustarse en un amplio rango de longitud de onda[5]. Cuando las nanopartículas de oro se exponen a la luz de una frecuencia específica, se produce una oscilación colectiva resonante de los electrones de superficie libre que se denomina resonancia de plasmón superficial (SPR) [15], que se rige por su tamaño,

forma y composición de superficie [16]. Después de la absorción de la luz, los electrones de superficie se fotoexcitan y el haz de electrones resultante calentado se disipa en unos pocos picosegundos al medio circundante[3], donde el daño fototérmico resultante en los tejidos biológicos incluye ruptura de la membrana celular, desnaturalización de proteínas, deterioro de la síntesis de ADN y de ARN y apoptosis[9], [17]. Hay varios tipos de GNP y cada uno tiene diferentes características y sus propias ventajas y desventajas. Existe una gran cantidad de tipos de nanopartículas de oro, como nanoesferas de oro que se consideran las más básicas de todas las GNP, nanocables de oro que están hechos de un núcleo de sílice y una capa de oro que los rodean, nanoestrellas de oro y *nanorods* de oro (GNR) usados en los experimentos, siendo los GNP los de sección transversal de absorción más alta entre todas las nano formulaciones de oro, debido a su longitud de onda de dos aspectos, longitudinal y transversal, cuya variación de relación ajusta su absorción dentro de NIR y son conocidas por su pequeño tamaño, entre 20 nm y 40 nm [3], [5], [12].

Sin embargo, con el fin de aumentar el efecto de transformación de luz a calor, un elemento adyacente tuvo que ser introducido con los GNR, un componente que posee las características ópticas deseadas para la hipertermia óptica, en estos experimentos la sustancia utilizada fue sílice (SiO₂), que es una forma oxidada de silicio[18], [19]. Estas micropartículas de dióxido de silicio son la base de una gran cantidad de investigaciones biomédicas debido a su estabilidad, baja toxicidad y capacidad de funcionalizarse con una gama de moléculas y polímeros [20], lo que también lo hace apto para mezclarse con tejidos biológicos. Como las células de glioma de ratón CT2A.

La biofuncionalización de las técnicas de nanopartículas de oro son procedimientos bien conocidos para las tecnologías biomédicas tanto *in vitro* como *in vivo*[7], [21]. Se han presentado recientemente en otros estudios las aplicaciones de nanopartículas de oro para hipertermia de ensayo con animales[8], [21–23]. Particularmente, los tumores cerebrales en modelos animales permiten un mejor abordaje de la investigación preclínica, como se ha demostrado en el caso de la línea celular de glioblastoma CT-2A [2], [4], [24] que se utiliza en este trabajo como modelo tumoral. Esta línea celular sobreexpresa el receptor de membrana CD133 [23]. Hace poco tiempo, los anticuerpos CD133 se han empleado en nanomedicina, orientados hacia el carcinoma hepatocelular[25]. Dado que el modelo tumoral CT2A exhibe características comunes con la enfermedad del astrocitoma humano, se convierte en un excelente candidato para evaluar nuevos procedimientos contra el cáncer[26], [27].

En base al uso de *nanorods* de oro biofuncionalizados (B-GNR), junto con la irradiación láser (fuente de láser de onda continua de 808nm de longitud de onda), muestra evidencia que el procedimiento de hipertermia utilizado constituye la base para una nueva terapia anti-glioblastoma. Esta investigación informa, además, por primera vez, sobre los efectos benéficos de esta tecnología que limita la progresión del tumor de astrocitoma de ratón CT2A intracraneal. Los B-GNR mostraron una alta citocompatibilidad, como se informó previamente *in vitro*[3], [28]. Veintisiete ratones de laboratorio C57BL / 6 se inocularon estereotáxicamente con células de glioblastoma CT2A, administradas directamente en el cuerpo estriado. Después de dos semanas de crecimiento tumoral, los tumores resultantes se trataron con la técnica de hipertermia óptica en la que, para analizar los volúmenes tumorales, las mediciones se realizaron mediante resonancia magnética *in vivo*. Los datos obtenidos mostraron una detención en el crecimiento tumoral en ratones tratados en comparación con sus respectivos controles. La reducción en el volumen tumoral fue entre 15 y 75%. En dos ratones, pertenecientes a diferentes series experimentales, se observó una remisión prácticamente total de la imagen tumoral.

El glioblastoma es altamente infiltrante, por lo que la resección es problemática y la recurrencia frecuente. El tratamiento fototérmico complementó la cirugía de resección de la masa tumoral sólida mediante el tratamiento de células tumorales infiltradas dentro del entorno del tumor. Ensayos que combinan la resección quirúrgica de tumores y el tratamiento con hipertermia óptica, también están en curso.

1.3 Hipertermia magnética

Las terapias térmicas se han utilizado durante décadas como un medio para ayudar a la recuperación de diversas enfermedades, principalmente como un medio complementario para el uso de medicamentos y/o manipulaciones mecánicas en función de la aplicación específica [29]. En particular, el cáncer es una enfermedad bastante adecuada para ser tratada con calor ya que las células cancerosas son más sensibles al calor que las sanas. De hecho, la temperatura aumenta más de 43 °C por varios minutos y puede dañar seriamente esas células, que mueren por apoptosis algunas horas después del tratamiento, mientras que el resto de las células sobreviven (células sanas) [30]. El calentamiento es también una terapia adecuada contra el cáncer ya que los tumores son insensibles a las moléculas terapéuticas por varias razones, y especialmente en lugares difíciles de alcanzar, como el parénquima cerebral [31]. Sin embargo, ya sea que se utilicen ultrasonido o diferentes tipos de fuentes electromagnéticas, todas las técnicas convencionales sufren de los mismos

inconvenientes: no hay suficiente resolución espacial; precisión en la ubicación del volumen donde depositar la energía térmica; y, lo peor de todo es la dificultad para que la radiación aplicada atraviese tejidos sanos que permitan alcanzar el área deseada. Estos tejidos pueden recibir una cantidad de energía incluso mayor que los que son los objetivos que también se calientan innecesariamente [32]. Algunos esfuerzos están en progreso para mejorar los efectos descritos y se están investigando técnicas convencionales nuevas como el caso de *Focused Ultrasound* para superar estas acciones limitantes. Se usan algunos agentes intermedios previamente desplegados en su lugar, los cuales reciben la energía, asumiendo que ésta viaja a través de los tejidos vivos sin afectarlos y convierten parte de la energía en calor, calentando así su entorno. De esta forma, cada problema se ajusta en un nivel diferente: la resolución espacial y la ubicación se resuelven correctamente al desplegar los agentes, lo que es principalmente un problema químico-fisiológico, y la cantidad de energía y su aplicación es principalmente una cuestión de la fuente de energía. Una de estas nuevas técnicas es la denominada Hipertermia Magnética[33], [34]. La energía proviene de una fuente de radiofrecuencia de cientos de kilohercios y, en consecuencia, se utilizan nanopartículas de materiales ferromagnéticos (algunas décimas de nanómetros) como agentes intermedios. La radiofrecuencia también calienta los tejidos vivos debido a su carácter conductivo. Este inconveniente puede corregirse limitando la potencia de la fuente y se compensa en gran medida por el hecho de que la longitud de onda correspondiente es lo suficientemente grande como para llevar la energía sin importar el lugar en el cuerpo. Las partículas se magnetizan cuando la radiofrecuencia está presente y comienzan a vibrar, ya sea en todo el cuerpo o su momento magnético interno, o ambos. Cualquiera que sea el mecanismo de interacción entre las partículas y la radiofrecuencia, la energía mecánica se transforma en calor [35]

Un campo posible de investigación es cómo colocar las partículas en su lugar y determinar el tipo de partículas de una manera segura y efectiva, y otra es cómo excitar esas partículas para maximizar el calentamiento. Por supuesto, el objetivo es reducir tanto como sea posible la cantidad de partículas y de energía entregadas, mientras se mantiene la eficacia terapéutica. Aunque ambos campos están estrechamente relacionados y se puede establecer todo el enfoque y su composición con muchas más caras, hay espacio para trabajar con cierta independencia en el campo del problema de excitación. En este punto, el estado de la técnica se basa en el uso de formas de onda sinusoidales para el emisor de radiofrecuencia, ya que se obtienen fácilmente a una potencia moderadamente alta y necesaria de los circuitos resonantes. En realidad, no se trata tanto de una cuestión de poder, sino de que el calentamiento de las partículas es bastante pequeño ya que la cantidad de partículas

no es tan alta. Sin embargo, el material ferromagnético cuando se distribuye como partículas muy por debajo de un diámetro micrométrico, para mencionar un límite común, se vuelve superparamagnético. Los materiales superparamagnético no desarrollan campos magnéticos remanentes y necesitan una mayor saturación magnética. Cuanto mayor sea la magnetización de las partículas, mayor será la cantidad de energía radiada convertida en calor. Por lo tanto, la cuestión de la amplitud es de gran importancia. Los circuitos resonantes se han utilizado como un instrumento para esto ya que pueden proporcionar potencia de radiofrecuencia de gran amplitud. La cantidad de energía no es alta, pero, en principio, no es necesaria para este propósito. Se han llevado a cabo pocos trabajos para explorar otras formas de onda, aunque se ha demostrado para partículas ferromagnéticas que se puede lograr una mayor eficiencia que la excitación sinusoidal convencional[36]. El mecanismo que convierte la energía de radiofrecuencia en calor es diferente en el caso de los materiales ferromagnéticos. Sin embargo, dado que el tamaño de las partículas hechas de materiales superparamagnéticos es menor, son muy útiles como agentes intermedios en los tejidos vivos por razones histológicas.

La pregunta sobre el uso de otras formas de onda con partículas superparamagnético está abierta. La interacción de estas partículas con el ambiente líquido donde están en suspensión es realmente compleja y todavía bastante desconocida. Un trabajo previo, señala la existencia de una dependencia de las pérdidas en las partículas en la amplitud del campo magnético diferente del teórico para campos bajos. Al mismo tiempo, el movimiento estacionario de las partículas, logrado al usar la excitación armónica, podría tender a reducir la eficacia de los mecanismos de disipación [37].

Para verificar todos estos problemas en la búsqueda de formas más eficientes para proporcionar la energía de radiofrecuencia en futuras terapias basadas en la hipertermia magnética, se ha desarrollado un nuevo instrumento presentado en esta investigación. Al igual que en otros casos [38]–[41], un circuito de electrónica de potencia ayuda mucho cuando se trata de desarrollar una nueva investigación con fines médicos. La principal contribución de este instrumento es que permite realizar pruebas con formas de onda diferentes a las sinusoidales de una manera sencilla.

En la hipertermia magnética, la conversión de energía electromagnética en calor generado por SPIONs sometidas a campos magnéticos alternos (HAC) se puede utilizar para causar la muerte de células tumorales [42], [43]. Estudios recientes han demostrado que la respuesta magnética, y por lo tanto la eficiencia de calentamiento de SPIONs, se reduce significativamente cuando estas nanopartículas se colocan en líquidos portadores viscosos[44], [45] y dentro de células vivas o tejidos biológicos [46]–[53]. La mayor viscosidad del entorno biológico y la distribución espacial o la

aglomeración de nanopartículas dentro de los orgánulos intracelulares influyen fuertemente en la eficacia de SPIONs para aumentar la temperatura del medio circundante[46], [47], [54], [55]. Estos factores que surgen de la interacción nano-bio hacen que la eficiencia del calentamiento en aplicaciones *in vitro* sea menos eficiente y previsible que en los ferrofluidos ideales.

Cuando los SPIONs son capturados e internalizados por los macrófagos, se acumulan en orgánulos intracelulares como los lisosomas [53][47], [54]–[57], generando una disminución en los grados mecánicos de libertad en términos de rotación y traducción de SPIONs [42], [50], [58], que podría afectar su comportamiento magnético. Por otro lado, cuando los SPIONs se suspenden en un fluido viscoso, la viscosidad del medio y la concentración de nanopartículas pueden generar un cambio en los procesos de relajación del momento magnético de los SPIONs [34], [50], [59], [60]. El conocimiento preciso sobre la distribución, el destino y la localización espacial de los SPIONs dentro de un entorno biológico sigue siendo un desafío. Se necesita una mejor comprensión de las interacciones del sistema célula-nanopartícula para controlar y optimizar las propiedades magnéticas de los SPIONs para aplicaciones biomédicas.

Las mediciones de magnetización de saturación, obtenidas de curvas de histéresis dependientes del campo (M-H), se llevaron a cabo en un magnetómetro de gradiente alterno MicroMag™ 2900 (sistema AGM) diseñado por Princeton Measurements Corporation, que se adaptó para medir muestras líquidas. La relajometría por ciclado rápido de campo SMARTracer (FFCNMR), diseñada por Stelar, junto con un electroimán Bruker se usaron para medir los perfiles de dispersión magnética de relajación (NMRD) de los coloides magnéticos. El sistema de AGM modificado se usó para determinar el cambio en el comportamiento magnético de las SPIONs suspendidas en un medio líquido y en contacto con las células. Se descubrió que el cambio en las propiedades magnéticas de las SPIONs estaba influenciado por el medio viscoso, el entorno biológico y la concentración de SPIONs.

1.4 ESTADO DEL ARTE

La aplicación de la nanotecnología para fines médicos es lo que se conoce como nanomedicina. Dentro de este campo, existen numerosas aplicaciones e investigaciones orientadas al desarrollo de terapias contra el cáncer. Cabe destacar las terapias denominadas fototérmicas o de hipertermia, las cuales han formado parte de proyectos de investigación en el Laboratorio de Bioinstrumentación y Nanomedicina LBN.

Se han realizado diferentes estudios utilizando distintas formas de nanopartículas, para comprobar cómo afecta la forma de las nanopartículas en la hipertermia. Se ha observado que los *nanorods* tienen mejor eficiencia térmica que los nanoshells. Es decir, que los *nanorods* aprovechan casi el doble la radiación que les llega para transformarla en calor [61].

Figura 1.Comparativa de la eficiencia fototérmica de los *nanoshells* y los *nanorods*[61].

Además, los *nanorods* tienen una rápida síntesis y una fácil bioconjugación, lo que quiere decir que no es difícil asociarlos a la superficie de polímeros o de moléculas que sean biocompatibles como puede ser el polietilglicol y así evitar que el cuerpo reaccione a la presencia de cuerpos extraños como son las nanopartículas, además de tener más absorción del infrarrojo superficial que los nanocages y los nanoshells[13] (ver Figura 1).

En otro estudio se comprobó *in vivo* que la temperatura alcanzada por los *nanorods* era superior, pero en su caso, los *nanorods* estaban en una concentración mayor que los nanocages que se utilizaban, por lo que plantearon que la diferencia de temperaturas no es mucha, y que por relación concentración-temperatura los nanocages usados eran mejores[62].

También se han realizado estudios de la propagación de las nanopartículas en el organismo. Uno de estos estudios establece cómo se distribuyen las nanopartículas por los principales órganos y por los tumores cuando se inyectan intra-tumoralmente o por vía intravenosa. Observaron que las nanopartículas de oro recubiertas con PEG no producen ninguna toxicidad incluso a altas concentraciones. Además, comprobaron que los riñones empiezan a expulsar nanopartículas a las 24 horas de la inyección y que el órgano donde más nanopartículas se almacenan es el bazo[63].

Se ha estudiado además la integración de fármacos anticancerígenos con nanopartículas de oro. Esto permitiría un tratamiento avanzado de hipertermia llamado termoquimioterapia. El compuesto del fármaco con nanopartículas estudiado tiene dos máximos de absorción

Zhang et al comprobaron que irradiando con una longitud de onda correspondiente al primer pico de la curva de nanocom-dox, se liberaba el fármaco de la unión con las nanopartículas. Esto supone un tratamiento dirigido precisamente al lugar donde se quiere actuar en este caso los tumores. Pero, además de liberar el fármaco en las células tumorales, se provoca un calentamiento con una radiación de longitud de onda correspondiente al segundo pico. Esto produce que el metabolismo vaya más rápido y por tanto acelera el efecto del fármaco, además de que por la propia acción del calor se producen daños estructurales en las células.

En este estudio se hicieron pruebas en tumores de 1 cm^3 comprobando que con esta técnica se elimina prácticamente el tumor, además al comparar los resultados con los de otros métodos utilizados para obtener efectos similares se obtuvieron curvas que se muestran en la Figura 2[64].

Figura 2. A. Muestras de tumores de aproximadamente 1 cm^3 después de someterlos a distintos métodos. B. Gráfica de la absorción respecto a la longitud de onda de *nanorods*(AuNRs), *nanoshells*(Au@Sio), nanocom y nanocom-Dox [64].

Dentro de la combinación de terapias, se ha utilizado terapia génica cuyo objetivo es evitar la producción de la *heat shock protein* HSP27 en las células cancerígenas prostáticas e hipertermia óptica. Al evitar la producción de la *heat shock protein* se consigue que, al dañar las células con calor, no tengan mecanismos de defensa para evitar la desnaturalización de las proteínas y evitar la necrosis o apoptosis de las

células. Esta es una técnica muy interesante pero la potencia de radiación que se utiliza de 4W es muy alta y produce quemaduras[16].

La hipertermia trata de minimizar el daño en los distintos tejidos intentando ser lo más precisa posible atacando únicamente células tumorales y de provocarla con métodos mínimamente invasivos a diferencia de otros tratamientos como la quimioterapia o la radioterapia. Hoy en día la hipertermia no tiene uso clínico porque es muy difícil mantener y medir la temperatura además de que los métodos, hasta ahora desarrollados, son invasivos[65].

A manera de realizar un reporte de los trabajos destacados en el área, se muestra una revisión desarrollada por Salunkhe *et al.*, 2014 [32] denominada *Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles: a Status Review* en la que se muestra una comparación de distintos tipos de nanopartículas que han sido empleadas en distintos tipos de células. En la Tabla 1 a continuación. se muestra la composición de las nanopartículas, método de preparación, tamaño promedio de la nanopartícula, tipo de recubrimiento, propiedades magnéticas RT, magnitud del campo magnético aplicado (AMF), frecuencia empleada, SAR potencia de pérdidas específica, línea de células y los resultados obtenidos en cada medida.

Tabla 1. Resumen estado del arte hipertermia magnética.

Composición	Método de preparación	Media de tamaño NPMs	Recubrimiento	Propiedades Magnéticas	Amplitud de Campo (a/m)	Frec. (kHz)	SAR (W/g)	Línea Celular	Resultados	Referencia
Fe ₃ O ₄	Descomposición térmica	19±3	PEG	Ms=80emu/gHc=0Oe	29	520	2452	KB células cancerígenas	Mortalidad de células de un 50% en equilibrio de temperatura de 430C, 1 hora de tratamiento.	[48]
Fe ₃ O ₄	Spray-co-precipitación	10.3	Quitosano	Ms= 25.6 emu/g, Hc = 580Oe	-	150	64.6	L929 & KB células cancerígenas	NPMs con recubrimiento con quitosano muestra una alternativa prometedora para la técnica de hipertermia magnética.	[66]
		10.3	Starch	Ms=16.4 emu/g, Hc=72.3 Oe	-	150	62.3			

ZnGd0.02Fe 1.98o4	Co- precipita- ción	20-30	PEG	Tc=318K	6.5	60	-	Células hu- áreas endotelial es vascular	Alta generación de calor con baja citotoxicidad.	[67]
Fe ₃ O ₄	reacción de condensa- ción hidrólisis	8.0	Cisteína	Ms= 24 emu/g, Hc = 0Oe	100 Oe	230KHz	156	Glioma (GL) 261	Método versátil para la funcionaliza- ción de la superficie.	[68]
γ- Mn0.2Fe1.8 O ₃	Descompo- sición térmica	5-28	Acrypol	Ms= 78 emu/g- 1, Hc =< 10Oe	150 Oe	425kHz	22.8 a 370C	Células H eLa	Primer reporte de la investigación sobre la muerte de células empleando hipertermia magnética.	[69]
γ-Fe ₂ O ₃	Método Massart	5nm	Sílica	-	200 Oe	100KHz	-	Células A549,	El cultivo celular muestra que	[70]

								células HeLa, células Saos-2, células HepG2.	ajustando la cantidad de NPMs, el tiempo de exposición y la magnitud de campo de intensidad leve a alta el calor puede ser archivado.	
γ -Fe ₂ O ₃	Sol-gel	5-10nm	Silica	Ms=2.5emu/g Hc=3.44 Oe	12mT	141kHz	20	-	Esta publicación ayuda a la comprensión del modelado del calentamiento del tejido <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , y ayuda a comprender el fenómeno de entrega de calor	[71]

									en el tratamiento de hipertermia en tumores sólidos.	
Fe ₃ O ₄	Co-precipitación	-	-	Ms=16emu/g Hc=284 Oe	-	~750-1150kHz	-	Células HFL1	La generación de calor con los compuestos nanofibrosos, reduce la proliferación y crecimiento de células malignas. [72]	
Fe ²⁺		-	-	Ms=27.2 emu/g, Hc=298 Oe.	-	~750-1150kHz	-	Células HFL1		
Fe ₃ O ₄	Co-precipitación	28nm	Suero de albúmina bovina	-	6.3kAm ⁻¹	400kHz	36	CélulaHeLa	BSA es un recubrimiento estable en una variedad de medios, provee rápido y eficiente calentamiento bajo AMF condiciones, no [73]	

									se observó citotoxicidad.	
La _{0.56} (SrCa) 0.22MnO ₃		150 nm	Sílica	Ms=30emu/g	15mT	100kHz	-	CélulaHe La	La muestra celular se activa aun cuando el incremento de temperatura durante el tratamiento de hipertermia es menor a 0.50C.	[74]
γ-Fe ₂ O ₃	Co- precipita- ción	10 y 20nm	PEG	-	88mT	108kHz	13±3	KB 3-1, MCF7, celulaHeL a	La investigación se enfoca en la construcción de un equipo de hipertermia con un gran solenoides en el cual el campo magnético aplicado pueda	[75]

									ser homogéneo en todo el portamuestra.	
$\gamma\text{-MnxFe}_2\text{-xO}_3$		~30nm	934	Ms=25-78emu/g	150 Oe	425kHz	22-28 W/g	CélulaHeLa	El tratamiento produce un rompimiento en el citoesqueleto, actina y microtubulares y el núcleo de la célula de HeLa, lo cual produce una muerte celular. El rompimiento del citoesqueleto es la razón de la muerte celular.	[76]
Fe/MgO		75nm	MgO	Ms=210emu/g	8-29 kAm-	765 kHz	100-	MDA-MB-231 y	Las partículas logran mayor	[77]

		(±16%)			1		500	células MCF7	eficiencia térmica en menor tiempo, se encontró un valor de SAR proporcional a la intensidad de campo magnético e inversamente proporcional a la concentración de las partículas.	
La _{0.56} (SrCa) 0.22MnO ₃	Método Cerámico	150 nm	sílica	T _c =317K	H=15mT	100KHz	-	CélulaHe La	La aplicación de campo magnético durante 30min produce daño celular ocasionando muerte celular,	[74]

									incluso cuando el incremento de temperatura fue menor a 0.5oC.	
Fe ₃ O ₄	comprado	15(2)	dextran	Ms=68.0 emu/g, Hc=15(5) Oe	12.7 Ka/m	250kHz	-	Céluladen drítica	El cultivo de células dendríticas contiene entre 0.5 y 8 pg de Fe ₃ O ₄ por célula, mostrando una clara disminución de células una vez que se aplica el tratamiento por 10 min.	[78]

CAPÍTULO II HIPÓTESIS, OBJETIVOS, METODOLOGÍA

2

2.1 HIPÓTESIS

Se considera que, a través del desarrollo del equipo de hipertermia magnética, ajustando parámetros no tradicionales como la utilización de formas de onda arbitrarias y una reducción en las concentraciones de las nanopartículas magnéticas que permitan una baja toxicidad, se pueda producir una muerte celular en células cancerígenas, tomando en cuenta el efecto magneto-visco existente en las muestras biológicas.

Es posible mediante la de la técnica de hipertermia óptica, mejorar la transmisión de la energía, para producir un calentamiento efectivo, a través de ajustes en la instrumentación, modificaciones en los elementos de transmisión de luz, y uso de nanopartículas adecuadas para tal fin, para así producir una muerte celular de las células cancerígenas in-vitro e in-vivo.

2.2 OBJETIVOS

Se plantean los siguientes objetivos en el desarrollo de este proyecto:

1. Construir un equipo de hipertermia magnética, que permita utilizar formas de onda arbitrarias, para lograr una disminución importante en la concentración de las nanopartículas de óxido de hierro, para ello se plantea realizar ensayos, pruebas de toxicidad comenzando con ensayos in-vitro.
2. Estudiar el efecto magneto-viscoso presente en las muestras biológicas en hipertermia magnética, se propone emplear fluidos viscosos utilizando biomateriales para emular la viscosidad del medio intracelular.
3. Optimizar la técnica de hipertermia óptica utilizando materiales dispersantes de luz, con la finalidad de elevar la eficiencia, disminuyendo concentraciones de oro, manteniendo la biocompatibilidad.
4. Realizar experimentación in-vivo (con ratones C57/BL6) en animales aplicando hipertermia óptica, para ello se optimizará la metodología de cirugía esterotáxica intracraneal explorando nuevas tecnologías, en modelos

animales con el fin de medir efectividad de la técnica aplicada, utilizando el modelo de glioblastoma murino CT2A.

2.3 METODOLOGÍA

El Centro de Tecnología Biomédica dispone de una serie de recursos que fueron utilizados para el desarrollo de esta tesis: a. Laboratorio de bioinstrumentación y nanomedicina. b. Laboratorio de modelos animales y celulares. c. Animalario. d. Plataforma de Caracterización de Nanopartículas Magnéticas (NANOMAG). Dentro de las actividades desarrolladas en este proyecto se enumeran las siguientes:

Hipertermia Magnética:

- a. Construcción de un equipo, que permita utilizar formas de onda arbitrarias.
- b. Realización de pruebas de toxicidad en ensayos in-vitro, determinación de las máximas concentraciones soportadas, utilizando diferentes líneas celulares.
- c. Estudio del efecto magneto-viscoso, presente en muestras biológicas.

Hipertermia Óptica:

- a. Optimización de la aplicación de calor aplicando mezcla de nanopartículas de oro y biomateriales dispersantes de luz.
- b. Aplicación de la metodología en ensayos in-vitro con efectos secundarios bajos en los tejidos sanos circundantes.
- c. Perfeccionamiento de la metodología implementada en la cirugía esterotáxica intracraneal en ratones.

La integridad de la interacción inmunológica entre anfitrión y GBM hace que estos modelos constituyan una excelente herramienta para estudiar la inmunidad antitumoral, así como la eficacia y toxicología del perfil de los enfoques inmunoterapéuticos para GBM xenoinjertos. En este caso, CT-2A serán implantados en ratones C57BL/6. Como en el humano, el crecimiento de gliomas murinos implantados ortotópicamente requiere un alto grado de angiogénesis. El modelo CT-2A imita el cáncer humano y por lo tanto se pudo usar como sistema modelo para la investigación del cáncer. Modelos de tumores singénicos producidos por la implantación de cualquiera CT-2A cumplieron los criterios de los modelos tumorales válidos. Estos modelos tumorales exhiben características histopatológicas similares de la enfermedad humana incluidos la necrosis, la neovascularización y la proliferación endotelial, lo que sugiere la presencia de un ambiente hipóxico en el ratón GBM, como se ha descrito en pacientes humanos. Además, durante la angiogénesis se pueden producir efectos rápidos en la arquitectura vascular resultando en vasos con fugas, lo que podría abrir una oportunidad para delinear un posible tratamiento eficaz.

CAPÍTULO III DESARROLLO

3.1 EXPERIMENTOS CON MATERIALES INERTES

Para iniciar el proceso de optimización de las técnicas hipotérmicas mediadas por nanopartículas se utilizaron medios no vivos, para ello se empleó una serie de caracterizaciones y mejoras que a continuación se describen de acuerdo a la técnica empleada.

3.1.1 Hipertermia óptica

Dentro de la técnica de hipertermia óptica se utilizaron tres tipos distintos de elementos con el fin de mejorar características como temperatura, tiempo y concentraciones, para aumentar la eficiencia de la técnica. Para disminuir las concentraciones de nanopartículas de oro se usaron materiales dispersantes de luz como elementos incorporados al sistema.

3.1.1.1 Materiales dispersantes de luz

Se emplearon dos tipos de material microparticulado en forma de esfera, denominados material dispersante que a los valores de incidencia de luz del láser (808 nm) refleja la luz y tiene valores de absorción muy bajos, provocando rebotes de luz en diferentes direcciones.

Las microesferas de poliestireno utilizadas en los experimentos de hipertermia asociados a este equipo son de poliestireno dispersas en agua deionizada, con un diámetro de 3 μm , a una concentración del 5% (Kisker, PPs-3).

Estas microesferas presentan un índice de refracción de 1,5894 y un coeficiente de absorción despreciable en la zona del infrarrojo cercano (Near-Infrared, NIR)[79], ya que la parte compleja del índice de refracción del poliestireno, que es la que se relaciona con la absorción, tiende a cero a 808nm. El coeficiente de extinción molar de estas microesferas es igual al coeficiente de *scattering* puesto que el coeficiente de absorción es despreciable a la frecuencia del láser utilizado en el sistema de hipertermia óptica (808 nm), teniendo un valor de 29,491 (mm^{-1}).

Las microesferas de sílice utilizadas en los experimentos de hipertermia son microesferas de sílice dispersas en agua deionizada, con un diámetro de 3 μm , a una concentración del 5% (Kisker, PSi-3.0). Estas microesferas presentan un índice de refracción de 1,46 y un coeficiente de absorción despreciable en la zona del infrarrojo cercano. El coeficiente de *scattering* es de 18,949 (mm^{-1}). Las partículas de sílice son estables en agua y disolventes orgánicos. Estas partículas son fáciles de funcionalizar y son útiles en el acoplamiento del ADN, oligonucleótidos, oligopéptidos, proteínas, lectinas y anticuerpos. Son biodegradables y biocompatibles.

En este experimento se utilizaron tres tipos de muestras con distinto material dispersante, sílice y poliestireno. La primera fue una mezcla de *nanorods* de oro con agua destilada como muestra control, la segunda fue una mezcla de *nanorods* con microesferas de poliestireno y la tercera fue una mezcla de *nanorods* con microesferas de sílice, estas dos últimas con la misma proporción de agua destilada para homogeneizar sus características.

Los tres tipos de muestras siguieron el mismo proceso de preparación. Se utilizaron tres cantidades distintas del material dispersante, 150, 100 y 50 μL respectivamente, y cada muestra se completó añadiendo *nanorods* hasta obtener un total de 500 μL de muestra total. Las concentraciones de los distintos compuestos en cada muestra se presentan en la Tabla 2.

Se utilizaron las concentraciones de los compuestos del fabricante para evitar al máximo los errores que pudieran surgir al pipetear y al cambiar las concentraciones de los materiales.

Tabla 2. Concentraciones en las muestras irradiadas (NRs: *nanorods*).

	NRs y Agua	NRs y Sílice o Poliestireno	
	Oro ($\mu\text{g/mL}$)	Oro ($\mu\text{g/mL}$)	Sílice o Poliestireno (mg/mL)
Tipo 1	31,5	31,5	5
Tipo 2	28	28	10
Tipo 3	24,5	24,5	15

Medición

Para realizar la medición se encendieron el sensor f100 y el láser, éste último se debe encender unos 30 minutos antes de empezar a medir para su estabilización. Se realizó una comprobación con el detector de potencia en el ordenador utilizando el programa PowerMax PC y cuando la potencia se estabiliza se procedió a la medición.

El programa ULOG debe estar abierto. Se tomaron mediciones sin colocar el láser durante 1 min aproximadamente para obtener medidas estables de la temperatura ambiente y realizar luego un ajuste de temperatura. Se conectó en el colimador del soporte que apunta a la muestra.

Se tomaron medidas con el láser conectado durante 30 minutos, después se desconectó la fibra y se continuó midiendo durante 20 minutos más, así se obtuvo la curva de calentamiento hasta una temperatura estable y la curva de enfriamiento hasta la temperatura ambiente. Finalmente, a los 50 minutos aproximadamente se detuvo la medición.

Tratamiento de datos

Se realiza el ajuste a 20 grados de la temperatura ambiente. Este ajuste se realizó con las medidas tomadas durante el primer minuto y cuando el láser no estaba todavía colocado se obtuvo un promedio de las medidas de cada canal. Todas las medidas conseguidas en cada canal son llamadas ch1 y ch2.

Se calculó la diferencia $Dif = avch1 - avch2$, el cual se sumó a los datos del canal 2 y restando la media de los primeros datos del canal 1. A ese *array* de datos se le llama $k = ch2 + dif - avch1$. Seguidamente se calculó la diferencia de los datos del canal 1 con los datos del *array* k, llamando a este nuevo *array* $j = ch1 - k$.

Se calculó la diferencia entre la media de los primeros datos del canal 2 con la temperatura a la que se quería ajustar el experimento, es decir, veinte grados (20 °C), $r = avch2 - 20$. Por último, se restó esta última variable obtenida a la variable j obtenida anteriormente $ch1adj = j - r$, y así se obtuvo el *array* de temperaturas del canal 1 ajustado a una temperatura ambiente de 20°C.

Figura 3. Curva de temperatura ajustada a 20°C de una muestra de 500ul de NPs irradiada a 1W durante 30 min y 20 min posteriores.

Con los datos calculados anteriormente se creó una gráfica de temperatura a lo largo del tiempo en el que se observa la temperatura de la muestra ajustada a una temperatura ambiente de 20°C.

Por último, se realizó un ajuste exponencial de la curva del calentamiento o la de enfriamiento (Figura 3). Este ajuste se basa en la formula $T = T_0 + \Delta T_{max} \cdot (1 - e^{t/\tau})$ que es una fórmula de tipo Boltzmann esto se debe al modelo térmico del sistema (Anexo 1) donde 'T' representa las temperaturas que se van a calcular, 'T₀' es la temperatura inicial, ' ΔT_{max} ' es la diferencia de temperatura entre la temperatura máxima alcanzada por la muestra y la temperatura ambiente, 't' es el tiempo y, por último, ' $\tau(s)$ ' es la constante de tiempo térmica característica del sistema [80].

Medidas realizadas

Se realizaron medidas a dos potencias del láser, a 1 W/cm² y a 2W/cm², utilizando dos materiales dispersantes con las nanopartículas, sílice y poliestireno, y un control con agua, a tres concentraciones distintas.

Caracterización del sistema

Este sistema, se calibró para las condiciones establecidas (20 ° C), permitiendo obtener una constante de tiempo térmica del sistema $\tau(s) = \bar{x} \pm \sigma = 219,76 \pm 16,10$. Este parámetro evalúa la viabilidad del sistema afirmando en este caso que es un sistema fiable.

Radiación con luz láser

La radiación con luz láser, la cual es parte esencial del proceso de hipertermia óptica, fue llevada a cabo en la estructura descrita en los apartados anteriores para los ensayos inertes. El proceso de radiación se lleva a cabo una hora después de haber contaminado los pocillos con las soluciones de micropartículas y nanopartículas correspondientes (Figura 4).

Figura 4. Fuente de laser 800 nanómetros.

Resultados

A continuación, se muestran los datos de temperaturas procesados obtenidos por el sensor F100 de las distintas medidas realizadas en este experimento.

En la Figura 5 se observa en barras las muestras de las distintas soluciones estudiadas, las concentraciones analizadas en volumen 350 agua y 150 μL , 100 μL y 50 μL de las soluciones de poliestireno y sílice respectivamente, además la figura muestra las curvas de temperatura a 1W. Al analizar dicha muestra se evidencia que la concentración 400-100 es la apropiada para combinarla con las nanopartículas de oro; al igual que en el sílice (Figura 5.b.) la concentración más idónea es la concentración 400-100, en muestras irradiadas con láser a 1W, sin embargo en la Figura 5.c. se observó una pequeña diferencia, existe un aumento leve en las

muestras a concentraciones 450-50 a una potencia de irradiación de 2W y, por último, la Figura 5.d. muestra la concentración 400-100 con el mejor comportamiento frente a esta potencia irradiada.

Figura 5. Curvas ajustadas a 20°C de la evolución de la temperatura en distintas muestras, poliestireno, sílice y agua a un volumen de 50μL de dispersante, y 450 μL de NRs a dos potencias 1 y 2W (500 μL total).

En todos los casos la muestra compuesta de nanopartículas de oro y sílice calienta considerablemente más que las otras muestras en ambas potencias (4 a 7°C). Por tanto, se puede decir que la hipótesis es correcta y que al utilizar sílice los rayos rebotan en las micropartículas provocando que más rayos incidan en las nanopartículas.

3.1.1.1.1 Caracterización óptica de nanopartículas y micropartículas

Para esta investigación y con el propósito de lograr una optimización del proceso de hipertermia óptica, se caracterizaron de forma óptica cada uno de los materiales empleados en el proceso experimental. Puesto que el propósito de estudio fue determinar el resultado de añadir ciertas micropartículas en conjunto con los *nanorods* de oro, fue indispensable conocer la caracterización óptica de las microesferas de sílice y las microesferas de polietileno. El parámetro de interés empleado para medir la actividad óptica fue la densidad óptica[80].

La densidad óptica a una longitud de onda concreta se define en términos de absorbancia como el cociente entre la absorbancia a esa longitud de onda y la

longitud de paso definida como el parámetro característico de la ecuación de Lambert-Beer.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Se trata de una magnitud que sirve como medida de un elemento óptico a través de su absorción por unidad de distancia, para una longitud de onda dada.

En primer lugar, se determinó cuál era el espectro de absorción de estas partículas en el espectro visible, y se observó que éste era prácticamente plano en todas las longitudes de onda, con lo cual se pasó a medir la actividad óptica de diferentes volúmenes de una suspensión de estos materiales en diferentes proporciones.

Para el procedimiento se empleó un espectrofotómetro de ultravioleta visible, midiendo la absorbancia a dos longitudes de onda, 550 nm y 700 nm, elegidas con el criterio de que estuviesen separadas lo suficiente como para comprobar que la actividad óptica no variaba con este parámetro; lo cual se deduce del espectro plano de absorción en el espectro visible que se había obtenido.

El protocolo experimental que se empleó para este estudio difiere de los estudios de espectrofotometría convencionales, debido a que, por la viscosidad característica de las suspensiones de estos materiales, fue difícil medir los volúmenes con la precisión suficiente. Por tanto, se desarrolló un protocolo diferente que permitiese cierta reproducibilidad de los datos, dado que, debido al factor de viscosidad, el error experimental que se generaba al realizar las medidas en volumen era demasiado elevado. El estudio se realizó como sigue:

1. Se realiza la calibración del espectrofotómetro tomando un blanco de agua destilada.
2. Se mide la masa de un tubo eppendorf en una balanza de precisión y a continuación, se coloca la muestra de volumen V.
3. Se vuelve a medir la masa del tubo con la muestra en la misma balanza y se calcula la diferencia de masas con el fin de obtener la masa de la muestra.
4. Se divide la masa de la muestra entre la densidad que se pretende que tenga al ser introducida en el espectrofotómetro, y se le añade el volumen de agua resultante de la operación

De esta manera se obtiene diluido el volumen exacto de muestra que se pretende estudiar. El siguiente paso fue introducir la muestra en el espectrofotómetro y medir su absorbancia. Se realizaron tres medidas para cada volumen y para cada tipo de

material, obteniéndose sus curvas de absorción con su error de medida correspondiente.

3.1.1.1.1 Resultados de la caracterización óptica de nanopartículas y micropartículas

Se estudiaron las diferentes curvas de absorción óptica obtenidas, con el fin de caracterizar la propiedad de las partículas empleadas en los ensayos posteriores.

En primer lugar y después de realizar un ajuste lineal a la curva obtenida tras medir la absorbancia de microesferas de polietileno, se puede apreciar en la Figura 5 como la tendencia para ambas longitudes de onda sigue la función característica de la ecuación de Lambert-Beer. Por tanto, en este caso la dispersión de luz de la partícula podría ser equivalente a la luz absorbida, lo que permite relacionar este parámetro de forma directamente proporcional con la concentración, lo cual se consideró a la hora de preparar las soluciones para cultivos. A continuación, se realizó el mismo procedimiento para las partículas de sílice, las cuales son verdaderamente interesantes para el empleo en los cultivos.

Figura 6. Ajuste lineal de absorbancia del polietileno.

En la Figura 6, y concretamente el parámetro R^2 , se aprecia como la bondad de ajuste a una tendencia lineal, no presenta un valor que pueda considerarse un ajuste óptimo. Esta tendencia es más bien logarítmica como se puede apreciar en la Figura 7.

Figura 7. Ajuste lineal de absorbancia de la sílice.

Figura 8. Ajuste logarítmico de la absorbancia de la sílice.

De acuerdo con lo anterior no es posible aproximar la densidad óptica de las partículas a una relación directamente proporcional con la concentración. Esto supone una dificultad añadida a la hora de hacer los cálculos para las soluciones de

contaminación. En este tipo de partículas la aglomeración[80], parece un fenómeno típico, lo cual hace que, a concentraciones más altas, se disperse menos luz, apareciendo este efecto logarítmico no deseado.

Luego se procedió a ensayar con una mezcla de partículas, quedando en proporción 4:1 entre nanopartículas de oro y microesferas respectivamente. Esta proporción guarda relación con resultados expuestos más adelante.

Figura 9. Ajuste lineal de la absorbancia del polietileno + oro.

En la Figura 9 se observa la tendencia lineal que guarda la solución de nanopartículas de oro y las microesferas de polietileno con la dispersión óptica, lo cual es el efecto deseado comentado anteriormente.

Después de realizar el ensayo con nanopartículas de oro y microesferas de sílice, se aprecia en la Figura 10 como las partículas interaccionan entre ambos tipos, dejando de interactuar entre ellas únicamente, eliminando estos efectos de aglomeración que ocurrían en el caso anterior. Esto da paso a una tendencia que puede ser aproximada a una recta, lo cual finalmente permitió preparar las soluciones para cultivos, teniendo en cuenta que la densidad óptica presentó una relación directamente proporcional con la concentración. De esta manera queda justificada la metodología.

Figura 10. Ajuste lineal de la absorbancia de la sílice + oro.

3.1.1.2 Soluciones de fibroína de seda de gusano

La fibroína de seda de gusano liofilizada fue proporcionada por el Laboratorio de Bio-Materiales y su síntesis está descrita en la literatura. Este material liofilizado se utilizó para preparar tres soluciones acuosas cuya viscosidad se varió modificando las concentraciones del soluto, a saber: 0.062, 0.075 y 0.125g/ml.

La fibroína liofilizada fue pesada en una balanza de precisión (Serie Discovery de Ohaus). En un frasco de vidrio pyrex de 100ml se depositó un volumen determinado de agua deionizada y posteriormente, pequeños pedazos de fibroína se adicionaron poco a poco mientras se realizaban movimientos circulares con el fin de evitar la formación de espuma en la superficie de la mezcla. Esta mezcla se depositó en tubos tipo Falcon estériles de 50 ml y se llevó a una Centrífuga Rotina 380 de Hettich a 5000 rpm a 24 °C durante 10 minutos para inducir la decantación de las piezas de fibroína no disueltas. Las soluciones se depositaron en nuevos contenedores tipo Falcon y se almacenaron a una temperatura a 8°C.

La caracterización de la viscosidad de las muestras se realizó a temperatura ambiente mediante un viscosímetro rotacional serie Alpha de Fungilab. Las viscosidades obtenidas fueron $\eta=3.31$; $\eta=4.12$ and $\eta=7.97$ mPa.s, una de las cuales fue usada como fantoma del citoplasma celular ($\eta=4$ mPa.s)[81].

3.1.1.3 Disoluciones de fibroína con nanopartículas de oro

Estas disoluciones se obtuvieron utilizando las distintas concentraciones de fibroína según la medida a realizar. Primero se tomaron 500 μ L de nanopartículas y se centrifugaron durante 5 minutos en un eppendorf a 15.000 r.p.m., esto hace que las nanopartículas se decanten al fondo y se pueda retirar el sobrenadante. Para estas muestras se retiraron 475 μ L de sobrenadante. Los 25 μ L restantes corresponden a las nanopartículas concentradas que se mezclaron con 475 μ L de fibroína a la concentración correspondiente que se quiera para realizar la medida.

Ubicación de la muestra

Para solucionar y minimizar el efecto de la temperatura ambiente se diseñó una caja negra con las medidas del soporte y con un agujero para la sonda del sensor de temperatura F100 y así disminuir el ruido ambiental de las medidas.

Medidas realizadas

Se realizaron medidas a dos potencias del láser, a 1 W/cm^2 y a 2 W/cm^2 , y se utilizaron tres tipos de fibroína que variaron en su viscosidad, a 3.29, 4.12, y 7.95 mPa*s. De cada experimento se realizaron cuatro réplicas. Además, para comparar se tomaron medidas del proceso con 500 μL de agua y con 500 μL de nanopartículas de oro.

Figura 11. Evolución de la temperatura de fibroínas respecto al tiempo, sometidas a 1W de potencia del láser durante 30 min y 20 min sin irradiar.

En la Fig. 11 se muestran los datos procesados bservándose una comparativa del proceso de calentamiento Fig14c y el de enfriamiento de las muestras de fibroína que no contienen nanopartículas.

Como se puede observar en esta Figura 11 las distintas disoluciones de fibroína alcanzaron menos temperatura que el agua cuando se les aplicó la radiación del láser a una potencia de 1W, además también se observó que cuanto más viscoso es el compuesto de fibroína más temperatura alcanza. Si la fibroína dispersa los rayos,

se produce un fenómeno parecido al del experimento anterior con el material dispersante.

En el caso de la comparativa del proceso de calentamiento y de enfriamiento de las muestras de fibroínas y nanopartículas, se observó que hay una muestra de fibroína, la más viscosa, que alcanza un mayor incremento de temperatura que la muestra que contiene únicamente nanopartículas.

Para confirmar los efectos que se produjeron calentando con el láser a 1W, y poder ver cómo afecta la intensidad de la luz del láser a las medidas, se realizaron las mismas medidas a 2W de potencia.

Figura 12. Evolución de la temperatura de fibroínas respecto al tiempo, sometidas a 2W de potencia del láser durante 30 min y 20 min sin irradiar con láser.

En la Figura 12 se observó que al aumentar la potencia del láser a 2W no se reproducen los hechos vistos con una potencia de 1W. En este caso cuanto más viscosa es la muestra menos temperatura alcanza.

Figura 13. Caracterización óptica de películas de seda de fibroína a) Espectro de transmisión
b) Espectro de absorción[82].

En la Figura 12 se observa que la mezcla de fibroína de viscosidad 7,95 mPa*s con *nanorods* alcanzó mayor temperatura que la muestra que sólo tenía *nanorods*, superando ambas los 50°C. Las otras dos muestras de fibroína mezcladas con *nanorods* quedan muy por debajo respecto a la temperatura. Se presentaron varios problemas al realizar la medida con la muestra de fibroína 4,12mPa*s: en unas réplicas se producía gelificación justo donde se encontraba la sonda del sensor de temperatura, lo que aumentaba mucho la temperatura, en cambio, en otras réplicas no se presentó un resultado similar, observándose una temperatura mucho menor.

En todas las figuras se puede observar que el proceso de incremento de temperatura se da en los primeros 1200 segundos de la medida y a partir de entonces se forma una meseta que, dependiendo de la muestra, está a distinta temperatura. Para poder comparar mejor las diferencias de la variación de temperatura máxima entre las muestras a distinta potencia se realizó el siguiente diagrama de barras.

Figura 14. Variaciones máximas de temperaturas en las muestras de fibroínas con oro a 1 y 2W de potencia radiada. Media de las tres réplicas en cada medida y la barra de error es la desviación estándar.

En la Figura 14 se puede comprobar que la variación máxima de temperatura fue alta en todos los casos, superando los 17.3 de media de variación en el tratamiento con láser a 1W y a los 27°C el tratamiento con láser a 2W.

Si se produce el mismo calentamiento en el cuerpo que normalmente está a unos 37 ° C, se superarían en la zona de irradiación los 50 ° C que es una temperatura muy alta. Por lo que se puede considerar que 1W es demasiada potencia para irradiar a través de un tejido biológico.

3.1.2 Hipertermia Magnética

La hipertermia magnética, es actualmente una de las aplicaciones más estudiadas a nivel de investigación, ya que presenta varias ventajas en preclínica siendo la principal la generación de una mínima invasión posible al cuerpo humano, atacando solamente la zona afectada. La mayoría de los grupos de investigación que se relacionan con ésta área, han apostado su trabajo a la búsqueda de nuevos materiales y nuevas nanoestructuras que puedan ser más eficientes en la aplicación final, es decir que el material con el que se trabaje puede dar una respuesta magnética alta en el momento de la aplicación del campo magnético sin la necesidad de aplicar una magnitud alta de éste y conservando el requisito de que los tamaños del material deben cumplir con la característica de presentar estructura monodominio.

La máquina de hipertermia magnética fue diseñada, elaborada y construida en el LBN dentro del equipo encargado de hipertermia magnética alterna.

3.1.2.1.1 Caracterización de fluidos viscosos, las nanopartículas AGM y el relajómetro

Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro NpSMs fueron suministradas por el Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Politécnica de Valencia. Se sintetizaron siguiendo el método descrito en la literatura [83]. Las NpSMs sintetizadas se caracterizaron por difracción de rayos X (XRD) y Microscopía Electrónica de Trasmisión (TEM).

Las reflexiones típicas del óxido de hierro se observaron en el patrón de XRD en el intervalo de $25^\circ < 2\theta < 65^\circ$. Los picos de Bragg corresponden al arreglo cúbico de la Magnetita (Figura 15.a). La imagen del TEM mostró nanopartículas bien definidas con un diámetro promedio de 12 nm (Figura 15.b).

Figura 15. a) Patrón de difracción de Rayos X. b) Imagen representativa de TEM de NpSMs sintetizado.

La caracterización magnética se realizó mediante el AGM System y su curva de magnetización (M-H) dependiente del campo se puede observar en la Figura 14. Cabe notar que la magnetización de saturación de las NpSMs en su estado natural es $\pm 60 \text{ A.m}^2/\text{Kg}$.

Las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) en polvo se depositan en tubos eppendorf previamente tasados mediante una Balanza de Precisión Discovery de Ohaus. Seguidamente el material magnético se pesó y una pequeña cantidad de agua deionizada se adicionó para formar una disolución homogénea. Finalmente, la solución de fibroína se añadió. Se prepararon tres muestras a diferentes concentraciones: 0.05, 2.5 and 10mg/ml.

Las muestras se mezclaron usando un Agitador Vortex Reax-Control de Heidolph a 1500 r.p.m. durante 20 minutos con el objetivo de conseguir un coloide estable y prevenir la formación de espuma y cambios físicos en las muestras asociados al baño de ultrasonidos.

De la misma manera, se prepararon suspensiones compuestas de agua deionizada y nano- partículas de magnetita en polvo y, a diferencia de las muestras de fibroína, éstas se homogenizaron mediante un baño de ultrasonidos.

3.1.2.1.2 Caracterización coloidal

La Dispersión Dinámica de Luz (DDL) es una técnica físico-química no invasiva empleada para determinar la distribución del tamaño de las partículas en suspensión o macromoléculas en soluciones tales como proteínas o polímeros y medir el grado de agregación expresado por el tamaño hidrodinámico (DH) (Figura 16).

En general, la técnica se utiliza mejor para partículas en la región submicrométrica, pero puede ser usada para medir partículas con tamaños inferiores. El DDL analiza la distribución de la velocidad del movimiento de partículas midiendo fluctuaciones dinámicas de la intensidad de dispersión de la luz causada por el movimiento browniano de la partícula.

Esta técnica produce un radio hidrodinámico, o diámetro, a partir de las mediciones mencionadas anteriormente. Produce una medida global de la partícula perpendicular a la fuente de luz en ese instante[84].

Se empleó un Zetasizer Nano ZS de Malvern para medir DH de las NpSMs diluidas/suspendidas en agua y soluciones acuosas de fibroína a una concentración de 0.5 mg/ml localizada en una cubeta estándar. La estabilidad coloidal de las dispersiones de partículas se preservó por lo menos 24 horas. Se utilizó una muestra de 1 mL.

Las medidas se realizaron a 25°C y los índices de refracción de la magnetita y el material dispersante se fijaron en 2 y 1.33 respectivamente.

Figura 16. Caracterización coloidal de las NpSMs.

3.1.2.1.3 Estudio del comportamiento magnético

Para estudiar el comportamiento magnético de las NpSMs de 14 nm inmersas en agua deionizada y en soluciones de fibroína, se caracterizó la muestra en un AGM a través de las curvas de magnetización (M-H) como función del campo magnético aplicado. Para este propósito, el dispositivo se calibró diariamente a través de un material de referencia estándar 2853 Magnetic Moment Standard-Yttrium Iron Garnet Sphere (YIG). La calibración establece una relación entre los valores y las incertidumbres indicados en el instrumento de medida provistas por estándares y los valores conocidos correspondientes a una magnitud de medida o patrón, asegurando la trazabilidad de las medidas a las correspondientes unidades básicas. En el AGM, las medidas de los ciclos de histéresis se pueden realizar en dos diferentes modos de operación: en resonancia y fuera de resonancia. En esta caracterización se seleccionó el modo en resonancia para mejorar la calidad en la relación señal/ruido [85] y se utilizó la sonda P2 Parallel Silica debido a que el peso del portamuestra PMMA es superior a 50 gramos. Las medidas se tomaron a temperatura ambiente.

De acuerdo con la viscosidad de las muestras a caracterizar, se utilizó una pipeta de viscosidad Transferpettor 701817, para extraer ~14,5µL de la disolución a medir (previamente homogenizada). Esta cantidad se añadió al portamuestra PMMA-AGM, se selló con Parafilm M para evitar el derramamiento del líquido y se adhirió a la sonda. Finalizada la medida, se retiró cuidadosamente el Parafilm M y la muestra se alojó en un horno de secado (DigiTheat de JP Selecta) durante 24 horas para evaporar el líquido de la muestra. Pasado este tiempo, la muestra se selló con Parafilm y se realizó una segunda caracterización.

El AGM da información del momento magnético de la muestra a través de la medida del ciclo de histéresis. Los valores del momento magnético se normalizaron a la cantidad total de masa de las NpSMs, la cual se extrajo por cálculo simple, para obtener el valor de la magnetización específica mediante la fórmula, de manera que las curvas fueran cuantitativamente comparables.

$$\vec{M} = \frac{\vec{m}}{m}$$

Donde $\vec{m}$ es el momento magnético de la muestra y sus unidades se dan en [Am^2] y m es el peso de la muestra dada en [Kg].

Construcción del equipo de hipertermia

Tomó más de tres años. Para ello, además del trabajo del CTB, ha sido necesaria la colaboración del Departamento de Electrónica de la Facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad Politécnica de Madrid (CEI-UPM).

El equipo se encuentra en constante evolución y su finalidad es que sea posible su comercialización en un futuro.

Fuente de corriente de alta potencia alterna

El equipo ha sido diseñado y construido con la ayuda de CEI-UPM. Gracias a esta colaboración el equipo fue capaz de generar una fuente de tensión alterna en la que se pueden ajustar las siguientes propiedades de la onda de la señal excitadora:

- Corriente, hasta 24 [App]
- Frecuencia, desde 100 [KHz] hasta 2 [MHz]
- Tiempo Muerto, desde el 0% (señal triangular) del periodo hasta el 100% (señal cuadrada)
- Pendiente, desde 0 [$A/\mu s$] hasta 54 [$A/\mu s$]

La fuente de tensión consta de tres partes: fuente continua, inversor y circuito disparador que se describen a continuación.

Fuente de tensión DC

Modelo 6015A de HP, con una potencia de 1000 W (Figura 17).

Figura 17. Fuente de tensión empleada.

Inversor

Los inversores son convertidores de corriente continua (CC) a corriente alterna (CA). Se trata de un inversor en puente completo formado por cuatro MOSFETs, controlados por un circuito de disparo, que se describe a continuación.

Este inversor ha sido desarrollado por el CEI-UPM y lleva en funcionamiento desde septiembre 2014. Se trata de un inversor en puente completo formado por cuatro MOSFETs, controlados por un circuito de disparo, desarrollado por el CEI-UPM y funciona desde septiembre 2014 (Figura 18 y Figura 19).

Figura 18. Configuración del inversor en puente completo.

Figura 19. Foto del inversor desarrollado por el CEI-UPM.

Circuito de disparo

Para regular la tensión de salida se empleó, en el caso de estudio, un control de fase desplazada. Este tipo de control consiste en disparar los transistores Q_1 y Q_2 , así como Q_3 y Q_4 , de forma complementaria con lo que se evita el cortocircuito de las ramas. El ciclo de trabajo es aproximadamente del 50%, sujeto a variaciones debidas a la existencia de tiempos muertos entre señales complementarias. El control de fase desplazada tiene la ventaja, frente a otros tipos de control, de permitir

una mejor regulación de la tensión de salida, así como de conseguir conmutaciones suaves de tensión cero en el encendido de los MOSFET, lo que aumenta significativamente el rendimiento del inversor ver Figura 20.

Para controlar la tensión de salida se modificó el desfase entre las señales de disparo de Q1 y Q4, Φ en la figura, ya que, al estar abiertos simultáneamente Q1 y Q3 o Q2 y Q4, la tensión aplicada a la carga será nula y se consigue con ello variar la tensión eficaz en la carga.

Si se recopilan todos los requisitos nombrados anteriormente, las señales de disparo de los transistores serán las siguientes:

Figura 20. Señales de control de disparo transistores. Fase desplazada.

Bobina

La bobina es la encargada de generar el campo magnético alterno. La bobina actual es usada desde septiembre 2014, ha sido diseñada y fabricada por el CIE-UPM. Se trata de una bobina de 14 espiras, la cualidad más importante de la bobina es la utilización de 25 hilos de cobre por cada enrollamiento mitigando el efecto pelicular del cobre y así aumentando el campo generado. (Figura 21 y 22).

Figura 21. Foto bobina actual.

Figura 22. Simulación bobina $f=800$ kHz $I=9$ A.

Equipo de registro de medidas de los experimentos

Para calcular la eficiencia del equipo fue necesario la construcción de un calorímetro en el que se emplazan las muestras. El calorímetro además de aislar la pérdida de calor de las NpSMs, es necesario que aisle del calor producido por la bobina cuando se le aplica una corriente de alta tensión, alrededor de los 100°C . Por eso fue necesario la inclusión de una camisa de agua que absorbiera el calor. Para la toma de medidas se usó un termómetro de fibra óptica, ya que los termómetros normales se calentarían ante la presencia del campo.

Figura 23. Ilustración del equipo de medidas.

El calorímetro es la pieza encargada de aislar el sistema térmico del exterior, ha sido fabricado en borosilicato. Cómo se ve en la figura 23, está formado por tres partes.

1. Zona para las muestras, en el centro de la camisa.
2. Camisa de agua, para absorber el calor generado en la bobina.
3. Vacío para aislar la zona de muestras.

La camisa de agua está conectada a un equipo de refrigeración capaz de regular la temperatura del fluido de refrigeración entre 0 y 100 °C, en nuestro caso agua (Figura 24).

Figura 24. Calorímetro.

Termómetro

Se trata de un termómetro de fibra óptica, de la marca LumaSense Technologies, modelo LUXTRON m3300 Biomedical Lab-Kit. Tiene un error de $0,2^{\circ}\text{C}$, y toma medidas cada segundo. Las medidas son enviadas al ordenador a través de un puerto RS-232 y registradas por el programa LabVIEW Figura 25.

Figura 25. Termómetro de fibra óptica.

Sondas

Debido a que el calentamiento de las muestras no es uniforme y existe un gradiente de temperatura dentro de la muestra es necesario que todas las temperaturas sean tomadas en el mismo punto de la muestra para poder comparar medidas.

Para esto fue necesario crear una herramienta, que sea fácil de conseguir, que no se caliente por el campo magnético, sea duradera y replicable (Figura 26).

Figura 26. Sonda con resistencia para caracterización de la camisa.

Medidor de corriente

Para comprobar la corriente que circula a través del conductor de la bobina se desarrolló un medidor de corriente con una pequeña bobina. Esta bobina es capaz de hacer mediciones con un $\pm 10\%$ de error, más que suficiente para su cometido que es la de registrar el funcionamiento del equipo. No se ha optado por un diseño más preciso debido al enorme precio de este tipo de dispositivos.

Experimentación

En las siguientes tablas se recogen todos los experimentos realizados tomando en cuenta el modelo térmico del sistema de hipertermia (Anexo 1). La primera tabla contiene los datos de los experimentos para la caracterización térmica del equipo y la segunda tabla presenta los datos para el estudio de la onda excitadora (Tabla 3 y Tabla4).

Tabla 3.Experimentos de validación.

Nº	Concentración	Tiempo	Comentarios
1	Agua	1:40	Potencia 0.1425 [W]
2	Agua	1:40	Sonda v2.0
3	Agua	1:40	Sonda v2.0
4	100 mg/ml	1:40	Sonda v2.0
5	100 mg/ml	1:40	Sonda v2.0
6	100 mg/ml	1:40	Sonda v2.0
7	50 mg/ml	1:40	Sonda v2.0
8	50 mg/ml	1:40	Sonda v2.0
9	25 mg/ml	1:40	Sonda v2.0
10	50 mg/ml	1:40	Sonda v2.0 Rot. resistencia NV
11	50 mg/ml	1:40	Sonda v2.1 Muestra NPMs NV
12	50 mg/ml	1:40	Sonda v2.2

13	50 mg/ml	1:40	Sonda v2.2
14	50 mg/ml	1:40	Sonda v2.2

Tabla 4. Experimentos de la caracterización de la onda excitadora.

Nº	Ensayo	Tiempo	Comentarios
1	Amplitud 1	0:50	8.5 lpp, probeta demasiado corta
2	Amplitud 1	1:00	8.5 lpp, probeta demasiado corta
3	Forma de Onda 2	1:00	F=800 Khz, Desfase=4/10
4	Forma de Onda 2	1:00	F=800 Khz, Desfase=5/10
5	Forma de Onda 2	1:00	F=800 Khz, Desfase=6/10
6	Forma de Onda 2	1:00	F=800 Khz, Desfase=7/10
7	Forma de Onda 2	1:00	NO VALIDO, Rotura inversor
8	Forma de Onda 2	1:00	F=800 Khz, Desfase=8/10
9	Forma de Onda 2	1:00	F=800 Khz, Desfase=9/10
10	Búsqueda Max	1:10	F=800 Khz
11	Búsqueda Max	1:10	F=833 Khz
12	Búsqueda Max	1:10	F=854 Khz
13	Búsqueda Max	1:10	F=877 Khz
14	Búsqueda Max	1:10	F=917 Khz
15	Búsqueda Max	1:10	F=877 Khz
16	Búsqueda Max	1:10	F=854 Khz
17	Var. Pendiente	1:10	Frecuencia: 854
18	Var. Pendiente	1:10	Frecuencia: 757
19	Var. Pendiente	1:10	Frecuencia: 657
20	Var. Pendiente	1:10	Frecuencia: 558

21	Var. Pendiente	1:10	Frecuencia: 462
22	Var. Pendiente	1:10	Frecuencia: 263
23	Var. Pendiente	1:10	Frecuencia: 163
24	Var. Pendiente	1:10	Frecuencia: 100
25	Var. Pendiente	1:10	Frecuencia: 366
26	Pendiente cte	1:10	Pendiente: 29
27	Pendiente cte	1:10	Pendiente: 29
28	Pendiente cte	1:10	Pendiente: 30
29	Pendiente cte	1:10	Pendiente: 29
30	Pendiente cte	1:10	Pendiente: 29
31	Pendiente cte	1:10	Pendiente: 29

A continuación, se adjuntan tres ejemplos de las formas de onda utilizadas en los experimentos de la caracterización de la onda excitadora (Figura 27, Figura 28 y Figura 29).

Figura 27. Corriente medida en la bobina de la onda más triangular posible (amarillo).

Figura 28. Corriente medida en la bobina de la onda trapezoidal (amarillo).

Figura 29. Corriente medida en la bobina de la onda más cuadrada posible.

Cálculo de los parámetros térmicos

Una vez planteado el modelo térmico (Anexo 1), fue necesario obtener los parámetros térmicos que describen nuestro sistema. Se modeló el sistema para cuatro concentraciones distintas, 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml y agua deionizada sin nanopartículas (ver Figura 30).

Figura 30. Gráfica de un experimento para la caracterización.

El proceso experimental se realizó de la misma forma que se describe en el apartado anterior, extrayendo la resistencia de la probeta para que no altere el experimento. La resistencia usada fue de 14(Ω) (ver Tabla 5).

Tabla 5. Valores de los experimentos para los cálculos del modelo térmico.

Concentración (mg/ml)	P(W)	$\Delta T(^{\circ}C)$	$\tau(s)$	R^2
0 (agua)	0.1425	15.44	285.17	0.99
0 (agua)	0.1425	14.55	292.03	0.99
0 (agua)	0.1425	15.07	282.04	0.99
25	0.1425	15.30	297.34	0.99
25	0.1425	15.43	290.17	0.99
25	0.1425	15.16	289.21	0.99
50	0.1425	15.44	301.23	0.99
50	0.1425	15.16	295.56	0.99
50	0.1425	15.32	298.12	0.99
100	0.1425	15.27	314.04	0.99
100	0.1425	15.26	292.12	0.99
100	0.1425	15.40	285.28	0.99

Con los datos de los experimentos se calcularon los parámetros térmicos del sistema como se indicó anteriormente (ver Tabla 6).

Tabla 6. Valor de la capacidad y conductancia térmica.

Concentración (mg/ml)	C_t (J/K)	C_d (W/K)
0 (agua)	$0.0092 \pm 8.8E - 5$	$2.973 \pm 9.36E - 3$
25	$0.0092 \pm 5.6E - 5$	$2.955 \pm 2.63E - 2$
50	$0.0092 \pm 3.6E - 5$	$2.794 \pm 3.61E - 2$
100	$0.0093 \pm 2.76 - 5$	$2.782 \pm 2.74E - 2$

Se utilizaron los resultados de la Tabla 5 para **calcular resistencia térmica equivalente (R_{eq})** en los experimentos.

Influencia de la señal excitadora

Tradicionalmente los equipos de hipertermia magnética han trabajado con señales sinusoidales. El equipo con el que cuenta actualmente el CTB es capaz de generar señales trapezoidales y seleccionar los parámetros de la señal, esto ha posibilitado hacer un estudio de la influencia de los distintos parámetros de la señal.

Para ello se seleccionaron las series de experimentos válidas de todos los hechos en la fase de experimentación. Cada serie de experimentos a partir de ahora se denominaron ensayos.

- Ensayo A
 - a. Frecuencia: 800 [KHz]
 - b. Amplitud: 12 [App]
 - c. Tiempo de transición: **0% periodo – 100% periodo**
 - d. Medidas: 6

- Ensayo B
 - a. Frecuencia: **100 [KHz] – 1 [MHz]**
 - b. Amplitud: 7.4-7.6
 - c. Tiempo de transición: 50% periodo
 - d. Medidas: 9
- Ensayo C
 - a. Frecuencia: **250[KHz] – 2 [MHz]**
 - b. Amplitud: 12 [App]
 - c. Pendiente: 30
 - d. Medidas: 6

Para analizar la influencia de la señal excitadora primero se observaron los datos experimentales y a continuación se compararon con la teorí .

Para poder comparar los datos a la teoría del calentamiento de las SPIONs por un campo magnético se hicieron unas modificaciones en la ecuación. Primero dado que el pico del campo magnético en este caso es proporcional al pico de corriente de la bobina, $H_0^2 = A * I_0^2$, donde A es una constante. Por lo tanto, se puede reescribir la ecuación 5 de la siguiente manera.

$$P = \pi\mu_0\chi_0 A I_0^2 f \frac{2\pi f\tau}{1 + (2\pi f\tau)^2}$$

$$P/I_0^2 = \pi\mu_0\chi_0 A f \frac{2\pi f\tau}{1 + (2\pi f\tau)^2}$$

Como para los experimentos se han usado las mismas NPMs se puede tomar $\pi\mu_0\chi_0 A$ como si fuera una constante que se llamará K_0 . Dicha constante se normalizó de forma que cortara al resultado de los experimentos en 1 [MHz] para que fuera posible compararlos con la teoría.

$$P/I_0^2 = K_0 f \frac{2\pi f \tau}{1 + (2\pi f \tau)^2}$$

Figura 31. P/I_0^2 en función de la frecuencia.

La Figura 31 muestra los resultados experimentales $P/I_0^2 \left[\frac{W}{A^2} \right]$ respecto a la frecuencia [KHz] del ensayo A, B y C. Se aprecia como los distintos experimentos tienen resultados dispares. En el ensayo B y C parecen distribuirse en una recta con distintas pendientes, esto se debe a la influencia de la forma de la corriente. Por lo tanto, a continuación, analizaremos los ensayos por separado (ver Figura 32 y 33).

En la siguiente gráfica se analizan los resultados del ensayo B

Figura 32. Datos del ensayo B con ajuste lineal.

Se hizo un ajuste a la recta $y = a + b * x$

- $a = 1,67736E - 4 \pm 4,69072E - 5$
- $b = 1,94645E - 7 \pm 4,01325E - 8$

Figura 33. Datos del ensayo C con ajuste lineal.

Figura 34. Gráfica de resultados experimentales y teóricos ensayo B.

Se comprobó en la gráfica anterior (Figura 34) como la potencia térmica no concuerda con lo establecido por la teoría. Ahora si en lugar de usar P/I_0^2 se usa la R_{eq} definida en la sección anterior queda la siguiente gráfica (ver Figura 35).

Figura 35. Valor de R_{eq} respecto a la frecuencia de los ensayos A, B y C.

En la gráfica anterior (Figura 35) se puede observar como los resultados de los experimentos se asemejan más a una recta, esto nos indica una mayor influencia de la I_{rms} respecto la I_0 .

3.1.2.1.4 Adaptación del equipo para ensayos *in-vitro* e *in-vivo*. Diseño del Módulo Físico

El diseño del módulo fue una etapa intermedia entre la simulación y el diseño de las PCBs, Pero a la vez, fue fundamental conocer el tamaño de cada componente para tener una primera aproximación del espacio necesario.

El módulo físico se diseñó con los siguientes objetivos:

- Aislar físicamente las etapas, evitando que el sobrecalentamiento que se prevé en la etapa de potencia se generalice en el resto de las etapas. Además, aporta la estructura necesaria para instalar el sistema de refrigeración/calefacción cuyo flujo de aire se focaliza en los cuatro MOSFETs que forman el inversor.
- Este aislamiento físico sirvió de soporte en la instalación de dos cajas Faraday para aislar de ruidos electromagnéticos tanto la etapa de potencia como el transformador de la etapa de alimentación.
- Compactar y unir las partes que forman este dispositivo para facilitar su uso en un espacio reducido.

Figura 36. Diseño del recinto para cultivos celulares.

La Figura 36 muestra el diseño físico realizado para incluir pocillos de cultivos celulares de 35 mm lo que permitió alojar la placa y también la circulación de flujo de agua con la finalidad de mantener la temperatura fija a 37 ° C similar al incubador de cultivos celulares, y se previó acceso para un termómetro de fibra óptica.

Para los futuros ensayos *in vivo*, se realizó una estructura de aislamiento térmico que actúa como cama para los ratones, la cual se mantuvo a una temperatura de

37°C con el mismo procedimiento que con la estructura anterior. En la Figura 37, se muestra el prototipo de la cama.

Figura 37. Prototipo del aislante térmico para ratones.

3.2 EXPERIMENTOS *IN-VITRO*

3.2.1 Hipertermia Magnética

3.2.1.1 Cultivos Celulares

En esta investigación se utilizaron tres líneas celulares, una de ellas fue fibroblastos de ratón (NIH/3T3; ATCC NCRL-1658). Para asegurar la proliferación, las células 3T3 se mantuvieron en un medio de cultivo el cual está compuesto de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con Glucosa (w/o L-Glutamine w/25mM Hepes w/o Sodium Pyruvate de Biowest) suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (FBS-South American Origin de Biowest) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Life Technologies, Grand Island, NY #15140122). Los cultivos celulares en crecimiento fueron mantenidos en una atmósfera humidificada al 95% en 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas mediante un incubador FORMA Series II Water Jacket CO₂ de Thermo Scientific. Finalizado este tiempo, los cultivos fueron observados a través de un Microscopio Electrónico DMIL LED de Leica con el fin de verificar el crecimiento y la adherencia celular al fondo de los pocillos. La línea celular fue colectada mediante tripsinización y centrifugación dos veces por semana y se llevó a cabo un cambio de medio de cultivo parcial cada 3 días. Los cultivos se sembraron a una densidad de 5×10^3 células/pocillo PPMA-AGM y 2.5×10^4 células/pocillo en placas multipocillo P24 (X50 24- well Multidish PS Treated, ref: 11874235).

Para la etapa de experimentación, se utilizaron osteoblastos (MC3T3), pertenecientes al tejido óseo y células de glioblastoma (CT2A), pertenecientes a tumores de glía de alto grado, algo más difíciles de manejar. El comportamiento de los osteoblastos es similar al de los fibroblastos, ambos se cultivan con el mismo medio, DMEM, y los protocolos a seguir para el cultivo de ambos son los mismos. Sin embargo, las células de glioblastoma necesitan un medio distinto, RPMI. Estos últimos se utilizaron para experimentación *in-vivo* y se cultivaron de la misma manera, el sedimento se resuspendió en medio RPMI 1640 y la suspensión celular se ajustó para obtener una concentración apropiada de células para inyección (8×10^4 células en 4 μ l) [86].

3.2.1.2 Viabilidad celular

Uno de los métodos de determinación de la viabilidad celular para comprobar la biocompatibilidad de los pocillos PMMA-AGM y las nanopartículas de óxido de hierro desnudas con los cultivos celulares 3T3, desde el punto de vista cualitativo, fue el análisis mediante marcaje con calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP). Este ensayo es un test colorimétrico que utiliza la tinción fluorescente simultánea.

El porcentaje de viabilidad celular se lleva a cabo mediante la siguiente expresión:

$$V_c = \frac{\text{Número células vivas}}{\text{Número de células vivas} + \text{Número de células muertas}} \times 100$$

3.2.1.2.1 Viabilidad celular en los portamuestras PMMA-AGM

Estos fueron desarrollados con finalidad de valorar la biocompatibilidad de los portamuestras PMMA-AGM con los cultivos celulares NIH/3T3. Los portamuestras PMMA-AGM se limpiaron y lavaron con agua doblemente destilada y se esterilizaron con luz ultravioleta dentro de una campana de extracción (LabGard® Class II Biological Safety Cabinet) por un tiempo 20 minutos. Luego de ello, se sembraron células 3T3 en los portamuestras PMMA-AGM a una densidad celular inicial de 5×10^3 células/portamuestras PMMA-AGM a total confluencia, y se alojaron en una placa multipocillo P24 (Figura 38). Inmediatamente del tiempo de incubación (24 horas), se retiró el medio de cultivo y las células se lavan dos veces con PBS

(Phosphate-Buffered Saline de Gibco) con la finalidad de remover las células no adheridas al fondo del portamuestras PMMA-AGM. La viabilidad celular es determinada mediante el ensayo de doble tinción de Calceína/Ioduro de Propidio (IP) (Invitrogen-Molecular Probes). Para este ensayo, se preparó una solución añadiendo 0.5 μ l de Calceína y 0.5 μ l de Ioduro de Propidio en 1 ml de medio de cultivo celular. Una cantidad aproximada de 14.5 μ l de esta solución se añadió a los cultivos celulares sembrados en los portamuestras PMMA-AGM y se incuban a 37°C durante 20 minutos.

Se evaluó por fluorescencia mediante un microscopio invertido (Leica DMIRB) equipado con cámara digital (Leica DC100 (Nussloch, Germany)) y las fotografías se tomaron a 10X. Este experimento se repitió a las 48 y 72 horas. Los experimentos de viabilidad celular se realizaron cuatro réplicas para cada concentración o condición experimental y se consideraron los controles de muerte basal de la línea celular (sin SPIONs).

Figura 38. Células NIH/3T3 cultivadas en portamuestras PMMA-AGM y ubicadas en una placa multipocillo P24 para facilitar su almacenamiento y manipulación.

3.2.1.2.2 Adherencia celular en los portamuestras PMMA-AGM

Con la finalidad de conocer la cantidad de células que se pegan al fondo en los portamuestras PMMA-AGM. Se sembraron las células 3T3 y se realizó el ensayo de viabilidad celular como se describió anteriormente. Las fotografías se tomaron con aumento de 2.5X con el fin de visualizar el fondo del pocillo entero y realizar el conteo de células vivas y muertas. Posteriormente, las fotografías se llevaron al

software Photoshop Cs6 y mediante una cuadrícula propia del programa se realizó el conteo de las células de forma manual.

3.2.1.2.3 Viabilidad celular después de la incubación con SPIONs

Con el objetivo de valorar la biocompatibilidad de las SPIONs en los cultivos celulares, las células 3T3 se sembraron en placas multipocillo P24 con una densidad inicial de 2.5×10^4 células/pocillo. Subsiguientemente las células se incuban, durante un periodo de 24 horas, empleando SPIONs suspendidas en medio de cultivo a dos concentraciones: 1mg/ml y 2.5mg/ml. Luego del tiempo de incubación, se eliminó el medio de cultivo que contiene las SPIONs, se lavaron las células dos veces con PBS para eliminar residuos de las SPIONs no fagocitadas y se vuelve a añadir medio de cultivo. Por último, se practicó el ensayo de Calceína/Ioduro de Propidio (IP). El experimento se repitió a las 48 horas.

Con el objetivo de comprobar la viabilidad celular en suspensiones de nanopartículas magnéticas y ópticas en el que el término viabilidad celular se refiere a medir la proporción de células vivas y muertas tras la imposición de éstas a una determinada condición que se quiere estudiar, se realizaron varios experimentos que requirieron los siguientes equipos y materiales:

Microscopio de fluorescencia (Figura 39): por ser la fluorescencia una técnica fundamental para estudiar procesos biológicos. Se utilizó para capturar imágenes en experimentos de viabilidad celular ya que hace posible la diferenciación de células vivas y muertas con distintos filtros de luz, con una tinción celular previa. El microscopio se utilizó con la luz de la sala en la que está ubicado apagada para que se conserve el máximo tiempo la fluorescencia y las imágenes no aparezcan veladas.

Figura 39. Microscopio de fluorescencia.

Tintes: utilizados para teñir las células y así diferenciar entre vivas y muertas en el proceso de captura de imágenes por el microscopio de fluorescencia. Esto es posible ya que se utilizan tintes distintos para vivas y muertas:

Yoduro de propidio (*Propidium Iodide*, PI): tinte rojo que actúa como agente de intercalación y que se une al ADN entre las bases con poca o ninguna preferencia de secuencia. Una vez que el colorante se ha unido, su fluorescencia aumentó entre 20 y 30 veces. Se observó que toda la disolución acuosa aparece teñida, pero es mucho más intensa en aquellas células donde se ha intercalado. Como el yoduro de propidio no es permeable en células vivas, se puede emplear para detectar células muertas en una muestra.

Calceína (calcein, AM): es un colorante que penetra en la célula y que puede utilizarse para determinar la viabilidad celular en la mayoría de las células eucariotas. En células vivas, la calceína AM no fluorescente se convierte en calceína con fluorescencia verde tras la hidrólisis del acetoximetil éster por parte de las esterasas intracelulares.

3.2.1.2.4 Localización intracelular de las SPIONs

La localización intracelular de SPIONs se determinó mediante microscopía de fluorescencia usando una tinción de lisosomas con marcadores fluorescentes específicos de estos orgánulos. Para ello, las células 3T3 fueron sembradas en placas multipocillo P24 con una densidad de 2.5×10^4 células/pocillo como se explicó

con anterioridad. A las 24 horas de la siembra de las células, éstas fueron nuevamente incubadas durante 24 horas con una suspensión de SPIONs y medio de cultivo a una concentración de 2.5 mg/ml. Las células se lavaron 3 veces con PBS para eliminar el exceso de nanopartículas con el fin de facilitar la observación y se incubaron por 10 minutos con LysoTracker® Red DND-99 (Life Technologies) a 40 nM en medio de cultivo celular. Por último, las fotografías de las muestras tinturadas con fluorescencia se tomaron usando un microscopio (Leica DMIRB) equipado con una cámara digital (Leica DC100, Nussloch - Germany).

3.2.1.2.5 Estudio de la magnetización (M) de las SPIONs libres y unidas a las células

Luego de realizar todas las valoraciones anteriores respecto a la biocompatibilidad de los portamuestras PMMA-AGM y las SPIONs con los cultivos celulares NIH/3T3, se realizó la caracterización magnética mediante el equipo de magnetometría con el fin de analizar el comportamiento de las SPIONs cuando están internalizadas (dentro de las células) y cuando son liberadas de las células. Con este propósito, se incuban las células NIH/3T3 (5×10^3 células/portamuestra PMMA-AGM) en una suspensión de SPIONs (2.5 mg/ml) como se describió anteriormente. En un tiempo inferior a una hora, se realizó la primera caracterización magnética que corresponde a las SPIONs internalizadas en las células. Terminada la caracterización, el medio de cultivo celular se extrajo cuidadosamente, se adicionaron 14.5 µl de Trypsin-EDTA y se incubaron durante 10 minutos para despegar las células. Luego de este tiempo, el portamuestras PMMA-AGM se sella nuevamente con Parafilm y se introduce en el ultrasonido con la finalidad de romper las membranas celulares y liberar el material magnético. Y fue realizada una segunda caracterización magnética las SPIONs liberadas de las células. Se obtuvieron los valores del momento magnético dentro y fuera de las células. Finalmente, las SPIONs liberadas y las células muertas se extrajeron del portamuestras y fue realizada una tercera caracterización para conocer el valor residual del momento magnético proveniente de las SPIONs posiblemente adheridas a las paredes del portamuestras PMMA-AGM.

Con la finalidad de conocer el valor del momento magnético neto de las SPIONs internalizadas y liberadas de las células, el valor residual del momento magnético (la

tercera caracterización) fue sustraído del resultado de la caracterización obtenida de las SPIONs tanto dentro como fuera de las células. Esto se realizó cuando se procesaron los datos.

3.2.1.2.6 Análisis Estadístico

Los resultados de los experimentos realizados se cuantificaron utilizando la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) proveniente de al menos 4 experimentos independientes. Los datos se analizaron con los programas Origin 8 y SigmaPlot (v 12.5, Systat Software Inc.). El análisis paramétrico se realizó mediante el test de varianza de ANOVA. El nivel de significancia estadística se estableció con $p < 0.05$.

3.2.1.2.7 Resultados

3.2.1.2.7.1 Influencia de la viscosidad del medio y la concentración de SPIONs en el nanomagnetismo

La Figura 40 muestra los ciclos de magnetización cuasi-estática (M-H) en función del campo magnético aplicado a SPIONs (2.5 y 10 mg/ml) a dos concentraciones suspendidas en fluidos inertes (no vivos): agua deionizada y soluciones de fibroína. Las soluciones de fibroína a tres diferentes viscosidades ($\eta=3.31$; $\eta=4.12$ y $\eta=7.97$ mPa.s), una de ellas emula la viscosidad del citoplasma celular[81].

Figura 40. Curvas de magnetización como función del campo magnético (H) de SPIONs suspendidas en fluidos inertes con dos diferentes concentraciones de nanopartículas. A) 2.5 mg/ml y B) 10mg/ml.

Figura 41. Caracterización magnética de los fluidos inertes. Curvas de magnetización en función del campo (H) realizadas a temperatura ambiente de los fluidos inertes (agua deionizada y soluciones de fibroína a distintas viscosidades).

En la Figura 41 se muestran las curvas de magnetización (M-H), tomadas a temperatura ambiente, de los fluidos viscosos en los que se suspendieron las SPIONs: agua deionizada y soluciones de fibroína a distintas viscosidades. Se observa que el comportamiento de todos los fluidos es diamagnético.

Figura 42. Curvas de magnetización normalizadas (M/Ms vs H) de SPIONs suspendidas en agua deionizada y SPIONs en sólido tomadas a temperatura ambiente. Las SPIONs fueron suspendidas a diferente concentración (2.5mg/ml y 10mg/ml).

En la Figura 42 se presenta la normalización (M/Ms) de las SPIONs cuando están suspendidas en agua deionizada con dos concentraciones (2.5 y 10 mg/ml) y cuando las SPIONs se encuentran en fase sólida. Esta normalización es importante para estudiar los fenómenos de interacción dipolar magnética de las SPIONs suspendidas en fluidos bajo la acción de un campo magnético externo aplicado.

Figura 43. Curvas de magnetización normalizadas (M/M_s vs H) de SPIONs suspendidas en agua desionizada y soluciones de fibroína a una concentración de 2.5 mg/ml. Las curvas de magnetización se llevaron a cabo también a las SPIONs en sólido y todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

Los resultados experimentales mostraron una disminución en la magnetización (M) de las suspensiones coloidales magnéticas a medida que la viscosidad del líquido portador aumenta (Figura 43). El valor M de las SPIONs en estado sólido es aproximadamente $65 \text{ Am}^2/\text{kg}$ alcanzado a una intensidad de campo magnético $H = \pm 8,0 \text{E}5 \text{ A/m}$ a temperatura ambiente. Los valores de campo coercitivo (H_c) y magnetización remanente (M_r) próximos a cero (material magnéticamente blando) corroboraron el comportamiento superparamagnético, es decir que las partículas son monodominio.

Por otro lado, la forma de la curva de magnetización varía con la concentración de las partículas y la viscosidad del líquido portador, llegando a ser un poco más inclinada en soluciones de fibroína que en agua desionizada. Además, esta curva es más pronunciada cuando se incrementa la concentración de las nanopartículas.

Las nanopartículas magnéticas dispersas en soluciones de fibroína se comportan como pequeños magnetos con sus ejes de anisotropía orientados al azar con respecto a la dirección del campo magnético externo o al vector de magnetización. Como consecuencia, el ángulo (θ) entre el eje de fácil imanación y el vector de magnetización es finito en las soluciones donde las SPIONs están casi inmovilizadas. Por otro lado, cuando las nanopartículas están dispersas en agua desionizada y las partículas son libres de rotar, se favorece el alineamiento entre el eje fácil y el vector magnetización ($\theta = 0$). Es decir que, las interacciones magnéticas y la viscosidad del medio portador favorecen o afectan el alineamiento del eje de

fácil imanación con el vector de magnetización de las partículas cuando ellas están idealmente libres o idealmente inmovilizadas.

3.2.1.2.8 Influencia de la viscosidad del medio en la relajatividad (r_1) de las SPIONs

La Figura 44 muestra la relajatividad (r_1) como función de la frecuencia de Larmor en suspensiones coloidales inertes con SPIONs de 14 nm a 2mM. A bajas intensidades de campo magnético se observó un incremento en la relajatividad inducida por la viscosidad del líquido portador que incrementa el tiempo de correlación rotación y produce una alta relajatividad.

Por el contrario, a bajas viscosidades, el incremento en la relajatividad es despreciable. El hecho de que en las muestras de agua y en soluciones acuosas de baja viscosidad la velocidad de relajación sea menor que en soluciones de mayor viscosidad indica una alta accesibilidad de las moléculas de agua a la superficie de las SPIONs.

En cambio, a altas viscosidades, la superficie de las SPIONs estaba, en parte, protegida contra el agua libre por la matriz de fibroína. Este proceso que implica la accesibilidad del agua libre a la superficie de las partículas es el origen de la dependencia de los valores de relajación en la viscosidad del fluido de la muestra, a valores de relajación elevados de alta viscosidad.

Figura 44. Perfiles de dispersión de la relajación magnética nuclear (NMRD). Medida de los perfiles de dispersión de la relajación magnética nuclear (NMRD) para diferentes intensidades de campo magnético en dispersiones de nanopartículas de óxido de hierro de 14 nm suspendidas en agua deionizada y soluciones de fibroína a distintas viscosidades y una concentración de 2mM.

3.2.1.2.9 Influencia de la internalización celular de las SPIONs en la magnetización

Para conocer la influencia que ejerce la internalización celular de las nanopartículas en su comportamiento magnético, fue necesario estudiar la biocompatibilidad de los portamuestras PMMA-AGM y de las SPIONs con los cultivos celulares empleados en esta investigación. Así mismo, se requirió conocer la localización de las nanopartículas en el entorno celular con el objetivo de comparar el comportamiento magnético de las SPIONs cuando están internalizadas en las células y cuando están fuera de ellas.

3.2.1.2.10 Evaluación de la viabilidad celular en los portamuestras PMMA-AGM

La evaluación de la biocompatibilidad de los portamuestras PMMA-AGM (Figura 45) se realizó mediante el ensayo de marcaje de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP). Se utilizaron cultivos celulares de fibroblastos de ratón NIH/3T3 a una densidad inicial de 5×10^3 células/portamuestras PMMA-AGM (confluente) incubadas durante 24, 48 y 72 horas. La misma cepa celular fue incubada en placas estándar de poliestireno P24 con una densidad inicial de 2.5×10^4 células/pocillo, durante 24 horas. Por consiguiente, se puede comparar el crecimiento celular en los portamuestras PMMA-AGM y en los pocillos estándar. La cepa celular NIH/3T3 se utilizó debido a su rápida proliferación celular.

Los resultados muestran que la incubación de las células en los portamuestras PMMA-AGM, para garantizar su crecimiento, no afectó significativamente la viabilidad de las células 3T3 a las 24 (86.45%) y 48 horas (87.60%) sugiriendo que los portamuestras PMMA-AGM no inducían toxicidad celular aguda en los tiempos analizados. Una reducción en la viabilidad celular de 73.21% se observó a las 72 horas (Figura 45A). Esta ligera disminución podría ser causada por la inherente no uniformidad de los portamuestras PMMA-AGM debido al proceso de fabricación generando posiblemente que las células dejen de proliferarse, se despeguen y mueran. Por otro lado, la viabilidad celular en los pocillos estándar P24 después de 24 horas de incubación es de 96.38%. La comparación del porcentaje de la viabilidad celular después de las 24 horas en los portamuestras PMMA-AGM y los pocillos estándar P24 es de ~10% (Figura 45B).

Figura 45. Viabilidad celular en los portamuestrasPMMA-AGM. A) Ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células NIH/3T3 incubadas durante 24, 48 y 72 horas en los portamuestrasPMMA-AGM. B) Comparación de la viabilidad celular de los portamuestrasPMMA-AGM y las placas multipocillos P24 a 24 horas. Los datos están expresados como la media $\pm$ SEM, el error estándar de la media, en inglés (Standar Error Medium) de n=4 experimentos independientes. *p<0.05; (Test de ANOVA).

Cabe resaltar que los experimentos se llevaron a cabo durante las primeras 48 horas, lo que permite tener una viabilidad celular suficiente para realizar el trabajo experimental. Las fotografías de microscopía de fluorescencia de las células cultivadas en los portamuestras PMMA-AGM, mostraron imágenes difusas debido a la ligera concavidad del portamuestras PMMA-AGM ocasionado en la fabricación.

3.2.1.2.11 Evaluación de la adherencia celular en los portamuestras PMMA-AGM

La evaluación de la adherencia de las células NIH/3T3 a los portamuestrasPMMA-AGM se realizó mediante el ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP). Las células se incubaron a una densidad de 5×10^3 células/portamuestrasPMMA-AGM durante 24, 48 y 72 horas.

La Figura 46 muestra los resultados de la adherencia de las células en los portamuestras PMMA-AGM. El porcentaje de viabilidad celular procedente de la adherencia es de 83.92% a las 24 horas y una disminución no significativa se observó a las 48 horas (81.13%). No obstante, se observó una disminución significativa a las 72 horas (70.39%).

Figura 46. Adherencia celular en los portamuestrasPMMA-AGM. Ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células 3T3 incubadas durante 24, 48 y 72 horas en los portamuestrasPMMA-AGM. Los datos representan la cuantificación de la adherencia celular. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de n=3 experimentos independientes. * $p < 0.05$; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).

3.2.1.2.12 Evaluación de la viabilidad celular después de la incubación con SPIONs

La evaluación de la biocompatibilidad de las SPIONs de magnetita (Fe_3O_4) incubadas durante 24 horas en células NIH/3T3 se realizó mediante el ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP). Se utilizó una suspensión de nanopartículas con núcleo de hierro desnudas (14 nm) y medio de cultivo a concentraciones de 1 y 2.5 mg/ml. Los resultados del ensayo revelaron que el porcentaje de viabilidad durante la incubación de SPIONs a una concentración de 1 mg/ml (93.03%) en comparación con las células control (91.29%) no afectaba significativamente a la viabilidad de las células 3T3. Para una concentración de 2.5 mg/ml, se observó una reducción en la viabilidad celular (88.57%) con respecto al control. Esta diferencia de la viabilidad con respecto al control es $< 5\%$ (Figura 47 A-D). En general, la incubación de células 3T3 con SPIONs no perjudicó la viabilidad celular. Los resultados sugirieron que los niveles de acumulación de hierro resultantes de la incubación con las SPIONs no indujeron toxicidad celular aguda en el tiempo y las concentraciones analizadas.

Figura 47. Viabilidad de células NIH/3T3 incubadas con SPIONs. Imágenes de microscopía de fluorescencia para el ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células 3T3 incubadas durante 24 horas con SPIONs de 14 nm a 0 (A), 1 mg/ml (B) y 2.5 mg/ml (C). Barra de escala= 50 μm. (D) Representa la cuantificación de la viabilidad celular para cada condición. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de n=4 experimentos independientes. * $p < 0.05$; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).

3.2.1.2.13 Tiempo de vida celular fuera del incubador

La viabilidad de las células NIH/3T3 incubadas con SPIONs en portamuestras PMMA-AGM durante 24 horas y posteriormente situadas fuera de su entorno idóneo de humedad y temperatura durante diferentes periodos de tiempo (Figura 48.), se realizó mediante el ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP). Los portamuestras PMMA-AGM que contienen las células cultivadas con SPIONs se retiran del incubador, se sellan con Parafilm y se exponen a condiciones externas de temperatura ambiente durante un periodo de 0.5, 1 y 2 horas en el cual se lleva a cabo la caracterización del comportamiento magnético mediante el AGM. Al finalizar la caracterización magnética, se realiza el ensayo de doble tinción.

Figura 48. Porcentaje de viabilidad celular respecto al tiempo de vida fuera de las condiciones ambientales óptimas de crecimiento celular. Ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células 3T3 incubadas con SPIONs durante 24 y posteriormente expuestas a condiciones ambientales externas durante 0.5, 1 y 2 horas. Los datos representan el porcentaje de viabilidad celular para en los diferentes tiempos. Cada valor indica la media $\pm$ SEM de n=4 experimentos independientes. * $p < 0.05$; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).

Los resultados obtenidos indicaron que el porcentaje de viabilidad celular de las células 3T3 fuera del incubador durante un periodo de media hora (86.74%) en comparación con las expuestas a las mismas condiciones ambientales externas durante 1 hora (84.51%) no afectó significativamente a la viabilidad de las células 3T3. Sin embargo, una reducción en la viabilidad celular se observó en las células 3T3 expuestas durante 2 horas (75.32%) a las mismas condiciones ambientales. En general, la exposición de los cultivos celulares 3T3 a condiciones ambientales externas (25°C) no perjudicó significativamente a la viabilidad celular en un tiempo no superior a 1 hora. Vale la pena mencionar que la caracterización del comportamiento magnético se realiza en un tiempo inferior a 1 hora

3.2.1.2.14 Localización intracelular de las SPIONs

La localización celular de las SPIONs de magnetita 14 nm se determinó mediante microscopía de fluorescencia usando una tinción de lisosomas con sustratos fluorogénicos. Los resultados experimentales mostraron que cuando las células NIH/3T3 se incubaban con SPIONs durante 24 horas, la mayoría de las nanopartículas eran internalizadas por las células y acumuladas en las vesículas intracelulares, especialmente en los lisosomas, según se determina por microfluorescencia usando un marcador fluorescente específico para etiquetar lisosomas.

Figura 49. Localización intracelular de SPIONs de 14 nm de tamaño en células NIH/3T3. Imágenes de microscopía de fluorescencia de SPIONs de 14 nm sin recubrimiento. Las nanopartículas han sido incubadas en células NIH/3T3 durante 24h. Las SPIONs se muestran bajo transmisión de luz (A). Las células se tiñen con un marcador específico para lisosomas (B). Barra de escala= 50 μ m.

Como se observa en la Figura 49, la presencia de SPIONs, visualizadas bajo transmisión de luz como puntos negros (Figura 49A), muestra una acentuada localización con el marcador fluorescente de lisosomas (Figura 49B), lo que indica que la mayoría de las SPIONs se almacenan en las células dentro de estos orgánulos (Figura 49C).

3.2.1.2.15 Análisis del magnetismo de las SPIONs dentro de las células NIH/3T3

Para demostrar que las partículas magnéticas internalizadas en orgánulos celulares, como lisosomas, inducen cambios en su comportamiento magnético, se incubaron SPIONs de 14 nm de diámetro en células NIH/3T3 durante 24 horas y se comparó la magnetización obtenida a través de las mediciones de los ciclos de histéresis (M-H) cuando las nanopartículas se encuentran en el interior celular y, posteriormente,

cuando ellas han sido liberadas de las células mediante procesos bioquímicos y mecánicos (tripsinización y sonicación respectivamente).

Figura 50. Comparación del comportamiento magnético de SPIONs internalizadas en células NIH/3T3 y fuera del interior celular. Comportamiento magnético de SPIONs de 14 nm incubadas en células NIH/3T3 durante 24 horas. Se llevan a cabo las mediciones de las curvas de histéresis (M-H) cuando las SPIONs están internalizadas en los orgánulos celulares y posteriormente cuando son liberadas de las células. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de n=6 experimentos independientes. *p<0.05; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).

La Figura 50 muestra los valores del comportamiento magnético de SPIONs dentro de las células 3T3 y una vez que son liberadas. Se observó una disminución en el valor de la magnetización de aproximadamente 6.31 Am²/Kg (aproximadamente 14.2%) cuando las nanopartículas están internalizadas en las células en comparación con el valor de la magnetización obtenido cuando las mismas SPIONs están fuera del entorno celular, es decir en suspensión libre.

Mediante una curva de calibración permitió cuantificar la masa de SPIONs cuando están internalizadas en las células y para las SPIONs cuando son liberadas de ellas. La cantidad de material magnético por célula se estimó en 145 pg después de 24 horas de incubación

La Tabla 7 presenta los resultados más relevantes derivados de la magnetización de las SPIONs suspendidas en fluidos inertes y de las SPIONs en los cultivos celulares NIH/3T3. Se observa que el error estándar de la media (SEM) de la magnetización

de las SPIONs liberadas de las células (0.08 Am²/Kg) es menor que la magnetización de las SPIONs internalizadas (1.44 Am²/Kg). Esto es debido a que el valor de la masa se obtuvo a partir de la curva de calibración de las suspensiones de SPIONs y Trypsin-EDTA el cual es un ambiente semejante a las SPIONs liberadas de las células. El test de ANOVA indicó que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre el valor de la magnetización cuando las SPIONs están internalizadas en las células y cuando están suspendidas en la solución de fibroína que imita la viscosidad media del citoplasma (4.12 mPa.s).

Tabla 7. Valores de la magnetización de las SPIONs suspendidas en fluidos inertes e internalizadas en cultivos celulares NIH/3T3.

<i>Muestra Magnetización (M) [Am²/Kg]</i>				
		Concentración 0.05 mg/ml	Concentración 2.5 mg/ml	Concentración 10 mg/ml
<i>SPIONs y Fibroína</i> <i>η=3.31mPa.s</i>		40.60±0.45	55.14±0.11	59.63±0.19
<i>SPIONs y Fibroína</i> <i>η=4.12mPa.s</i>		39.20±0.42	54.40±0.08	58.36±0.15
<i>SPIONs y Fibroína</i> <i>η=7.97mPa.s</i>		36.86±0.50	53.33±0.05	55.47±0.08
<i>SPIONs internalizadas en</i> <i>células NIH/3T3</i>		38.02±1.44	-	-
<i>SPIONs no internalizadas en</i> <i>células NIH/3T3</i>		44.33±0.08	-	-

3.2.1.3 Experimentos con osteoblastos de ratón cepa celular MC 3T3 y CT2A

Con la finalidad de avanzar en lo que sería la puesta en marcha de la máquina de hipertermia magnética construida en el laboratorio, se realizaron diferentes experimentos, que fijaran los máximos valores de concentraciones de SPIONs que las líneas celulares existentes en el laboratorio soportarían, dicho esto se procederá a describir dichos experimentos.

Tabla 8. Concentraciones de NPM utilizadas.

control	c1	c2	c3	c4	c5
0 mg/ml	0,625 mg/ml	1,25 mg/ml	2,5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml

Los valores de concentraciones que se observan en la Tabla 8 de SPIONs fueron elegidos porque existían estudios previos en el CTB. Para determinar la citotoxicidad / viabilidad celular, las células se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de 12.500 células por pocillo a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Se utilizaron células de tejido óseo y glioblastoma con el fin de comparar la proliferación de ambas líneas celulares en presencia de nanopartículas. Después de 24 horas de cultivadas, el medio en los pocillos se reemplazó con el medio fresco que contenía nanopartículas en las concentraciones de la tabla anterior.

Los experimentos de citotoxicidad se realizaron para distintos tiempos de cultivo con nanopartículas, 1, 2, 24 y 48 horas. Pasado este tiempo, se añadieron a cada pocillo 1 µl de calceína y 1 µl de yoduro de propidio y se observaron en el microscopio de fluorescencia.

Se realizaron 10 fotos con el filtro azul del microscopio (células vivas) y 10 fotos con el filtro verde (células muertas) de cada pocillo. Estas fotos eran tomadas de forma aleatoria, pero intentando mapear todo el pocillo. De esta forma, se consiguió una buena media para determinar la viabilidad celular. Las fotografías se realizaron con un aumento de 10x.

3.2.1.3.1 Ensayos de control de la estructura de aislamiento térmico

Los primeros ensayos llevados a cabo para realizar el control de la estructura de aislamiento térmico se llevaron a cabo con cultivos celulares en placas de 35 mm que se introducían en el interior de la cueva situada a media altura de la estructura de aislamiento térmico. Con este experimento se quería comprobar la viabilidad celular que se esperaba tuviera una escasa mortalidad, por el simple hecho de encontrarse fuera de la incubadora donde tienen un entorno favorable para su

proliferación (37° C y 5 %de CO₂). Estos ensayos se realizaron con dos líneas celulares distintas (MC3T3 y CT2A) que se utilizaron para todos los demás ensayos que se contarán más adelante con el fin de comparar el comportamiento de ambas.

Para determinar la viabilidad celular, las células se sembraron en placas con una densidad de 72.500 células / placa en una placa de 35 mm de diámetro y se mantuvieron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. La densidad celular es proporcional a la utilizada anteriormente. Esta es calculada sabiendo que la superficie de estas placas es 5 veces la de los pocillos utilizados anteriormente.

Después de 24 h de cultivo, se introdujeron placa a placa en la estructura de aislamiento térmico que ya se encontraba a 37°C tras una hora de exposición, se añadieron a cada pocillo 1 µl de calceína y 1 µl de yoduro de propidio y se vieron en el microscopio de fluorescencia.

Esta vez, se realizaron 25 fotos de células vivas y 25 fotos células muertas de cada placa, tomadas de forma aleatoria, pero intentando recorrer todo el pocillo. Se aumentó el número de fotos ya que el tamaño. De esta forma, se consigue una buena media para determinar la viabilidad celular. Las fotografías se realizaron con un aumento de 10x.

3.2.1.3.2 Experimentos de citotoxicidad

A continuación, se presentan los resultados obtenidos separadamente para ambas líneas celulares.

CT2A

Las células tumorales son más sensibles al calor y con este experimento se quería comprobar si también son más sensibles que otro tipo de células en condiciones desfavorables de crecimiento como lo es encontrarse en un medio incubado con nanopartículas en altas concentraciones en lugar de medio únicamente del que toman los nutrientes para su desarrollo.

En las Figuras 51 y 52 se observan algunos de los resultados fotografiados con el microscopio de fluorescencia tras 24 y 48 horas de incubación con diferentes concentraciones de nanopartículas. En la primera fila se encuentran células muertas, en color rojo, que van aumentando según se avanza de izquierda a derecha. De manera inversa, en la segunda fila se pueden ver a las células vivas, en color verde, como van disminuyendo en número según se avanza en el mismo sentido. Esto se debe a que las imágenes muestran el estado de las células con concentraciones de

nanopartículas desde 0,625 a 5 mg/ml y a mayor concentración se obtiene una mayor mortalidad celular.

Figura 51. Células incubadas durante 24 horas con SPIONs. A- grupo de control; B- [0,625] mg/ml; C- [1,25] mg/ml; D- [2,5] mg/ml; E- [5]mg/ml.

Figura 52. Células incubadas durante 48 horas A-Grupo Control; B- [0,625] mg/ml; C- [1,25] mg/ml; D- [2,5] mg/ml; E- [5]mg/ml 48 horas con NPM.

La Figura 53 muestra los resultados obtenidos de las células incubadas con una concentración de nanopartículas de 10 mg/ml. Esta concentración es excesivamente alta, por ello los resultados muestran una mayoría de células muertas. Tras observar esta alta cantidad de mortalidad, se descartó esta concentración en los experimentos posteriores pues resultaba altamente tóxica y conllevaba un alto gasto

Figura 53. Células incubadas durante 24 (A1; A2) y 48 (B1; B2) horas con una [10] mg/ ml de NPM.

Figura 54. Viabilidad de CT2A a 24 y 48h.

Con el fin de comparar resultados se realizó una gráfica que se muestra en la Figura 54 y en la que se establece la viabilidad de CT2A a 24 y 48 horas. Las barras de color verde claro muestran el porcentaje de células vivas tras 24 horas de incubación con nanopartículas. Éstas, a su vez, están determinadas por las diferentes concentraciones de nanopartículas que se han utilizado. Asimismo, las barras de color verde oscuro muestran el porcentaje para células tras 48 horas con esta misma incubación.

El porcentaje de células vivas se calculó respecto del total de células vivas y muertas, encontradas en las imágenes de un mismo pocillo. El resultado final de cada porcentaje es la media de todos los pocillos utilizados dentro de cada concentración.

Como se puede observar, a mayor concentración de nanopartículas se produce una menor viabilidad celular, como se había observado en las imágenes anteriores, aunque éstas eran meramente ilustrativas. Las muestras con C1 presentan una viabilidad celular muy similar a las muestras de control. Se observa una viabilidad aceptable hasta la C3 que se mantiene relativamente constante a las anteriores.

La C4 representa una caída en el porcentaje de células vivas además de encontrar una gran diferencia entre las dos condiciones de incubación. Por otra parte, la

gráfica demuestra que hay una mortalidad casi total de las células en la concentración de 10 mg/ml, como ya se había comentado anteriormente.

Por lo tanto, se puede interpretar que las líneas celulares cancerígenas soportan la incubación con NPM para concentraciones 2,5 mg/ml o menores.

MC3T3

Se realizaron los mismos experimentos de citotoxicidad sobre osteoblastos con el objetivo de observar lo que les ocurriría también a las células sanas en un posible tratamiento con NPM.

En las Figura 55 se puede observar, de la misma manera que con las CT2A, los resultados de viabilidad celular en cultivos de células MC3T3 con NPM a las 24 y 48 horas.

Figura 55. Viabilidad celular de MC3T3 a las 24 y 48 horas.

Las barras de color verde claro muestran el porcentaje de células vivas tras 24 horas de incubación con nanopartículas. Estas, a su vez, están determinadas por las diferentes concentraciones de nanopartículas que se han utilizado. De la misma

manera, las barras de color verde oscuro muestran este porcentaje para células tras 48 horas con esta misma forma de incubación.

El porcentaje de células vivas se calculó respecto del total, células vivas y muertas, encontradas en las imágenes de un mismo pocillo. El resultado final de cada porcentaje es la media de todos los pocillos utilizados dentro de cada concentración.

Tal y como ocurría con las CT2A, a mayor concentración de nanopartículas también se observó una menor viabilidad celular. Las muestras con C1, presentan una viabilidad celular similar a las muestras de control. En el caso de las muestras con C2, se observó una pequeña baja en la viabilidad. A partir de la C3, los resultados muestran una viabilidad que no puede considerarse no tóxica ya que el porcentaje de células vivas es relativamente bajo para tratarse únicamente de un ensayo sin tratamiento de hipertermia.

Como puede verse, no aparecen resultados para la concentración de 10 mg/ml ya que, como se había dicho anteriormente, se descartó por la alta mortalidad que producía.

3.2.2 Hipertermia Óptica

3.2.3 Soluciones con nanopartículas y micropartículas

Pasadas las 24 horas desde la siembra, tiempo durante el cual las células han quedado fijadas a la superficie del pocillo, se procedió a preparar las soluciones con las partículas para contaminar la muestra y una hora después radiar. Estas soluciones podían también, haber sido preparadas el día anterior junto con la siembra, y haber sido conservadas en frío hasta el día siguiente.

A la hora de emplear micropartículas para optimizar el proceso de hipertermia se optó por preparar soluciones con microesferas de sílice, debido a que no mostraban citotoxicidad celular en los cultivos. Los tipos de soluciones que se prepararon para cada ensayo fueron: 6 pocillos con microesferas de sílice, 6 pocillos con nanopartículas de oro, 6 pocillos con nanopartículas de oro y microesferas de sílice y por último 6 pocillos solo con medio y agua a modo de control.

Se debe tener en cuenta que las microesferas de sílice se encontraban en suspensión con agua destilada, de forma que, al centrifugar, la mitad del volumen resultante era el material y la otra mitad agua. Por este motivo, en aquellos pocillos en los que no hubiese microesferas de sílice, se debía añadir la parte proporcional a la mitad del volumen de las microesferas de sílice correspondientes al agua y la parte correspondiente al material sustituido con medio. De esta forma se hace

posible garantizar la igualdad de condiciones experimentales en todos los ensayos. Por tanto, los volúmenes que se debían emplear para cada solución por cada pocillo serían los siguientes:

- Control: 450 microlitros de medio y 50 microlitros de agua.
- Sílice: 100 microlitros de solución microesferas de sílice y 400 microlitros de agua.

Por otra parte, es importante conocer que la solución de nanopartículas de oro se encontraba a una concentración correspondiente a una densidad óptica de 50. Dado que se pretendía trabajar con valores de densidad óptica 1, y que al caracterizar partículas la densidad óptica en las partículas de oro parece disminuir linealmente con la disminución de la concentración, se puede decir que la densidad óptica es directamente proporcional con la concentración y por tanto se puede diluir de forma directa. Este es el motivo por el cual, al preparar la solución para contaminar los pocillos, cuando van a contener nanopartículas de oro, se realiza previamente una disolución, formada por:

- Oro: 8 microlitros de nanopartículas de oro, 392 microlitros de medio, 50 microlitros de medio correspondientes al volumen de microesferas de sílice y 50 microlitros de agua correspondientes al agua de la solución de las microesferas de sílice
- Oro y sílice: 8 microlitros de nanopartículas de oro, 392 microlitros de medio y 100 microlitros de microesferas de sílice

Siguiendo este esquema, pudo fabricarse soluciones de 500 microlitros para cada uno de los tipos de contaminación. La relación equivalente de volúmenes para 6 pocillos es la que se puede apreciar en la Tabla 9.

Tabla 9.Relación de volúmenes para soluciones.

Ensayo	Partículas oro	Partículas sílice	Medio	Agua	Total
Oro DO=50	48	0	2352	0	2400
Oro DO=1	2400	0	300	300	3000
Sílice DO=1	0	600	2400	0	3000
Control	0	0	2700	300	3000
*Oro DO=50	48	0	2352	0	2400
Oro + Sílice	2400	600	0	0	3000
Total	96	600	9804	300	12000

El hecho de introducir agua en todas las muestras que no contenían microesferas de sílice obliga necesariamente la toma de controles en ausencia de esta cantidad de agua para las soluciones solo con medio (control) y solo con nanopartículas de oro. Esta solución se preparó simplemente añadiendo a los pocillos 500 microlitros de medio en el caso del control y 500 microlitros de solución diluida a densidad óptica 1 en el caso de las nanopartículas de oro. En este caso se tomaron 4 pocillos de cada tipo para cada tiempo.

3.2.3.1 Optimización de la técnica de hipertermia óptica con material dispersante

El proceso de hipertermia óptica se sometió a un largo proceso de optimización que tomó aproximadamente tres años, en dicho proceso se optimizaron casi todas las variables involucradas en el proceso, empleando sílice.

Figura 56. Diagrama de bloques resumen de la optimización de la técnica de hipertermia óptica.

En la Figura 56 se observa el diagrama de bloques resumen del proceso de optimización, el proceso inicia con unas condiciones iniciales realizadas por la predecesora de este proyecto [80], como es la potencia de irradiación, 1 Watt/cm², Duración de la terapia 30 minutos, densidad óptica 1, tipo de nanopartículas *nanorods*, mortalidad $\geq 90\%$ línea celular astrocitoma cerebral humano (1321N1; ECACC 86030402). El proceso inicial fue descrito al inicio de esta sección en el cual se adquiere al Silice por sus propiedades biocompatibles, así como sus buenas características previamente descritas, dicho proceso tomó alrededor de un curso académico, una vez validado la mortalidad celular con experimentos de citotoxicidad, y ensayos con irradiación con láser en cuatro tipo de muestras: Grupo Control (medio de cultivo celular), Grupo Solo Silice, Grupo Oro disminuido su concentración en 20 %, y Grupo Oro + Silice en las proporciones de la sección previamente descrita. Seguidamente el proceso de optimización se realizarondisminuciones en los tiempos de irradiación en intervalos de 10 minutos (30 minutos, 20 minutos y 10 minutos), y se corroboró que a 10 minutos en los cuatro tipos de muestras se mantuvo la tasa de mortalidad superior al 90%, lo que se consideró como validada y, por último, se implementó la disminución en la potencia irradiada del 10 y 20 % por ciento respectivamente, validando 900

mWatt/cm² como la potencia optima de la técnica. Durante todo el proceso se utilizaron dos líneas celulares CT2A (Glioblastoma murino de ratón) y MC3T3 (Osteoblastos de ratón), la primera representando una línea celular cancerígena y la segunda una línea celular no cancerígena, con el fin de verificar si hay diferencias en la mortalidad entre líneas celulares cancerígenas y no cancerígenas. Las Figs. 57 y 58 presentan los resultados finales de este proceso:

Figura 57. A Graficas de mortalidad celular en CT2A a 10 minutos de irradiación, 900 mWatt. B Graficas de mortalidad celular en MC3T3 a 10 minutos, 900 mWatt.

Figura 58. CT2A: 900 mW a 10 minutos. A. Grupo Control. B. Grupo Sílice. C. Grupo GNRs. D. Grupo GNRs más sílice.

En la Figura 58 se observan los resultados del microscopio de fluorescencia tras radiar las células a 900mW. Se ha utilizado el programa *ImageJ* para hacer la composición de imágenes y poder observar la tasa de mortalidad en cada imagen, las células muertas están en color rojo debido a la tinción con el yoduro de propidio que señala el aumento de la cantidad de células muertas. Por otro lado, las células

vivas se encuentran en color verde debido a la tinción con calceína, que, de manera inversa al anterior, disminuye el número de ellas según avanzamos.

Esto se debe a que las imágenes muestran el estado de las células cuando son radiadas en ausencia de micropartículas de sílice y *nanorods* de oro, y cuando son radiadas en presencia de éstas. Como se puede observar cuando se radian las células junto con las *nanorods* de oro y micropartículas de sílice, hay una mayor mortalidad celular.

Las tasas de mortalidad entre 1 W y 900mW a 10 minutos, prácticamente no difieren entre ellas, puesto que siguen siendo lo suficientemente elevadas como para considerar la muerte absoluta de las células tumorales. Sin embargo, entre las potencias de 900mW y 800mW se observó una gran disminución de la tasa de mortalidad celular, descartando de esta manera la potencia de 800mW como la potencia óptima de radiación. El resultado final de cada porcentaje es la media de los pocillos que se encuentran dentro de la distribución normal que se realizó para descartar valores erróneos.

Además, para cada gráfica se muestran las barras de error calculado por medio del estudio estadístico, que se encontrará en el mismo apartado mencionado anteriormente.

Para decidir qué potencia de radiación fue la óptima, se comparan los resultados junto con la línea celular MC3T3, como se verá más adelante. Se realizaron los mismos experimentos de mortalidad celular *in-vitro* sobre células precursoras de osteoblastos, con el objetivo de observar lo que ocurría sobre las células sanas con las GNRs y micropartículas de sílice al radiarlas con las mismas potencias que las células cancerígenas.

En este contexto, no se realizaron experimentos con una potencia de radiación a 800mW con las MC3T3, debido a que previamente se hicieron los ensayos con las CT2A a dicha potencia, observando que la tasa de mortalidad disminuía significativamente con respecto a 1 W y 900mW, y por tanto 800mW sería la potencia que se descartó desde el principio.

En los ensayos inertes y con la finalidad de validar la temperatura alcanzada con el sistema de hipertermia a las condiciones antes mencionadas, las muestras estaban en ausencia de células, y únicamente se realizaron ensayos en presencia de nanopartículas de oro y micropartículas de sílice.

Los resultados a las potencias de 1 W y 900mW, se descartaron en los ensayos de mortalidad. Con cada uno de los grupos se tomaron 3 medidas de datos diferentes que se muestran en un gráfico de barras donde se representa el promedio de la máxima temperatura de cada grupo con su respectivo error medio muestral (SEM), con el fin de representar las curvas de temperatura más adecuadas. En la Figura 59 se puede observar que se alcanzan temperaturas de hipertermia tanto con las GNRs como con sílice más GNRs.

Figura 59. Diagrama de barras de ensayos inertes de los diferentes grupos a 900 mW durante 10 minutos.

3.3 EXPERIMENTOS *IN-VIVO*

3.3.1 Hipertermia Óptica

3.3.1.1 Experimentos con glioblastoma murino de ratón CT-2A

Se realizaron tres aproximaciones experimentales, la primera consistió en inocular ratones con la cepa tumoral, inyectando nanopartículas con recubrimiento de proteína G en el cual se obtuvo un rango muy amplio, sin embargo, se consiguieron reducciones en los crecimientos de aproximadamente 15 % en comparación a los grupos controles.

En la segunda aproximación se modificaron algunas variables lo que permitió reducciones un poco mayores pero el margen superior prevaleció en 15 % de reducción en el crecimiento tumoral. Para el último acercamiento al desarrollo de la nueva tecnología, se reprodujo el escenario quirúrgico normalmente utilizado para la resección del tumor, aunque se aplicó un tratamiento fototérmico en lugar de la extirpación del tumor.

Aunque este tipo de cáncer crea tumores sólidos, también es muy infiltrante lo que no se puede tratar con resección. Por lo tanto, el tratamiento fototérmico podría ser no solo una forma de tratar tumores sólidos, sino también una herramienta complementaria junto con la cirugía de resección, cuando sea aplicable, para tratar el volumen circundante del tumor que no es tratable con cirugía. Después de dos semanas de crecimiento tumoral, los tumores resultantes se trataron con la técnica de hipertermia óptica descrita anteriormente.

Para describir los volúmenes tumorales, las mediciones se realizaron con RMN. Los datos muestran una detención en el crecimiento tumoral en ratones tratados en comparación con sus respectivos controles. La disminución en el volumen del tumor representa entre 15 y 75%, y en dos ratones, pertenecientes a diferentes series experimentales, se observó una remisión prácticamente total.

3.3.1.1.1 Modelo de tumor de ratón

Se realizaron un total de tres experimentos usando ratones C57BL/6 de cuatro meses ($35,26 \text{ g} \pm 1,01$ de peso corporal). Los animales fueron alojados con acceso libre a comida y agua en una sala de animales con una temperatura controlada y un ciclo de luz natural. Las rutinas diarias se realizaron entre las 7 a.m. y las 4 p.m. por personal autorizado.

Las células CT-2A se inyectaron en el caudate putamen derecho (CP) de veintisiete animales de experimentación mediante inyección intracraneal utilizando una guía estereotáctica.

Los ratones se anestesiaron profundamente con isoflurano inhalado (Isoflo) y se colocaron en un marco estereotáxico para ratones (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EE. UU.).

Mientras se realizaba una anestesia profunda, se realizó una incisión sagital a través de la piel para exponer el cráneo, y se perforó un orificio de trépano a 0,1 mm anterior y 2,25 mm lateral a bregma. Se insertó una jeringa Hamilton de 10 μL

(Hamilton, Reno, NV, EE. UU.) Con una aguja de calibre 27 desde la superficie del cerebro a 4 mm de profundidad para la infusión de células tumorales.

Las células tumorales se inyectaron en un volumen de 0,15 μ L durante un intervalo de tiempo de 15 minutos, esta cantidad fue equivalente a aproximadamente 3000 células. Dos semanas después del implante celular, se confirmó la proliferación celular adecuada mediante inmunohistoquímica y MRI.

Dos semanas después de la implantación de la célula tumoral, se evaluó la presencia y el tamaño del tumor cerebral generado mediante MRI.

Todos los procedimientos se realizaron según los reglamentos españoles para la experimentación animal (Leyes 53/2013 y ECC / 566/2015) sobre experimentos con animales y con el Comité Ético del Consejo Español de Investigaciones Científicas (CSIC).

Los experimentos y mediciones se realizaron utilizando una manta térmica para mantener estable la temperatura corporal del ratón y así evitar que la temperatura caiga debido a la anestesia.

Figura 60. Proliferación celular como se ve por tinción de H & E y MRI. Los paneles A, B representan imágenes ponderadas en T1 (gadolinio poscontraste) correspondientes al mismo tumor experimental CT-2A representado en B, C, respectivamente, que muestran la progresión tumoral a diferentes niveles rostro-caudal dos semanas después del implante celular. Observe que en A y B la señal hiperintensa está restringida al CP en el hemisferio

derecho. El recuadro en D muestra una imagen mitótica cerca de un vaso sanguíneo neoformado. Barras de escala: A, B = 5 mm; C, D = 1 mm, inserción en D = 15 μ m.

Figura 61. Diagrama del resumen de la metodología.

3.3.1.1.2 Histopatología

Todos los ratones se evaluaron clínicamente y se sacrificaron en diferentes intervalos de tiempo, 7, 14, 21 y 28 días después de los implantes celulares. Los animales experimentales se sacrificaron cuando mostraron signos de disfunción motora o mostraron síntomas consistentes con la falta de crecimiento según los protocolos de cuidado animal. La histopatología se realizó en secciones de tejido coronal obtenidas a través de los mismos niveles rostro-caudal que previamente se identificaron mediante MRI y que mostraban crecimiento tumoral. Los ratones se anestesiaron profundamente como para RMN y luego se perfundieron transcardialmente a través de una cánula roma con 20 ml de solución salina tamponada con fosfato de Gibco (PBS) seguido de 40 ml de paraformaldehído al 4% en tampón de fosfato 0,1 M (PB), pH 7,4. Los cerebros se eliminaron y se fijaron posteriormente durante 4 horas por inmersión en el mismo fijador, a temperatura ambiente. Para H & E, los bloques de tejido con tinción se incrustaron en parafina y luego se cortaron coronalmente en secciones de 5 μ m (Figuras 60, C). Para la inmunohistoquímica de microscopía óptica, el tejido cerebral se seccionó a 40 μ m en

el plano coronal con la ayuda de un vibratomo (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania)

3.3.1.1.3 Inmunohistoquímica

La expresión de la proteína CD133 en el tumor experimental se evaluó utilizando anticuerpos policlonales (laboratorios Sr John's, STJ201168). Ki67 inmunotinción utilizando anticuerpos policlonales (ab15580 abcam) también se llevó a cabo para evaluar la proliferación celular [87]. La inmunohistoquímica se realizó según los métodos estándar del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC)[88]. La inmunohistoquímica para CD133 y Ki67 se llevó a cabo en secciones de flotación libre que se preincubaron en H₂O₂ al 1% en PBS durante una hora para bloquear la peroxidasa endógena. Las secciones fueron tratadas con 3% de suero normal obtenido de la especie que proporciona los anticuerpos secundarios diluidos en PBS que contiene 0,2% de Triton X-100, durante 1 ha temperatura ambiente (RT). Luego, las secciones se incubaron durante la noche a 4°C en los anticuerpos primarios diluidos en PBS que contenía 0,2% de Triton X-100. Las diluciones de anticuerpos fueron: i) CD133, 1: 500 y ii) Ki67. Después de lavar a fondo en PBS, se incubaron secciones histológicas con anticuerpos secundarios biotinilados, inmunoglobulinas anti-conejo de cabra 1: 200 en PBS (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.) Durante 1 ha TA. Después de lavados adicionales, las secciones se incubaron con ABC unido a peroxidasa (Vector Laboratories) durante 90 minutos. La actividad de la peroxidasa fue desarrollada por el 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) mejorado con níquel como se describe[89]. Finalmente, las secciones se lavaron, montaron y deshidrataron para la visualización de microscopía óptica. Las secciones histológicas se examinaron con un microscopio Zeiss Axiophot II (Zeiss Iberica, Madrid, España) e imágenes capturadas con una cámara digital (DMC 1e, Polaroid, Cambridge, MA, EE. UU.). El método de etiquetado BrdU[90] también se utilizó para estudios de proliferación celular tumoral *in vivo*, siguiendo un procedimiento previamente publicado por el laboratorio[91]. Se utilizó *nestina* como un marcador para el endotelio proliferativo en gliomas, y se combinó su expresión inmunocitoquímica con BdrU *immunostaining* en nuestro modelo de tumor por inmunofluorescencia. La tinción de inmunofluorescencia para microscopía confocal se llevó a cabo incubando secciones de tejido en el anticuerpo de rata específico para BrdU (1: 2000, abcam) y anticuerpos de conejo para nestina (1: 000, Sigma-Aldrich, SAB4200347). Las secciones se lavaron a fondo con PBS, los anticuerpos primarios se visualizaron usando los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con Alexa, v.g. Alexa Fluor® 488 burro anti-conejo y Alexa Fluor® 568

anti-rata de cabra (1: 1000, Invitrogen, Molecular Probes) durante 2 horas a temperatura ambiente y montado en portaobjetos de vidrio con medio de montaje anti-fotoblanqueo (DABCO / Mowiol). Para los experimentos de control, las rodajas se tiñeron solo con anticuerpos secundarios. Las secciones se contratiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 300 nM en PBS, Invitrogen) y se examinaron en un microscopio confocal LEICA TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Para los experimentos de control, las rodajas se tiñeron con anticuerpos secundarios solamente. IgG anti-ratón de C3-burro y IgG anti-conejo de burro Rhodamina roja (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA, EE. UU.) Diluido 1: 200 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las imágenes confocales se adquirieron utilizando un escáner Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). No se detectó inmunomarcaje cuando los anticuerpos primarios se omitieron o se reemplazaron con una concentración equivalente de suero normal de ratón o conejo. Además, la preabsorción con un exceso del antígeno evitó la tinción en todos los casos.

3.3.1.1.4 Biofuncionalización de nanopartículas de oro con anticuerpo CD133

Se descubrió que la proteína G captura una amplia gama de Ig, incluida IgG de conejo, a través de la región Fc de IgG. Esta es la razón por la cual el compuesto GNR-proteína G se diseñó para la biofuncionalización de nanopartículas de oro. Los GNR (10 × 40nm C12-10-808-TPG-50, NANoPARTz, OD / ml: 50) se sintonizaron en la fuente de láser, con un pico de resonancia de plasmón de superficie (banda longitudinal) a 808 nm, nanopartículas de oro comerciales-Proteína G se resuspendieron completamente en PBS para obtener una suspensión homogénea. Para la captura de Ig, se transfirieron 100 μ l de solución de nanopartículas - proteína G a un tubo a temperatura ambiente (RT) y se lavó en PBS varias veces mediante centrifugación durante 5 minutos a 14,5 rpm, a temperatura ambiente. Luego, se agregaron anticuerpos policlonales contra CD133 (St John's Laboratory, STJ 20168) a una dilución final de 1: 500 en una solución hecha de 100 μ L de nanopartículas lavadas-proteína G en 500 μ L de BSA al 3%. La mezcla se incubó durante 1 hora con agitación rotativa suave, a 4 °C. La mezcla se lavó luego tres veces en 600 μ L de BSA al 3% mediante centrifugación durante 5 minutos a 14,5x1000 rpm, a temperatura ambiente. Después de la última centrifugación, el compuesto GNR-proteína G-CD133 se resuspendió en 100 μ l de PBS.

3.3.1.1.5 Dispositivo y parámetros

El dispositivo de hipertermia óptica utilizado fue una onda láser continua (MDL H808, con fuente de alimentación PSU-H-LED, Changchung New Industries, Changchun Jilin, China) que trabaja a 808 nm, con una potencia de salida máxima de 5 W, una altura de haz desde la base de 29 mm, un diámetro de haz con una apertura de 5-8 mm³, y dimensiones de cabeza láser de 155 × 77 × 60 mm³. El láser se conectó al sistema a través de una fibra óptica multimodo con un diámetro del núcleo de 600 μm, una longitud de 1,5 m y una transmisión de potencia del 90-99% (600 μm de fibra MM, Changchung New Industries). La fibra óptica se fijó a la estereotáxica suspendida verticalmente a través de una lente de colimación (78382, Newport, Irvine, CA) con la orientación hacia abajo a una densidad de potencia de 3,55 vatios / cm² para esto se utilizó un medidor de potencia Newport modelo 843-R con Newport 818-SL fotodetector.

3.3.1.1.6 Terapia de Hipertermia Óptica

Dos semanas después de la implantación de la célula tumoral, los ratones fueron pesados y luego anestesiados con 1% de isoflurano. Los animales seleccionados al azar se procesaron para terapia fototérmica. Utilizando el mismo protocolo de cirugía que en la sección anterior, se inyectaron 2 μL de GNR biofuncionalizadas a 4 mm de profundidad, el mismo lugar donde las células tumorales se inyectaron previamente dos semanas antes, a una velocidad de 0,5 μL / min. Después de 5 minutos, se inyectó una segunda dosis de 2 μL a una profundidad de 2 mm levantando la aguja de manera apropiada. 10 minutos después de la segunda inyección, se retiró la aguja. En resumen, se inyectaron un total de 4 μL de GNR biofuncionalizados. El láser se enfocó a través del mismo orificio de trépano previamente utilizado para inyectar las células tumorales y GNR biofuncionalizadas. El proceso de radiación se llevó a cabo durante 25 minutos continuos. El procedimiento se replicó durante tres días consecutivos a dieciocho ratones llamados grupo tratado (Figura 61).

3.3.1.1.7 Mediciones de temperatura

Se introdujo una sonda térmica (Luxtron Corporation) en el tejido cerebral a través de un orificio de rebaja adicional de 1 mm (Figura 62) para analizar la magnitud del aumento de temperatura después de la irradiación con láser de los CD133-GNR

inyectados. El experimento se llevó a cabo en tres animales sometidos al mismo protocolo de inyección de nanopartículas y se iluminó con un láser durante 25 minutos. Las muestras se registraron cada segundo utilizando el software suministrado por el fabricante en el software LabView y versión 2011.

Figura 62. Metodología para medir temperatura.

3.3.1.1.8 Adquisición de MRI

La resonancia magnética se realizó en la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y el Centro de Giro Electrónico de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) usando un escáner de RM de mesa Tesla [Icon (1T-MRI); Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Alemania]. El sistema consiste en un imán permanente de 1 T (sin refrigeración adicional requerida para el imán) con una bobina de gradiente que proporciona una resistencia de gradiente de 450 mT / m. Los sistemas de monitoreo animal y la bobina RF de cabeza de ratón solenoide para la 1T-MRI se integraron en la cama y permitieron que los animales se manejaran con un posicionamiento preciso de la bobina y un control total de la anestesia y la temperatura corporal. Quince minutos antes de colocar el ratón en el lecho de MRI, a los ratones se les inyectó intraperitonealmente 0,4 mmol / kg de Gadopentetato dimeglumina (Gadolinio, Magnevist, Schering, Alemania). Los animales se anestesiaron con una mezcla de isoflurano en oxígeno (2% para inducción y 1% para mantenimiento).

Con el fin de evaluar el volumen del tumor, el experimento de RM consistió en imágenes de dos tiempos de eco de espín rápido (FSE) pre y post contraste, T1 y T2 (T1WI, T2WI). Ambas secuencias fueron adquiridas con la misma geometría y resolución: campo de visión de 20 × 20 mm, número de cortes de 15, grosor de corte de 1 mm, tamaño de matriz 160 x 160 reconstruido a 200 x 200, resolución final de 0.100 x 0.100 mm. Los parámetros de T2WI fueron los siguientes: tiempo de repetición / tiempo de eco (TR / TE), 3040/96 ms; 12 promedios, longitud del tren de eco, 12; tiempo de adquisición ~ 8 minutos. Los parámetros de T1WI fueron: TR / TE, 262/6 ms; 36 promedios, longitud del tren de eco, 2; tiempo de adquisición ~ 12 minutos. La primera medición se realizó tres semanas después de la inoculación. El volumen del tumor se analizó utilizando el software libre ImageJ 1.50i. En todos los casos, se midieron los volúmenes tumorales absolutos y relativos, normalizados con respecto al volumen total del cerebro. Las imágenes se repitieron una semana después para todas las personas. En los casos que muestran una clara tendencia de supervivencia, se llevaron a cabo dos estudios MRI adicionales semanales, hasta un total de cuatro escaneos.

3.3.1.1.9 Estudios ultraestructurales

Se cortó el tumor CT-2A experimental tratado con nanopartículas de oro activadas con CD133, en secciones de tejido de 40 µm de espesor, utilizando un vibratomo. Para la ubicación subcelular de las nanopartículas de oro, las secciones de tejido se procesaron como para microscopía óptica, excepto que Triton X-100 se evitó en las etapas de incubación. Las secciones se lavaron durante 5 minutos en PBS primero y luego en 0,1M de PB, se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1% en 0,1M de PB durante 1 hora, se deshidrataron en etanol de concentraciones crecientes y se tiñeron en bloque en acetato de uranilo (1% en 70 % de etanol) en la oscuridad durante 40 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las secciones se incrustaron de forma plana y se montaron en portaobjetos de resina DurSphere ACM (Sigma-Aldrich Inc.) bajo cubreobjetos de plástico y se curaron durante 3 días a 56 ° C. Las áreas seleccionadas del tumor se disecaron y se volvieron a incrustar en Durcupan. Se obtuvieron secciones ultrafinas con la ayuda de un ultramicrotomo Reichert OM U3 (Reichert, Alemania), se montaron en rejillas recubiertas de formvar, se tiñeron con citrato de plomo y se examinaron bajo un microscopio electrónico Jeol 1200 (Jeol, Tokio, Japón) a 80 Kv.

3.3.1.1.10 Resultados

Las células CT-2A crecieron *in vitro* como una monocapa de células con forma fusiforme. Cinco a diez días después de la inyección intracraneal con células CT-2A, se observó una masa hipercelular blanda no cohesiva cerca del sitio de inyección (Figuras 63). Tres a cuatro semanas después del implante celular, se detectó un tumor blando altamente angiogénico y hemorrágico (Figuras 63A).

Figura 63. La proliferación celular como se ve por RMN y tinción de H & E. Los paneles A, B representan imágenes ponderadas en T1 (gadolinio poscontraste) correspondientes al mismo tumor experimental CT-2A representado en B, C, respectivamente, que muestran la progresión tumoral a diferentes niveles rostro-caudal, dos semanas después del implante celular. Observe que en A y B la señal hiperintensa está restringida al CP en el hemisferio derecho. El recuadro en D muestra una imagen mitótica cerca de un vaso sanguíneo neoformado. Barras de escala: A, B = 5 mm; C, D = 1 mm, inserción en D = 15µm.

Los márgenes tumorales fueron típicamente bien definidos, fusionándose de manera discernible con la sustancia blanca y gris adyacente. El análisis histológico mostró rasgos característicos de un astrocitoma de alto grado, como índice mitótico alto,

proliferación microvascular y densidad celular (Figura 63A, B, C, D) y un área central de necrosis según lo informado previamente por nuestro laboratorio [28]. Bajo el microscopio electrónico, las células tumorales eran pleomórficas, grandes fusiformes o pequeñas, con núcleos característicos que exhibían áreas de heterocromatina y nucleolos prominentes frecuentes. El citoplasma contenía abundantes mitocondrias y polirribosomas, lo que indica una alta tasa metabólica y sintética. Los tumores mostraron una gran heterogeneidad.

Figura 64. Caracterización de tumores cerebrales inducidos por CT-2A. A. Secciones coronales de 1 mm de grosor a través del mismo cerebro de ratón con una masa tumoral hemorrágica CT-2A situada en el hemisferio cerebral derecho, 28 días después de la inyección de células CT-2A. La fotografía fue tomada después de la resonancia magnética (B) in vivo y la extracción del cerebro en el momento de la necropsia para la histología. B, los paneles representan imágenes ponderadas en T1 (gadolinio poscontraste) a diferentes niveles rostro-caudal correspondientes al mismo tumor experimental CT-2A representado en A, que muestra la progresión tumoral cuatro semanas después del implante celular. Obsérvese en B una señal hiperintensa en el borde del tumor que indica que el borde del tumor está bien vascularizado y también una hipoatenuación en regiones centrales del tumor que sugiere necrosis. Barras de escala: A, B = 4 mm.

3.3.1.1.10.1 *Análisis por resonancia magnética*

El reconocimiento de tumores intracraneales se mejoró notablemente con la administración previa de gadolinio, con un límite de resolución de 0,8-1 mm³. La RM convencional potenciada en T1 (gadolinio post contraste) proporcionó una sensibilidad excepcional para detectar y delinear la ubicación de los tumores intracraneales (Figura 66 A, B, C, D). Las imágenes potenciadas en T1 con aumento de gadolinio de la vascularización se usaron rutinariamente para detectar la ubicación, los márgenes, el tamaño y el crecimiento del tumor. Las imágenes de MRI con respecto al tamaño del tumor y la ubicación se correlacionaron con precisión con los resultados del análisis histopatológico en este estudio (Figura 66). Las imágenes

pesadas en T1 revelaron una masa de mejora heterogénea bien definida que surgió en el CP extendiéndose a lo largo del tiempo rostro-caudalmente y eventualmente involucrando la corteza cerebral y el hipocampo. La progresión del tumor se verificó mediante MRI en serie a lo largo del tiempo, y se obtuvieron con éxito imágenes semanales de tumores CT-2A experimentales (Figuras 69). El tumor experimental se caracterizó por un crecimiento rápido apenas detectable 1 semana después de la inyección y se hizo insoportable a las 4 semanas. En ese momento, los ratones comenzaron a presentar complicaciones neurológicas y tuvieron que sacrificarse. El crecimiento tumoral dio como resultado una marcada deformación de los tercetos ventrículos laterales y dorsal. Se observó con frecuencia una hipoatenuación central del tumor en las imágenes potenciadas en T1 que sugerían necrosis central que se confirmó en el análisis histológico de esos casos.

Aparecieron signos de destrucción del parénquima cerebral y aumento de la presión dentro del cerebro al invadir las estructuras cerebrales vecinas como consecuencia del crecimiento del tumor. Después de 20-25 días después de la implantación, los ratones comenzaron a mostrar signos de presión intracraneal elevada. Síntomas como letargo o disfunción motora con la postura encorvada, mala preparación, falta de crecimiento y pérdida de peso, eran comunes. La periferia del tumor tenía en todos los casos un suministro sanguíneo bien establecido como lo revela el patrón mejorado en las imágenes potenciadas en T1 con gadolinio (Figura 66B). Inmunohistoquímica: la inmunocitoquímica de microscopía óptica para CD133 y Ki67 reveló numerosas células CT-2A positivas en la masa del tumor (Figura 66D). Ki67 muestra tinción nuclear intensa (Figura 66A y B) mientras que CD133 fue exclusivamente citoplasmático, con el producto de reacción acumulado en puntos en el citoplasma de las células tumorales (Figura 66 C). Particularmente, la tinción de Ki67 se acumuló en el borde del tumor. Numerosas células Ki67 positivas se detectaron dentro de la masa tumoral, siendo más abundantes en el borde tumoral y cerca de los vasos sanguíneos (Figura 66 A, B). Bajo el microscopio electrónico, se llevó a cabo el producto final de inmunoreacción subcelular utilizando el compuesto de anticuerpo B-GNR como anticuerpo primario. Ocasionalmente B-GNR inmunomarcado unido a la membrana nuclear, mientras que la mayoría de los productos de inmunoreacción B-GNR es intracelular, asociado con orgánulos intracelulares (Figura 66 C, D).

Figura 65. A. Imagen de microscopía electrónica de células tumorales CT-2A teñidas con osmio que ilustran el aspecto ultraestructural de las células tumorales en la zona de transición con el cuerpo estriado. Las células tumorales muestran pleomorfismo citológico con nucléolos prominentes, procesos delgados y heterocromatina característica. Observe las fibras mielínicas adyacentes del cuerpo estriado en el neurópulo circundante y el edema aparente, lo que sugiere una inflamación del tejido. B, Micrografía de luz que muestra la deposición intratumoral de B-GNR unida a las células tumorales como se revela por tinción inmunohistoquímica, capilares cercanos. En C y D, el producto de inmunorreacción parece etiquetar nanopartículas que se acumulan intracelularmente (flechas grandes). C y D, ilustran la ubicación subcelular de los complejos que forman el producto final de inmunorreacción B-GNR unidos a la membrana nuclear (C) y orgánulos intracelulares (D). E, es un aumento de potencia superior del producto de reacción mostrado en C que muestra la inmunorreactividad de B-GNR asociada con la membrana nuclear. Barras de escala: A = 15 μm ; B = 100 μm ; C = 5 μm ; D = 0,25 μm .

Se evaluó la eficacia de la biofuncionalización: para B-GNR como herramienta para unir células tumorales mediante inmunohistoquímica y la ubicación subcelular de B-GNR en secciones de tejido después de la inyección *in-vivo*. Las secciones tisulares se procesaron para detectar CD133 endógeno utilizando la resuspensión de muestra de B-GNR como anticuerpo primario. La inmunohistoquímica se llevó a cabo como se muestra para la inmunohistoquímica de CD133 (histopatología). Por esta razón, se usaron B-GNR resuspendidos, diluidos 1: 100 en PBS que contenía Triton X-100 al 0,2%, como anticuerpo primario. Las secciones tumorales, de 40 μm de grosor, se incubaron durante la noche a 4°C con agitación continua. Luego, las secciones de tejido se lavaron completamente y se procesaron para inmunohistoquímica siguiendo los mismos pasos que para la inmunohistoquimioterapia con CD133. Por

microscopía óptica se encontró que el producto de la reacción marcó exclusivamente las células CT-2A proliferantes, siguiendo la misma distribución celular que la observada para la inmunohistoquímica de CD133. Este último sugiere que las GNRs soportan de manera consistente anticuerpos anti-CD133 apoyados por los resultados de microscopía electrónica.

Figura 66. Caracterización inmunocitoquímica de tumores cerebrales inducidos en ratones C57BL / 6, 21 días después de la implantación de la línea celular CT-2A. Las micrografías claras A-C ilustran las células positivas Ki67 (A, B) y CD133 (C) en la masa tumoral. Observe en A que numerosos vasos sanguíneos intratumorales (asteriscos) se ven en la masa tumoral. También en B, las células positivas para ki67 exhiben un producto de inmunorreacción en el núcleo celular de las células que se organiza típicamente alrededor de un capilar. Además, ver en C punta del producto de inmunorreacción de CD133 restringido a células tumorales. El color amarillo en la parte inferior del lado izquierdo en C representa una región hemorrágica. D, ilustra la neoangiogénesis asociada a tumor mediante tinción de inmunofluorescencia doble para BrdU (núcleo celular, rojo) y Nestina (endotelio proliferante, verde). Como se informó previamente para los gliomas humanos, la inmunorreactividad de Nestin se encontró como un marcador en este estudio para el endotelio proliferativo en el modelo CT-2A. El recuadro en D, muestra detalles de un capilar proliferante anómalo. Barras de escala: A = 500 μ m; B = 200 μ m; C = 50 μ m; D = 100 μ m; Recuadro en D = 50 μ m.

3.3.1.1.10.2 Mediciones de temperatura

Para corroborar la generación de un aumento adecuado de la temperatura para eliminar las células por hipertermia, los cambios de temperatura se determinaron in situ, después de la inyección de B-GNR como se describe en la sección 3.3.1.1.7. Los resultados muestran que en el grupo de control (PBS) el aumento de temperatura fue: 40.0 ± 0.5 ° C. En marcado contraste, el grupo inyectado con B-GNR y luego irradiado con láser la elevación de la temperatura fue: 43.0 ± 1.0 ° C.

3.3.1.1.10.3 Terapia de hipertermia óptica

El crecimiento tumoral se analizó en dos momentos: semana 1 (una semana después de la irradiación con láser, tres semanas después del implante celular) y semana 2 (dos semanas después de la irradiación con láser, cuatro semanas después del implante celular), 168 horas y 336 horas, respectivamente, después de la irradiación con láser de B-GNR administradas endógenamente (CD133-GNR, 18 animales) y grupos control PBS + Laser (Control, 9 animales). La Figura 67 muestra las diferencias en las relaciones de volumen tumoral entre grupos, CD133-GNR y control. El gráfico muestra la evolución del tumor como un porcentaje del volumen del tumor con respecto al volumen total del cerebro.

Figura 67. Volumen tumoral, expresado como un porcentaje del volumen total del cerebro, en ratones control (PBS + láser) y B-GNRs + láser (CD133-GNR), en la semana 1 y la semana 2 (períodos de tiempo después de la irradiación con láser). Los datos representan la media $\pm$ SEM de $n = 3$ experimentos independientes. La prueba t de Student reveló una diferencia significativa ($p = 0,03$) entre control y CD133-GNR en la semana 1. El grupo CD133-GNR alcanzó un mayor beneficio de significación ** en la semana 2 ($p = 0,008$).

El volumen del tumor fue medido por MRI a diferentes tiempos después del post-tratamiento. La “semana 1” y la “semana 2” tuvieron de control (PBS+Laser) y B-GNRs+Laser (CD133-GNRs) de los post-tratamientos. En la semana 1 el grupo CD133-GNRs mostró una reducción significativa en el volumen del tumor con respecto al control ($p=0.03$): 1,8% vs 4.7 %, con respecto al tamaño del cerebro. Es interesante señalar que las diferencias en la progresión del tumor entre estos grupos se hicieron altamente significativo en la semana 2 ($p=0.008$): 8.1% vs 22.9 con respecto al tamaño del cerebro. Estos datos apoyan la idea que el tratamiento CD133-GNRs +Laser ejerce un efecto tumoral potente en el modelo astrocitoma de los ratones CT-2A.

Figura 68. Imágenes de MRI de dos ratones elegidos al azar de ambos grupos: Control (A, B) y CD133-GNR para 'Semana 1' (A, C: tres semanas después del implante CT-2A) y 'Semana 2' (B, D: cuatro semanas después del implante CT-2A) postratamiento, respectivamente. Estas imágenes muestran una aparente desaceleración en la progresión del tumor en el grupo CD133-GNR.

En este estudio, ratones B-GNR + tratados con láser mostraron un claro comportamiento de reducción tumoral. Los tumores se analizaron en semanas consecutivas 1 y 2 después del tratamiento de hipertermia. Los paneles en la Figura 69 corresponden a la RMN de la misma sección cerebral de dos ratones representativos, control (PBS + láser, Fig. 68 A, B) y tratados (B-GNR + láser, Fig. 68 C, D) adquiridos en semanas 1 y 2 después de la irradiación con láser. La masa tumoral inicial en el cuerpo estriado fue débil una semana después de B-GNRs + irradiación con láser en comparación con el control.

CAPÍTULO IV DISCUSIÓN

4

Los resultados de la investigación desarrollada permitieron lograr la optimización de la técnica de hipertermia óptica, el mejoramiento de la transmisión de la energía y la producción de un calentamiento efectivo. Con los ajustes realizados en la instrumentación, se alcanzó la generación de nuevos métodos de radiación de luz, modificaciones en los elementos de la transmisión de la luz y el uso de nanopartículas adecuadas lográndose al final muerte celular de las células cancerígenas.

Por otra parte, el diseño de un inversor de potencia configurable para inducir el calentamiento en una muestra con nanopartículas, permitió el mejoramiento de la técnica de hipertermia magnética y su optimización produjo el desarrollo de los experimentos en esta área, el ajuste de parámetros no tradicionales como la utilización de formas de onda arbitrarias y una reducción en las concentraciones de las nanopartículas para disminuirla toxicidad y producir muerte celular en células cancerígenas.

4.1 HIPERTERMIA ÓPTICA

Los experimentos desarrollados con material inerte permitió la verificación y el cumplimiento de las propiedades ópticas de las nanopartículas de oro, que generan calor al entorno por la absorción de luz láser y las propiedades de las micropartículas de sílice que optimizan el sistema de hipertermia al hacer que estas dispersen la luz y las *nanorods* sean capaces de absorber más luz provocando una mayor generación de calor.

Se observó que los valores de temperatura de control y de sílice son mayores cuando se aplica 1 W, sin embargo para los grupos de *nanorods* y sílice más *nanorods* se alcanzó la hipertermia elevando la temperatura hasta un valor aproximado de 44 °C tal y como sugiere la literatura [2], [20], [21], [57], [80]. Dicho valor es suficiente para matar células cancerígenas, reduciendo las concentraciones de oro en las muestras, tiempos de irradiación del laser y potencia irradiada del mismo, lo que constituye un avance en la técnica de hipertermia óptica mediada por

nanopartículas de oro utilizando material dispersante de luz altamente biocompatible como lo es el sílice.

En la implementación del material dispersante de luz (sílice) de los ensayos *in-vitro*, la tasa de mortalidad disminuyó más de un 10% al bajar los valores de potencia, lo que constituye un avance positivo puesto que se produce una disminución de la tasa de mortalidad de las células sanas. Si se comparan las gráficas obtenidas con la línea celular CT2A y las MC3T3, se observa que a menor potencia menor tasa de mortalidad. Sin embargo, la disminución de la tasa de mortalidad de las células cancerígenas fue menor que la de las células sanas, lo que sugirió que la potencia óptima para el sistema de hipertermia óptica usando *nanorods* sería de 900 mW con un tiempo de exposición de 10 minutos. Este resultado es de la mayor importancia, favorece la muerte celular de las células tumorales sin causar tanto daño a las células sanas, como ocurría con la radiación a 1 W, en la cual se moría la mitad de las células sanas ante la exposición de radiación láser como condición inicial del sistema de hipertermia óptica. Existe una diferencia evidente de la mortalidad celular entre la línea celular CT2A (células cancerígenas) y la línea celular MC3T3 (células sanas) lo que podría ser considerado como un aporte importante de esta técnica.

El uso de fibroína de seda en fluídos con *nanorods* según el estudio de Mrinal K.Hota (2012)[82], establece con claridad que la seda de fibroína absorbe muy poco a una longitud de onda de 800 nm, lo que se ha confirmado en esta investigación.

En la implementación realizada *in-vivo* con ratones se demostró que la inmunofluorescencia doble para BrdU y nestina producía una mayor cantidad de células positivas para BrdU en la masa tumoral, mientras que las células positivas para nestina que también exhibían tinción de BrdU, se localizaron exclusivamente en células endoteliales tumorales. Este último resultado se correlaciona con estudios previos que señalan que la nestina es un marcador de endotelio proliferativo en gliomas[91]. Por lo tanto, se puede concluir que el modelo de tumor CT-2A utilizado en esta investigación exhibió características comunes con la enfermedad de glioglastoma humano, como se muestra por histopatología, inmunohistoquímica y procedimientos de imagen no invasivos (MRI).

La medición de temperatura *in-situ* arrojó valores que están de acuerdo con los de estudios previos anteriores[92]. Los resultados arrojados en esta técnica son lo suficientemente enriquecedores para validar la metodología propuesta en esta tesis, y están en concordancia con otras investigaciones en donde se producen

reducciones de los tumores [64], [13], [93]. Cabe señalar que en este trabajo es relevante que las diferencias significativas entre los grupos va en aumento con el tiempo, lo que hace evidente la eficacia de la técnica con biofuncionalización de los *nanorods* y, adicionalmente, en dos casos los tumores se fueron reduciendo de tamaño con el paso de las semanas, lo que podría implicar un aporte sustancial a la nanomedicina.

4.2 HIPERTERMIA MAGNÉTICA

Durante esta investigación se realizaron estudios para caracterizar fluidos viscosos utilizando fibroína de seda de gusano, así como la aplicación de dicho fluido como emulador del interior intracelular. Se procede a discutir estos resultados que fueron transversales a la investigación relacionada con hipertermia magnética, cuya finalidad se aclarará en trabajos futuros.

El hallazgo de la influencia de la viscosidad del medio y de la concentración sobre el magnetismo de SPIONs suspendidas en fluidos inertes, está de acuerdo con trabajos anteriores [44], [81]. Se consiguió valores de magnetización de SPIONs secos cercanos a $65 \text{ Am}^2 / \text{kg}$ más allá de $H = \pm 8.0 \text{ E5 A / m}$ a temperatura ambiente. Resultados similares de la magnetización (64-70 emu / gmagh) han sido publicados para nanopartículas de óxido de hierro (7 a 22 nm) en otros estudios que utilizan un magnetómetro de muestra vibrante (VSM)[45].

La forma de la pendiente de magnetización varió de acuerdo con la concentración de SPIONs y la viscosidad del líquido portador, llegando a ser un poco más fuerte en soluciones de fibroína que en agua deionizada. La pendiente de magnetización inclinada puede deberse al eje de anisotropía orientado al azar con respecto a la dirección del campo externo[94]–[96].

Los resultados logrados están de acuerdo con la teoría clásica que explica el efecto magnetovisco por el obstáculo de la rotación libre de nanopartículas individuales que no interactúan debido al par magnético que alinea los momentos magnéticos de la nanopartícula con la dirección del campo magnético [97], [98].

También es bien sabido que a medida que aumenta la intensidad del campo magnético éste puede provocar la agregación y la formación de estructuras similares a cadenas, que conducen a un aumento de la viscosidad del coloide magnético y, por lo tanto, a una pérdida de magnetización [99], [100].

Se sugiere, de acuerdo con la exploración realizada, que los niveles de acumulación de hierro intracelular que resulta de la incubación con SPIONs no indujeron toxicidad celular aguda en los tiempos y concentraciones analizados y están de acuerdo con informes anteriores que muestran que las nanopartículas de óxido de hierro son biocompatibles de las distintas líneas celulares empleadas 3T3, MC3T3 y CT2A [101], [102].

Los resultados de la biocompatibilidad de las SPIONs incubadas durante 24 horas en las células NIH/3T3, MC3T3 y CT2A en las concentraciones empleadas indicaron que el porcentaje de viabilidad celular a la concentración de 1 mg/ml, en comparación con el control de las células, no afectó significativamente su viabilidad. Se observó además una ligera reducción de la viabilidad celular respecto a la muestra control para la concentración de 2.5 mg / ml.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES

- Se realizaron mediciones de magnetometría de SPIONs con un diámetro medio de 14 nm suspendidas en agua deionizada, soluciones de fibroína de seda a diferentes viscosidades y fibroblastos de ratón 3T3 para determinar la influencia de la viscosidad y el entorno intracelular en su magnetismo. En fluidos inertes, las propiedades magnéticas de las SPIONs se vieron alteradas por los medios viscosos, la formación de agregados y el efecto magnetovisco. En cultivos celulares, el cambio en las propiedades magnéticas de SPIONs puede deberse a la adhesión mecánica a las membranas celulares y posterior internalización, lo que condujo a una disminución en los grados mecánicos de libertad de rotación y traducción de SPIONs. De esta manera, el nanomagnetismo podría proporcionar evidencia de la localización de SPIONs en las células.
- Todos los resultados concluyen que la mayoría de las nanopartículas siempre se acumulan intracelularmente en lisosomas en todos los diferentes tiempos y concentraciones probadas, lo que indica que el contenido magnético internalizado tiene una influencia mínima o nula en la vía de captación celular. Por otro lado, los resultados muestran que las mediciones de magnetización de SPIONs en solución de fibroína a $\eta = 4.12 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ fueron una medida indirecta de la viscosidad real del citoplasma, que se ha estudiado en la literatura.
- La adaptación del soporte de muestra de fabricación no industrial que se utiliza en AGM se validó para medir la respuesta magnética de SPIONs en muestras líquidas y células vivas. Además, las medidas r_1 y M de los coloides magnéticos se correlacionaron con la viscosidad, mostrando un aumento y disminución, respectivamente, cuando se aumentó la viscosidad del fluido transportador. Con respecto a r_1 , esta característica se considera muy importante para el diseño de un agente de contraste que podría encapsularse en moléculas de fibroína para reducir la concentración de SPIONs y, por lo tanto, la toxicidad.
- El inversor de potencia configurable diseñado para inducir el calentamiento en una muestra con nanopartículas permitió realizar pruebas con diferentes

parámetros del campo magnético, como frecuencia, intensidad y forma. Desde el punto de vista de la electrónica de potencia, el éxito se logra gracias a un diseño optimizado del inversor de puente completo (ZVS y bajas pérdidas), y especialmente al inductor, que maximiza el campo en la posición donde se encuentra la muestra con nanopartículas. situado. La combinación de estos tres parámetros puede mostrar la mejor manera de continuar la investigación con esta técnica. Por el momento, se han logrado incrementos de temperatura superiores a 15°C, lo que es un resultado muy prometedor ya que es la primera vez que se utiliza una forma de onda no sinusoidal para este propósito. Los primeros conjuntos de experimentos han sido muy útiles para identificar que la frecuencia óptima para calentar las nanopartículas es de alrededor de 850 kHz y que la forma de onda triangular parece ser mejor que el resto.

- Los ensayos de mortalidad *in vitro*, se probó que las células cancerígenas tienen una alta tasa de mortalidad celular en el sistema de hipertermia óptica usando *nanorods* y micropartículas de sílice al disminuir la potencia hasta 900 mW. De la misma manera, se realizaron los mismos experimentos con los osteoblastos, observando que la disminución de la tasa de mortalidad de las MC3T3 era mayor que la de las CT2A, pudiendo concluir que para el sistema de hipertermia óptica usando GNRs junto con micropartículas de sílice, la potencia óptima es de 900 mW con un tiempo de exposición de 10 minutos y un 20 % menos de concentración de oro.
- En la caracterización térmica de las GNRs y micropartículas de sílice, se logró obtener una serie de curvas de temperatura donde se alcanzó la hipertermia tanto con las GNRs como con sílice más *nanorods*, comprobando de esta manera que se cumplen las propiedades ópticas de las *nanorods* de oro, las cuales generan calor al entorno por absorción de la luz láser, y las propiedades de las micropartículas de sílice que mejoran el sistema de hipertermia óptica debido a que dispersan la luz haciendo que las GNRs puedan absorber más luz generando una mayor producción de calor al entorno.
- Este estudio muestra la eficacia de B-GNR + tratamiento con láser que promueve el efecto tumoricida de la hipertermia óptica en un modelo de astrocitoma CT-2A *in vivo*. Este tratamiento constituye una opción alternativa prometedora para tratar neoplasias intracraneales en humanos. La reducción del volumen del tumor intracraneal después de este procedimiento puede considerarse como un logro sobresaliente en el tratamiento de este cáncer

mortal que abre nuevas vías en la comprensión y el tratamiento del cáncer cerebral primario, lo que respalda futuras investigaciones en este campo.

CAPÍTULO VI MEJORAS Y TRABAJOS FUTUROS

- El estudio transversal realizado en esta investigación tiene como objetivo futuro, conocer todas las características tanto en fluidos inertes y viscosos, como en el interior celular, la línea de hipertermia magnética será comprobar el efecto de la pérdida de calor generado por las SPIONs cuando se aplica un campo magnético alterno (hipertermia magnética) y que está asociado a la viscosidad del medio, el ambiente intracelular, la concentración y agregación de las SPIONs, estos trabajos deberán realizarse en ensayos con fluidos inertes, y cultivos celulares utilizando la máquina de hipertermia construida.
- Ganar selectividad en los tratamientos de hipertermia óptica para en un futuro poder emplear esta técnica como tratamiento estable de tumores, utilizando la optimización presentada en esta tesis con el uso de Silice como material dispersante de luz, en el cual se logró una disminución de todas las variables, consiguiendo una muerte celular selectiva, llevar esta técnica a ensayos in-vivo proporcionara mayor opciones para una futura fase pre-clínica.
- Crear nanoconjugados de nanopartículas de oro con micropartículas de sílice biofuncionalizadas, con el fin de poder realizar estudios para aplicaciones in-vitro e in-vivo.
- Actualmente existen nanopartículas de oro en forma de estrella más eficientes que los *nanorods*, en investigaciones futuras se debe explorar éstas.
- Otra forma de mejorar la técnica de hipertermia óptica en aplicaciones in-vivo podría ser la de cargar a macrófagos con nanopartículas de oro, para que a manera de caballos de Troya penetren el interior del tumor y sea más sencillo su destrucción.
- Por último, el modo de radiación en Hipertermia Óptica empleado puede ser mejorado con una guía de onda diseñada para tal fin, de esa forma se reduciría las perdidas por enfoque y los posibles errores humanos en el momento de la aplicación de la terapia.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. N. Prasad, *Introduction to Nanomedicine and Nanobioengineering*. Wiley-Interscience: Hoboken., 2012.
- [2] M. Ramos, Sanchez, Martinez, Pozo, Serrano, and M. Ramos, "Induction of cell death in a glioblastoma line by hyperthermic therapy based on gold nanorods," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, no. March, p. 1511, Mar. 2012.
- [3] X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles," *Lasers Med. Sci.*, vol. 23, no. 3, pp. 217–228, Jul. 2008.
- [4] C. P. and others Stewart, BWKP and Wild, "{World cancer report 2014}," *Health (Irvine. Calif.)*, 2017.
- [5] S. J. Madsen, Ed., *Optical Methods and Instrumentation in Brain Imaging and Therapy*. New York, NY: Springer New York, 2013.
- [6] S. Avvakumova, M. Colombo, P. Tortora, and D. Prosperi, "Biotechnological approaches toward nanoparticle biofunctionalization," *Trends Biotechnol.*, vol. 32, no. 1, pp. 11–20, 2014.
- [7] T. Fernández-Cabada, C. S.-L. de Pablo, L. Pisarchyk, J. J. Serrano-Olmedo, and M. Ramos-Gómez, "Optical Hyperthermia Using Anti-Epidermal Growth Factor Receptor-Conjugated Gold Nanorods to Induce Cell Death in Glioblastoma Cell Lines," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 16, no. 7, pp. 7689–7695, Jul. 2016.
- [8] E. S. Day, P. A. Thompson, L. Zhang, N. A. Lewinski, N. Ahmed, R. A. Drezek, S. M. Blaney, and J. L. West, "Nanoshell-mediated photothermal therapy improves survival in a murine glioma model," *J. Neurooncol.*, vol. 104, no. 1, pp. 55–63, Aug. 2011.
- [9] F. Luchetti, B. Canonico, M. Della Felice, S. Burattini, M. Battistelli, S. Papa, and E. Falcieri, "Hyperthermia triggers apoptosis and affects cell adhesiveness in human neuroblastoma cells," *Histol. Histopathol.*, vol. 18, no. 4, pp. 1041–1052, 2003.
- [10] M. Z. Khalid, "Mechanism of Laser/light beam interaction at cellular and tissue level and study of the influential factors for the application of low level laser therapy," pp. 1–20, Jun. 2016.
- [11] S. L. Jacques, "Optical properties of biological tissues: a review," *Phys. Med. Biol.*, vol. 58, no. 11, pp. R37–R61, Jun. 2013.
- [12] D. K. Chatterjee, P. Diagaradjane, and S. Krishnan, "Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy," *Ther. Deliv.*, vol. 2, no. 8, pp. 1001–1014, Aug. 2011.
- [13] E. B. Dickerson, E. C. Dreaden, X. Huang, I. H. El-Sayed, H. Chu, S. Pushpanketh, J. F. McDonald, and M. A. El-Sayed, "Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice," *Cancer Lett.*, vol. 269, no. 1, pp. 57–66, Sep. 2008.
- [14] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, "Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine," *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 12,

pp. 1578–1586, Dec. 2008.

- [15] K. Cherukula, K. Manickavasagam Lekshmi, S. Uthaman, K. Cho, C.-S. Cho, and I.-K. Park, “Multifunctional Inorganic Nanoparticles: Recent Progress in Thermal Therapy and Imaging,” *Nanomaterials*, vol. 6, no. 4, p. 76, Apr. 2016.
- [16] J. Leung, S. Wu, K. Chou, and R. Signorell, “Investigation of Sub-100 nm Gold Nanoparticles for Laser-Induced Thermo-therapy of Cancer,” *Nanomaterials*, vol. 3, no. 1, pp. 86–106, Jan. 2013.
- [17] E. S. Day, P. A. Thompson, L. Zhang, N. A. Lewinski, N. Ahmed, R. A. Drezek, S. M. Blaney, and J. L. West, “Nanoshell-mediated photothermal therapy improves survival in a murine glioma model,” *J. Neurooncol.*, vol. 104, no. 1, pp. 55–63, Aug. 2011.
- [18] L. Vaccaro, P. Camarda, F. Messina, G. Buscarino, S. Agnello, F. M. Gelardi, M. Cannas, and R. Boscaino, “Oxidation of silicon nanoparticles produced by nanosecond laser ablation in liquids,” 2014, pp. 174–178.
- [19] J. T. Wright, D. J. Carbaugh, M. E. Haggerty, A. L. Richard, D. C. Ingram, S. Kaya, W. M. Jadwisieniczak, and F. Rahman, “Thermal oxidation of silicon in a residual oxygen atmosphere—the RESOX process—for self-limiting growth of thin silicon dioxide films,” *Semicond. Sci. Technol.*, vol. 31, no. 10, p. 105007, Oct. 2016.
- [20] I. Manavitehrani, A. Schindeler, and M. Parviz, “Nanomedicine & Nanotechnology Open Access Mesoporous Silica Nanoparticles : Synthesis , Modification and Applications Nanomedicine & Nanotechnology Open Access,” vol. 3, no. 2, pp. 1–10, 2018.
- [21] C. Yao, L. Zhang, J. Wang, Y. He, J. Xin, S. Wang, H. Xu, and Z. Zhang, “Gold Nanoparticle Mediated Phototherapy for Cancer,” *J. Nanomater.*, vol. 2016, pp. 1–29, 2016.
- [22] F. Pourgholi, M. Hajivalili, J. Farhad, H. S. Kafil, and M. Yousefi, “Nanoparticles: Novel vehicles in treatment of Glioblastoma,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 77, pp. 98–107, Feb. 2016.
- [23] A. Espinosa, R. Di Corato, J. Kolosnjaj-Tabi, P. Flaud, T. Pellegrino, and C. Wilhelm, “Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment,” *ACS Nano*, vol. 10, no. 2, pp. 2436–2446, Feb. 2016.
- [24] R. Martínez-Murillo and A. Martínez, “Standardization of an orthotopic mouse brain tumor model following transplantation of CT-2A astrocytoma cells,” *Histol Histopathol*, vol. 22, no. 12, pp. 1309–1326, 2007.
- [25] J. X. Jiang, H. W. Chen, C. Yu, Y. Y. Zhang, M. Y. Chen, S. Tian, and C. Y. Sun, “The promotion of salinomycin delivery to hepatocellular carcinoma cells through EGFR and CD133 aptamers conjugation by PLGA nanoparticles,” *Nanomedicine*, vol. 10, no. 12, pp. 1863–1879, 2015.
- [26] E. Piktel, K. Niemirowicz, M. Watek, T. Wollny, P. Deptuła, and R. Bucki, “Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 14, no. 1, pp. 1–23, 2016.
- [27] N. S. Abadeer and C. J. Murphy, “Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 120, no. 9, pp. 4691–4716, 2016.

- [28] E. Binello, Z. A. Qadeer, H. P. Kothari, L. Emdad, and I. M. Germano, "Stemness of the CT-2A Immunocompetent Mouse Brain Tumor Model: Characterization In Vitro," *J. Cancer*, vol. 3, pp. 166–174, 2012.
- [29] W. C. Dewey, L. E. Hopwood, S. A. Sapareto, and L. E. Gerweck, "Cellular Responses to Combinations of Hyperthermia and Radiation," *Radiology*, vol. 123, no. 2, pp. 463–474, May 1977.
- [30] X. Wang, L. Yang, Z. Chen, and D. M. Shin, "Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 58, no. 2, pp. 97–110, Jan. 2008.
- [31] A. A. Brandes, A. Tosoni, E. Franceschi, M. Reni, G. Gatta, and C. Vecht, "Glioblastoma in adults," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 67, no. 2, pp. 139–152, Aug. 2008.
- [32] A. B. Salunkhe, V. M. Khot, and S. H. Pawar, "Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles: A Status Review," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 14, no. 5, pp. 572–594, 2014.
- [33] R. V. Ferreira, T. M. da M. Martins, A. M. Goes, J. D. Fabris, L. C. D. Cavalcante, L. E. F. Outon, and R. Z. Domingues, "Thermosensitive gemcitabine-magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy," *Nanotechnology*, vol. 27, no. 8, p. 085105, 2016.
- [34] M. Azam, K. Akhtar, S. Riaz, and S. Naseem, *Structural and Magnetic Properties of Lower Temperature Calcined Iron Oxide Nanoparticles*, vol. 2, no. 10. Elsevier Ltd., 2015.
- [35] O. Garcia, N. Moreno-Arrones, A. B. Cuesta, A. Gutierrez, P. Alou, J. A. Oliver, J. A. Cobos, J. Uceda, E. Aznar, R. Martinez-Manez, C. Sanchez, O. E. Casanova, J. J. Serrano, and F. Del Pozo, "Development and Testing of a New Instrument for Researching on Cancer Treatment Technologies Based on Magnetic Hyperthermia," *IEEE J. Emerg. Sel. Top. Power Electron.*, vol. 4, no. 1, pp. 243–251, 2016.
- [36] E. Kita, T. Oda, T. Kayano, S. Sato, M. Minagawa, H. Yanagihara, M. Kishimoto, C. Mitsumata, S. Hashimoto, K. Yamada, and N. Ohkohchi, "Ferromagnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia and thermoablation therapy," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 43, no. 47, p. 474011, Dec. 2010.
- [37] M. C. A. M. Rosales, "Universidad politécnica de madrid," 2017.
- [38] V. Valente, C. Eder, N. Donaldson, and A. Demosthenous, "A High-Power CMOS Class-D Amplifier for Inductive-Link Medical Transmitters," *IEEE Trans. Power Electron.*, vol. 30, no. 8, pp. 4477–4488, Aug. 2015.
- [39] J. A. Sabate, V. Vlatkovic, R. B. Ridley, F. C. Lee, and B. H. Cho, "Design considerations for high-voltage high-power full-bridge zero-voltage-switched PWM converter," *Fifth Annual Proceedings on Applied Power Electronics Conference and Exposition*. pp. 275–284, 1990.
- [40] R. Bondade, Y. Wang, and D. Ma, "Design of Integrated Bipolar Symmetric Output DC–DC Power Converter for Digital Pulse Generators in Ultrasound Medical Imaging Systems," *IEEE Trans. Power Electron.*, vol. 29, no. 4, pp. 1821–1829, Apr. 2014.
- [41] J. G. Kassakian and T. M. Jahns, "Evolving and Emerging Applications of Power Electronics in Systems," *IEEE J. Emerg. Sel. Top. Power Electron.*, vol. 1, no. 2, pp. 47–58, Jun. 2013.

- [42] Y. Piñeiro, Z. Vargas, J. Rivas, and M. A. López-Quintela, "Iron Oxide Based Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Strategies in Biological Applications," *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2015, no. 27, pp. 4495–4509, Sep. 2015.
- [43] S. Kossatz, R. Ludwig, H. Dähling, V. Ettelt, G. Rimkus, M. Marciello, G. Salas, V. Patel, F. J. Teran, and I. Hilger, "High Therapeutic Efficiency of Magnetic Hyperthermia in Xenograft Models Achieved with Moderate Temperature Dosages in the Tumor Area," *Pharm. Res.*, vol. 31, no. 12, pp. 3274–3288, Dec. 2014.
- [44] J. Li, X. M. Gong, Y. Q. Lin, X. D. Liu, L. L. Chen, J. M. Li, H. Mao, and D. C. Li, "Investigation into loss in ferrofluid magnetization," *AIP Adv.*, vol. 4, no. 7, p. 077123, Jul. 2014.
- [45] G. Salas, J. Camarero, D. Cabrera, H. Takacs, M. Varela, R. Ludwig, H. Dähling, I. Hilger, R. Miranda, M. del P. Morales, and F. J. Teran, "Modulation of Magnetic Heating via Dipolar Magnetic Interactions in Monodisperse and Crystalline Iron Oxide Nanoparticles," *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 34, pp. 19985–19994, Aug. 2014.
- [46] J.-P. Fortin, F. Gazeau, and C. Wilhelm, "Intracellular heating of living cells through Néel relaxation of magnetic nanoparticles," *Eur. Biophys. J.*, vol. 37, no. 2, pp. 223–228, Feb. 2008.
- [47] M. Levy, C. Wilhelm, N. Luciani, V. Deveau, F. Gendron, A. Luciani, M. Devaud, and F. Gazeau, "Nanomagnetism reveals the intracellular clustering of iron oxide nanoparticles in the organism," *Nanoscale*, vol. 3, no. 10, p. 4402, 2011.
- [48] P. Guardia, R. Di Corato, L. Lartigue, C. Wilhelm, A. Espinosa, M. Garcia-Hernandez, F. Gazeau, L. Manna, and T. Pellegrino, "Water-Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment," *ACS Nano*, vol. 6, no. 4, pp. 3080–3091, Apr. 2012.
- [49] U. Engelmann, E. M. Buhl, M. Baumann, T. Schmitz-Rode, and I. Slabu, "Agglomeration of magnetic nanoparticles and its effects on magnetic hyperthermia," *Curr. Dir. Biomed. Eng.*, vol. 3, no. 2, Jan. 2017.
- [50] D. Cabrera, A. Coene, J. Leliaert, E. J. Artés-Ibáñez, L. Dupré, N. D. Telling, and F. J. Teran, "Dynamical Magnetic Response of Iron Oxide Nanoparticles Inside Live Cells," *ACS Nano*, vol. 12, no. 3, pp. 2741–2752, Mar. 2018.
- [51] B. Sanz, M. P. Calatayud, E. De Biasi, E. Lima, M. V. Mansilla, R. D. Zysler, M. R. Ibarra, and G. F. Goya, "In Silico before In Vivo: how to Predict the Heating Efficiency of Magnetic Nanoparticles within the Intracellular Space," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 38733, Dec. 2016.
- [52] D. Soukup, S. Moise, E. Céspedes, J. Dobson, and N. D. Telling, "In Situ Measurement of Magnetization Relaxation of Internalized Nanoparticles in Live Cells," *ACS Nano*, vol. 9, no. 1, pp. 231–240, Jan. 2015.
- [53] R. Di Corato, A. Espinosa, L. Lartigue, M. Tharaud, S. Chat, T. Pellegrino, C. Ménager, F. Gazeau, and C. Wilhelm, "Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs," *Biomaterials*, vol. 35, no. 24, pp. 6400–6411, Aug. 2014.
- [54] M. Lévy, C. Wilhelm, M. Devaud, P. Levitz, and F. Gazeau, "How cellular processing of superparamagnetic nanoparticles affects their magnetic

- behavior and NMR relaxivity," *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 7, no. 4, pp. 373–383, Jul. 2012.
- [55] M. Lévy, F. Gazeau, J.-C. Bacri, C. Wilhelm, and M. Devaud, "Modeling magnetic nanoparticle dipole-dipole interactions inside living cells," *Phys. Rev. B*, vol. 84, no. 7, p. 075480, Aug. 2011.
 - [56] D. Cabrera, J. Camarero, D. Ortega, and F. J. Teran, "Influence of the aggregation, concentration, and viscosity on the nanomagnetism of iron oxide nanoparticle colloids for magnetic hyperthermia," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 17, no. 3, p. 121, Mar. 2015.
 - [57] C. Wilhelm and F. Gazeau, "Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 29, no. 22, pp. 3161–3174, Aug. 2008.
 - [58] M. L. Etheridge, K. R. Hurley, J. Zhang, S. Jeon, H. L. Ring, C. Hogan, C. L. Haynes, M. Garwood, and J. C. Bischof, "Accounting for biological aggregation in heating and imaging of magnetic nanoparticles," *TECHNOLOGY*, vol. 02, no. 03, pp. 214–228, Sep. 2014.
 - [59] J. G. Ovejero, D. Cabrera, J. Carrey, T. Valdivielso, G. Salas, and F. J. Teran, "Effects of inter- and intra-aggregate magnetic dipolar interactions on the magnetic heating efficiency of iron oxide nanoparticles," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 16, pp. 10954–10963, 2016.
 - [60] J.-P. Fortin, C. Wilhelm, J. Servais, C. Ménager, J.-C. Bacri, and F. Gazeau, "Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 9, pp. 2628–2635, Mar. 2007.
 - [61] V. P. Pattani and J. W. Tunnell, "Nanoparticle-mediated photothermal therapy: A comparative study of heating for different particle types," *Lasers Surg. Med.*, vol. 44, no. 8, pp. 675–684, Oct. 2012.
 - [62] R. Robinson, W. Gerlach, and H. Ghandehari, "Comparative effect of gold nanorods and nanocages for prostate tumor hyperthermia," *J. Control. Release*, vol. 220, pp. 245–252, Dec. 2015.
 - [63] K. Ahmed and S. F. Zaidi, "Treating cancer with heat: hyperthermia as promising strategy to enhance apoptosis," *J. Pak. Med. Assoc.*, vol. 63, no. 4, pp. 504–8, Apr. 2013.
 - [64] Z. Zhang, J. Wang, X. Nie, T. Wen, Y. Ji, X. Wu, Y. Zhao, and C. Chen, "Near Infrared Laser-Induced Targeted Cancer Therapy Using Thermoresponsive Polymer Encapsulated Gold Nanorods," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 20, pp. 7317–7326, May 2014.
 - [65] P. Kaur, M. L. Aliru, A. S. Chadha, A. Asea, and S. Krishnan, "Hyperthermia using nanoparticles – Promises and pitfalls," *Int. J. Hyperth.*, vol. 32, no. 1, pp. 76–88, Jan. 2016.
 - [66] D.-H. Kim, K.-N. Kim, K.-M. Kim, and Y.-K. Lee, "Targeting to carcinoma cells with chitosan- and starch-coated magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 88A, no. 1, pp. 1–11, Jan. 2009.
 - [67] A. Yao, F. Ai, D. Wang, W. Huang, and X. Zhang, "Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity of self-regulating magnetic implant material for hyperthermia application," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 8, pp. 2525–2529, Oct. 2009.

- [68] K. Hayashi, K. Ono, H. Suzuki, M. Sawada, M. Moriya, W. Sakamoto, and T. Yogo, "One-Pot Biofunctionalization of Magnetic Nanoparticles via Thiol–Ene Click Reaction for Magnetic Hyperthermia and Magnetic Resonance Imaging," *Chem. Mater.*, vol. 22, no. 12, pp. 3768–3772, Jun. 2010.
- [69] N. K. Prasad, K. Rathinasamy, D. Panda, and D. Bahadur, "Mechanism of cell death induced by magnetic hyperthermia with nanoparticles of γ - $\text{Mn}_x\text{Fe}_{2-x}\text{O}_3$ synthesized by a single step process," *J. Mater. Chem.*, vol. 17, no. 48, p. 5042, 2007.
- [70] F. M. Martín-Saavedra, E. Ruíz-Hernández, A. Boré, D. Arcos, M. Vallet-Regí, and N. Vilaboa, "Magnetic mesoporous silica spheres for hyperthermia therapy," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 12, pp. 4522–4531, Dec. 2010.
- [71] P.-E. Le Renard, R. Lortz, C. Senatore, J.-P. Rapin, F. Buchegger, A. Petri-Fink, H. Hofmann, E. Doelker, and O. Jordan, "Magnetic and in vitro heating properties of implants formed in situ from injectable formulations and containing superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) embedded in silica microparticles for magnetically induced local hyperthermia," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 323, no. 8, pp. 1054–1063, Apr. 2011.
- [72] T.-C. Lin, F.-H. Lin, and J.-C. Lin, "In vitro feasibility study of the use of a magnetic electrospun chitosan nanofiber composite for hyperthermia treatment of tumor cells," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 7, pp. 2704–2711, Jul. 2012.
- [73] B. Samanta, H. Yan, N. O. Fischer, J. Shi, D. J. Jerry, and V. M. Rotello, "Protein-passivated Fe_3O_4 nanoparticles: low toxicity and rapid heating for thermal therapy," *J. Mater. Chem.*, vol. 18, no. 11, p. 1204, 2008.
- [74] A. Villanueva, P. de la Presa, J. M. Alonso, T. Rueda, A. Martínez, P. Crespo, M. P. Morales, M. A. Gonzalez-Fernandez, J. Valdés, and G. Rivero, "Hyperthermia HeLa Cell Treatment with Silica-Coated Manganese Oxide Nanoparticles," *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 5, pp. 1976–1981, Feb. 2010.
- [75] F. Sonvico, S. Mornet, S. Vasseur, C. Dubernet, D. Jaillard, J. Degrouard, J. Hoebeke, E. Duguet, P. Colombo, and P. Couvreur, "Folate-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Solid Tumor Targeting as Potential Specific Magnetic Hyperthermia Mediators: Synthesis, Physicochemical Characterization, and in Vitro Experiments," *Bioconjug. Chem.*, vol. 16, no. 5, pp. 1181–1188, Sep. 2005.
- [76] T. Sadhukha, L. Niu, T. S. Wiedmann, and J. Panyam, "Effective Elimination of Cancer Stem Cells by Magnetic Hyperthermia," *Mol. Pharm.*, vol. 10, no. 4, pp. 1432–1441, Apr. 2013.
- [77] A. Chalkidou, K. Simeonidis, M. Angelakeris, T. Samaras, C. Martinez-Boubeta, L. Balcells, K. Papazisis, C. Dendrinou-Samara, and O. Kalogirou, "In vitro application of Fe/MgO nanoparticles as magnetically mediated hyperthermia agents for cancer treatment," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 323, no. 6, pp. 775–780, Mar. 2011.
- [78] L. Asín, M. R. Ibarra, A. Tres, and G. F. Goya, "Controlled Cell Death by Magnetic Hyperthermia: Effects of Exposure Time, Field Amplitude, and Nanoparticle Concentration," *Pharm. Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 1319–1327, May 2012.
- [79] D. Passos, J. C. Hebden, P. N. Pinto, and R. Guerra, "Tissue phantom for optical diagnostics based on a suspension of microspheres with a fractal size distribution," *J. Biomed. Opt.*, vol. 10, no. 6, p. 064036, 2005.

- [80] C. Sanchez Lopez de Pablo, "Contribución al estudio de sistemas de hipertermia óptica y su aplicación en muestras biológicas," Universidad Politécnica de Madrid, 2013.
- [81] M. Jeun, Y. J. Kim, K. H. Park, S. H. Paek, and S. Bae, "Physical Contribution of Néel and Brown Relaxation to Interpreting Intracellular Hyperthermia Characteristics Using Superparamagnetic Nanofluids," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 13, no. 8, pp. 5719–5725, Aug. 2013.
- [82] M. K. Hota, M. K. Bera, B. Kundu, S. C. Kundu, and C. K. Maiti, "A Natural Silk Fibroin Protein-Based Transparent Bio-Memristor," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 22, no. 21, pp. 4493–4499, Nov. 2012.
- [83] A. L. Urbano Bojorge, O. E. Casanova Carvajal, N. Félix González, L. F. García, R. Madurga, S. Sanchez, E. Aznar, M. Ramos, and J. J. Serrano Olmedo, "Influence of Medium Viscosity and Intracellular Environment on the Magnetization of Superparamagnetic Nanoparticles in Silk Fibroin Solutions and 3T3 Mouse Fibroblast Cell Cultures," *Nanotechnology*, Jun. 2018.
- [84] R. C. Murdock, L. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, J. J. Schlager, and S. M. Hussain, "Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique," *Toxicol. Sci.*, vol. 101, no. 2, pp. 239–253, Feb. 2008.
- [85] J. . Harrell, "Effect of AC gradient field on magnetic measurements with an alternating gradient magnetometer," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 205, no. 1, pp. 121–129, Oct. 1999.
- [86] K. Eun and H. Myung, "Cytotoxic Effects of Nanoparticles Assessed," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 17, pp. 1573–1578, 2007.
- [87] T. N. Seyfried, M. El-Abbadi, and M. L. Roy, "Ganglioside distribution in murine neural tumors," *Mol. Chem. Neuropathol.*, vol. 17, no. 2, pp. 147–167, Oct. 1992.
- [88] K. I. Sugawara, H. Kurihara, M. Negishi, N. Saito, Y. Nakazato, T. Sasaki, and T. Takeuchi, "Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas," *Lab. Invest.*, vol. 82, no. 3, pp. 345–351, 2002.
- [89] R. Le Fèvre, M. Durand-Dubief, I. Chebbi, C. Mandawala, F. Lagroix, J. P. Valet, A. Idbah, C. Adam, J. Y. Delattre, C. Schmitt, C. Maake, F. Guyot, and E. Alphandéry, "Enhanced antitumor efficacy of biocompatible magnetosomes for the magnetic hyperthermia treatment of glioblastoma," *Theranostics*, vol. 7, no. 18, pp. 4618–4631, 2017.
- [90] L. E. Abate, P. Mukherjee, and T. N. Seyfried, "Gene-linked shift in ganglioside distribution influences growth and vascularity in a mouse astrocytoma," *J. Neurochem.*, vol. 98, no. 6, pp. 1973–1984, 2006.
- [91] Gang Lu Sen Mun Wai W.S. Poon D.T. Yew, "Ki67 and doublecortin positive cells in the human prefrontal cortices of normal aging and vascular dementia," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 68, no. 5, pp. 255–257, 2005.
- [92] V. C. Muñetón-Gómez, E. Doncel-Pérez, A. P. Fernandez, J. Serrano, A. Pozo-Rodríguez, L. Velloso-Huerta, J. S. Taylor, G. P. Cardona-Gómez, M. Nieto-Sampedro, and R. Martínez-Murillo, "Neural differentiation of transplanted neural stem cells in a rat model of striatal lacunar infarction: light and electron microscopic observations," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 6, no. August, pp. 1–19, 2012.

- [93] G. von Maltzahn, J.-H. Park, A. Agrawal, N. K. Bandaru, S. K. Das, M. J. Sailor, and S. N. Bhatia, "Computationally Guided Photothermal Tumor Therapy Using Long-Circulating Gold Nanorod Antennas," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 9, pp. 3892–3900, May 2009.
- [94] Y. Wang, Q. Zhao, N. Han, L. Bai, J. Li, J. Liu, E. Che, L. Hu, Q. Zhang, T. Jiang, and S. Wang, "Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 11, no. 2, pp. 313–327, Feb. 2015.
- [95] I. S. Poperechny, Y. L. Raikher, and V. I. Stepanov, "Dynamic magnetic hysteresis in single-domain particles with uniaxial anisotropy," *Phys. Rev. B*, vol. 82, no. 17, p. 174423, Nov. 2010.
- [96] B. Mehdaoui, R. P. Tan, A. Meffre, J. Carrey, S. Lachaize, B. Chaudret, and M. Respaud, "Increase of magnetic hyperthermia efficiency due to dipolar interactions in low anisotropy magnetic nanoparticles : theoretical and experimental results," *arXiv.org, e-Print Arch., Condens. Matter*, no. Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 1–21, arXiv:1301.5590v1 [cond-mtrl-sci], 2013.
- [97] M. Martsenyuk, Y. L. Raikher, and M. I. Shliomis, "On the kinetics of magnetization of suspensions of ferromagnetic particles," *Sov. J. Exp. Theor. Phys.*, vol. 38, no. 2, p. 413, 1974.
- [98] C. Yang, X. Bian, J. Qin, X. Zhao, K. Zhang, and Y. Bai, "An investigation of a viscosity-magnetic field hysteretic effect in nano-ferrofluid," *J. Mol. Liq.*, vol. 196, pp. 357–362, Aug. 2014.
- [99] A. Y. Zubarev and L. Y. Iskakova, "To the theory of rheological properties of ferrofluids: influence of drop-like aggregates," *Phys. A Stat. Mech. its Appl.*, vol. 343, pp. 65–80, Nov. 2004.
- [100] G. A. Van Ewijk, G. J. Vroege, and A. P. Philipse, "Susceptibility measurements on a fractionated aggregate-free ferrofluid," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 14, no. 19, pp. 4915–4925, 2002.
- [101] N. Singh, B. Manshian, G. J. S. Jenkins, S. M. Griffiths, P. M. Williams, T. G. G. Maffei, C. J. Wright, and S. H. Doak, "NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials," *Biomaterials*, vol. 30, no. 23–24, pp. 3891–3914, Aug. 2009.
- [102] M. Safi, H. Sarrouj, O. Sandre, N. Mignet, and J.-F. Berret, "Interactions between sub-10-nm iron and cerium oxide nanoparticles and 3T3 fibroblasts: the role of the coating and aggregation state," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 14, p. 145103, Apr. 2010.

ANEXO 1

Modelo térmico del sistema

Con el objetivo de entender mejor como funciona, desde un punto de vista térmico, el sistema de hipertermia magnética se llevó a cabo un proceso de modelado matemático para el cual se empleó una metodología de calentamiento independiente de la generación de campo magnético alterno.

Con el modelo y parámetros obtenidos podremos trabajar con el concepto resistencia térmica equivalente (R_{eq}) de los experimentos, para así obtener una aproximación de la tasa de absorción específica (SAR) que nos ayudara a valorar mejor la influencia de la variación de parámetros de la señal excitadora del campo magnético.

Para poder determinar los parámetros que caracterizan y describen el comportamiento térmico de nuestro sistema, fue necesario en primer lugar desarrollar un modelo térmico. El modelo puede ser planteado a partir de la resolución de un circuito eléctrico equivalente, tal y como se observa en la siguiente Figura 69.

Figura 69. Modelo RC del sistema térmico.

En este circuito, P es la potencia incidente, $T(t)$ es la temperatura de la muestra en función del tiempo, y Cd y Ct son la conductividad térmica y la capacidad térmica del sistema respectivamente. La conductividad térmica Cd (W/K) es una propiedad física de los materiales que mide la capacidad de conducción de calor, es decir, es la capacidad de una sustancia de transferir energía cinética de sus moléculas a otras moléculas adyacentes o a sustancias con las que no está en contacto. La

conductividad térmica es una magnitud intensiva, es decir, que no depende de la cantidad de sustancia o del tamaño de un sistema.

La capacidad térmica o calorífica C_t (J/K), se define como el cociente entre la cantidad de energía calorífica transferida a un cuerpo o sistema en un proceso cualquiera y el cambio de temperatura que experimenta. Una definición más coloquial, es aquella que define la capacidad térmica como la cantidad de calor necesaria para elevar un grado la temperatura de una determinada sustancia. Indica la mayor o menor dificultad que presenta dicho cuerpo para experimentar cambios de temperatura bajo el suministro de calor. La capacidad térmica es una propiedad extensiva, ya que su magnitud depende, no sólo de la sustancia, sino también de la cantidad de materia del cuerpo o sistema.

Es importante tener en cuenta que nuestro modelo no se planteó para determinar el comportamiento térmico de una sustancia concreta, sino para determinar los parámetros térmicos que describen el comportamiento térmico conjunto de todo nuestro recinto experimental.

La solución al circuito eléctrico equivalente planteado se basó en encontrar la ecuación que describe la tensión del condensador en el dominio del tiempo, $V_c(t)$. La ecuación diferencial puede describirse como la suma de una solución natural, que permite resolver el circuito cuando la fuente de corriente está apagada (circuito abierto), obteniendo en ese caso una curva exponencial (similar a la curva de carga y descarga de un capacitor); y de una solución forzada, que resuelve la ecuación la señal escalón desde $t = 0$ s. Por tanto, la solución sería la siguiente (CI: Condición planteada utilizando una solución que es similar a la fuente de corriente, es decir, una Inicial, CF: Condición Final):

$$V_c(t) = (CI - CF)e^{-t/\tau} + CF$$

Ecuación que modela la evolución de la temperatura como un circuito RC.

Es importante establecer la equivalencia entre los parámetros eléctricos y térmicos para reescribir la ecuación anterior en función de los segundos:

- $V_c(t)$, tensión $\rightarrow T(K)$, temperatura.
- $I(t)$, corriente $\rightarrow P(W)$, potencia.

- $r(V/A)$, Resistencia eléctrica $\rightarrow (K/W)$, Resistencia térmica $\rightarrow =$ conductividad térmica.
- $C(A/V)$, capacitor eléctrico $\rightarrow C_t (J/K)$, capacidad térmica.
- $\tau(s) = r(V/A) \cdot C(A/V)$, constante de tiempo eléctrica $\rightarrow \tau(s) =$, constante de tiempo térmico $\frac{C_t(\frac{J}{K})}{C_d(\frac{W}{K})}$ constante de tiempo térmica.
- $CI(V) \rightarrow T_i (^{\circ}C)$, $CF(V) \rightarrow T_f (^{\circ}C)$, $\Delta T = T_f - T_i$

Por tanto, se pudo reescribir

$$T(t) = (T_i - T_f)e^{-t/\tau} + T_f$$

Resultado del Modelo Térmico del Sistema

Por otro lado, pudo plantearse una ecuación que define la distribución de potencias en el circuito, y que depende del valor $T(t)$ calculado anteriormente:

$$P = P_{Ct} + P_{Cd} = P_{almacenada} + P_{disipada} = C_t \frac{d(T(t) - T_{amb})}{dt} + (T(t) - T_{amb})C_d$$

Si $T(t)=T_{max}$, es constante; por lo tanto, se pudo simplificar.

$$P = (T_{max} - T_{amb})C_d = \Delta T_m C_d$$

En un experimento convencional de hipertermia magnética, un campo magnético alterno es aplicado sobre un ferrofluido, el cual actúa como pequeñas fuentes de calor. Y en hipertermia óptica la generación de calor sucede por el efecto de resonancia de plasmón superficial. En el modelo propuesto, la fuente de calor es un pequeño resistor eléctrico (resistencia de montaje superficial) conectado a un generador de tensión. El resistor calienta la muestra (como lo hacen las nanopartículas dispersas en el medio) hasta la temperatura de estabilización o equilibrio y posteriormente, la fuente de tensión se apaga y el resistor se extrae

rápidamente de la muestra (para que no la siga calentando) para poder obtener la curva de enfriamiento.

Este proceso permitió obtener los parámetros térmicos del sistema, es decir, la conductividad y la capacidad térmica buscados y, a partir de ellos, se pudieron determinar los parámetros del sistema.

- Potencia $P(W)$: se obtiene a partir del valor de tensión $V(V)$ y el valor del resistor $R(\Omega)$.

$$P = \frac{V^2}{R}$$

- Curvas de temperatura: Son procesadas haciendo una adaptación a la ecuación 7 para eliminar el ruido y sacar los parámetros.
- Variación de temperatura: Se toma T_f de las curvas de temperatura procesadas, mientras que T_i se obtiene antes de iniciar el experimento
- Constante de tiempo térmica de enfriamiento, $\tau(s)$: es la constante de tiempo de la curva de enfriamiento. La ecuación exponencial que describe la curva se obtiene a partir de las curvas de temperatura procesadas.
- Conductividad térmica, $C_d (W/K)$: este parámetro es característico de cada sistema concreto.

$$C_d = \frac{P}{\Delta T_m}$$

Expresión de la conductividad térmica

- Capacidad térmica, $C_t (J/K)$: este parámetro puede obtenerse a partir de la Constante de tiempo térmica.

$$C_t = C_d \tau$$

Expresión de la capacidad térmica.