



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

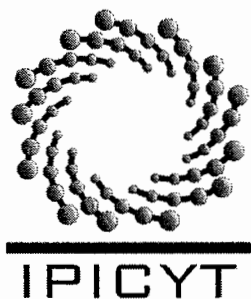
**Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro
funcionalizadas con seroalbúmina bovina para
aplicaciones biomédicas**

Tesis que presenta
Clara de la Luz Carreón Álvarez

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la tesis:
Dr. Rubén López-Revilla
Dr. José Luis Rodríguez López

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2016



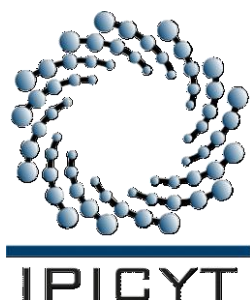
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro funcionalizadas con seroalbúmina bovina para aplicaciones biomédicas”*** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Clara de la Luz Carreón Álvarez** y aprobada el **doce de julio del dos mil dieciséis** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Codirector de la tesis

Dr. José Luis Rodríguez López
Codirector de la tesis

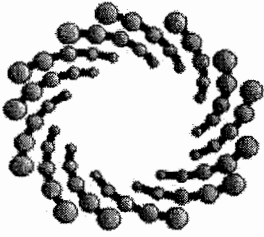
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular y el Laboratorio de Síntesis y Propiedades de Nanopartículas Metálicas de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los doctores Rubén López-Revilla y José Luis Rodríguez-López.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (634988) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 150 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de julio del año 2016, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Dr. José Luis Rodríguez López
Dr. Rubén Hipólito López Revilla

Presidente
Secretario
Sinodal

IPICYT
IPICYT
IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Clara de la Luz Carreón Alvarez

sobre la Tesis intitulada:

Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro funcionalizadas con seroalbúmina bovina para aplicaciones biomédicas

que se desarrolló bajo la dirección de

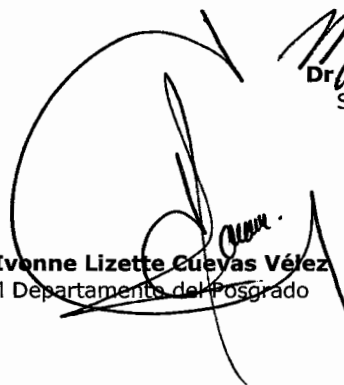
Dr. José Luis Rodríguez López
Dr. Rubén Hipólito López Revilla

El Jurado, después de deliberar, determinó

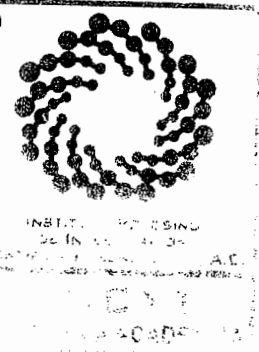
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 17:55 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 12 días del mes de julio de 2016.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Benilla Maín
Secretario Académico



Dedicatorias

Con todo mi amor, respeto y admiración a mis padres, Felipe y Guille, por siempre confiar en mí y por apoyarme en todas mis decisiones.

Agradecimientos

A mis codirectores, el Dr. Rubén y el Dr. José Luis por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos, por todo el tiempo invertido en este trabajo, por sus consejos, su apoyo incondicional y amistad.

A la Bióloga Mireya Sánchez Garza por su apoyo técnico en el laboratorio, por su paciencia y dedicación.

A mis hermanos, por estar conmigo en todo momento, por apoyarme y sobre todo por aguantarme.

A Roberto, por su apoyo, su paciencia y comprensión.

Al Dr. José Luis Sánchez García por las enseñanzas recibidas en la síntesis de nanopartículas y más aún gracias por la amistad brindada.

A mis compañeros de los laboratorios de Biotecnología Médica y Pecuaria y Síntesis y Propiedades de Nanopartículas Metálicas, especialmente a Mariel, Cindy, Julián, Billy, Mariana, Alan, Víctor, Moni y Raúl.

Al Dr. Luis Salazar y a su grupo de trabajo, de manera especial a la Dra. Angélica Montoya por su apoyo técnico en el laboratorio.

A la Dra. Hynd Remita (LCP-Université Paris Sud) y a su grupo de trabajo, de manera especial a Nazym, Erwan, Luis, Lyad, Laura y Marie por haberme aceptado en su laboratorio y por todo el apoyo recibido durante mi estancia.

Al Dr. Mario Enrique Rodríguez García (CFATA-UNAM) y al Dr. Javier González Contreras y M.C. Sebastián Gonzales (CIACYT) por las facilidades prestadas para la realización de los ensayos de hipertermia.

Al Laboratorio de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN), IPICYT, por facilitar el uso de sus instalaciones, en particular, a la Dra. Gladis Judith Labrada Delgado por su apoyo técnico para la caracterización de las muestras por SEM.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al IPICYT por la beca de maestría otorgada (634988).

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Copia del acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	viii
Resumen	ix
Abstract	x
Introducción	1
Nanociencia y Nanotecnología	1
Nanomedicina.....	2
Nanopartículas empleadas en nanomedicina	2
Nanomedicina y cáncer	3
Nanopartículas de oro anisotrópicas (MBAuNPs).....	3
Funcionalización de las nanopartículas.....	4
Ablación térmica de tumores con MBAuNPs	5
Justificación.....	7
Resultados principales	8
Material y métodos	9
Reactivos.....	9
Síntesis de semillas áuricas	9
Análisis de la concentración de semillas por ICP	9
Análisis de la concentración de semillas por UV-VIS.....	10
Síntesis controlada de MBAuNPs.....	10
Microscopía electrónica de barrido	11
Funcionalización con BSA de las MBAuNPs	11
Curva tipo de BSA	12
Geles phantom con MBAuNPs	12
Ensayos de hipertermia de las MBAuNPs irradiadas con el láser de 808 nm.....	12
Resultados	14
Síntesis de las semillas áuricas.....	14
Síntesis controlada de MBAuNPs.....	14
Funcionalización con BSA de las MBAuNPs seleccionadas	20
Funcionalización de MBAuNPs con concentraciones variables de BSA.....	20
Ensayos de hipertermia de MBAuNPs en suspensiones acuosas y geles phantom	27
Discusión	32
Referencias	34

Lista de tablas

Tabla 1. Mezclas para la síntesis de semillas áuricas.....	15
Tabla 2. Variables en las mezclas para la síntesis de MBAuNPs	16
Tabla 3. Condiciones de síntesis y características de las MBAuNPs.....	17
Tabla 4. Moléculas de BSA por MBAuNPs en función del contenido de BSA en las mezclas de funcionalización.	26
Tabla 5. Contenido de MBAuNPs en los ensayos de hipertermia.	28

Lista de figuras

Figura 1. Características de las semillas áuricas.....	15
Figura 2. Aspecto de las MBAuNPs en el microscopio electrónico de barrido	18
Figura 3. Espectros UV-VIS de las MBAuNPs	19
Figura 4. Efecto del contenido inicial de semillas sobre el tamaño de las MBAuNPs	21
Figura 5. Efecto del contenido inicial de semillas e hidroxilamina sobre la longitud de onda de los máximos de absorbancia de las MBAuNPs	22
Figura 6. Espectros UV-VIS de MBAuNPs, BSA, y MBAuNPs-BSA	23
Figura 7. Curva tipo de BSA	25
Figura 8. Espectros normalizados UV-VIS de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA	25
Figura 9. Moléculas de BSA por MBAuNP en función del contenido de BSA en las mezclas de funcionalización.	26
Figura 10. Espectros UV-VIS de las semillas y las MBAuNPs utilizadas en los ensayos de hipertermia.....	28
Figura 11. Curso temporal de la temperatura de las suspensiones acuosas de semillas y MBAuNPs irradiadas con el láser a 808 nm.....	29
Figura 12. Curso temporal de la temperatura de geles phantom con MBAuNPs, irradiados con potencias variables del láser a 808 nm	30
Figura 13. Curso temporal de la temperatura de suspensiones acuosas y geles phantom con diferentes concentraciones de MBAuNPs irradiadas con potencias variables del láser a 808 nm.....	31

Resumen

Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro funcionalizadas con seroalbúmina bovina para aplicaciones biomédicas

Como la hipertermia empleada para eliminar tumores es ineficaz y afecta a las células cancerosas y normales, la técnica basada en el efecto plasmónico de las nanopartículas de oro anisotrópicas (MBAuNPs, Multi-branched Gold Nanoparticles) está siendo explorada para mejorar la ablación térmica de tumores. Aquí nos propusimos sintetizar MBAuNPs potencialmente útiles para la ablación térmica de tumores (anisotrópicas, con diámetro ≤ 100 nm y absorción máxima de luz cercana al infrarrojo medio), funcionalizarlas con seroalbúmina bovina (BSA) para dirigir las a las células endoteliales y determinar la hipertermia inducida por irradiación de las MBAuNPs con un láser a 808 nm en suspensiones acuosas y geles que simulan la piel. Sintetizamos MBAuNPs a partir de semillas áuricas en mezclas con variaciones en el contenido de semillas, HEPES e hidroxilamina. Sus propiedades ópticas se determinaron mediante el espectro ultravioleta-visible (UV-VIS) durante y después de la síntesis, la forma y tamaño por microscopía electrónica de barrido y la concentración por espectroscopía UV-VIS y espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Las semillas áuricas fueron esféricas con un diámetro medio de 18 nm y absorción máxima a 520 nm. Las 27 mezclas de síntesis generaron MBAuNPs con una concentración media de 6.9×10^9 /mL, diámetros entre 95 y 160 nm y absorbancia máxima entre 640 y 873 nm. Para la funcionalización seleccionamos MBAuNPs con un diámetro medio de 97.5 nm y absorción máxima a 820 nm. El espectro UV-VIS de las MBAuNPs-BSA tuvo un pico a 280 nm (idéntico al de BSA pura) y otro desplazado de 820 a 865-890 nm en función de la concentración de BSA. Concluimos que las MBAuNPs seleccionadas parecen adecuadas para la ablación térmica de tumores pues la irradiación con el láser a 808 nm produce hipertermia de 3.7-5.2 °C en los geles phantom, proporcional a la concentración de MBAuNPs y la potencia de irradiación.

Palabras clave: Nanomedicina, Nanopartículas de oro anisotrópicas, Seroalbúmina bovina, Hipertermia, Ablación térmica de tumores.

Abstract

Synthesis and characterization of gold nanoparticles functionalized with bovine serum albumin for biomedical applications

Since hyperthermia to remove tumors is ineffective and affects cancer and normal cells, the plasmonic effect of anisotropic gold nanoparticles (MBAuNPs, Multi-branched Gold Nanoparticles) is being explored for thermal ablation of tumors. Our aim was to synthesize MBAuNPs for thermal ablation of tumors of diameter ≤ 100 nm, maximum light absorption near the mid-infrared region, functionalized with bovine serum albumin (BSA) to target them to endothelial cells, and to determine the hyperthermia induced with a 808 nm laser in aqueous suspensions and gels simulating the skin. MBAuNPs were synthesized in mixtures with variable auric seed content, HEPES, and hydroxylamine. Their ultraviolet-visible (UV-VIS) spectrum was determined during and after synthesis, their shape and size by scanning electron microscopy, and their concentration by UV-VIS spectroscopy and inductively-coupled plasma mass-spectroscopy. Auric seeds were spherical, 18 nm in diameter, with maximum absorption at 520 nm; all synthesis mixtures generated MBAuNPs with average concentration of 6.9×10^9 / mL, diameters between 95 and 160 nm, and maximum absorbance between 640 and 873 nm. For functionalization, MBAuNPs of 97.5 nm diameter and maximum absorption at 820 nm were selected. The UV-VIS spectrum of MBAuNPs-BSA had a peak at 280 nm (as pure BSA) and the 820 nm one displaced to 865-890 nm as a function of BSA concentration. The selected MBAuNPs appear to be appropriate for thermal ablation of tumors, since irradiation with the 808 nm laser produces hyperthermia of 3.7-5.2 °C in gels, proportional to MBAuNPs concentration and irradiation power.

Keywords: Nanomedicine, Anisotropic gold nanoparticles, Bovine serum albumin, Hyperthermia, Thermal ablation of tumors.

Introducción

Nanociencia y Nanotecnología

La nanociencia y la nanotecnología han trascendido las barreras disciplinarias entre la ingeniería y la física, la química y la biología (Binns 2010).

Richard Feynman (1960) parece haber sido el primero en plantear la idea de manipular la materia a niveles nanométricos para obtener los arreglos deseados en los átomos y en manifestar que hasta entonces nos conformamos con excavar la tierra para encontrar minerales, calentarlos para conseguir sustancias puras y producir objetos en gran escala. Después de más de dos décadas de esta declaración el término 'nanotecnología' fue acuñado por Norio Taniguchi (1974).

La nanociencia es el estudio de los materiales a escala nanométrica (10^{-9} m = 1 nm), los cuales tienen propiedades y funciones diferentes a los materiales en la escala normal. La nanotecnología es la aplicación de la nanociencia sobre todo con objetivos de aplicaciones industriales y comerciales y se basa en la manipulación, control e integración de los átomos y las moléculas para formar materiales, estructuras, componentes, dispositivos y sistemas en nanoescala (Mahindra et al. 2008).

Las nanopartículas (NPs) son partículas dispersas o sólidas no mayores de 100 nm que varían en forma, tamaño y propiedades dependiendo del método empleado para su síntesis. Todos los materiales metálicos, incluso los sólidos, tienen estructura granular y el control de su síntesis permite producir NPs con funciones superiores o diferentes para obtener metales más fuertes, películas magnéticas con muy alta magnetización o suspensiones con propiedades a la medida (Binns 2010), por mencionar solo algunas propiedades de un amplio espectro.

Nanomedicina

Con la concurrencia de las ciencias de la vida, la medicina y la ingeniería biomolecular, la nanomedicina pretende lograr avances en el diagnóstico, el diseño de fármacos (Tong et al. 2014), la medicina personalizada, la medicina regenerativa y los sistemas de administración de fármacos basados en nanomateriales (Bartneck et al. 2014).

En las últimas décadas los avances en la nanociencia y la nanotecnología han sido acompañados por nuevas aplicaciones en la nanomedicina (Yang et al. 2014) y un aumento en el uso de los nanomateriales (Conde et al. 2014).

La nanomedicina se ha orientado a la administración de fármacos y el tratamiento del cáncer y las enfermedades neurodegenerativas, pues ofrece la oportunidad de dirigir las NPs a sitios específicos con menor toxicidad y efectos secundarios y a mejorar la biodisponibilidad de los fármacos (Jang et al. 2014).

El tratamiento del cáncer y otras enfermedades es limitado por la falta de especificidad celular y la liberación de los agentes activos antes de alcanzar su objetivo (Nehoff et al. 2014). También es limitado por las barreras de transporte asociadas al microambiente tumoral, por lo cual las NPs deben ser diseñadas y caracterizadas considerando su interacción con tales barreras (Ozcelikkale et al. 2013). Para aumentar la biocompatibilidad de las NPs también deben tomarse en cuenta sus interacciones con las biomoléculas (Hassan and Singh 2014).

La focalización activa (*active targeting*) es importante para el diseño de los nanofármacos que recubren la superficie de los nanovehículos y permiten la unión selectiva de las nanopartículas a receptores celulares o moleculares específicos (Modery-Pawlowski and Gupta 2014).

Nanopartículas empleadas en nanomedicina

Las NPs son partículas dispersas o sólidas no mayores de 100 nm que varían en forma, tamaño y propiedades dependiendo del método empleado para su síntesis.

Propiedades únicas de las NPs que les dan ventajas sobre los materiales de tamaño normal son el tamaño, la capacidad para encapsular fármacos, la

modificación de la superficie con ligandos, el aumento del tráfico intracelular y la liberación sostenida de la carga útil de fármacos (Xu et al. 2015).

Los avances recientes incluyen el uso de NPs para la obtención de imágenes, como nanovehículos para la administración de fármacos y como máquinas moleculares para estudios biológicos y médicos (Tong et al. 2014). Estas funciones se han logrado manipulando su composición elemental, tamaño, forma, carga y superficie (Thorley and Tetley 2013).

Nanomedicina y cáncer

El tamaño tan pequeño de las NPs las hace potencialmente superiores para su uso en la detección, el tratamiento y la obtención de imágenes de tumores (Saadeh et al. 2014). Una estrategia emergente para lograr tratamientos más seguros y efectivos en diversos tipos de cáncer es el uso de formas nanoestructuradas de medicamentos, vacunas, venenos de animales, hierbas y agentes nutracéuticos (Bell et al. 2014).

El diseño de la mayoría de los nanomedicamentos se basa en los perfiles genéticos de los tumores con el objeto de seleccionar el tratamiento más intenso y eficaz para cada paciente (Markman et al. 2013). Agentes quimioterapéuticos y de imagen más eficaces y seguros basados en la nanotecnología son empleados para el tratamiento dirigido a sitios específicos (Chow and Ho 2013). Además se trata de disminuir los efectos secundarios de los agentes anticancerosos reduciendo su administración a los tejidos normales (Matsumura 2014).

La terapia fotodinámica es otra estrategia prometedora basada en la activación de fármacos fotosensibles con longitudes de onda específicas que pueden generar especies reactivas de oxígeno que desemboquen en muerte celular apoptótica o necrótica; la terapia fotodinámica puede además permitir la incorporación de agentes para la formación de imágenes a las NPs (Master et al. 2013).

Nanopartículas de oro anisotrópicas (MBAuNPs)

Las propiedades de las nanopartículas metálicas dependen de su forma y tamaño (Fayaz et al. 2011). Las nanopartículas de oro (AuNPs) son utilizadas en

nanotecnología por sus propiedades ópticas, fototérmicas y químicas (Austin et al. 2014) y son las más ampliamente utilizadas para el diagnóstico, imagenología, monitorización y tratamiento de enfermedades (Curry et al. 2014) debido a que no son tóxicas, tienen efecto plasmónico —interacción de la luz con los electrones libres de la superficie de los metales— (Palacios 2011) y pueden ser conjugadas ('funcionalizadas') con ligandos que las dirigen preferentemente hacia receptores celulares específicos (Kruse et al. 2011).

Las MBAuNPs requieren más de un parámetro estructural para describirlas y sus propiedades físicas y químicas, únicas, fáciles de modificar y diferentes de las de AuNPs esféricas, las hacen candidatos idóneos para diversas aplicaciones (Sajanlal et al. 2011).

Un ligero cambio en la forma de las MBAuNPs puede producir grandes cambios en la posición del máximo del plasmón de superficie en el espectro de absorción de luz, que difícilmente se logra en las AuNPs esféricas (Sajanlal et al. 2011).

En contraste con las AuNPs esféricas, las MBAuNPs pueden tener una banda de plasmón en la región del infrarrojo cercano (NIR, *near infrared*) cuya irradiación es absorbida escasamente por los tejidos. Esta propiedad es utilizada tanto para el diagnóstico como para la terapia fototérmica (Li et al. 2014).

Funcionalización de las nanopartículas

El control de las interacciones AuNPs-biosistemas es esencial para la eficaz utilización de estos materiales en biomedicina (Mout et al. 2012).

La funcionalización con biomoléculas específicas produce AuNPs multifuncionales con mayor eficacia, baja citotoxicidad, menos efectos secundarios, excelente fotoestabilidad y alto rendimiento cuántico, debido a su capacidad de localización específica en tumores y su captación activa por las células (Erathodiyil and Ying 2011; Feng et al. 2013; Subbiah et al. 2010).

La funcionalización de la superficie de las AuNPs mediante la introducción de ligandos sintéticos o biomoléculas naturales se ha convertido en un componente crítico para expandir su potencial de aplicación biomédica

(administración de fármacos, terapia del cáncer, diagnóstico, ingeniería de tejidos, bioimagen, biosensores) (Subbiah et al. 2010; Weingart et al. 2013).

Las aplicaciones biomédicas requieren que las AuNPs tengan buena estabilidad en condiciones fisiológicas (Amstad et al. 2011) y aunque la funcionalización es un prerrequisito para procedimientos de diagnóstico y tratamiento, esto debe lograrse sin que se agreguen o aglomeren (Liu and Thierry 2012).

Las AuNPs tienen tendencia a agregarse, especialmente en presencia de niveles altos de sales y moléculas biológicas como ácidos nucleicos y proteínas (Gao et al. 2012). La selección racional de biomoléculas terapéuticamente activas para el diseño de NPs aumentará su aplicabilidad por el aumento de la eficacia asociada a la estabilidad y la prevención de la agregación (Veerapandian and Yun 2011).

La seroalbúmina bovina (BSA, *bovine serum albumin*) se une preferentemente a los receptores que abundan en la superficie de las células endoteliales que delimitan la luz de los capilares sanguíneos (Kragh-Hansen 1981; Weis and Cheresh 2011) y se ha utilizado como agente estabilizante y funcionalizador de AuNPs suspendidas en agua y sintetizadas a partir de precursores de HAuCl_4 (Nghiem et al. 2010; Zook et al. 2011a; Zook et al. 2011b). La BSA también ha demostrado su eficacia como sistema de soporte de fármacos para el tratamiento del cáncer (Peralta et al. 2015).

Ablación térmica de tumores con MBAuNPs

El tratamiento del cáncer requiere el desarrollo de nuevos enfoques que sean eficaces e inocuos (Gannon et al. 2008).

La hipertermia (también llamada terapia térmica o termoterapia) es un tipo de tratamiento del cáncer en el que el tejido del cuerpo está expuesto a altas temperaturas (hasta 40-44°C) (van der Zee 2002). Al matar las células cancerosas y dañar las proteínas dentro de las células (Hildebrandt et al. 2002), la hipertermia puede reducir los tumores y puede mejorar la eficacia de la quimioterapia y la radiación.

La hipertermia es un tratamiento atractivo debido a que conserva un perfil de efectos secundarios más bajo al de los tratamientos convencionales contra el cáncer, con el potencial de que se puede realizar una aplicación repetida sin la preocupación de agravar los niveles de toxicidad (Singh et al. 2015).

Uno de los principales retos de la terapia fototérmica es el desarrollo de transductores fototérmicos biocompatibles que puedan absorber y convertir en calor la luz del infrarrojo cercano (NIR) con alta eficiencia logrando además una distribución de temperatura homogénea en todo el tejido (Singh et al. 2015; Sun et al. 2016).

Las AuNPs con composición, tamaño, forma y arquitectura diversa se han explorado en el campo de la nanomedicina como agentes fototérmicos para el tratamiento del cáncer, debido a su biocompatibilidad in vivo (Fazal et al. 2014). Después de la irradiación de las AuNPs, los electrones superficiales se excitan y resuenan con fuerza. Cuando estos electrones vuelven a su estado fundamental, emiten energía en forma de calor, esto desencadena en un aumento de temperatura del medio en el que se encuentran las AuNPs. El aumento de temperatura depende principalmente de la forma y de la concentración de las AuNPs, tiempo de incubación en los tejidos, potencia y tiempo de exposición del láser. El espectro de absorción característico de las AuNPs es dependiente de su forma y tamaño y por lo general se seleccionan las que están dentro del espectro infrarrojo (entre 650 y 900 nm) donde hay una mínima absorción del tejido de fondo y una alta penetración (Singh et al. 2015).

Aunque ya ha sido demostrada la ablación de células cancerosas utilizando técnicas de calentamiento con radiofrecuencia, este enfoque tiene defectos serios que incluyen ablación inconsistente de los tumores acompañada de ablación significativa de células normales (Burford et al. 2013).

Las MBAuNPs se han estudiado ampliamente para utilizarlas en la terapia fototérmica del cáncer porque generan calor por irradiación del espectro infrarrojo cercano (NIR, *near-infrared*). Sin embargo, los principales problemas que deben resolverse siguen siendo la mejora de su especificidad (*tumor-targeting*) y la optimización de su tamaño para maximizar el efecto fototérmico (Kang et al. 2015).

Existen estudios recientes que logran lo anterior con un cierto grado de efectividad, e.g., Fazal et al. (2014) probaron AuNPs con rangos de absorción de 800-1000 nm sobre una línea celular de carcinoma epidermoide cuya muerte indujeron tras la irradiación con un láser pulsado a 808 nm con potencia de 6 W/cm². La ablación térmica de tumores con AuNPs también se ha probado en líneas celulares de cáncer gastrointestinal, carcinoma hepatocelular, tumores de hígado y cáncer de próstata (Gannon et al. 2008; Li et al. 2013; Liu et al. 2010; Munireddy et al. 2012).

Justificación

Las MBAuNPs funcionalizadas con BSA son potencialmente útiles para la ablación térmica de tumores superficiales vascularizados.

La hipertermia generalizada o localizada, empleada para tratar de eliminar los tumores, es ineficaz y tiene efectos adversos porque no sólo afecta a las células cancerosas sino a las células normales. Los tratamientos para la ablación térmica de tumores deben ser más específicos, eficaces e inocuos. La hipertermia basada en el efecto plasmónico de las nanopartículas de oro anisotrópicas —de tamaño adecuado, absorción máxima de luz cercana al infrarrojo, conjugadas con biomoléculas que las dirijan a las células cancerosas— está siendo utilizada para mejorar la ablación térmica de tumores.

El propósito de este trabajo fue sintetizar y seleccionar MBAuNPs con diámetro ≤ 100 nm y absorbancia máxima en el infrarrojo medio (700-900 nm), funcionalizarlas con seroalbúmina bovina (BSA) para dirigirlas a los receptores de la superficie de las células endoteliales que abundan en los tumores superficiales vascularizados e inducir hipertermia controlada por irradiación con un láser de 808 nm de potencia variable, en geles que simulen la piel y contengan las MBAuNPs seleccionadas.

El avance esperado fue inducir hipertermia por irradiación con la potencia mínima del láser en los geles con las MBAuNPs seleccionadas.

Resultados principales

En este trabajo sintetizamos semillas áuricas esféricas con diámetro de 18 nm y absorción máxima a 520 nm, a partir de las cuales sintetizamos MBAuNPs con diámetros de 98 a 185 nm y absorción máxima de luz en el rango de 640 a 869 nm. Seleccionamos MBAuNPs con diámetro medio de 97.5 nm y absorbancia máxima a 820 nm para las siguientes etapas del proyecto. Las MBAuNPs funcionalizadas con BSA tienen un pico de absorbancia característico (865-890 nm) cuyo desplazamiento al infrarrojo medio depende de la concentración de BSA empleada. El número de moléculas de BSA por cada MBAuNPs depende de la concentración inicial de BSA en las mezclas de funcionalización. La irradiación con el láser a 808 nm no produce hipertermia del agua ni de suspensiones acuosas con semillas áuricas, pero la temperatura de suspensiones acuosas y geles con MBAuNPs aumenta 3.7-13 °C, dependiendo del medio en que están inmersas (gel o agua), y también esto es función de la concentración de las MBAuNPs y la potencia del láser.

Material y métodos

Reactivos

Ácido cloroáurico (HAuCl₄), HEPES sal sódica (99.5%), hidroxilamina (NH₂OH), citrato de sodio 99%, seroalbúmina bovina (BSA), agar y polvo de polietileno fueron adquiridas de Sigma-Aldrich. TX-151 proviene de Balmar, L.L.C.

Síntesis de semillas áuricas

Llevamos a cabo la síntesis de semillas esféricas con el método de Turkevich a partir de HAuCl₄ 25 mM y citrato de sodio 0.75 mM pH 7.4 como agente reductor (Frens and Cense 1973; Kimling et al. 2006; Turkevich et al. 1951).

En un vaso de precipitados de 30 mL con barra magnética le añadimos 19.8 mL de citrato de sodio 0.75 mM pH 7.4 y lo mantuvimos a 70 °C con agitación en una parrilla eléctrica. Inmediatamente después añadimos 0.2 mL de HAuCl₄ 25 mM. Mantuvimos la mezcla en estas condiciones por 40 min hasta que cambió de color, empezando con gris claro y finalizando en color rojo con aspecto de vino tinto. Cuando finalizó la reacción, tomamos lectura de su espectro UV-VIS con el espectrofotómetro (Agilent, modelo Cary 60) para conocer su máximo de absorbancia. También analizamos las muestras en el microscopio electrónico de barrido para conocer su forma y tamaño (Dual Beam FEI-Helios Nanolab 600), las imágenes fueron observadas con un aumento de 300,000x, 5 KV, 88 pA y distancia de trabajo de 4 mm.

Análisis de la concentración de semillas por ICP

Para el análisis de la concentración de semillas por ICP (Allabashi et al. 2009) seguimos el siguiente procedimiento: realizamos la síntesis de semillas con el procedimiento descrito antes. Cuando hubo finalizado la síntesis centrifugamos la muestra por 20 min a 13,000 rpm (Microcentrífuga, Labnet International, Force 1624) y retiramos el sobrenadante por aspiración cuidadosa. Para disolver las semillas añadimos 4 mL de HCl 1 N tanto al precipitado de semillas lavadas por centrifugación como al sobrenadante. La muestra se analizó en el ICP-OES.

Realizamos el cálculo de la concentración N con las siguientes fórmulas:

$$N_{at} = \frac{N_A \pi \rho D^3}{6M}$$

$$N = A_t N_{at}$$

En donde:

N_{at} = Promedio de átomos por nanopartícula

N_A (número de Avogadro) = 6.022×10^{23} átomos/mol

ρ (densidad de fcc de las semillas) = 1.93×10^{-20} g/nm³

D (diámetro de las nanopartículas) = 18 nm

M (peso atómico del oro) = 197 g/mol

A_t (número de átomos totales en la muestra) = 1.3889×10^{20} átomos/L

El número de átomos en la muestra se calculó con el resultado del análisis de ICP-OES = 45.4367 mg/L.

Análisis de la concentración de semillas por UV-VIS

Realizamos el análisis de la concentración de semillas por espectroscopía UV-VIS (Haiss et al. 2007) con la siguiente fórmula:

$$N = \frac{A_{520} \times 10^{14}}{D^2 \left[-0.295 + 1.36 \exp \left(- \left(\frac{D - 96.8}{78.2} \right) \right) \right]}$$

En donde:

N = Número de nanopartículas por mL

$A_{520} = 0.8554$

$D = 18$ nm

Síntesis controlada de MBAuNPs

Sintetizamos las MBAuNPs en 27 mezclas diferentes con un contenido fijo de ácido cloroáurico (HAuCl₄) 0.8 mM y adiciones de volúmenes variables de semillas (6.9×10^{11} semillas/mL), hidroxilamina 100 mM pH 7.4 y HEPES 50, 75 y 100 mM pH 7.4.

En un vaso de precipitado de 30 mL con barra magnética, dentro de un recipiente con hielo mantuvimos sumergida la sonda del espectrofotómetro (A_{300} - A_{1000} , velocidad de lectura media) para registrar la lectura inicial (blanco) y cada 2

min mientras ocurría la reacción. Añadimos 12.5 mL de HEPES (50, 75, o 100 mM), después añadimos las semillas (50, 100 o 150 μ L), hidroxilamina (200, 300 y 400 μ L) y 2.2 mL de HAuCl₄ (1gt/8 seg). La morfología y tamaño de las MBAuNPs fue analizada por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Microscopía electrónica de barrido

A un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con 500 μ L de etanol añadimos 1 ml de cada mezcla de síntesis de MBAuNPs. Posteriormente sonicamos la mezcla en un baño ultrasónico, Marca Branson, Modelo 2800 durante 5 min y la mezclamos con el vórtex por 20 seg, La centrifugamos durante 10 min a 13,000 rpm (15,304 \times g) y 7 °C. Después eliminamos el sobrenadante por aspiración cuidadosa y añadimos 1 mL de agua MilliQ. Repetimos el lavado por centrifugación seis veces. En un portamuestra (pin) de aluminio depositamos 75 μ L de la muestra y la dejamos secar toda la noche antes de su visualización en el microscopio electrónico de barrido (Dual Beam FEI-Helios Nanolab 600). Las imágenes fueron observadas con un aumento de 150,000 \times , 5 KV, 88 pA y distancia de trabajo de 4 mm.

Funcionalización con BSA de las MBAuNPs

Para la funcionalización elegimos la síntesis de MBAuNPs en las siguientes condiciones: HEPES 50 mM pH 7.4, 2.2 mL de HAuCl₄ 0.8 mM, 400 μ L de NH₂OH 100 mM y 150 μ L de semillas (6.9×10^{11} semillas/mL). Lavamos las MBAuNPs 6 veces por centrifugación con agua, y sus espectros UV-VIS fueron registrados antes y después de la funcionalización.

Después de la última centrifugación retiramos el sobrenadante por aspiración, sonicamos la muestra por 4 min y después la mezclamos en el vórtex 15 seg. Inmediatamente después añadimos 1 mL de BSA (20,10 y 2.5 μ g/ μ L según fue el caso) para evitar que las MBAuNPs se agregaran, nuevamente mezclamos con el vórtex. La mezcla se mantuvo 24 h a 4 °C, transcurrido este tiempo lavamos las MBAuNPs tres veces por centrifugación con PBS para eliminar la BSA disuelta.

Curva tipo de BSA

Preparamos una solución madre de BSA con 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con PBS 1x. Después realizamos diluciones dobles seriadas hasta 0.078 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Tomamos lecturas en el espectrofotómetro ($A_{200}-A_{1000}$) de cada dilución y graficamos el valor de A_{280} contra la concentración.

El número promedio de moléculas de proteína unidas a cada MBAuNP fue calculado interpolando la absorbancia a 280 nm de las MBAuNPs-BSA en la curva tipo de BSA.

Geles phantom con MBAuNPs

Preparamos geles phantom en cajas de Petri con agua desionizada, agar, TX-151 (polvo de solidificación) y polvo de polietileno (Chahat et al. 2012), con dos concentraciones de MBAuNPs (4.1×10^9 o 6.2×10^9 AuNPs/mL).

A un matraz kitasato añadimos 100 mL de Agua MilliQ, 1.5 g de agar y 2.5 g de TX-151. Calentamos la mezcla en el horno de microondas por periodos de 15 seg hasta la disolución completa del agar y TX-151. A la mezcla mantenida bajo agitación a 50 °C, añadimos las MBAuNPs y 2 g de polvo de polietileno. Cuando el polvo de polietileno se disolvió aplicamos vacío (Bomba de vacío para soluciones acuosas, Marca Welch, Modelo 2522) para eliminar las burbujas de aire. Vertimos la mezcla en cajas petri de 35x10 mm y la dejamos solidificar toda la noche a temperatura ambiente.

Ensayos de hipertermia de las MBAuNPs irradiadas con el láser de 808 nm

Cada tubo y gel fue irradiado durante 10 minutos con el láser a 808 nm (Lasermate modelo IML-808) con diferentes potencias (0.45, 0.75 y 1 W/cm^2). Medimos la temperatura de cada muestra con una cámara térmica Infrared modelo IR Flexcam R2 desde el tiempo cero hasta el final de la irradiación.

Llevamos a cabo el ensayo en suspensiones acuosas y en geles phantom, con semillas áuricas y MBAuNPs.

En las suspensiones acuosas medimos el curso temporal de la temperatura de semillas áuricas y de MBAuNPs, utilizando agua pura como blanco. En tubos de microcentrífuga de 500 μ L colocamos suspensiones acuosas de semillas (6.9×10^{11} semillas/mL), MBAuNPs (6.9×10^9 MBAuNPs/mL) y agua pura.

En los geles phantom medimos el curso temporal de la temperatura de suspensiones con (a) 4.1×10^9 y (b) 6.2×10^9 MBAuNPs/mL, utilizando como blanco un gel sin MBAuNPs. Con el objetivo de determinar si nuestros resultados son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) realizamos un análisis de varianza (ANOVA), los análisis se realizaron usando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.

Resultados

Síntesis de las semillas áuricas

Sintetizamos y caracterizamos las semillas áuricas con las cuales iniciaríamos la síntesis de MBAuNPs. Llevamos a cabo la síntesis de semillas con el método de Turkevich a partir de HAuCl_4 , con citrato de sodio como agente reductor (Tabla 1) (Frens and Cense 1973; Kimling et al. 2006; Turkevich et al. 1951). Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido mostraron semillas esféricas con diámetros de 17-19 nm y espectro UV-VIS con absorbancia máxima a 520 nm (Fig. 1). Determinamos las concentraciones de semillas típicas en las suspensiones mediante dos métodos: (a) por espectroscopía UV-VIS obtuvimos 6.04×10^{11} semillas/mL, y (b) por espectroscopía ICP-OES la concentración fue de 7.71×10^{11} semillas/mL.

Con los métodos adecuados para la síntesis y caracterización de semillas áuricas esféricas decidimos sintetizar las MBAuNPs a partir de suspensiones con concentraciones conocidas de semillas.

Síntesis controlada de MBAuNPs

El objetivo de esta etapa fue producir MBAuNPs adecuadas (diámetro ~100 nm y absorbancia máxima cercana al infrarrojo) a partir de las semillas esféricas.

Realizamos la síntesis de MBAuNPs en mezclas diferentes con un contenido fijo de ácido cloroáurico (HAuCl_4) y contenidos variables de semillas, hidroxilamina y HEPES en dos etapas (Tabla 2): 1) síntesis de semillas; 2) crecimiento de las MBAuNPs a partir de las semillas. Caracterizamos las MBAuNPs resultantes mediante espectroscopía UV-VIS y por microscopía electrónica de barrido para conocer la morfología y tamaño.

Las 27 mezclas produjeron MBAuNPs (Fig. 2), con un rango de diámetros de 95-160 nm y absorbancia máxima entre 640 y 873 nm (Tabla 3, Fig. 3). Las MBAuNPs más pequeñas (diámetro promedio = 97.5 nm) y absorbancia máxima

Tabla 1. Mezclas para la síntesis de semillas áuricas

Componentes	Volumen
Citrato de sodio 0.75 mM, pH 7.4	19.8 mL
HAuCl ₄ 25 mM	0.2 mL

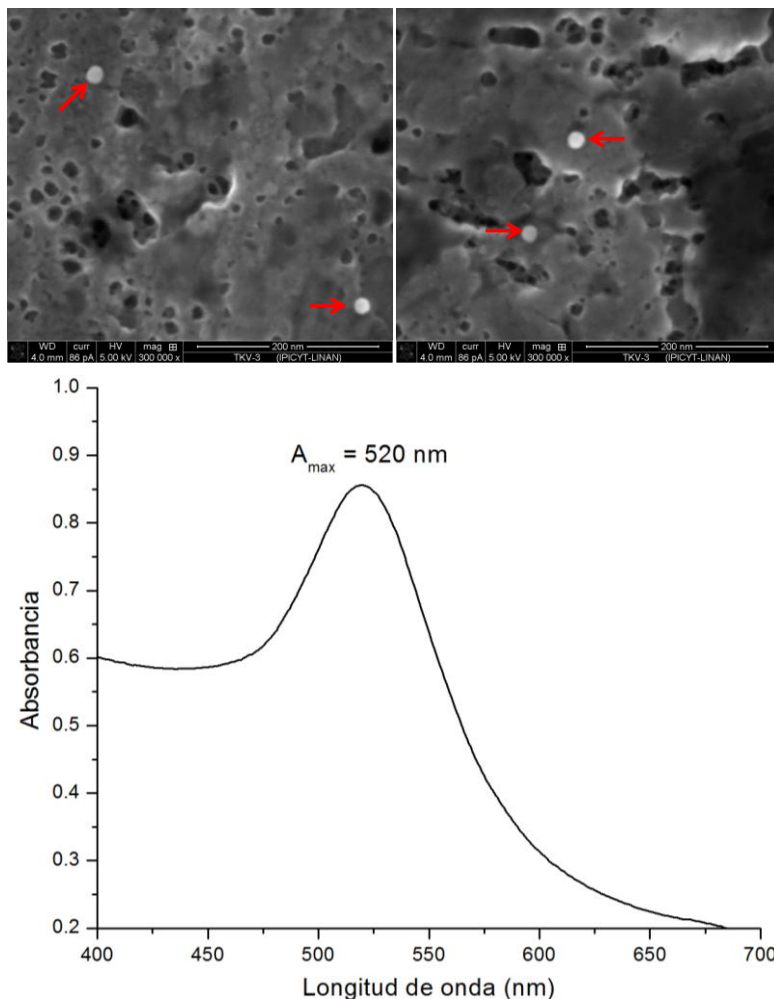


Figura 1. Características de las semillas áuricas

Las semillas (esferas claras indicadas con las flechas rojas) tienen diámetros de 17-19 nm y absorbancia máxima a 520 nm.

Tabla 2. Variables en las mezclas para la síntesis de MBAuNPs

HEPES-HCl pH 7.4 (12.5 mL)	Semillas ^a (μ L)	NH ₂ OH 0.1 M (μ L)		
		200	300	400
50 mM	50	200	300	400
	100	↓	↓	↓
	150	↓	↓	↓
75 mM	50	↓	↓	↓
	100	↓	↓	↓
	150	↓	↓	↓
100 mM	50	↓	↓	↓
	100	↓	↓	↓
	150	↓	↓	↓

^a 6.9×10^{11} semillas/mL.

Tabla 3. Condiciones de síntesis y características de las MBAuNPs

Adiciones sucesivas a la mezcla de síntesis*			Características de las MBAuNPs	
HEPES-HCl pH 7.4	NH ₂ OH 0.1 M (μL)	Semillas (μL)	Diámetro (nm)	A _{max} (nm)
50 mM	200	50	126.5	703
	↓	100	126	671
	↓	150	115	690
	300	50	160	845
	↓	100	137	793
	↓	150	119	775
	400	50	132.5	873
	↓	100	110	814
	↓	150	97.5	820
75 mM	200	50	165	792
	↓	100	140	707
	↓	150	105	717
	300	50	165	787
	↓	100	106.5	720
	↓	150	132.5	789
	400	50	185	867
	↓	100	155	830
	↓	150	145	869
100 mM	200	50	135	797
	↓	100	110	675
	↓	150	85	640
	300	50	185	849
	↓	100	140	800
	↓	150	150	810
	400	50	162.5	845
	↓	100	125	837
	↓	150	110	810

*2.2 mL HAuCl₄ 0.8mM

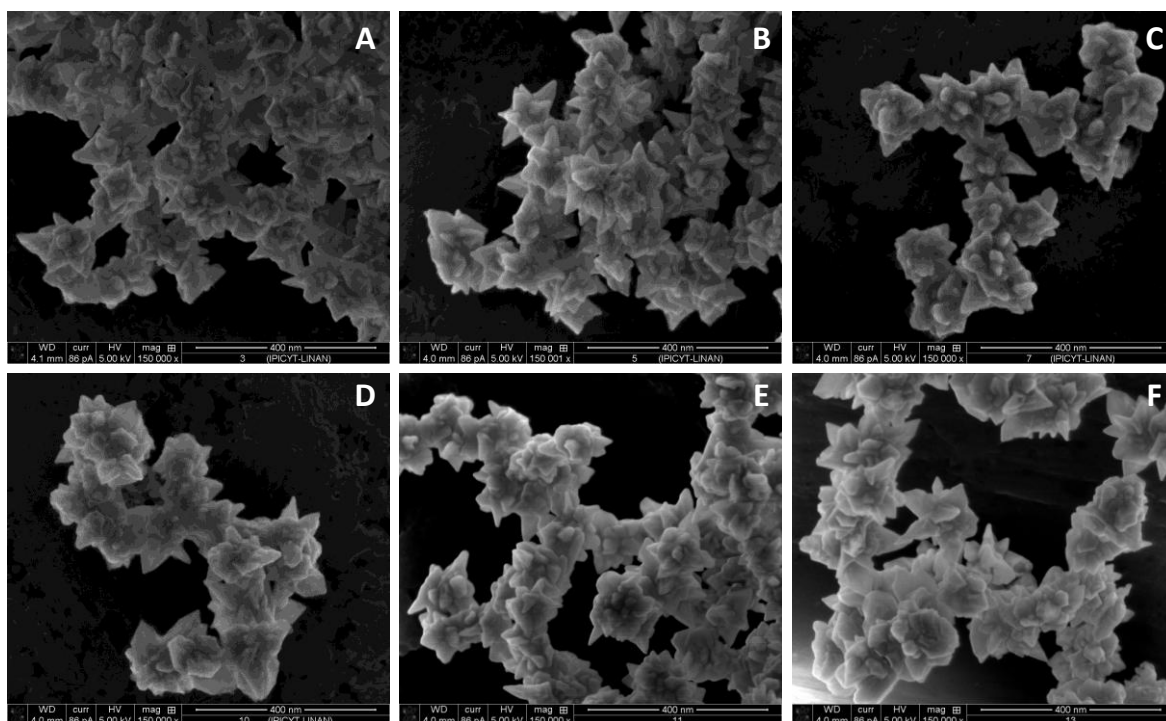


Figura 2. Aspecto de las MBAuNPs en el microscopio electrónico de barrido

En todas las 27 mezclas con diferentes condiciones de síntesis obtuvimos MBAuNPs. Las imágenes ejemplifican las MBAuNPs obtenidas en seis mezclas. Clave de lectura: H, concentración de HEPES (mM); N, microlitros de hidroxilamina 0.1 M añadidos por mezcla; S, microlitros de semillas añadidos por mezcla. (A) H50 N300 S150. (B) H75 N400 S100. (C) H75 N200 S50. (D) H50 N300 S50. (E) H50 N300 S100. (F) H50 N400 S50.

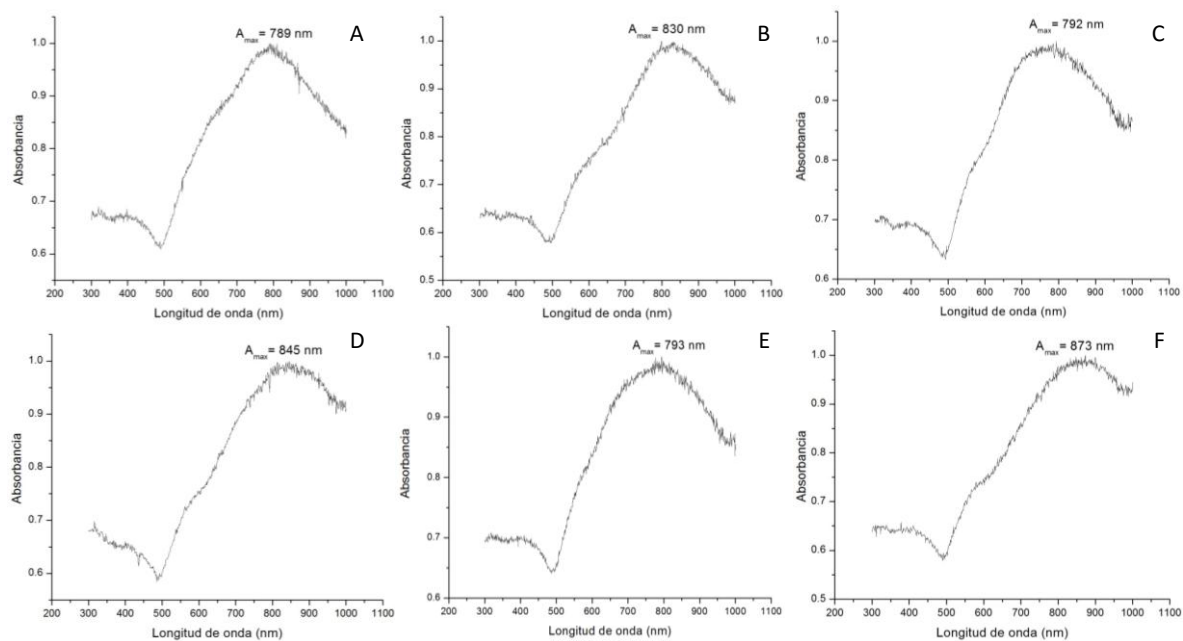


Figura 3. Espectros UV-VIS de las MBAuNPs

Los espectros UV-VIS corresponden a las MBAuNPs mostradas en los recuadros respectivos de la Fig. 2. Los valores de absorbancia fueron normalizados de manera que $A_{\text{máx}} = 1.0$. Clave de lectura: H, concentración de HEPES (mM); N, microlitros de hidroxilamina 0.1 M añadidos por mezcla; S, microlitros de semillas añadidos por mezcla. (A) H50 N300 S150. (B) H75 N400 S100. (C) H75 N200 S50. (D) H50 N300 S50. (E) H50 N300 S100. (F) H50 N400 S50.

más cercana al infrarrojo (873 nm) se obtuvieron con la adición mínima de semillas y máxima de hidroxilamina (Figs. 4 y 5).

Seleccionamos para el resto del proyecto las MBAuNPs de menor tamaño (diámetro medio de 97.5 nm) y absorbancia máxima de 820 nm que fueron generadas en mezclas con la adición máxima de hidroxilamina (2.62 mM) y semillas (150 μ L).

Funcionalización con BSA de las MBAuNPs seleccionadas

La funcionalización de las MBAuNPs consiste en recubrir su superficie con BSA, proteína que contribuye en dos factores muy importantes: (a) evita la aglomeración, y (b) puede dirigir las MBAuNPs a los receptores de superficie que abundan en las células endoteliales que forman la pared de los vasos sanguíneos.

Mezclamos las MBAuNPs seleccionadas con 20 μ g/ μ L de BSA y las lavamos por centrifugación con PBS. Empleando PBS como vehículo, determinamos los espectros UV-VIS de la solución de BSA pura y de las suspensiones de MBAuNPs puras y lavadas por centrifugación después de haberlas funcionalizado (MBAuNPs-BSA).

Los máximos del plasmón de superficie de los espectros UV-VIS fueron: para BSA pura, pico único a 280 nm; para MBAuNPs puras, pico único a 820 nm; para MBAuNPs-BSA, dos picos: a 280 nm (idéntico al de BSA pura) y a 865 nm (45 nm a la derecha del pico de AuNPs puras) (Fig. 6).

Concluimos que las MBAuNPs efectivamente pueden funcionalizarse con BSA y que las MBAuNPs-BSA tienen un máximo de absorbancia característico (865 nm), resultante del desplazamiento hacia el infrarrojo del pico de las MBAuNPs puras (820 nm).

Funcionalización de MBAuNPs con concentraciones variables de BSA

Para determinar el número de moléculas de BSA conjugadas por nanopartícula funcionalizamos las MBAuNPs en mezclas con 2.5, 10 y 20 μ g/ μ L de BSA con el protocolo descrito antes.

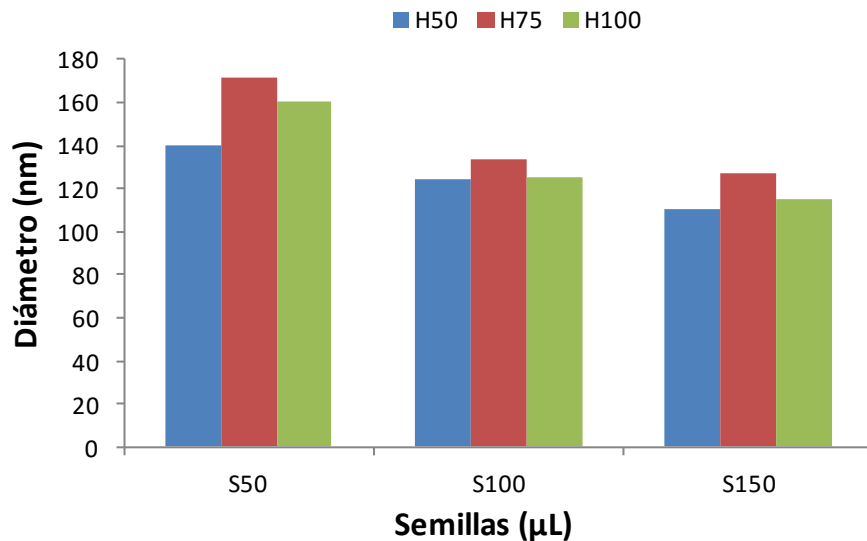


Figura 4. Efecto del contenido inicial de semillas sobre el tamaño de las MBAuNPs

Las abscisas indican el volumen de semillas añadido a las mezclas de síntesis y las ordenadas el diámetro medio de las MBAuNPs. Clave de lectura: H, concentración de HEPES (mM); N, microlitros de hidroxilamina 0.1 M añadidos por mezcla. Las MBAuNPs más pequeñas (~100 nm) se obtuvieron con la adición máxima de semillas (150 μL), independientemente del contenido de HEPES e hidroxilamina.

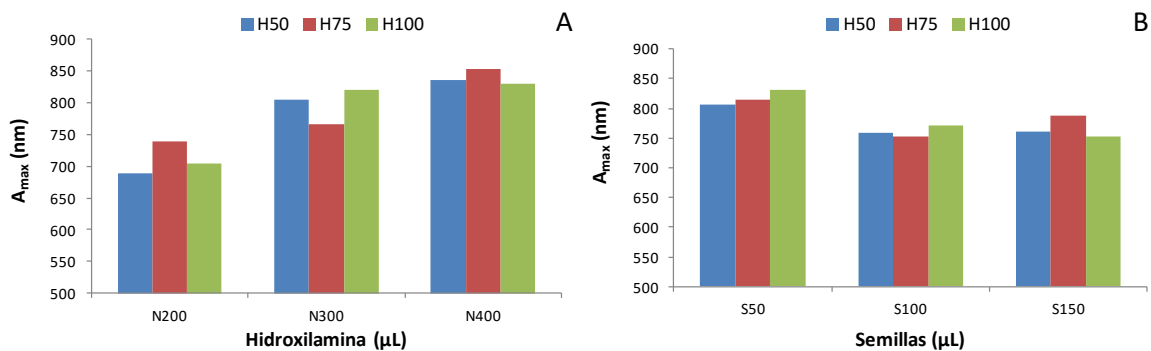


Figura 5. Efecto del contenido inicial de semillas e hidroxilamina sobre la longitud de onda de los máximos de absorbancia de las MBAuNPs

Clave de lectura: H, concentración de HEPES (mM); N, microlitros de hidroxilamina 0.1 M añadidos por mezcla; S, microlitros de semillas añadidos por mezcla. (A) Los máximos de absorbancia más cercanos al infrarrojo medio fueron obtenidos con la mayor cantidad inicial de hidroxilamina. (B) Los máximos de absorbancia más cercanos al infrarrojo medio fueron obtenidos con la menor cantidad inicial de semillas.

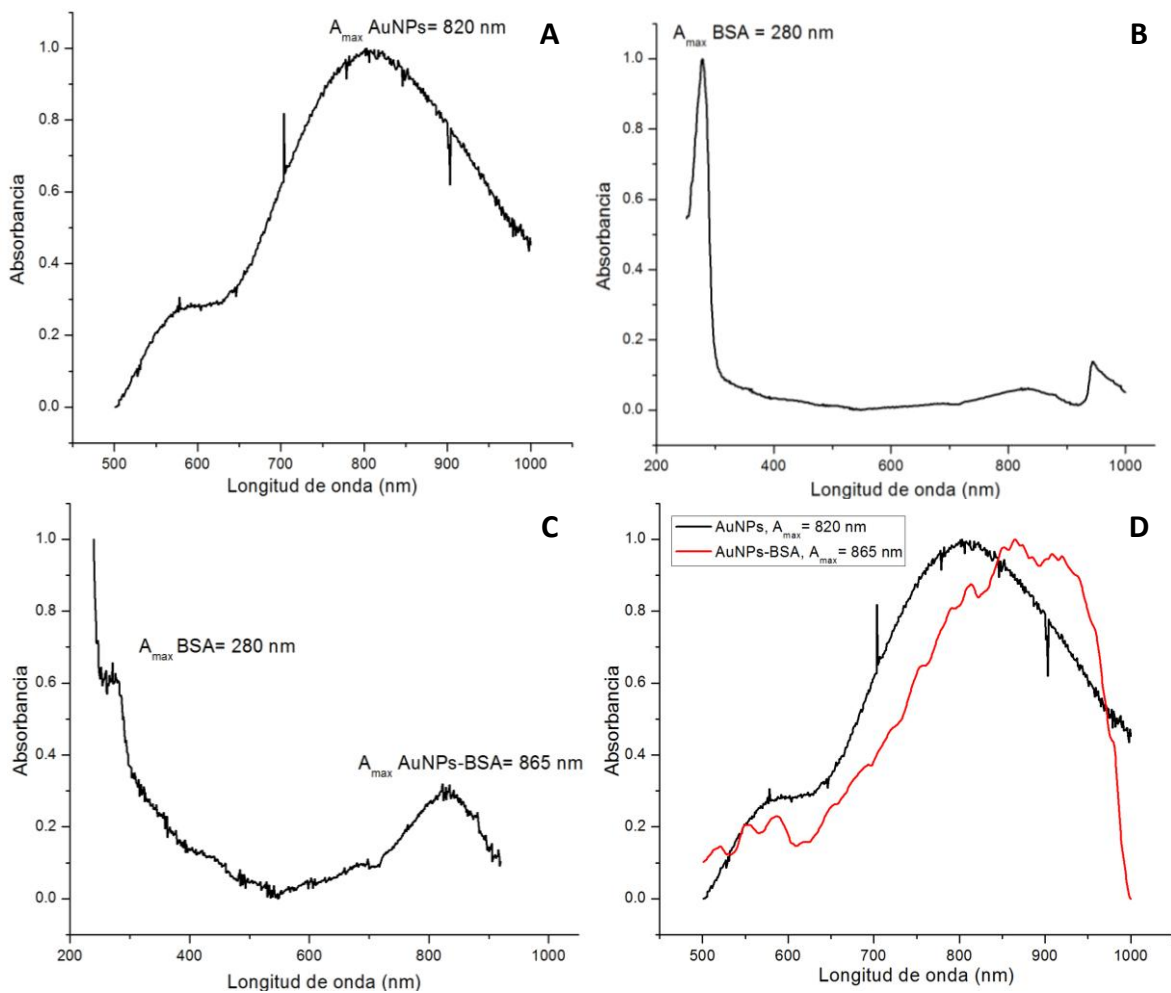


Figura 6. Espectros UV-VIS de MBAuNPs, BSA, y MBAuNPs-BSA

(A) Suspensión de MBAuNPs puras. (B) Solución de BSA pura. (C) Suspensión de MBAuNPs-BSA. (D) Suspensiones de MBAuNPs puras y MBAuNPs-BSA.

Calculamos el número promedio de moléculas de proteína unidas a cada MBAuNP interpolando la absorbancia a 280 nm de las MBAuNPs-BSA en la curva tipo de BSA (Fig. 7).

Las MBAuNPs-BSA obtenidas tuvieron los máximos de absorbancia característicos, desplazados 45-70 nm hacia el infrarrojo (Fig. 8). El número de moléculas de BSA conjugadas por cada MBAuNP varió en función de la concentración inicial de BSA (Tabla 4, Fig. 9), como sigue: para 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 444,928 moléculas (13.1% de las aplicadas); para 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1,395,942 moléculas (10.2% de las aplicadas); para 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$: 3,405,797 moléculas (12.5% de las aplicadas).

Confirmamos que el desplazamiento de 45-70 nm del pico de absorbancia de las MBAuNPs hacia el infrarrojo es característico de las MBAuNPs-BSA y concluimos que el número de moléculas de proteína en las MBAuNPs-BSA es proporcional a la concentración de BSA en la mezcla de funcionalización y corresponde al 10-13% de las moléculas disponibles.

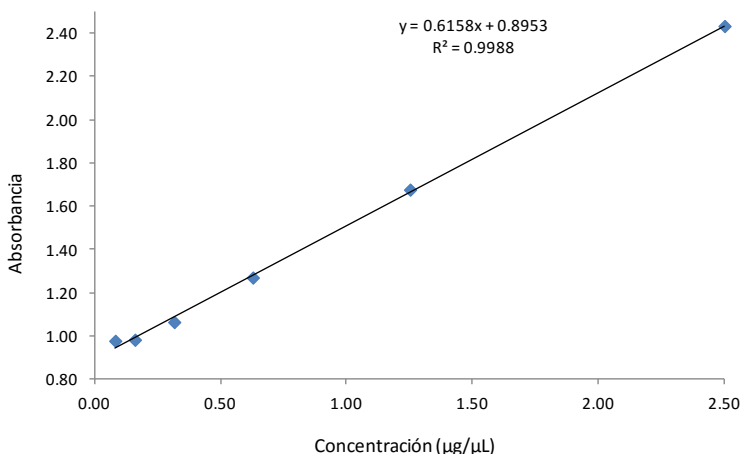


Figura 7. Curva tipo de BSA

La absorbancia de diluciones doble-seriadas de BSA fue determinada a 280 nm.

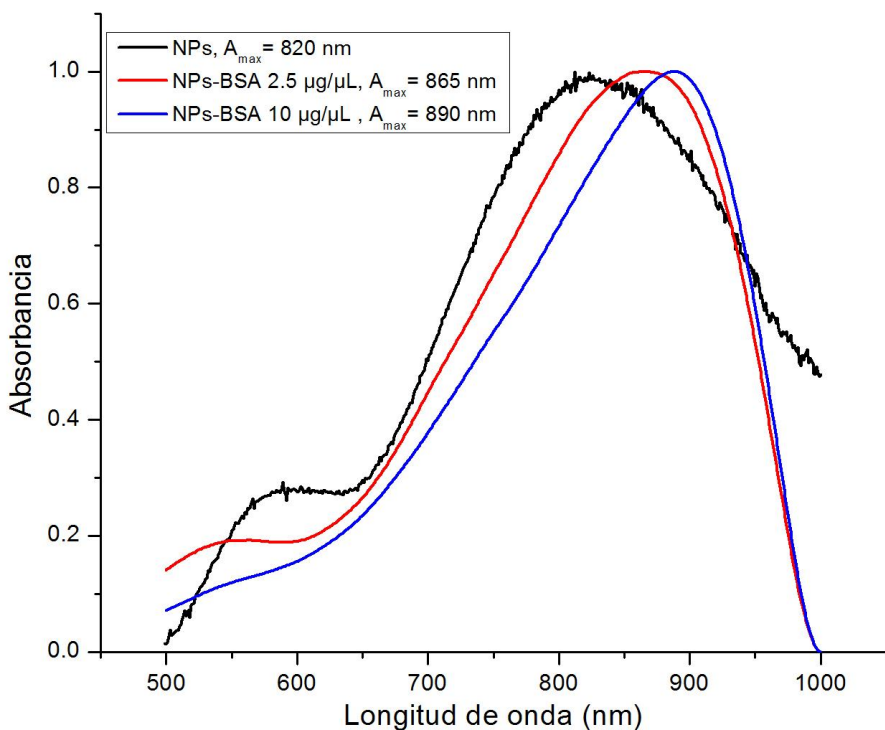


Figura 8. Espectros normalizados UV-VIS de MBAuNPs y MBAuNPs-BSA

Espectros UV-VIS de las MBAuNPs antes y después de ser funcionalizadas en mezclas con dos concentraciones diferentes de BSA.

Tabla 4. Moléculas de BSA por MBAuNPs en función del contenido de BSA en las mezclas de funcionalización.

BSA inicial			BSA final ^a			Moléculas de BSA	
mg/mL	μM	Moléculas/mL ^b	μg/μL	nM	Moléculas/mL	Por AuNP	Unidas/aplicadas
2.5	3.9	2.35E+16	0.02	5.1	3.07E+15	444,928	13.1%
10	15.6	9.41E+16	0.25	16.0	9.632E+15	1,395,942	10.2%
20	31.3	1.88E+17	0.72	23.0	2.35E+16	3,405,797	12.5%

^a Mezclas con 6.9×10^9 MBAuNPs/mL.

^b Peso molecular de la BSA: 64,000 Da.

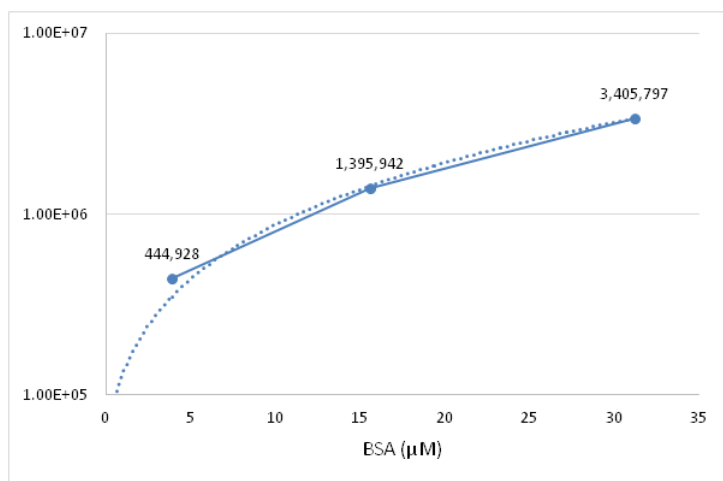


Figura 9. Moléculas de BSA por MBAuNP en función del contenido de BSA en las mezclas de funcionalización.

Ensayos de hipertermia de MBAuNPs en suspensiones acuosas y geles phantom

Determinamos la hipertermia causada por irradiación de las semillas áuricas y las MBAuNPs (**Fig. 10**) con luz cercana al infrarrojo en suspensiones acuosas y geles phantom uniformes (con permisividad relativa y conductividad equivalentes a las de la piel), sin burbujas.

Para los ensayos de suspensiones acuosas utilizamos agua pura, con semillas áuricas y con MBAuNPs. Para los ensayos de geles phantom utilizamos geles puros, con 4.1×10^9 MBAuNPs/mL y 6.2×10^9 MBAuNPs/mL (**Tabla 5**).

Irradiamos las suspensiones a lo largo de 10 min con un láser de 808 nm y potencia de 0.45, 0.75 o 1 W/cm². Con una cámara térmica determinamos el curso temporal de la temperatura de las suspensiones que estaban siendo irradiadas.

Observamos los siguientes incrementos de temperatura. En las suspensiones acuosas irradiadas con 0.75 W/cm²: agua sin NPs, 1.3 °C; semillas, 1.7 °C; MBAuNPs, 14.3 °C (**Fig.11A**). En las suspensiones acuosas con MBAuNPs irradiadas con potencia variable: 0.45 W/cm², 4.2 °C; 0.75 W/cm², 13 °C; 1 W/cm², 10.7 °C (**Fig.11B**). En los geles phantom con 4.1×10^9 MBAuNPs/mL irradiados con potencia variable: 0.45 W/cm², 0.1 °C; 0.75 W/cm², 3.7 °C; 1 W/cm², 3.9 °C (**Fig.12A**). En los geles phantom con 6.2×10^9 MBAuNPs/mL: 0.45 W/cm², 0.7 °C; 0.75 W/cm², 4.8 °C; 1 W/cm², 5.2 °C (**Fig. 12B**). Todos nuestros datos fueron estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

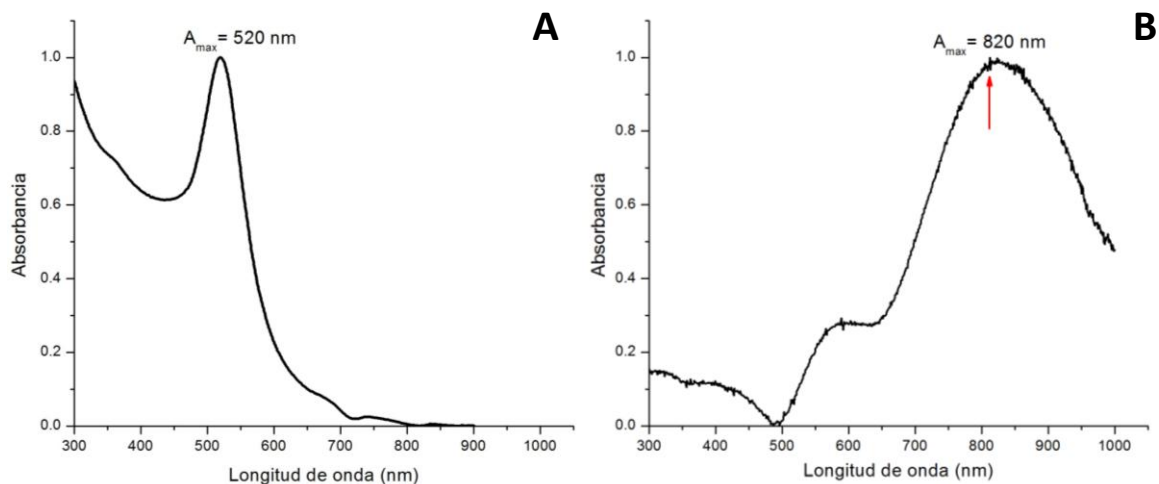


Figura 10. Espectros UV-VIS de las semillas y las MBAuNPs utilizadas en los ensayos de hipertermia

(A) Semillas de oro esféricas. Diámetro 18 nm, $A_{\max} = 520$ nm. (B) MBAuNPs. Diámetro 97.5 nm, $A_{\max} = 820$ nm. La flecha roja indica la longitud de onda del láser utilizado en los ensayos de hipertermia (808 nm).

Tabla 5. Contenido de MBAuNPs en los ensayos de hipertermia.

Componente	NPs/mL
Semillas áuricas en agua	6.9×10^{11}
MBAuNPs en agua	6.9×10^9
MBAuNPs en el gel 1	4.1×10^9
MBAuNPs en el gel 2	6.2×10^9

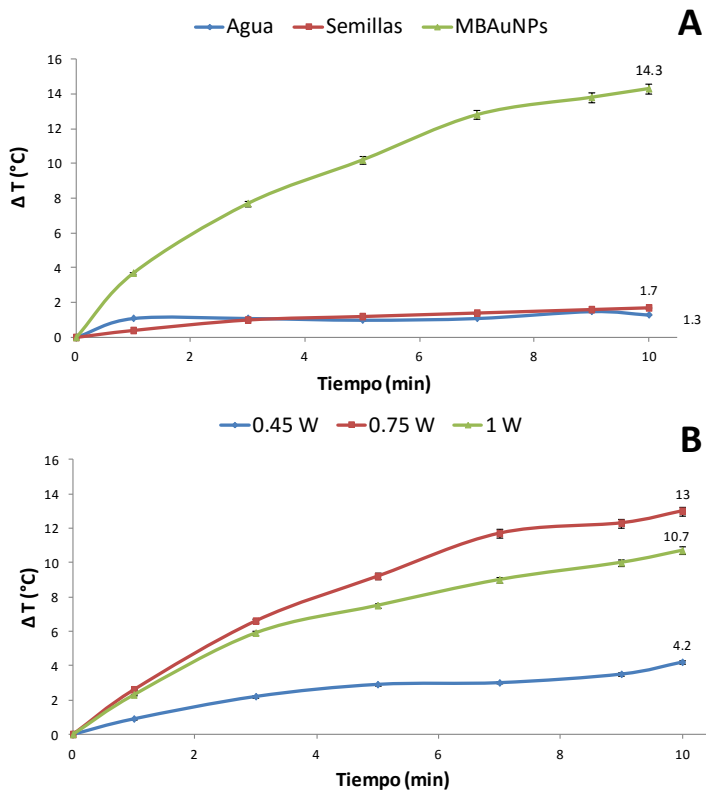


Figura 11. Curso temporal de la temperatura de las suspensiones acuosas de semillas y MBAuNPs irradiadas con el láser a 808 nm

Las suspensiones contenían 6.9×10^{11} semillas/mL o 6.9×10^9 MBAuNPs/mL. (A) MBAuNPs y semillas irradiadas con 0.75 W/cm^2 . (B) MBAuNPs irradiadas con potencias variables entre 0.45 y 1 mW/cm^2 . El error en la medición de la temperatura es de $\pm 2\%$.

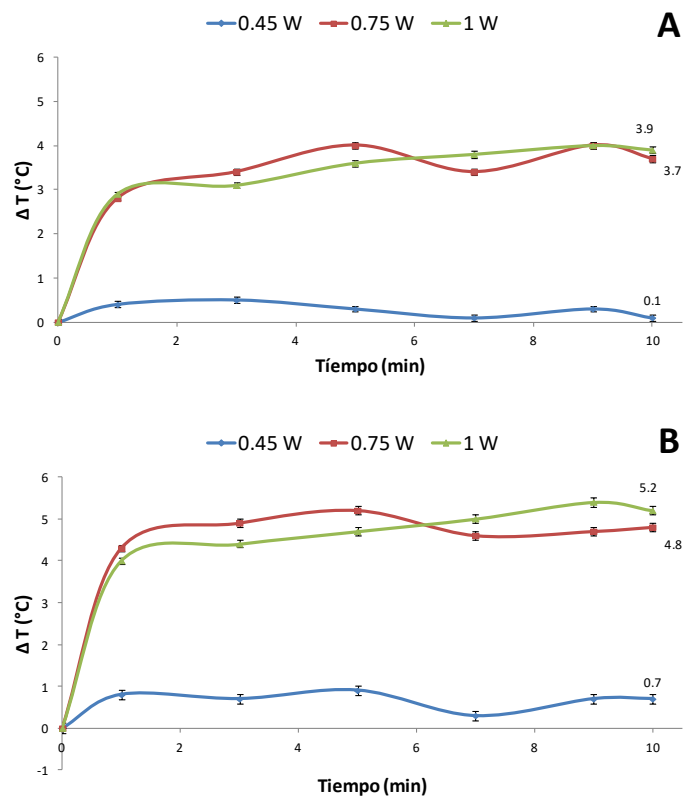


Figura 12. Curso temporal de la temperatura de geles phantom con MBAuNPs, irradiados con potencias variables del láser a 808 nm

(A) Gel con 4.1×10^9 MBAuNPs/mL. (B) Gel con 6.2×10^9 MBAuNPs/mL. El error en la medición de la temperatura es de $\pm 2\%$.

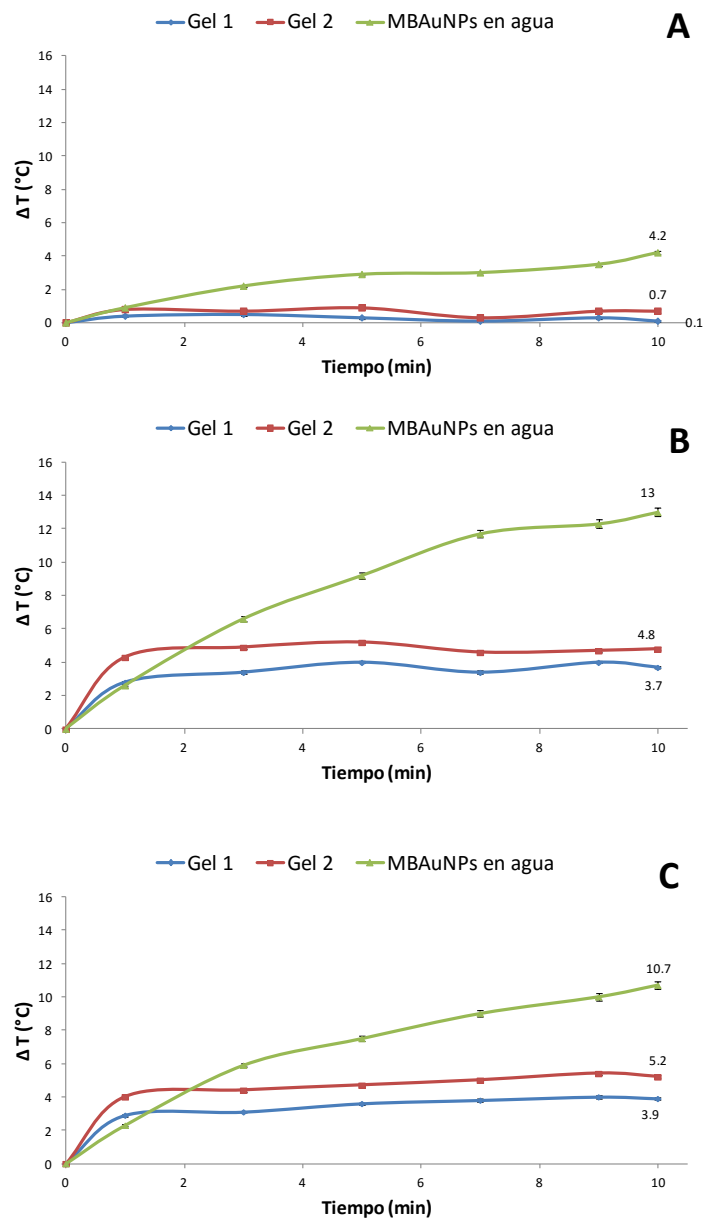


Figura 13. Curso temporal de la temperatura de suspensiones acuosas y geles phantom con diferentes concentraciones de MBAuNPs irradiadas con potencias variables del láser a 808 nm.

(A) 0.45 W/cm^2 . (B) 0.75 W/cm^2 . (C) 1 W/cm^2 . Gel 1, 4.1×10^9 MBAuNPs/mL. Gel 2, 6.2×10^9 MBAuNPs/mL. MBAuNPs en agua, 6.9×10^9 MBAuNPs/mL. El error en la medición de la temperatura es de $\pm 2\%$.

Discusión

Este trabajo permitió desarrollar un método de síntesis de MBAuNPs adecuadas para ensayos de hipertermia por irradiación láser en el infrarrojo cercano y demostrar por primera vez su potencial en los geles phantom, que constituyen un modelo de la piel.

Obtuvimos semillas áuricas esféricas estables, de características reproducibles (diámetro promedio de 18 nm y absorbancia máxima a 520 nm), como señalan diversos autores (Frens and Cense 1973; Kimling et al. 2006; Turkevich et al. 1951).

La concentración de las semillas determinada por ICP-MS y UV-VIS fue comparable (6.04×10^{11} y 7.71×10^{11} semillas/mL) y confirmó la validez de los protocolos de dos grupos (Allabashi et al. 2009; Haiss et al. 2007). El montaje de ambos métodos nos permitió utilizarlos indistintamente en los siguientes experimentos.

Maiorano et al. (2011) sintetizaron MBAuNPs con dos tamaños de semillas a la misma concentración, una concentración fija de hidroxilamina y menores concentraciones de HEPES (0, 0.2, 1, 2.5, 5 y 25 mM), concluyendo que el tamaño y la absorbancia máxima depende de la concentración de HEPES durante la síntesis de MBAuNPs. Nosotros probamos tres concentraciones de semillas, HEPES e hidroxilamina.

En todas las condiciones de síntesis obtuvimos MBAuNPs. Las más pequeñas (diámetro promedio = 97.5 nm) y absorbancia máxima más cercana al infrarrojo (873 nm), las obtuvimos con la adición mínima de semillas y máxima de hidroxilamina.

Con las diferentes concentraciones de BSA utilizadas para la funcionalización de las MBAuNPs observamos un desplazamiento de 45-70 nm hacia el infrarrojo del pico de las MBAuNPs puras (820 nm) que parece ser característico de las MBAuNPs-BSA y es mayor que el descrito por Nghiem et al. (2010).

Aunque estandarizamos el método para la funcionalización de las MBAuNPs con BSA, no hemos podido escalarlo a volúmenes mayores.

El número promedio de moléculas de BSA conjugadas a cada MBAuNP es proporcional al contenido de BSA en las mezclas de funcionalización: 444,928, 1,395,942 y 3,405,797 moléculas por MBAuNPs respectivamente en mezclas con 2.5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA. No encontramos ninguna publicación que describa la cuantificación de las moléculas de BSA en las MBAuNPs.

Obtuvimos geles phantom uniformes sin burbujas, en los que incluimos MBAuNPs en concentraciones variables. El calentamiento necesario para fabricar los geles podría desnaturalizar la BSA, por lo cual no tratamos de incluir MBAuNPs-BSA en ellos. Parece que somos los primeros en ensayar la hipertermia por irradiación de geles con MBAuNPs, pues tampoco hemos encontrado publicaciones al respecto.

La irradiación con el láser a 808 nm por 10 min aumentó entre 4.2 - 13 °C la temperatura de las suspensiones acuosas con MBAuNPs, y entre 3.7 - 5.2 °C la de los geles phantom con MBAuNPs, pero no la del agua ni la de las suspensiones acuosas con semillas áuricas. Encontramos además que la hipertermia de los geles phantom depende de la concentración de MBAuNPs y la potencia de irradiación.

Aunque nuestros ensayos de hipertermia con geles phantom que contienen MBAuNPs han sido exitosos, es necesario asegurar su eficacia en cultivos celulares o modelos animales.

Referencias

- Allabashi R, Stach W, de la Escosura-Muñiz A, Liste-Calleja L, Merkoçi A (2009) ICP-MS: a powerful technique for quantitative determination of gold nanoparticles without previous dissolving J Nanopart Res 11:2003-2011 doi:10.1007/s11051-008-9561-2
- Amstad E, Textor M, Reimhult E (2011) Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications Nanoscale 3:2819-2843 doi:10.1039/c1nr10173k
- Austin LA, Mackey MA, Dreaden EC, El-Sayed MA (2014) The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery Arch Toxicol 88:1391-1417 doi:10.1007/s00204-014-1245-3
- Bartneck M, Warzecha KT, Tacke F (2014) Therapeutic targeting of liver inflammation and fibrosis by nanomedicine Hepatobiliary Surg Nutr 3:364-376 doi:10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.02
- Bell IR, Sarter B, Koithan M, Banerji P, Jain S, Ives J (2014) Integrative nanomedicine: treating cancer with nanoscale natural products Glob Adv Health Med 3:36-53 doi:10.7453/gahmj.2013.009
- Binns C (2010) Introduction. In: Introduction to Nanoscience and Nanotechnology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp 1-10. doi:10.1002/9780470618837.ch
- Burford CD et al. (2013) Nanoparticle mediated thermal ablation of breast cancer cells using a nanosecond pulsed electric field IEEE Trans Nanobioscience 12:112-118 doi:10.1109/TNB.2013.2257836
- Conde J, Dias JT, Grazu V, Moros M, Baptista PV, de la Fuente JM (2014) Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine Front Chem 2:1-27 doi:10.3389/fchem.2014.00048
- Curry T, Kopelman R, Shilo M, Popovtzer R (2014) Multifunctional theranostic gold nanoparticles for targeted CT imaging and photothermal therapy Contrast Media Mol Imaging 9:53-61 doi:10.1002/cmml.1563
- Chahat N, Zhadobov M, Alekseev S, Sauleau R (2012) Human skin-equivalent phantom for on-body antenna measurements in 60 GHz band Electron Lett 48 67-68 doi:10.1049/el.2011.2619
- Chow EK, Ho D (2013) Cancer nanomedicine: from drug delivery to imaging Sci Transl Med 5:216-220 doi:10.1126/scitranslmed.3005872

- Erathodiyil N, Ying JY (2011) Functionalization of inorganic nanoparticles for bioimaging applications *Acc Chem Res* 44:925-935 doi:10.1021/ar2000327
- Fayaz AM, Girilal M, Venkatesan R, Kalaichelvan PT (2011) Biosynthesis of anisotropic gold nanoparticles using *Maduca longifolia* extract and their potential in infrared absorption *Colloids Surf B Biointerfaces* 88:287-291 doi:10.1016/j.colsurfb.2011.07.003
- Fazal S, Jayasree A, Sasidharan S, Koyakutty M, Nair SV, Menon D (2014) Green synthesis of anisotropic gold nanoparticles for photothermal therapy of cancer *ACS Appl Mater Interfaces* 6:8080-8089 doi:10.1021/am500302t
- Feng L, Zhu C, Yuan H, Liu L, Lv F, Wang S (2013) Conjugated polymer nanoparticles: preparation, properties, functionalization and biological applications *Chem Soc Rev* 42:6620-6633 doi:10.1039/c3cs60036j
- Feynman RP There's plenty of room at the bottom. In: *Engineering and Science*, California Institute of Technology, 1960. vol 5. pp 22-36
- Frens G, Cense WA (1973) Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions *Nature Phys Sci* 241:20-22 doi:10.1038/physci241020a0
- Gannon CJ, Patra CR, Bhattacharya R, Mukherjee P, Curley SA (2008) Intracellular gold nanoparticles enhance non-invasive radiofrequency thermal destruction of human gastrointestinal cancer cells *J Nanobiotechnology* 6:1-9 doi:10.1186/1477-3155-6-2
- Gao J, Huang X, Liu H, Zan F, Ren J (2012) Colloidal stability of gold nanoparticles modified with thiol compounds: bioconjugation and application in cancer cell imaging *Langmuir* 28:4464-4471 doi:10.1021/la204289k
- Haiss W, Thanh NT, Aveyard J, Fernig DG (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra *Anal Chem* 79:4215-4221 doi:10.1021/ac0702084
- Hassan S, Singh AV (2014) Biophysicochemical perspective of nanoparticle compatibility: a critically ignored parameter in nanomedicine *J Nanosci Nanotechnol* 14:402-414 doi:10.1166/jnn.2014.8747
- Hildebrandt B et al. (2002) The cellular and molecular basis of hyperthermia *Crit Rev Oncol Hematol* 43:33-56 doi:10.1016/s1040-8428(01)00179-2
- Jang SF, Liu WH, Song WS, Chiang KL, Ma HI, Kao CL, Chen MT (2014) Nanomedicine-based neuroprotective strategies in patient specific-

- iPSC and personalized medicine *Int J Mol Sci* 15:3904-3925
doi:10.3390/ijms15033904
- Kang S et al. (2015) Mesenchymal Stem Cells Aggregate and Deliver Gold Nanoparticles to Tumors for Photothermal Therapy *ACS Nano* 9:9678-9690 doi:10.1021/acsnano.5b02207
- Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A (2006) Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited *J Phys Chem B* 110:15700-15707 doi:10.1021/jp061667w
- Kragh-Hansen U (1981) Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin *Pharmacol Rev* 33:17
- Kruse DE, Stephens DN, Lindfors HA, Ingham ES, Paoli EE, Ferrara KW (2011) A radio-frequency coupling network for heating of citrate-coated gold nanoparticles for cancer therapy: design and analysis *IEEE Trans Biomed Eng* 58:2002-2012 doi:10.1109/TBME.2011.2124460
- Li N, Zhao P, Astruc D (2014) Anisotropic gold nanoparticles: synthesis, properties, applications, and toxicity *Angew Chem Int Ed Engl* 53:1756-1789 doi:10.1002/anie.201300441
- Li Y, Brown RE, Martin RC (2013) Incomplete thermal ablation of hepatocellular carcinoma: effects on tumor proliferation *J Surg Res* 181:250-255 doi:10.1016/j.jss.2012.07.014
- Liu LN, Xu HX, Lu MD, Xie XY (2010) Percutaneous ultrasound-guided thermal ablation for liver tumor with artificial pleural effusion or ascites *Chin J Cancer* 29:830-835 doi:1944-446X201009830 [pii]
- Liu T, Thierry B (2012) A solution to the PEG dilemma: efficient bioconjugation of large gold nanoparticles for biodiagnostic applications using mixed layers *Langmuir* 28:15634-15642 doi:10.1021/la301390u
- Mahindra P et al. (2008) Skin cancers, blindness, and anterior tongue mass in African brothers *J Am Acad Dermatol* 59:881-886 doi:10.1016/j.jaad.2008.06.030
- Maiorano G et al. (2011) Monodispersed and size-controlled multibranching gold nanoparticles with nanoscale tuning of surface morphology *Nanoscale* 3:2227-2232 doi:10.1039/c1nr10107b
- Markman JL, Rekechenetskiy A, Holler E, Ljubimova JY (2013) Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance *Adv Drug Deliv Rev* 65:1866-1879 doi:10.1016/j.addr.2013.09.019

- Master A, Livingston M, Sen Gupta A (2013) Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: perspectives and challenges *J Control Release* 168:88-102 doi:10.1016/j.jconrel.2013.02.020
- Matsumura Y (2014) The drug discovery by nanomedicine and its clinical experience *Jpn J Clin Oncol* 44:515-525 doi:10.1093/jjco/hyu046
- Modery-Pawlowski CL, Gupta AS (2014) Heteromultivalent ligand-decoration for actively targeted nanomedicine *Biomaterials* 35:2568-2579 doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.047
- Mout R, Moyano DF, Rana S, Rotello VM (2012) Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine *Chem Soc Rev* 41:2539-2544 doi:10.1039/c2cs15294k
- Munireddy S, Katz S, Somasundar P, Espat NJ (2012) Thermal tumor ablation therapy for colorectal cancer hepatic metastasis *J Gastrointest Oncol* 3:69-77 doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.008
- Nehoff H, Parayath NN, Domanovitch L, Taurin S, Greish K (2014) Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect *Int J Nanomedicine* 9:2539-2555 doi:10.2147/IJN.S47129
- Nghiem THL et al. (2010) Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol* 1:25009-25013 doi:10.1088/2043-6254/1/2/025009
- Ozcelikkale A, Ghosh S, Han B (2013) Multifaceted transport characteristics of nanomedicine: needs for characterization in dynamic environment *Mol Pharm* 10:2111-2126 doi:10.1021/mp3005947
- Palacios SC (2011) Mechanisms for enhancing the optical transmission through a single sub-wavelength hole
- Peralta DV, Heidari Z, Dash S, Tarr MA (2015) Hybrid paclitaxel and gold nanorod-loaded human serum albumin nanoparticles for simultaneous chemotherapeutic and photothermal therapy on 4T1 breast cancer cells *ACS Appl Mater Interfaces* 7:7101-7111 doi:10.1021/acsami.5b00858
- Saadeh Y, Leung T, Vyas A, Chaturvedi LS, Perumal O, Vyas D (2014) Applications of nanomedicine in breast cancer detection, imaging, and therapy *J Nanosci Nanotechnol* 14:913-923
- Sajanlal PR, Sreepasad TS, Samal AK, Pradeep T (2011) Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions *Nano Reviews* 2:5883 doi:10.3402/nano.v2i0.5883

- Singh M, Harris-Birtill DC, Markar SR, Hanna GB, Elson DS (2015) Application of gold nanoparticles for gastrointestinal cancer theranostics: A systematic review *Nanomedicine* 11:2083-2098 doi:10.1016/j.nano.2015.05.010
- Subbiah R, Veerapandian M, Yun KS (2010) Nanoparticles: functionalization and multifunctional applications in biomedical sciences *Curr Med Chem* 17:4559-4577 doi:BSP/CMC/E-Pub/ 285 [pii]
- Sun M et al. (2016) Salt-induced aggregation of gold nanoparticles for photoacoustic imaging and photothermal therapy of cancer *Nanoscale* 8:4452-4457 doi:10.1039/c6nr00056h
- Taniguchi N On the Basic Concept of Nano-Technology. In: International Conference on Production Engineering, Tokyo, 1974. Japan Society of Precision Engineering,
- Thorley AJ, Tetley TD (2013) New perspectives in nanomedicine *Pharmacol Ther* 140:176-185 doi:10.1016/j.pharmthera.2013.06.008
- Tong S, Fine EJ, Lin Y, Cradick TJ, Bao G (2014) Nanomedicine: tiny particles and machines give huge gains *Ann Biomed Eng* 42:243-259 doi:10.1007/s10439-013-0952-x
- Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold *Discuss Faraday Soc* 11:55-75 doi:10.1039/DF9511100055
- van der Zee J (2002) Heating the patient: a promising approach? *Annals of Oncology* 13:1173-1184 doi:10.1093/annonc/mdf280
- Veerapandian M, Yun K (2011) Functionalization of biomolecules on nanoparticles: specialized for antibacterial applications *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1655-1667 doi:10.1007/s00253-011-3291-6
- Weingart J, Vabbilisetty P, Sun XL (2013) Membrane mimetic surface functionalization of nanoparticles: methods and applications *Adv Colloid Interface Sci* 197-198:68-84 doi:10.1016/j.cis.2013.04.003
- Weis SM, Cheresh DA (2011) Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets *Nat Med* 17:1359-1370 doi:10.1038/nm.2537
- Xu X, Ho W, Zhang X, Bertrand N, Farokhzad O (2015) Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy *Trends Mol Med* 21:223-232 doi:S1471-4914(15)00002-7 [pii]
- Yang Z, Kang SG, Zhou R (2014) Nanomedicine: de novo design of nanodrugs *Nanoscale* 6:663-677 doi:10.1039/c3nr04535h
- Zook JM, Maccuspie RI, Locascio LE, Halter MD, Elliott JT (2011a) Stable nanoparticle aggregates/agglomerates of different sizes and the effect

of their size on hemolytic cytotoxicity *Nanotoxicology* 5:517-530
doi:10.3109/17435390.2010.536615

Zook JM, Rastogi V, Maccuspie RI, Keene AM, Fagan J (2011b) Measuring agglomerate size distribution and dependence of localized surface plasmon resonance absorbance on gold nanoparticle agglomerate size using analytical ultracentrifugation *ACS Nano* 5:8070-8079
doi:10.1021/nn202645b