10 MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS *CORE-SHELL* *AU/FE$_3$O$_4$*

Todos los reactivos usados FeCl3·6H2O, (97%), $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, Amoniaco (30%), Ácido Tetracloroaúrico ($HAuCl_4$), Ácido Tánico ($C_{76}H_{52}O_{46}$), Citrato de Sodio [$NaH_2C_3H_5O(COO)_3$], fueron comprados de Sigma-Aldrich, y se usaron directamente sin ningún tratamiento adicional, excepto que se indique en el procedimiento.

10.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS *CORE-SHELL*

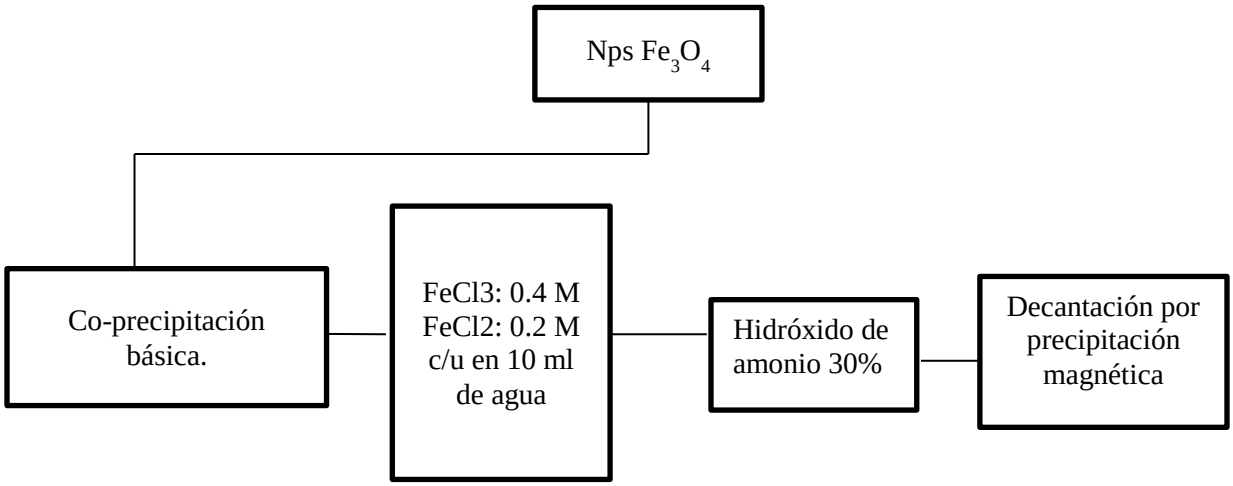

Figura 1. Síntesis de nanopartículas de magnetita.

Para la síntesis de estas nanopartículas se utilizó el método de co-precipitación básica de acuerdo a lo reportado por A-H, et al (2007) (Figura 1). Se prepararon dos soluciones que se explican a continuación:

Primera solución: 0.4 M de Cloruro Férrico ($FeCl_3$), (1.08 g de $FeCl_3$ en 10ml de agua destilada en un vaso de precipitados de 50 ml colocado sobre una parrilla de agitación). El resultado fue una solución de coloración naranja traslúcido. Cabe mencionar que esta solución se dejó en agitación por 10 minutos mientras se preparó la segunda solución.

Segunda solución: 0.2 M de Cloruro Ferroso ($FeCl_2$). En este caso se agregaron 0.3975 g de $FeCl_2$ en 10 ml de agua destilada en un vaso de precipitados de 50 ml colocado sobre una parrilla de agitación). Resultó una solución de coloración verde traslúcida.

Una vez que se tienen ambas soluciones, la segunda solución se agregó a la primera rápidamente mientras la agitación permaneció constante (500 rpm) para generar una tercera solución.

Esta tercera solución ($FeCl_2$ + $FeCl_3$) se dejó bajo agitación por 10 minutos a temperatura ambiente hasta asegurarse de que se hayan mezclado perfectamente la primera y segunda solución, se utilizó un vidrio de reloj para evitar salpicar el lugar de trabajo. Posteriormente, se agregaron rápidamente 2.5 ml de amoniaco al 30%, manteniendo una agitación a velocidad máxima para favorecer la formación de las nanopartículas de Fe_3O_4. El resultado final fue una solución de coloración negra (Figura 2) la cual fue decantada por precipitación magnética (mediante un imán de neodimio) (Figura 3) y obtención definitiva de la magnetita.

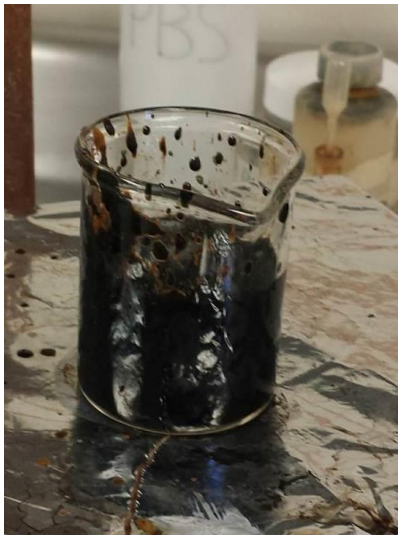

Figura 2. Magnetita sintetizada

Figura 3. Separación magnética de magnetita

De la misma forma se lavó 3 veces con agua destilada y en los intervalos de cada lavado se agitó para remover impurezas (Figura 4).

Figura 4. Magnetita libre de impurezas.

Finalmente se dejó secar en una estufa a 50 ºC por 24 hrs. Al secarse completamente fue posible observar cristales sólidos de color negro los cuales fueron recuperados con ayuda de una espátula y colocados en un mortero de Agata para molerlos y obtener un polvo negro y fino (Figura 5).

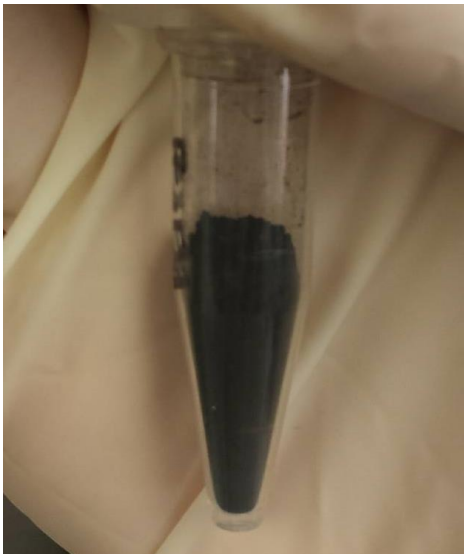

Figura 5. Producto final de magnetita

10.3 NANOPARTÍCULAS DE ORO (AU)

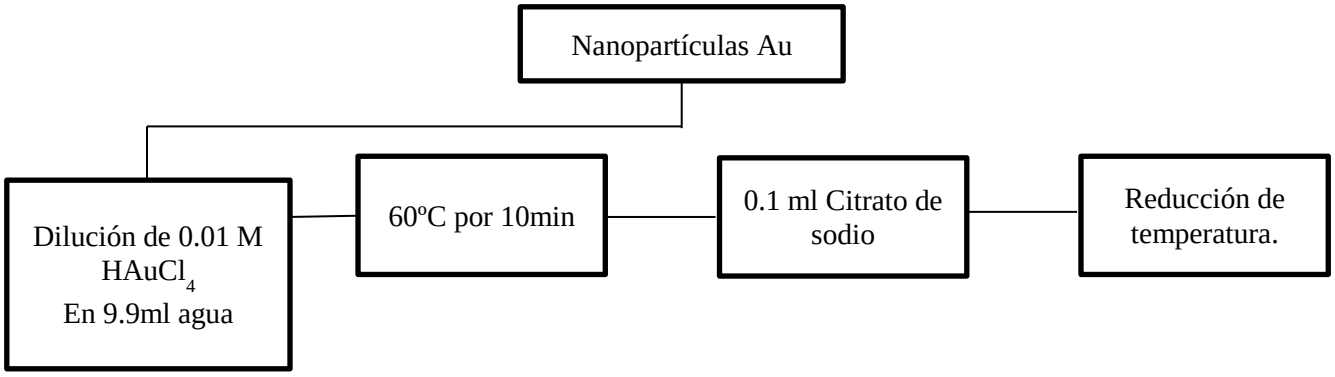

Figura 6. Síntesis de nanopartículas de oro.

Las nanopartículas de oro para este experimento fueron sintetizadas por:

Tamara Saitcevsky Parra y Tania Cecilia Hidalgo Castillo siguiendo la metodología expuesta por Damon, et al, (2012) en donde las nanopartículas de oro se elaboran por medio de la reducción de $HAuCl_4$ con citrato de sodio en medio acuoso.

Se diluyó 0.1 ml de $HAuCl_4$ 0.01 M en 9.9 ml de agua destilada en un tubo Falcon de 15 ml. Esta solución se colocó en baño maría con una temperatura mayor a 61 °C, por 10 minutos. Posteriormente, se añadió 0.1 ml de citrato de sodio al 1% con agitación vigorosa (0.01% final). Para finalizar, se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente y, en aproximadamente 10 minutos se observó el cambio de color a rosa – rojizo lo que indica la formación de las nanopartículas de oro (Figura 7).

Figura 7. Nanopartículas de oro.

10.4 NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA RECUBIERTAS CON ORO (Fe_3O_4/AU)

Esta síntesis se llevó a cabo una vez teniendo la magnetita pulverizada (Figura 8). A 100 mL de agua destilada, se les agregó 100 mg de Fe_3O_4. Por otro lado, se prepararon 15 mL de una solución de $HAuCl_4$ a una concentración de 46.5 Mm (Se utilizaron 0.0792 ml de $HAuCl_4$).

Esta solución se agregó a la mezcla de magnetita previamente preparada en un vaso de precipitado de 250 mL. Al mismo tiempo se adicionó 4 mL por minuto de ácido tánico. Al agregar lo anterior se puede observar un cambio de color a café – rojizo (Figura 9).

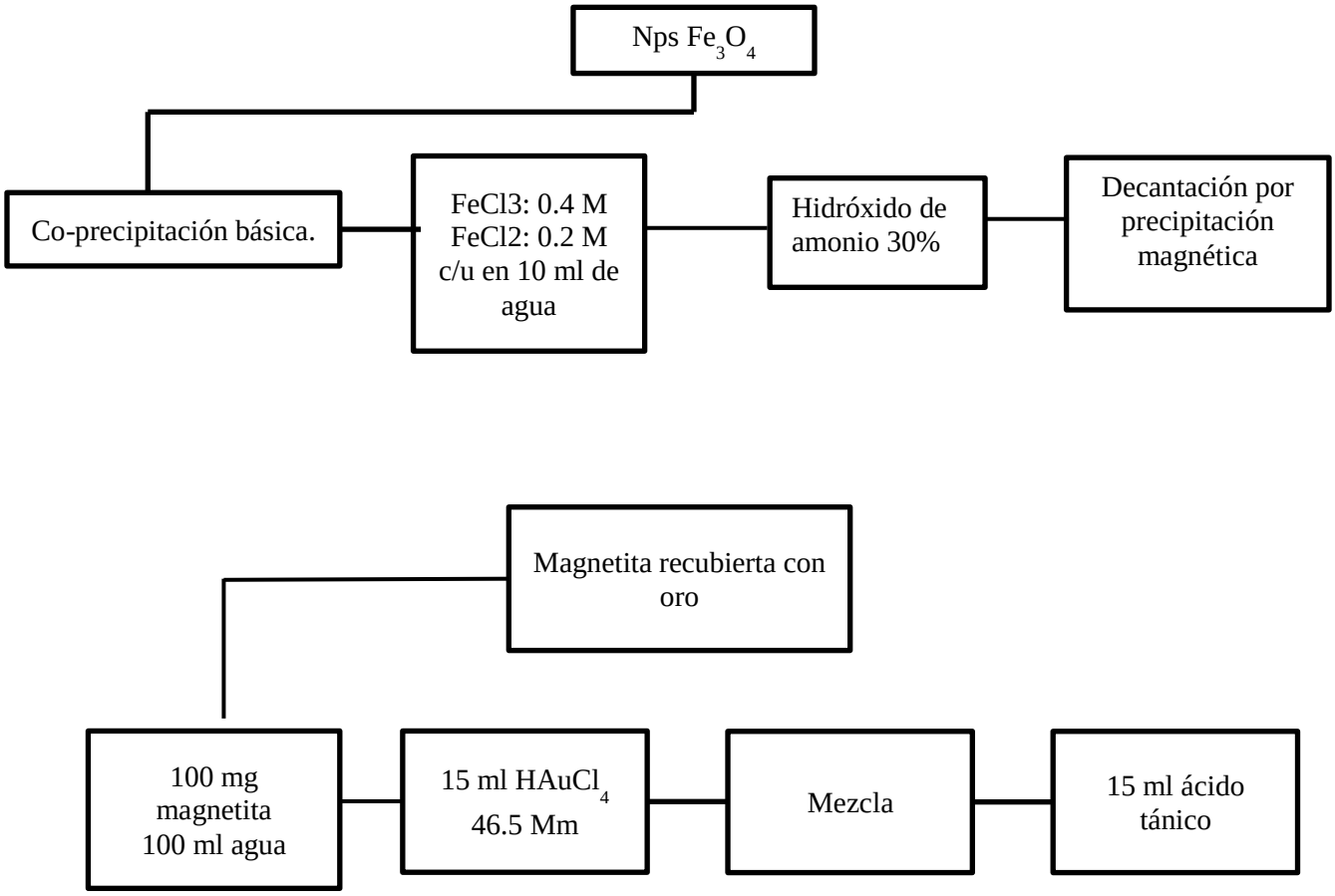

Figura 8. Síntesis de nanopartículas de magnetita recubierta con oro.

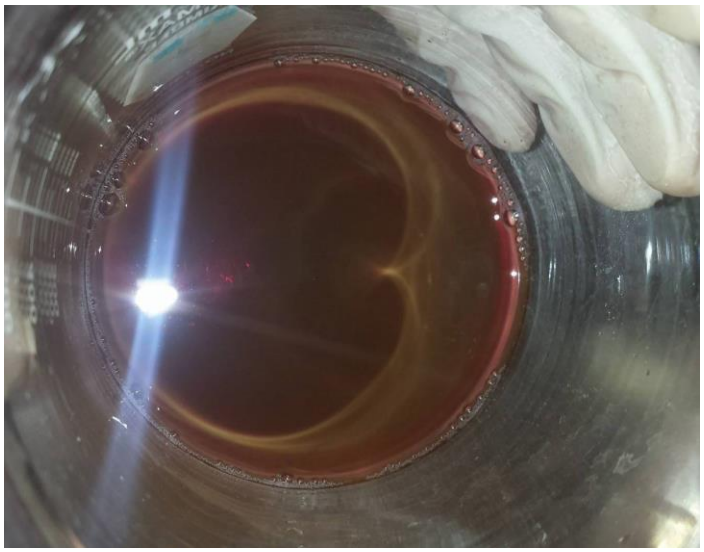

Figura 9. Magnetita con $HAuCl_4$ y ácido tánico.

Finalmente se realizaron lavados para remover impurezas mediante precipitación magnética y una vez terminado se dejaron las nanopartículas secar a temperatura ambiente por una noche, para esto se retiró el sobrenadante y se hizo un lavado con etanol, se desechó el etanol y se dejaron secar.

Al otro día se recolectaron las nanopartículas del vaso de precipitado y fueron pulverizadas con ayuda de un mortero de Agata (Figura 10).

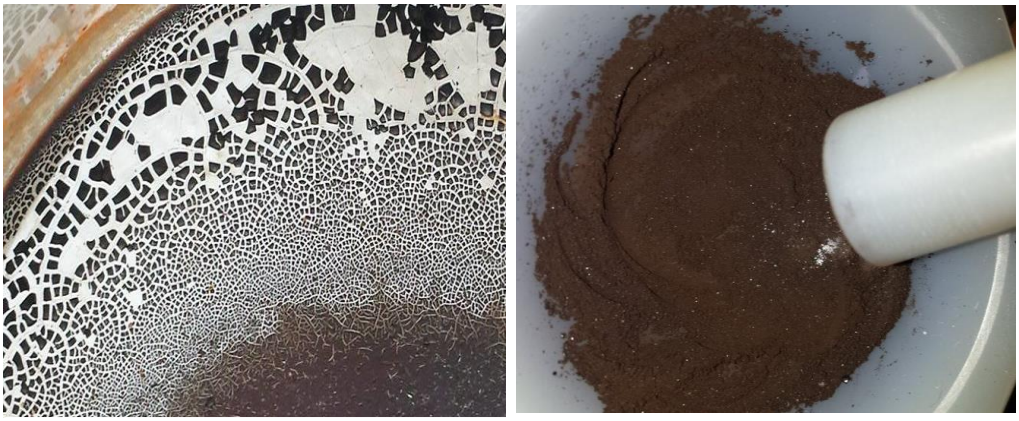

Figura 10. Cristales de Fe_3O_4/Au

10.5 NANOPARTÍCULAS DE ORO RECUBIERTAS CON MAGNETITA (AU/FE_3O_4)

Para esta síntesis, primero se sintetizaron las nanopartículas de oro como se muestra en la Figura 11 siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Posteriormente, se sintetizaron las nanopartículas de magnetita y aun encontrándose estas en suspensión se les agregó 10 ml de nanopartículas de oro en agitación constante.

Para purificar las nanopartículas sintetizadas se utilizó el método de coprecipitación básica con la utilización de un imán de neodimio. La manera de comprobar cualitativamente que el oro fue recubierto por la magnetita, la preparación debe ser diferente a la del oro y parecerse al de la magnetita. Se observa un cambio de color (un tanto café y ligeramente morado) (Figura 12). Este color es indicativo de que el oro fue recubierto por magnetita.

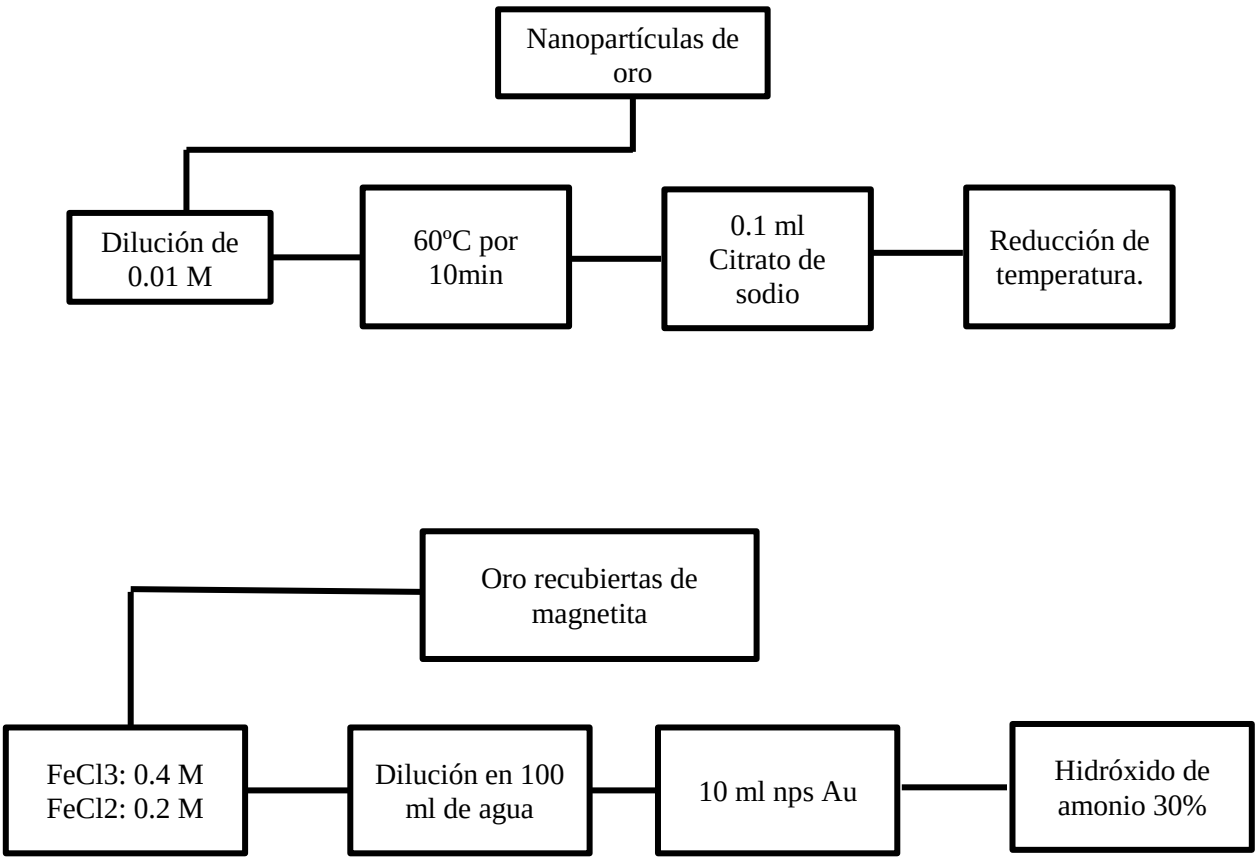

Figura 11. Síntesis de nanopartículas de oro recubiertas con magnetita.

Figura 12. Recubrimiento de magnetita por oro.

10.6 CULTIVOS CELULARES

10.6.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS HELA

Provienen de tejido de cérvix, son células epiteliales por lo que tienen morfología epitelial, la enfermedad que las caracteriza es el adenocarcinoma. En cuanto al cariotipo, el 98% de éstas células contienen un pequeño cromosoma telocéntrico y se observa aneuploidia. Expresan genes de lisofosfatidilcolina que induce actividad en AP-1 y en JNK (jun N-terminal cinasa) por una proteína cinasa C. Las células son positivas para queratina (ATCC, 2017).

10.6.2 Características de las células SiHa

Provienen de tejido de cérvix, células epiteliales por lo que tienen morfología epitelial, la enfermedad que las caracteriza es el carcinoma de células escamosas grado II. En cuanto al cariotipo, es una línea celular hipertriploide con el cromosoma número 71. Expresa los oncogenes p53 + y pRB+.Es una línea tumorigénica (ATCC, 2017).

10.6.3 Características de las células HaCaT

Derivan de tejido de prepucio de humanos, son células de tipo queratinocíticas. Tienen apariencia de adoquín, las células son redondas y no planas, muestran un índice alto mitótico. Cuando están en un 80 % de confluencia, las células se asocian en colonias. No se asocian con alguna enfermedad (ATCC, 2017).

10.6.4 Características de las células MDA-MB-231

Células humanas que derivan de tejido mamario de una zona metastática por lo que es tejido de tipo epitelial. La enfermedad que expresan es adenocarcinoma. El cariotipo de ésta línea celular es de una hembra aneuploide. Expresa receptores para factor de crecimiento (EGF) y factor de crecimiento transformado (TGF alpha). También, expresan el oncogén WNT7B y son células tumorigénicas (ATCC, 2017).

10.6.5 Técnicas de descongelación y cultivo en células HeLa

Los siguientes ensayos con células HeLa fueron realizados como prueba piloto para aprender las técnicas necesarias del cultivo celular para posteriormente realizar las pruebas de citotoxicidad en células SiHa y HaCat.

Se utilizaron células HeLa ya que su proliferación es relativamente rápida.

10.6.5.1 Descongelación

Antes de empezar, el material fue preparado, para esto se utilizó como medio DMEM y suero fetal bovino los cuales fueron colocados a baño maría para que su temperatura fuera de 37 ºC (Temperatura a la cual se encuentran las células en la incubadora) esto, para no causar shock térmico al momento de agregarlo a las células.

El cultivo de las líneas celulares se realizó en una campana de flujo laminar bioseguridad tipo II. Antes de empezar, el interior de la campana se limpió con etanol absoluto y se prendió la lámpara de luz UV por 20-30 min, dejando encendido el flujo de aire estéril.

Todo el material como contenedores de puntas, medios, pipetas antes de colocarlas dentro de la campana fueron rociadas y limpiadas con etanol para evitar contaminación en la campana. También, fue requerido el uso de guantes (rociados con etanol cada que fueran expuestos al exterior de la campana) y el mantener la puerta cerrada para evitar corrientes de aire que de igual forma contaminaran nuestro medio de cultivo.

Las células se descongelaron a temperatura ambiente antes de utilizarlas. Las células que se ocuparon se encontraban congeladas con medio DMEM con DMSO al 10 %, como el DMSO es tóxico para las células, el tubo eppendorf (2ml) con las células después de descongelarse, se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos para desechar el DMSO usando una micropipeta de 500 µl.

A la “pastilla” o “pellet” con las células se resuspendieron con 500 µl de medio DMEM y por pipeteo suave usando la micropipeta, se tomaron 20 µl para realizar un conteo celular con el uso de una cámara de Neubauer. Se contaron por cuadrantes y finalmente se obtuvo la cantidad de células por mililitro.

Este cálculo se realiza de la siguiente manera:

La cámara de Neubauer está compuesta por dos cuadrantes que a su vez cada cuadrante tiene cuatro cuadrantes más pequeños y cada uno de esos cuatro cuadrantes tiene cinco cuadrantes más (Figura 13)

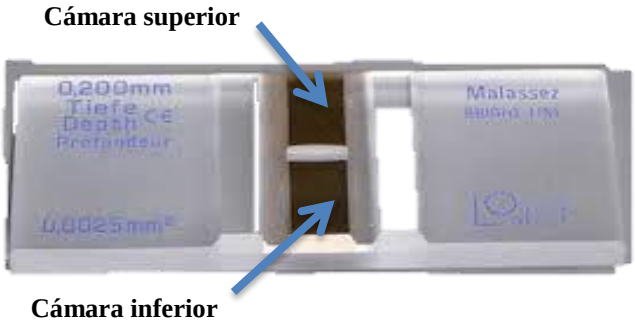

Figura 13. Cámara de Neubauer.

De los 20µl que se tomaron de la muestra, se colocan 10µl en uno de los dos cuadrantes de la cámara de Neubauer (se pueden ocupar los otros 10µl para el segundo cuadrante si se presiente de un mal conteo, comúnmente con el conteo de un solo cuadrante basta, figura 14).

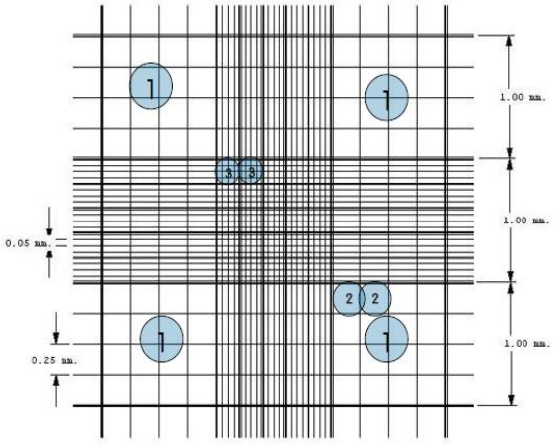

Figura 14. Cuadrantes en cámara de Neubauer.

Se cuentan todas las células que se encuentren en cada uno de los cuatro cuadrantes y posteriormente se utiliza la siguiente fórmula:

a)

$$\frac{Número\ total\ de\ células}{Número\ de\ cuadrantes\ contados\ (Ej.4)} = X$$

b)

$$X * 10,000 = Número\ de\ células\ en\ 1\ ml$$

*Nota: Si se hacen diluciones se debe hacer la conversión de 1ml a la cantidad de diluciones que se hicieron.

Las células restantes fueron adicionadas a una botella T-25 a la cual previamente se le habían colocado 500 µl de suero fetal bovino más 5 ml de medio DMEM y fue colocada dentro de la incubadora con dióxido de carbono al 5 % y a una temperatura de 37 ºC.

Las células fueron observadas al microscopio con objetivo 10 X para verificar que no se encontraran en una cantidad excesiva (Figura 15).

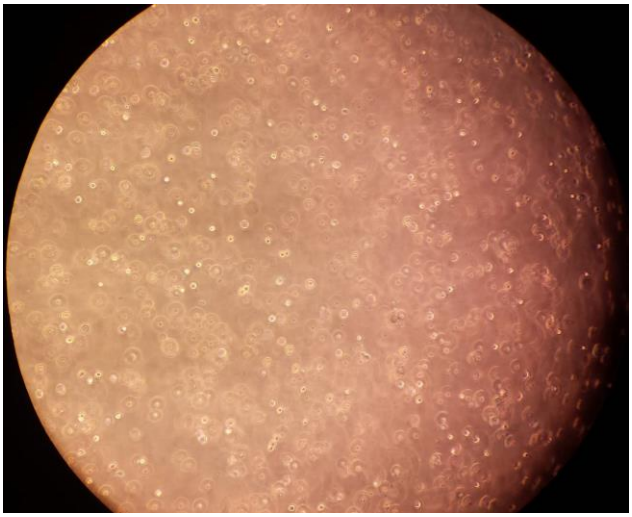

Figura 15. Células HeLa descongeladas (70% de confluencia).

10.6.5.2 Cambio de medio

Tres días después se realizó el cambio de medio ya que había cambiado su tonalidad rosa a naranja esto puede ser debido a contaminación (la cual no se evidenció en éste ensayo) o una alta confluencia celular (más del 90 % de confluencia) en donde las células comienzan a morir y a segregar proteínas o toxinas que acidifican el medio. Para el cambio de medio únicamente fue necesario desechar el mismo en el que se encuentran las células, lavar con PBS y colocar 5 ml de medio DMEM más 500 µl de suero fetal bovino (SFB) con las condiciones anteriormente mencionadas dentro de la campana de flujo laminar (previamente desinfectada).

10.6.5.3 Tripsinización

Al cuarto día, las células mostraron un 90 – 100% de confluencia, por lo que fue necesario tripsinizarlas y diluir su número (Figura 16).

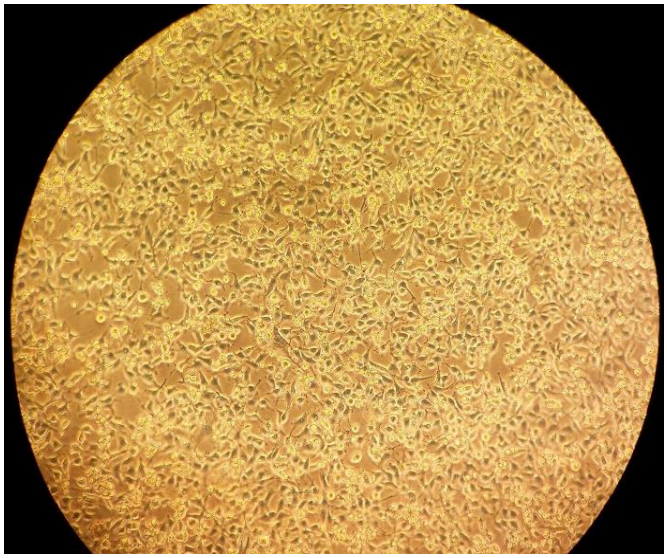

Figura 16. Confluencia en células HeLa (90%)

Este procedimiento se inició desechando el medio de la botella T-25 donde se encontraban las células. Luego, se agregó PBS (aproximadamente 4 ml, hasta que se cubriera todo el perímetro de la botella) con el fin de enjuagar el medio y eliminar desechos restantes que pudieron haber quedado.

Posteriormente, se agregaron 500 µl de tripsina con concentración 1X disuelta en PBS 1X en 1:10 de dilución (es importante mencionar que la cantidad de tripsina agregada es dependiente de la línea celular con la que se esté trabajando). Una vez que la tripsina fue agregada, se colocó la botella T-25 dentro de la incubadora por 5 min.

Después, se observó detenidamente si ya se habían despegado las células. De no ser así, la superficie de la botella T-25 se observa opaca y blanquecina. Para no desechar las células y recuperar la mayor cantidad posible se agrega un poco más de tripsina. En caso de no lograr un mayor desprendimiento de las células, se le dan unos leves golpes a la botella T-25 en las orillas con la mano para favorecer el desprendimiento de las células.

En este caso, los procedimientos anteriores no fueron necesarios ya que la tripsina surgió efecto en las células rápidamente y después de eso se añadieron en proporción 1:1 a la tripsina 500 µl de medio DMEM para inhibir la acción de la misma. Se tomó el medio con la tripsina y se agregó a un tubo eppendorf que posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 2500 rpm, se retiró el sobrenandante por decantación y se agregó 1 ml de medio DMEM.

De esa suspensión se tomaron 150 µl para cultivar células en una nueva botella T-25 con el medio necesario para su crecimiento y el resto fue congelado con DMSO a una concentración final de 10 %.

10.6.5.4 Congelación

La congelación con DMSO fue llevada a cabo primero centrifugando el tubo conteniendo las células, se desechó el sobrenadante, se agregaron 9 µl de medio y se resuspendieron las células. Esa solución fue pasada a un tubo de congelación en donde se agregó 1µl de DMSO concentrado y estéril, esto con una relación 1:9 (Concentración final de DMSO 10 %). Finalmente, el tubo de congelación se colocó inmediatamente dentro del ultracongelador (-80ºC), rotulado con fecha, nombre y componentes con los que se congeló.

10.6.6 ENSAYO DE CLONOGENICIDAD

Se llevó a cabo para conocer y adquirir las habilidades necesarias para después aplicarlo con las líneas celulares con las que finalmente se iban a trabajar. Primero, fue necesario realizar una tripsinización de las células que anteriormente se habían dejado en la botella T25.

En un tubo falcon se colocaron 15 ml de medio DMEM. También, se utilizó una microplaca de 12 pozos (A=3.8cm^2 x D= 22.1 mm), esta placa cabe mencionar que se ocupó debido a que sólo era para aprender la técnica ya que posteriormente se utilizaron microplacas de 24 pozos (A= 1.9cm^2 x D= 15.6 mm).

Se llevó el conteo de las células HeLa por medio de una cámara de Neubauer, después de realizar los cálculos se definió que en cada pozo se sembrarían aproximadamente 499.88 células por pozo, para esto se colocaron 16.85 µl de células HeLa en los 15 ml de medio DMEM c/ SFB (10 %) que se encontraba en el tubo falcon.

Finalmente, una vez agregado todo lo anterior se prosiguió a colocar un volumen de 1 ml en cada pozo de la solución final de medio DMEM + SFB + Células HeLa.

La placa se incubó por 3 días, al segundo día fue necesario cambiar medio de la placa para mantener el crecimiento de las líneas células.

Al tercer día, se fijaron y se tiñeron con cristal violeta.

10.6.6.1 Fijación y tinción con cristal violeta

La fijación con cristal violeta se realizó cuando se tuvo un 80 % de confluencia. También, es de suma importancia mencionar que para esto no son necesarias las condiciones de esterilidad.

El primer paso fue eliminar el medio de cultivo de cada pozo y después agregar PBS 1X, para asegurarse de haber quitado residuos y se desecha nuevamente el PBS.

Posteriormente se agregaron 300 µl de una solución de fijación, (ácido acético al 10 %, metanol 10 %, H_2O 80%), después de 10 minutos se enjuagó con agua destilada, y eliminando cualquier exceso de líquido, se procedió a teñir con 500 µl de una solución de cristal violeta (cristal violeta 0.2 %, etanol 20 % y agua 80 %). Se dejó el colorante durante 10 minutos. Para finalizar se retiró el cristal violeta (éste se puede reutilizar una vez más, de lo contrario se deshecha en el lugar correspondiente). Posteriormente, cada pozo fue lavado múltiples veces (aproximadamente 3 veces) con agua destilada para asegurar haber removido por completo el exceso de colorante. La placa se deja secar y se resguarda en un lugar seco y obscuro hasta su análisis.

10.7 ENSAYO DE CLONOGENICIDAD SIHA

Se descongelaron células SiHa que se encontraban en el ultracongelador y fueron sembradas en una botella T25 (que contenía 5ml de una solución compuesta por medio DMEM estéril, SFB en relación 10 % y penicilina a una concentración de 10 µg/mL). Se dejaron en la incubadora con 5 % de CO_2 a 37 °C por 3 días aproximadamente, hasta que alcanzaran un 80 – 90 % de confluencia para que pudieran ser tripsinizadas. Durante ese lapso de tiempo fue necesario lavarlas con PBS y cambiar medio una vez.

Cuando fueron tripsinizadas se realizó un conteo en la cámara de Neubauer para saber cuántas células se tenían en un mililitro y así del total, tomar las células necesarias para sembrar 5,000 células en cada pozo.

Se sembraron dos placas de 24 pozos cada una. Se dejaron en la incubadora por 24 hrs y al día siguiente se siguió el siguiente protocolo de tratamiento como se indica en la Figura 17 con un volumen final de 500 µl, usando una concentración de nanopartículas de 1 mg/mL es decir, se pesó 1 mg de nanopartículas y a eso se le añadió 1 ml de medio.

24 horas después de haberles colocado el tratamiento, éste fue retirado y posteriormente se añadieron 500 µl de medio DMEM (con SFB al 10 %) (Figura 17).

Las placas se incubaron nuevamente hasta que hubiera una confluencia del 80 % para que pudieran ser fijadas y teñidas con cristal violeta para después medir la absorbancia de cada pozo a 560 nm.

Se realizó el mismo experimento 2 veces más para obtener resultados por triplicado y validar el protocolo elaborado.

Es importante mencionar que en el primer experimento se observó que con el número de células (5,000) sembradas inicialmente no se logró tener una gran confluencia, por lo que las 2 veces siguientes se propuso sembrar el doble de células (10,000 células) en cada pozo.

10.8 ENSAYO DE CLONOGENICIDAD HACAT

Se sembraron placas multipozos tal como se hizo en las células SiHa (Figura 17). Al igual que como pasó con las células SiHa, fue necesario para el segundo y tercer experimento incrementar el número de células sembradas ya que 5,000 células por pozo resultaron ser pocas y fueron incrementadas al doble (10,000 células por pozo).

10.9 ENSAYO DE CLONOGENICIDAD MDA-MB-231

Para este ensayo se siguió el mismo procedimiento de sembrado que con las células SiHa y HaCaT. El único cambio que se observó es que estas células crecen más rápido en comparación con las otras líneas celulares por lo que al contrario que en las anteriores aquí se propuso sembrar menos células (de 5,000 células a 3,000). Y al igual que en las otras dos líneas celulares se realizaron 2 experimentos más para tener el ensayo por triplicado y validarlo estadísticamente.

10.10 LECTURAS DE PLACA CON CRISTAL VIOLETA

Cada placa de cada experimento después de ser fijada y teñida con cristal violeta se dejó secar por 3 días aproximadamente y después a cada pozo se le añadió 100 µL de ácido acético al 30 % dependiendo de la cantidad de células que se podían percibir teñidas a simple vista (la cantidad que se puede añadir de ácido acético 30 % es de 100 a 300 µl aproximadamente). Después de dejarlo en reposo 5 minutos, se colocaron 100 µl de cada muestra en una placa de 96 pozos para medir la absorbancia. Una mayor absorbancia indica una mayor cantidad de células presentes en el pozo mientras que una menor absorbancia indica menos cantidad de las mismas (Figuras 18 y 19).

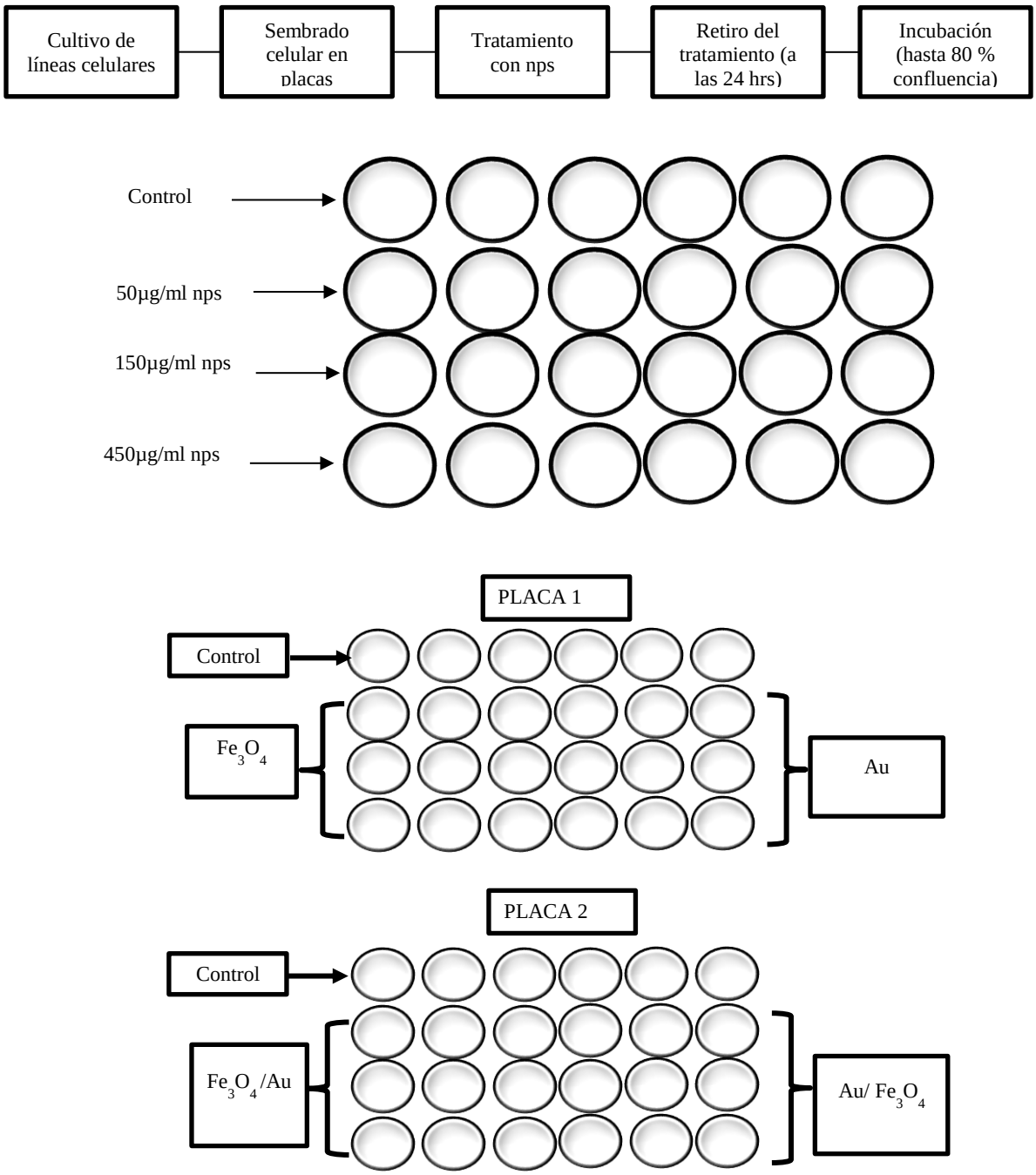

Figura 17. Distribución del sembrado de placas para ensayo de clonogenicidad mostrando cantidad de tratamiento colocado en cada pozo.

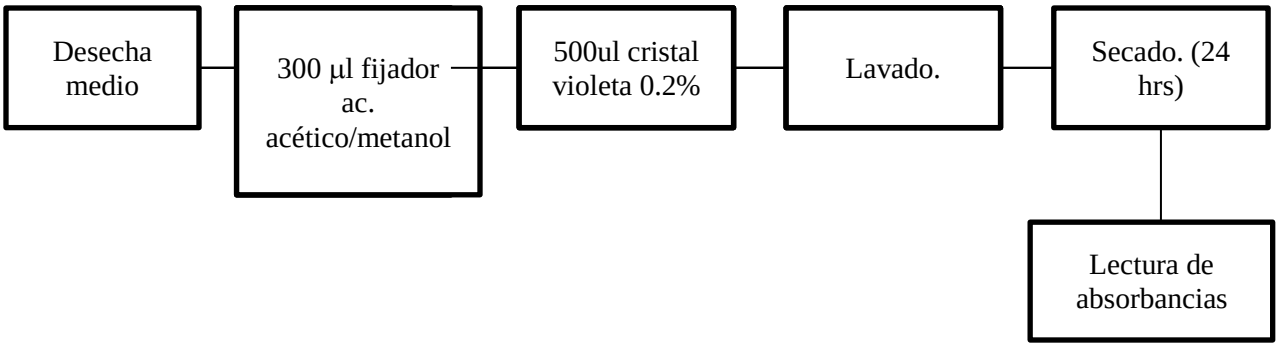

Figura 18. Cristal violeta.

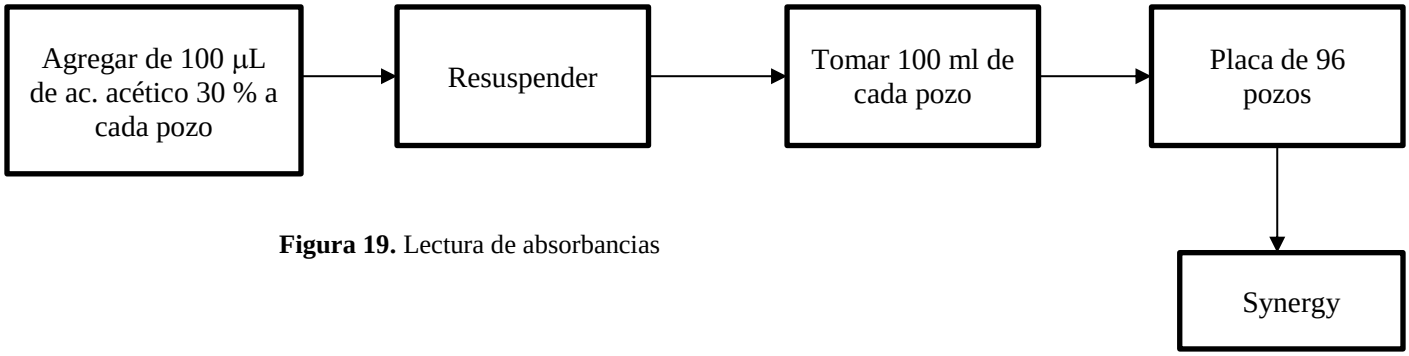

Figura 19. Lectura de absorbancias

10.11 IRRADIACIÓN

Se montó un sistema para evaluar la viabilidad y/o muerte celular de las líneas celulares SiHa, HaCaT y MDA-MB-231 después de ser irradiadas con luz infrarroja previamente adicionadas con una concentración subletal de nanopartículas Au/Fe3O4, Fe3O4/Au, Fe3O4, y Au.

El primer paso fue el cultivo celular de las líneas SiHa, HaCaT y MDA-MB-231 como se mencionó anteriormente y una vez que estuvieron listas para tripsinizar, se sembraron 4 placas de 24 pozos cada una para cada tipo de línea celular.

Se diseñó el experimento de modo que se pudieran explorar tres variables:

- Distancia
- Tiempo
- Temperatura

Por lo que la utilización de las cuatro placas fue la siguiente (Figura 20):

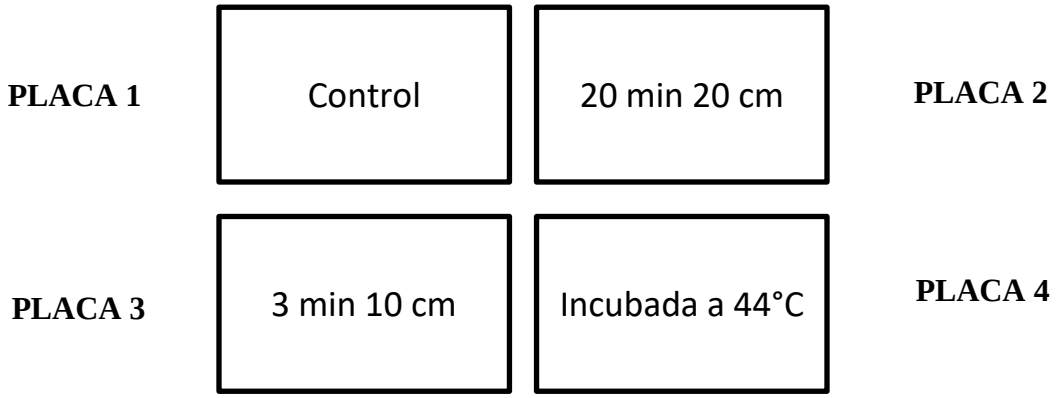

Figura 20. Placas para evaluación de nanopartículas con irradiación infrarroja.

El sembrado se realizó siguiendo el protocolo del ensayo de evaluación de la citotoxicidad de las nanopartículas sembrando 10,000 células por pozo para cada línea celular. Se incubaron por 24 horas, al otro día se les colocó el tratamiento con NPs y 24 horas después se irradiaron a diferentes tiempos. Luego de irradiarlas se dejaron en incubación hasta que los controles llegaran a un 80 % de confluencia para después realizar la tinción con cristal violeta y medir la absorbancia de cada pozo.

El orden de tratamiento fue aleatorio, esto para disminuir errores posicionales. Se decidió evaluar dos concentraciones de 15 µg/ml y 150 µg/ml de cada NP y la distribución en los pozos fue la siguiente (Figura 21).

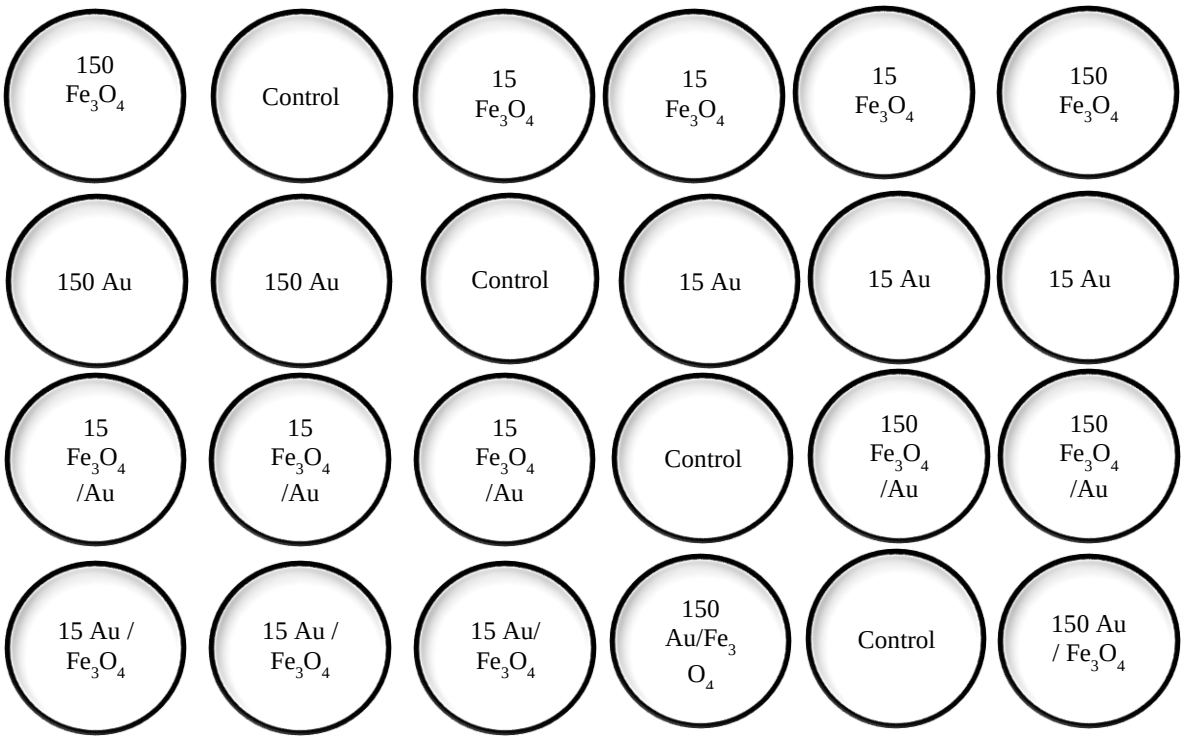

Figura 21. Distribución de pozos para evaluar nanopartículas al ser irradiadas.

Para diseñar el sistema de radiación se siguió la metodología propuesta por Hernández (2015). Se montó un foco de luz infrarroja de 150 W en un soporte universal sujetado por una pinza de tres dedos, fue necesario utilizar un socket y una extensión para conectar el foco dentro de la campana luminar bioseguridad tipo II. Se utilizó una base de unicel para simular las condiciones en las que se encontrarían las células cancerosas normalmente, esto a una temperatura estable de 37 ºC por lo que se colocó agua a 37 ºC (temperatura monitoreada por un termómetro de mercurio) sobre una base de unicel y sobre ésta la placa multipozos durante todo el procedimiento. En todos los experimentos la temperatura de cada pozo se monitoreó cada minuto al momento de irradiarse la placa mediante un pirómetro (termómetro de infrarrojos digital con láser marca Fluke). Y, se ocupó una caja que cubriera el foco de infrarrojo de tal forma que la radiación fuera dirigida únicamente a la placa como se muestra en la Figura 22.

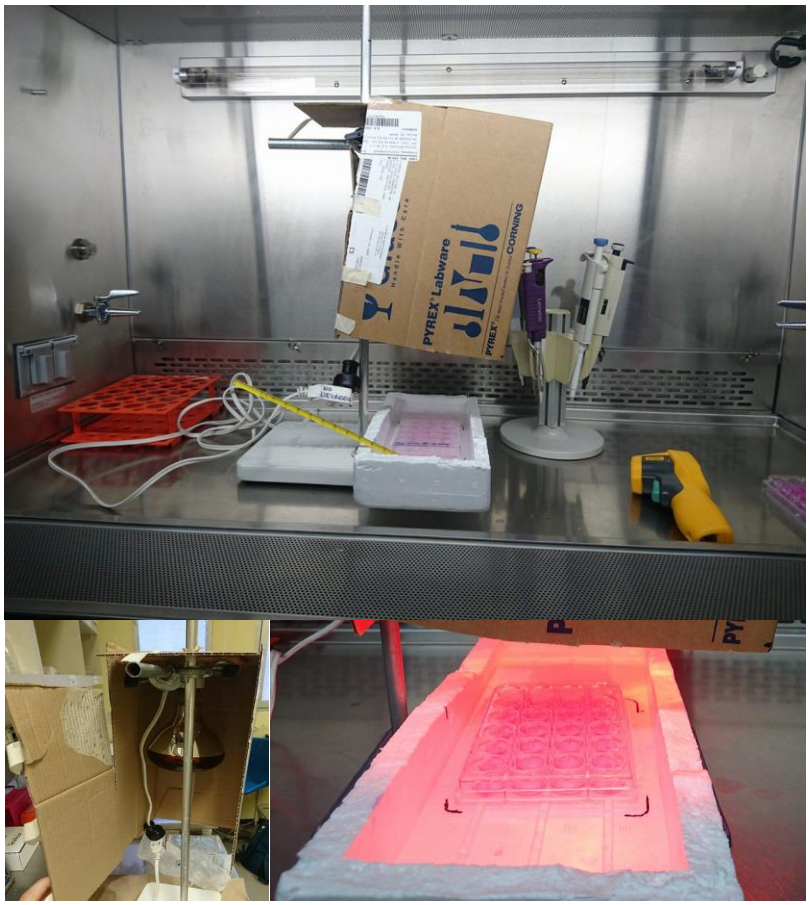

Figura 22. Sistema de irradiación de nanopartículas

Cabe mencionar que todos los instrumentos fueron esterilizados previamente a su utilización y colocados dentro de dicha campana primero rociándolos y limpiándolos con etanol absoluto para posteriormente dejarlos bajo luz ultravioleta por 30 minutos.

La primera placa sirvió como placa control por lo que esa simplemente se dejó en incubación a 37ºC y 5% CO_2 hasta que las células alcanzaron un 80% de confluencia.

La segunda placa se irradió por veinte minutos a veinte centímetros de distancia. La distancia de veinte centímetros fue de la base del foco infrarrojo hasta la base de la placa multipozos. La temperatura fue tomada en cada pozo por minuto hasta alcanzar los veinte minutos de irradiación.

La tercera placa se irradió por tres minutos esta vez a diez centímetros de distancia. Inicialmente se había propuesto irradiar la placa a diez centímetros de distancia por cinco minutos, pero se decidió parar la irradiación a los tres minutos ya que algunos pozos alcanzaron una temperatura hasta de 50ºC y se quiso evitar que las células murieran a causa de un shock térmico.

La cuarta placa se incubó a 44ºC por 20 minutos (sin 5% de CO_2) para probar que la luz infrarroja realmente tiene un efecto sobre las nanopartículas y no es simplemente causa del aumento de temperatura.

Esto se realizó para las líneas celulares SiHa y MDA-MB-231. Para HaCaT sólo se realizaron dos placas, una placa que fue irradiada veinte minutos a veinte centímetros y otra irradiada tres minutos a diez centímetros.

Después de haber sido irradiadas todas las placas se dejaron en incubación a 37ºC con 5% de CO_2 hasta que las placas controles alcanzaron un 80% de confluencia. Luego, se tiñeron todas las placas con cristal violeta y se midió la absorbancia de cada pozo (Figuras 18 y 19).