

¿En qué medida puede la Terapia  
Fototérmica Plasmónica eliminar células  
tumoraes minimizando los daños colaterales  
sobre células sanas?

---

Monografía de Física  
Bachillerato Internacional  
Premi Osona Contra el Càncer 2017

**Número de palabras:** 3.982

**Pseudónimo:** Roronoa Zoro

## Resumen

La Terapia Fototérmica Plasmónica (PPTT) es un tratamiento del cáncer en pleno desarrollo basado en la introducción de nanopartículas metálicas en células cancerígenas y en la posterior iluminación del tumor mediante luz que sea absorbida por las nanopartículas pero no por el tejido celular. Al absorber la luz irradiada, las nanopartículas se calientan e inducen a la muerte celular pacífica de la célula tumoral que las alberga.

En la monografía se ha investigado si la PPTT es capaz de eliminar células tumorales sin causar daños sobre células sanas. En primer lugar se ha seleccionado un láser adecuado para la terapia, y entonces se han sintetizado ocho muestras de nanopartículas de oro y se ha estudiado qué muestra alcanza una mayor temperatura al ser iluminada mediante la luz del láser. Para acabar, se han introducido nanopartículas óptimas en una muestra de células tumorales y se ha comprobado que su calentamiento al ser iluminadas por el láser es mucho mayor que el de una muestra de células convencionales en las mismas condiciones.

## Agradecimientos

Antes de proceder con la monografía, me gustaría agradecer el apoyo de todas las personas que han permitido y fomentado su realización, ya que sin ellos muy difícilmente hubiera podido estudiar un tema tan actual en la investigación científica.

En primer lugar doy las gracias al tutor de esta monografía por su supervisión a lo largo de la realización del trabajo. Tutorizar una monografía sobre un tema que difiere tanto del temario de clase no es tarea fácil, por lo que es necesario destacar su gran motivación y apoyo.

También me gustaría agradecer a Federica Beduini y Marta García-Matos que me hayan abierto las puertas del Instituto de Ciencias Fotónicas (ICFO), el centro donde se han llevado a cabo los experimentos presentes en esta monografía. Del mismo modo agradezco a Ignacio de Miguel Clave, miembro del grupo de investigación *Plasmon Nano-Optics Group*, su guía durante el proceso de nanofabricación en el laboratorio, y a Jordi Morales Dalmau, miembro del mismo equipo, su asesoramiento en la realización de experimentos que de otro modo no hubieran podido tener lugar, ya sea por el material o por las habilidades de laboratorio que requieren.

Para acabar, agradezco a mi familia el apoyo ofrecido durante todo el proceso de investigación y en un momento tan importante de mi vida como lo es la etapa preuniversitaria.

# Índice

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
1.1	Tema y objetivos de la monografía . . . . .	1
1.2	¿Qué es el cáncer? . . . . .	1
1.3	Terapia Fototérmica Plasmónica (PPTT) . . . . .	2
<b>2</b>	<b>Selección del láser adecuado para el tratamiento</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Selección del tipo óptimo de nanopartículas</b>	<b>4</b>
3.1	Resonancia Plasmónica de Superficie (RPS) . . . . .	4
3.2	Síntesis de distintas muestras de nanopartículas de oro . . . . .	5
3.3	Introducción a la espectrofotometría de absorción . . . . .	5
3.4	Estudio de la absorbancia de nanopartículas de oro . . . . .	6
3.5	Calentamiento de algunas muestras de nanopartículas . . . . .	8
<b>4</b>	<b>Termoablación de células tumorales <i>in vitro</i></b>	<b>10</b>
4.1	Inserción de nanopartículas de oro en células tumorales . . . . .	10
4.2	Calentamiento de células tumorales <i>in vitro</i> . . . . .	11
<b>5</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>12</b>
<b>6</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>14</b>
6.1	Referencias bibliográficas . . . . .	14
6.2	Libros de texto consultados . . . . .	14
6.3	Fuentes figuras . . . . .	14
6.4	Webgrafía . . . . .	15
<b>7</b>	<b>Apéndices</b>	<b>16</b>
7.1	Síntesis de nanopartículas de oro . . . . .	16

# 1 Introducción

## 1.1 Tema y objetivos de la monografía

Desde niño he sabido que el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Lo que más me llama la atención de esta enfermedad, y me da pie a iniciar esta investigación, son los perjuicios que suponen para el cuerpo humano los tratamientos que se aplican actualmente a los pacientes, como la quimioterapia o la radioterapia, ya que aunque eliminan las células tumorales producen daños irreparables en los tejidos sanos. La siguiente monografía se centra en el estudio de la Terapia Fototérmica Plasmónica, del inglés *Plasmonic Photothermal Therapy* (PPTT), un tratamiento en pleno desarrollo que aprovecha la gran absorción de luz por parte de nanopartículas metálicas para eliminar tumores. La decisión de basar mi monografía en este tratamiento fue tomada cuando supe que podría realizar parte de mi trabajo en las instalaciones del Instituto de Ciencias Fotónicas (ICFO) gracias al programa BIYSC destinado a jóvenes científicos. Llevando a cabo esta investigación podría obtener respuestas a mi curiosidad científica y aspirar a hacer una pequeña contribución a la cura de esta enfermedad. Pese a ser de carácter interdisciplinar, la PPTT se basa fundamentalmente en la Física; este tema también me atrae porque me permite ver cómo mi ciencia favorita se aplica a fines biomédicos que algún día llegarán a beneficiarnos a todos.

Con esta monografía pretendo dar respuesta a la pregunta: ¿en qué medida puede la Terapia Fototérmica Plasmónica eliminar células tumorales minimizando los daños sobre células sanas? Para alcanzar una respuesta, antes habrá que averiguar cuestiones como qué tipo de láser y de nanopartículas metálicas son los óptimos para poner en práctica esta técnica *in vivo*. Posteriormente se pondrá en práctica la termoablación de células tumorales *in vitro* para sacar conclusiones sobre la invasividad de la terapia, respondiendo así a la pregunta de investigación. De todos modos, el hecho de que este sea un campo tan virgen implicará la extracción de unas conclusiones parciales y abiertas a una futura ampliación.

## 1.2 ¿Qué es el cáncer?

Toda célula realiza su propio ciclo celular. Este empieza con el nacimiento de la célula, sigue con su crecimiento y la realización de funciones vitales y termina con la fase de división, en que da lugar a nuevas células. En esta última fase, la célula debe replicar su ADN para transmitirlo a su sucesora; un error en este proceso supone una mutación, una modificación de la información genética del individuo, que puede originar una célula cancerígena. Es posible que dicha célula muera antes de reproducirse, o bien que se reproduzca extendiendo así el cáncer por el tejido en cuestión. Así pues, el cáncer engloba un conjunto de enfermedades que se originan a raíz de una mutación y que se caracterizan por el desarrollo de células anormales que se dividen de forma descontrolada originando tumores.

### 1.3 Terapia Fototérmica Plasmónica (PPTT)

La PPTT se basa fundamentalmente en la transformación de energía lumínica en energía térmica, de aquí el atributo "Fototérmica". A nivel general, la terapia consiste en insertar nanopartículas metálicas en cada célula cancerígena para después irradiar luz transparente a nuestros tejidos que sea absorbida en gran medida por las nanopartículas. Si se lleva a cabo una buena síntesis de nanopartículas, estas suben fácilmente de temperatura y calientan la célula cancerígena que las envuelve, provocando así su muerte. En función del calor proporcionado, las células morirán por apoptosis o por necrosis. Si alcanzan una temperatura menor de 50 °C morirán por apoptosis, es decir, se activará un mecanismo intracelular que programa la muerte pacífica de las células, sin dañar al resto del tejido. En cambio, si la célula alcanza temperaturas extremas morirá por necrosis, una muerte celular muy violenta que induce a respuestas inflamatorias y produce daños irreparables en las células que la rodean.

Existen diversas variantes de la Terapia Fototérmica Plasmónica, que dependen de los fines perseguidos. Algunos investigadores optan por inducir a una muerte celular por necrosis<sup>[1]</sup>, ya que permite asegurar una eliminación completa de las células tumorales. Otros, por ejemplo, optan por aprovechar las propiedades de las nanopartículas de plata para tratar el cáncer de ovarios<sup>[2]</sup>. Como el objetivo de esta investigación es minimizar los daños sobre las células sanas del tejido se optará por inducir a una muerte celular por apoptosis, dada su naturaleza pacífica. Además, los materiales utilizados deberán tener una citotoxicidad<sup>1</sup> mínima. La citotoxicidad del oro está siendo investigada por equipos profesionales de Nanotoxicología, y algunos resultados sugieren que depende de parámetros como el tamaño de las nanopartículas introducidas en el cuerpo<sup>[3]</sup>. Todavía no se ha alcanzado una respuesta definitiva, pero se cree que el oro es un material biocompatible y que sus daños asociados son mucho menores que los provocados por otras terapias del cáncer. Por este motivo, se utilizarán nanopartículas de oro (AuNPs) en la terapia: se sintetizarán nanopartículas de distintas formas para después elegir la óptima para un tratamiento no invasivo.

Durante el tratamiento las AuNPs deben introducirse exclusivamente en las células tumorales, ya que de lo contrario las células sanas también serían eliminadas. Para ello debe adherirse a cada nanopartícula la molécula orgánica cRGD, que es atraída por las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , una clase de proteína contenida en todas las células pero que es sobreexpresada por las cancerígenas. Así pues, el cRGD se adhiere a las nanopartículas y, atraídas por las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ , penetran la membrana de las células tumorales<sup>[4]</sup>.

---

<sup>1</sup>La citotoxicidad es la propiedad de ser nocivo a nivel celular.

## 2 Selección del láser adecuado para el tratamiento

En esta sección se escogerá un láser para la puesta en práctica de la terapia, y posteriormente se sintetizarán AuNPs que se calienten al recibir su luz. La mejor opción será elegir un láser cuya luz sea transparente a los tejidos, ya que gracias al carácter selectivo de las nanopartículas y a su absorción de la luz del láser las células tumorales podrán ser eliminadas de todos modos.

El diagrama que compara la absorción de radiación electromagnética de distintas longitudes de onda por parte de una muestra se denomina espectro de absorbancia. La Figura 1 muestra el espectro de absorbancia aproximado en el rango visible-infrarrojo de los principales componentes de los tejidos del cuerpo humano, publicado en el sitio web de un centro especializado en medicina.

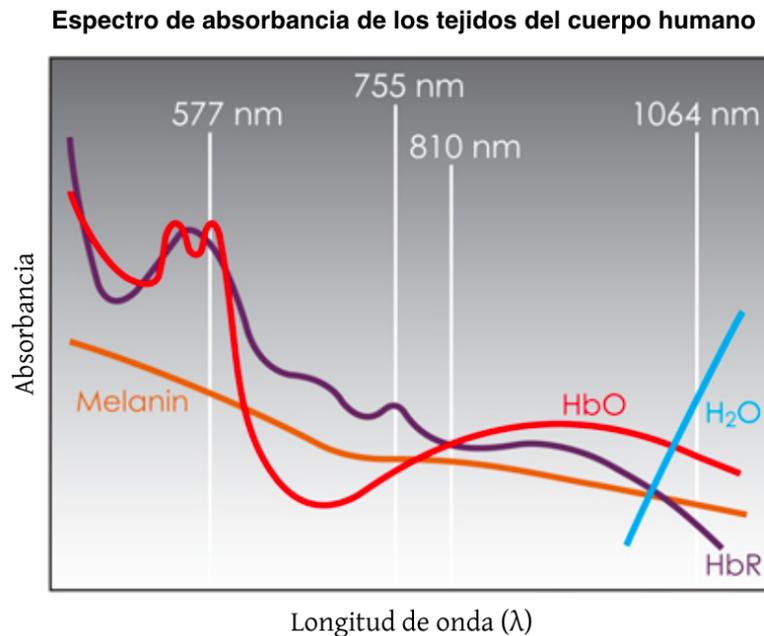


Figura 1: Espectro de absorbancia de los tejidos del cuerpo humano. Fuente: Lasers & Health Academy, *Lasers in medicine*.

Como puede observarse en la Figura 1, en general, a mayor longitud de onda menor absorción por parte de los tejidos, aunque sobre los 1.000 nm el agua empieza a absorber mucha luz. Por lo tanto, se puede fijar una ventana óptica en el intervalo de los 755-1.064 nm, llamada *Near-Infrared Optical Window*, donde la absorción de luz por parte de los tejidos es mínima. Teniendo en cuenta la ventana óptica y la disponibilidad de los laboratorios del ICFO, se utilizará un láser emisor de luz infrarroja de  $\lambda=810$  nm. De todos modos, en la Figura 1 puede distinguirse que los tejidos no son completamente transparentes a la luz láser: esto implicará que las células sanas sufrirán un pequeño aumento de temperatura, aunque los daños provocados serán mínimos.

### 3 Selección del tipo óptimo de nanopartículas

#### 3.1 Resonancia Plasmónica de Superficie (RPS)

La PPTT se denomina “Plasmónica” en referencia a la Resonancia Plasmónica de Superficie (RPS), el fenómeno físico que explica el gran calentamiento de las nanopartículas metálicas cuando son iluminadas mediante luz de cierta longitud de onda.

La estructura de las nanopartículas metálicas consiste en una red cristalina de cationes y una nube de electrones deslocalizados. Cuando se irradia luz de cierta longitud de onda, su campo eléctrico oscilante induce a la oscilación coherente de los electrones deslocalizados de la nanopartícula metálica<sup>[5]</sup>, como se ilustra en la Figura 2. Mientras los electrones oscilan en grupo a lo largo de la nanopartícula, chocan contra los cationes produciendo calor, lo que se conoce como Efecto Joule. Así, la energía de la luz se transforma en energía cinética y en calor, lo que permite el posterior calentamiento de la célula tumoral que alberga las nanopartículas.

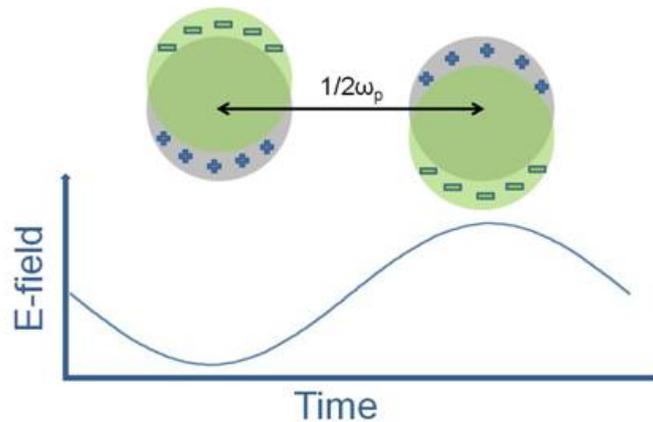


Figura 2: Diagrama de la oscilación de los electrones a causa del campo eléctrico de la luz. Fuente: Clean Energy Institute U. of Washington, *Gold Nanoparticles – Surface Plasmon Resonance*.

La Resonancia Plasmónica de Superficie es un acoplamiento entre la frecuencia de oscilación del campo eléctrico de la radiación y la del desplazamiento de los electrones a través de la nanopartícula, que provoca una gran absorción de luz. Por lo tanto, que se produzca la RPS depende de la distancia recorrida por los electrones, es decir, de la forma de la nanopartícula o *aspect ratio*<sup>2</sup>: nanopartículas de distinta forma alcanzan la RPS al ser irradiadas por luz de distinta longitud de onda, y cada nanopartícula metálica alcanza la resonancia con luz de una única longitud de onda.

---

<sup>2</sup>En el caso de los nanocilindros, es la proporción diámetro-longitud

### 3.2 Síntesis de distintas muestras de nanopartículas de oro

Una vez escogido el láser que se va a utilizar, es necesario sintetizar AuNPs adecuadas para la terapia. Estas deberán alcanzar la RPS al recibir un haz de luz de  $\lambda = 810$  nm para inducir a las células tumorales a una muerte por apoptosis. Como la resonancia depende de la forma de la nanopartícula, se han sintetizado ocho muestras de AuNPs de distintos tamaños y formas, esferas, cilindros y prismas, para escoger las que presenten una mayor absorción de la luz del láser.

La metodología que se ha seguido para la síntesis de cada tipo de nanopartícula se explica detalladamente en el Apéndice 1. Tras acabar la síntesis las AuNPs quedan en disolución, como se muestra en la Figura 3, y pueden ser analizadas para determinar la muestra óptima para ser iluminada mediante el láser escogido.



Figura 3: Disolución de AuNPs, del grupo de nanoprismas sin  $\text{AgNO}_3$ . Realización: 18/07/16.

### 3.3 Introducción a la espectrofotometría de absorción

La espectrofotometría de absorción es la técnica que me permitirá determinar la muestra óptima de AuNPs para la terapia. Su objetivo es recoger datos sobre la absorción de luz de distintas longitudes de onda por parte de una muestra, y se llevará a cabo mediante un espectrofotómetro lector de placas facilitado por el ICFO. En su interior, un láser emite luz que pasa a través de la muestra contenida en una placa de pozos. Algunos fotones de la luz incidente son absorbidos por la muestra, una pequeña parte se pierde por dispersión en la solución y el resto se sigue desplazando en la dirección de propagación. Finalmente, el haz de luz es captado por un detector que mide su intensidad luminosa; el proceso se repite con luz de las longitudes de onda deseadas.

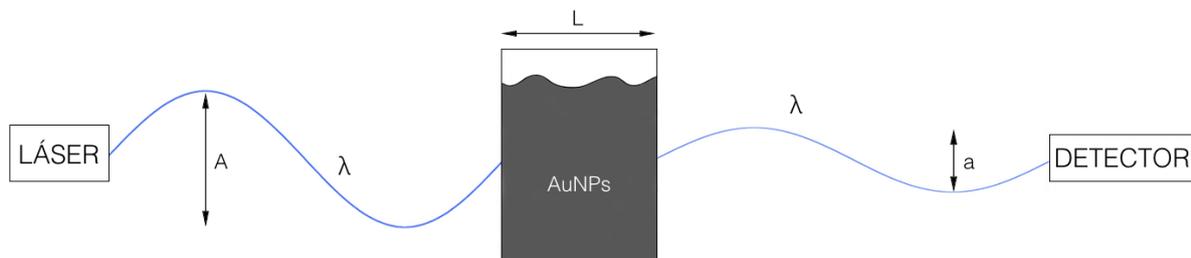


Figura 4: Diagrama simplificado de la espectrofotometría de absorción. Un haz de luz de longitud de onda  $\lambda$  atraviesa la disolución de AuNPs y es recogido por el detector. La muestra absorbe parte de la intensidad luminosa, por lo que la amplitud de la final es menor. Realización propia mediante *Pixelmator*.

Así pues, la espectrofotometría de absorción compara la intensidad luminosa emitida y la no absorbida por la muestra para obtener conclusiones sobre la absorbancia  $A$ , indicador de la tendencia de la muestra a absorber luz de cierta longitud de onda. La absorbancia se relaciona con la concentración de nanopartículas mediante la Ley de Beer-Lambert,

$$A = -\log\left(\frac{I_f}{I_0}\right) = \varepsilon cL \quad (1)$$

donde  $I_f$  es la intensidad luminosa que llega al detector e  $I_0$  la intensidad luminosa emitida por el láser. La Ley de Beer-Lambert relaciona la absorbancia con la extinción molar  $\varepsilon^3$ , la concentración de la muestra  $c$  y la longitud de la cubeta  $L$ .

Los datos referentes a la absorbancia de luz de distintas longitudes de onda por parte de la muestra recogidos por el espectrofotómetro pueden representarse gráficamente en un espectro de absorbancia. Seguidamente se analizarán los espectros de absorbancia de las ocho muestras de AuNPs sintetizadas, para determinar cuál es la más eficiente al ser iluminada mediante el láser emisor de luz de  $\lambda = 810$  nm.

### 3.4 Estudio de la absorbancia de nanopartículas de oro

Tras la síntesis las nanopartículas se encuentran en disolución<sup>4</sup> a una concentración suficiente como para que la luz que llegue al detector durante la espectrofotometría sea casi nula, lo que dificulta la toma de datos. Para evitar este problema se diluirán al 50% las respectivas disoluciones de AuNPs en agua desionizada MilliQ<sup>5</sup> para llevar a cabo la espectrofotometría de absorción. Por cada muestra sintetizada se introducirán 125  $\mu\text{l}$  de agua y 125  $\mu\text{l}$  de disolución de AuNPs en uno de los pozos de una placa mediante una pipeta de precisión micrométrica, como se ilustra en la Figura 5.



Figura 5: Preparación para la espectrofotometría de absorción. Realización: 19/07/16

Como sabemos que el agua absorbe luz en el rango infrarrojo (Figura 1), si se representara el espectro de absorbancia de una muestra de AuNPs disuelta al 50% podría identificarse un pico de absorbancia en el rango del infrarrojo a causa del agua. Para evitar dicho error, se estudiará paralelamente el espectro de absorbancia de 125  $\mu\text{l}$  de agua, y tras sustraer la absorbancia de los

<sup>3</sup>La extinción molar  $\varepsilon$  es una magnitud que define la capacidad de una muestra de absorber radiación electromagnética de cierta longitud de onda.

<sup>4</sup>Las nanopartículas de oro se encuentran disueltas en agua junto a otros compuestos residuales que no absorben luz del rango visible-infrarrojo, por lo que los restos de la síntesis no se tendrán en cuenta durante el estudio de la absorción de luz por parte de cada muestra.

<sup>5</sup>Agua con un alto grado de purificación, de la que se han eliminado las sales ionizadas.

125  $\mu\text{l}$  de agua a la de las disoluciones acuosas de AuNPs mediante un programa de cálculo<sup>6</sup>, se obtendrá finalmente el espectro de absorbancia de 125  $\mu\text{l}$  de cada muestra de nanopartículas.

Se ha configurado el espectrofotómetro para tomar datos de de longitudes de onda entre 400 nm y 990 nm. La incertidumbre de la absorbancia es de 0,001 unidades<sup>7</sup>, por lo que no se aprecia en el gráfico, y la incertidumbre de  $\lambda$  puede omitirse dada la gran precisión del espectrofotómetro.

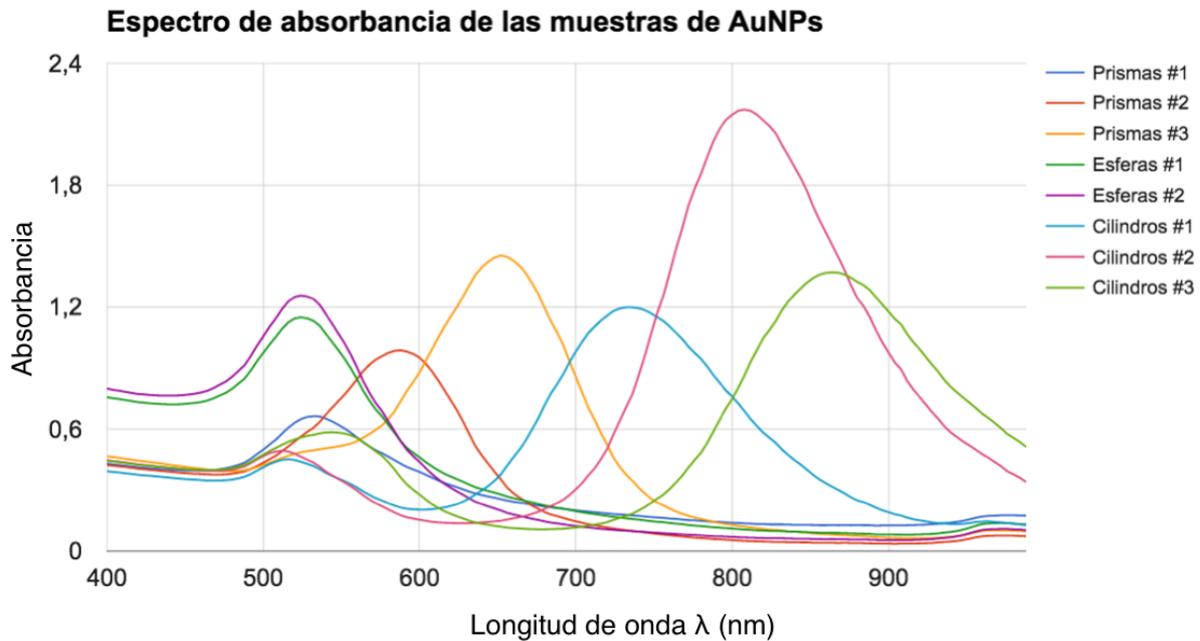


Figura 6: Espectro de absorción que contrasta la absorción de luz de longitudes de onda entre 400 nm y 990 nm por parte de las ocho muestras de AuNPs sintetizadas. Fuente: propia.

En el gráfico queda plasmado que la absorbancia de una muestra en función de la longitud de onda de la luz que la atraviesa sigue un modelo de distribución normal. La explicación de este fenómeno es que la síntesis ha sido imperfecta, y ha llevado a pequeñas variaciones en las dimensiones de las nanopartículas de una misma muestra y por lo tanto también en sus resonancias. No obstante, el diagrama permite identificar que la muestra que absorbe una mayor cantidad de luz del láser escogido es la de Cilindros #2, con un pico de absorbancia en  $\lambda = 808$  nm, que además es notablemente mayor que el resto. Este fenómeno es coherente con un estudio que afirma que la absorbancia de los nanocilindros de oro puede llegar a duplicar la de las nanoesferas<sup>[6]</sup>. Asimismo, además del pico principal, en el espectro de absorción de los nanocilindros puede observarse un pico secundario alrededor de los 530 nm, que corresponde a la oscilación transversal de los electrones de las nanopartículas.

El valor de la absorbancia en el pico de Cilindros #2 es de 2,192 unidades, por lo que se deduce que:

$$A = -\log\left(\frac{I_f}{I_0}\right) = 2,192 \quad (2)$$

<sup>6</sup>Los datos del gráfico pueden ser visualizados por cualquier usuario en el siguiente enlace: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1kPtSdloWgVBWid3MBFcFQqIMVHUrMS1PyjRHwaUDs1-E/edit?usp=sharing>

<sup>7</sup>La absorbancia no tiene unidades por sí misma puesto que viene dada por un logaritmo.

$$T = \frac{I_f}{I_0} = 10^{-2,192} \approx \frac{0,643}{100} \quad (3)$$

La intensidad luminosa relativa que atraviesa la muestra se denomina Transmitancia  $T$ , y puede expresarse como porcentaje ( $T\%$ ). En este caso,  $(T\%)=0,643\%$ , por lo que cuando se ilumina la muestra Cilindros #2 con luz de  $\lambda = 808 \text{ nm}$ , esta absorbe un  $99,357\%$  de la intensidad luminosa irradiada.

### 3.5 Calentamiento de algunas muestras de nanopartículas

Como la muestra Cilindros #2 es la que presenta una mayor absorción de la luz del láser, por el Principio de Conservación de la Energía también será la que alcanza una mayor temperatura al recibir su luz. El objetivo de esta sección será comprobar dicha hipótesis, comparando cómo evoluciona la temperatura de tres muestras de AuNPs a lo largo del tiempo al ser iluminadas por el láser. El experimento se llevará a cabo mediante un instrumento llamado *hyperbox*, que incorpora un láser emisor de luz de  $\lambda = 810 \text{ nm}$  que ilumina la muestra, contenida en una placa de pozos. Los parámetros del láser son controlados mediante el software OsTech V.0.2.1, y el software FLIR ResearchIR procesa los datos de temperatura recogidos mediante un multímetro, conectado a un cable de cobre que se encuentra en contacto con la muestra. Durante el experimento se mantendrá constante la potencia del láser, de  $2 \text{ W}$ , y el volumen de disolución de AuNPs, de  $1 \text{ ml}$ .

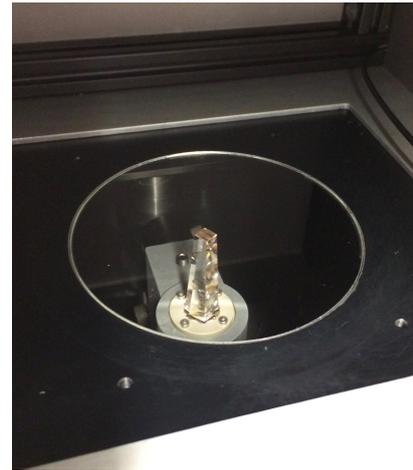


Figura 7: Láser emisor de luz de  $\lambda = 810 \text{ nm}$  situado dentro de la *hyperbox*. Fuente: propia. Realización: 20/07/16

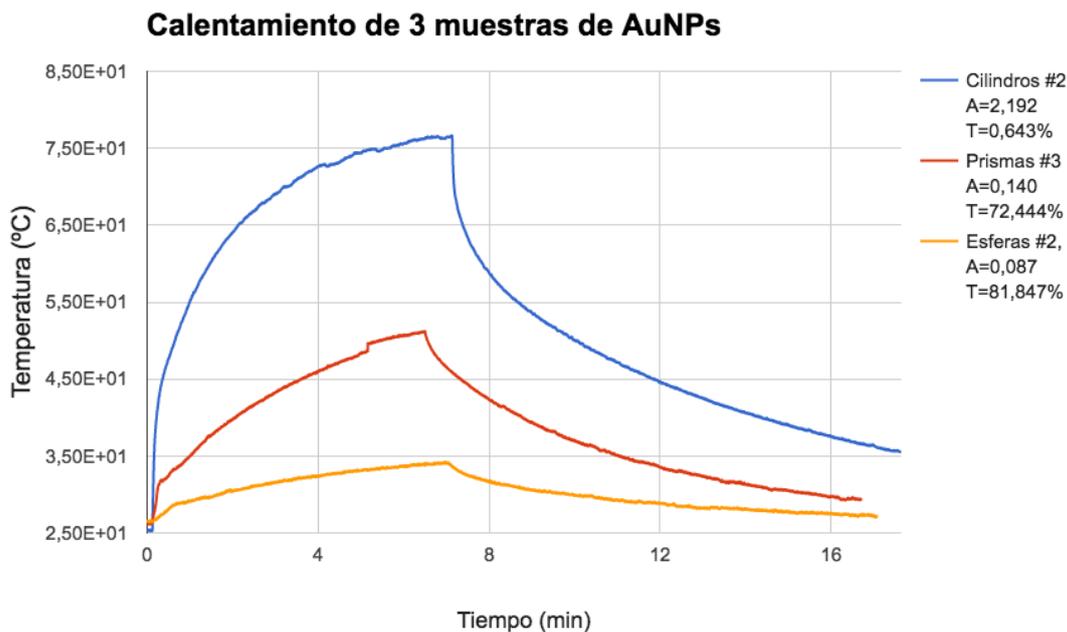


Figura 8: Gráfico temperatura-tiempo de tres de las muestras de AuNPs sintetizadas. Fuente: propia.

La Figura 8 es el gráfico temperatura-tiempo construido a partir de los datos recogidos<sup>8</sup> a partir de las tres muestras de AuNPs, durante 7 minutos de exposición y 10 minutos de reposo. No se consideran incertidumbres puesto que el objetivo del gráfico es la comparación entre distintas muestras de AuNPs de forma principalmente cualitativa.

En la Figura 8 queda reflejado que la temperatura de las muestras no aumenta linealmente en el tiempo. Esto es debido a que al calentar cualquier cuerpo a una temperatura mayor a la del ambiente, sufre una pérdida de energía directamente proporcional a la diferencia de temperatura entre cuerpo y el ambiente. Los resultados plasmados en el gráfico son muy coherentes, pues permiten comprobar que las muestras de AuNPs de mayor absorbancia, y por lo tanto de menor transmitancia  $T^9$ , alcanzan una mayor temperatura al ser iluminadas con el láser durante un mismo tiempo. De este modo, queda comprobado que la muestra Cilindros #2 contiene las nanopartículas óptimas poner en práctica la PPTT *in vitro*.

---

<sup>8</sup>Los datos son demasiado numerosos como para figurar en la monografía. Acceso a la hoja de cálculo: [https://docs.google.com/spreadsheets/d/1EcTTLQqeMt3SCuYeYZBYoxdhOOgbdm\\_c9EhwupVzTYI/edit?usp=sharing](https://docs.google.com/spreadsheets/d/1EcTTLQqeMt3SCuYeYZBYoxdhOOgbdm_c9EhwupVzTYI/edit?usp=sharing)

<sup>9</sup>El cálculo de la transmitancia  $T$  de las muestras de AuNPs, expresada en el lado derecho de la Figura 8, es análogo al realizado en la sección 3.4:  $T(\%) = 10^{3-A}$ .

## 4 Termoablación de células tumorales *in vitro*

### 4.1 Inserción de nanopartículas de oro en células tumorales

A continuación deben introducirse las nanopartículas en células tumorales de origen animal, aportadas por uno de los laboratorios de ICFO, con objeto de poner a prueba la termoablación *in vitro*. Primeramente la muestra de nanopartículas deberá liberarse de restos de reactivos utilizados para la nanofabricación, como el componente CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio), que tiene una alta citotoxicidad: se centrifugará la muestra de nanopartículas para eliminar los restos indeseados por decantación.

El siguiente paso es adherir la molécula orgánica cRGD a las nanopartículas, ya que es la responsable de guiarlas hasta las células tumorales. Los detalles de estos procedimientos no se tratarán porque no son el centro de mi investigación, sino un medio para extraer mis conclusiones sobre mi pregunta de investigación. Una vez preparadas para el tratamiento, las AuNPs se dejan durante 12 horas en contacto con tres distintas muestras de células tumorales cultivadas en una placa de pozos, para que el cRGD guíe a las nanopartículas hacia el interior de las células tumorales. Tras la espera, se eliminan de la placa los restos de disolución de AuNPs y se añade medio celular<sup>10</sup>.

La Figura 9 es una fotografía de un tejido celular tras la inserción de nanopartículas tomada mediante un microscopio de dos fotones, instrumento basado en la microscopía de fluorescencia<sup>11</sup>. La fotografía ha sido tomada después de sustituir los restos de disolución de AuNPs de los pozos que contienen las células por el medio celular, por lo que el hecho de que en la Figura 9 se identifiquen nanopartículas (puntos rojos) implica que la penetración en las células ha resultado satisfactoria. Una vez comprobado dicho fenómeno, se puede poner en práctica la termoablación de células tumorales *in vitro* para sacar conclusiones sobre la invasividad de la PPTT.

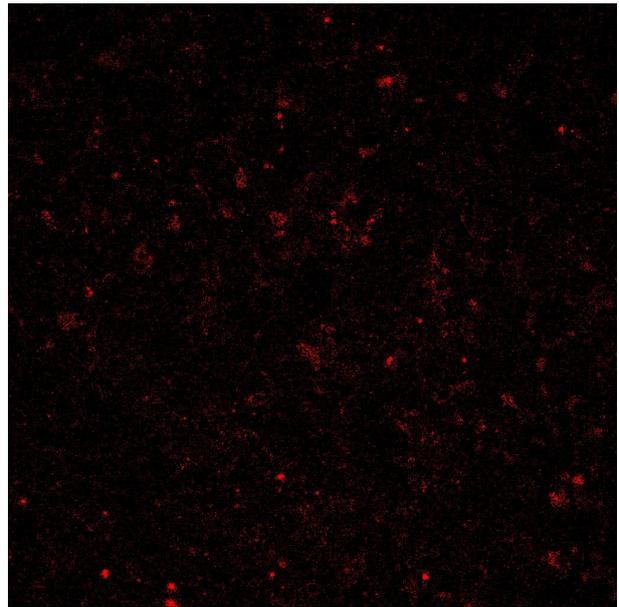


Figura 9: Microscopía de dos fotones de un tejido celular con AuNPs en su interior. El color rojo es arbitrario. Realización: 21/07/16

<sup>10</sup>Líquido que proporciona alimento a las células cultivadas *in vitro*.

<sup>11</sup>Clase de microscopía en que los electrones de un material absorben radiación electromagnética y la reemiten con una longitud de onda mayor que la inicial.

## 4.2 Calentamiento de células tumorales *in vitro*

Tras llevar a cabo los procedimientos preparatorios, puede llevarse a cabo un experimento para determinar si la PPTT puede inducir a la muerte de las células tumorales minimizando los efectos sobre las células sanas. Sería interesante hacer un cultivo celular con células sanas y enfermas para observar el efecto de forma más realista, pero la tecnología necesaria está fuera de mi alcance. En su lugar, se calentarán en la *hyperbox* las tres muestras de células tumorales con nanopartículas y se compararán los resultados con los del calentamiento de una placa con células sin nanopartículas en las mismas condiciones. El material utilizado en el experimento es mismo que en la sección 3.5: las células se encuentran en placas de pozos y se medirá su temperatura mediante un multímetro.

La experimentación se ha llevado a cabo con tres muestras de células cancerígenas con nanopartículas y una muestra de células cancerígenas sin nanopartículas, emitiendo una intensidad luminosa de  $100 \text{ W/cm}^2$  durante un tiempo de exposición de 45 segundos. Las temperaturas alcanzadas por cada placa de células se recogen en la Tabla 1:

Tabla 1. Incremento de temperatura de distintas muestras de células tumorales al recibir luz de intensidad luminosa $100 \text{ W/cm}^2$ durante 45 segundos			
	$T_0$ (°C)	$T_f$ (°C)	$\Delta T$ (°C)
Muestra 1 [con AuNPs]	24,5	65,3	40,8
Muestra 2 [con AuNPs]	24,6	69,0	44,4
Muestra 3 [con AuNPs]	24,6	72,7	48,1
Muestra 4 [sin AuNPs]	24,6	29,6	5,0

Una intensidad luminosa de  $100 \text{ W/cm}^2$  puede parecer excesiva, pero en este caso no lo es: es necesaria mucha más energía para calentar una capa de células adherida a una placa de pozos que para calentar células en suspensión (pertenecientes a un tejido en tres dimensiones). En un tratamiento *in vivo* podría lograrse un incremento de temperatura en las células con AuNPs como el plasmado en la Tabla 1 mediante con una intensidad luminosa mucho menor, aunque la intensidad luminosa y el tiempo de exposición necesarios dependerán de la situación de las células tumorales en el cuerpo. De todos modos, la conclusión a la que me permite llegar la Tabla 1 es que en las mismas condiciones en que las células que contienen AuNPs sufren un gran aumento de temperatura, la temperatura de las células sanas apenas se ve modificada. Si se tiene en cuenta que el aumento de temperatura necesario para inducir a la apoptosis celular apenas supera los  $10 \text{ °C}$ , queda claro que las células tumorales situadas a poca profundidad pueden ser eliminadas de forma no invasiva, ya que el incremento de temperatura de las células sanas es insuficiente como para inducir a la muerte celular.

## 5 Conclusiones

Tras llegar a este punto puede concluirse que se han cumplido los objetivos de esta monografía y que se podrá responder la pregunta de investigación planteada en un inicio. No obstante, un problema tan complejo como la cura de una enfermedad mortal requiere de una investigación que aborde el tema con mucha más profundidad antes de que la terapia se aplique a pacientes humanos.

Ya que el objetivo de la investigación era eliminar células tumorales sin inferir daños sustanciales en tejidos sanos, se ha diseñado con tal de inducir a una muerte celular por apoptosis, lo que implica un incremento de temperatura de las células tumorales menor que  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Primeramente se ha estudiado el espectro de absorbancia de los tejidos y se ha concluido que el láser utilizado debe ser emisor de luz infrarroja de  $\lambda = 810\text{ nm}$ . A continuación se han sintetizado ocho muestras de nanopartículas de oro de distintas dimensiones y formas, y se ha determinado mediante una espectrofotometría de absorción que la muestra Cilindros #2 es la que absorbe en mayor medida la luz del láser. Por lo tanto, se ha podido comprobar experimentalmente que dicha muestra también alcanza una mayor temperatura al ser iluminada por luz de  $\lambda = 810\text{ nm}$ . Finalmente se han comparado los efectos del láser en cultivos de células tumorales con y sin nanopartículas de oro, y el incremento de temperatura de las células sin nanopartículas ha resultado ser mucho menor que el de las células con nanopartículas. Por lo tanto, se concluye que la Terapia Fototérmica Plasmónica sí permite eliminar células tumorales minimizando los daños colaterales sobre el resto del tejido.

Debe tenerse en cuenta que mis conclusiones son aplicables a la eliminación de células tumorales, pero todavía no a la cura de tumores. Aun así, la técnica que se ha puesto en práctica acompañada de la regulación adecuada de parámetros como la concentración de nanopartículas, la zona de inyección, la potencia del láser y el tiempo de exposición podría servir para curar tumores superficiales, como los de tipo melanoma. En caso de querer extrapolar las conclusiones a células tumorales situadas a mayor profundidad, sería necesario realizar un estudio teniendo en cuenta que la intensidad luminosa decae exponencialmente cuando penetra un medio como el agua o nuestro cuerpo. Como alternativa, una variante de la PPTT para la cura de tumores más profundos podría ser la introducción una fibra óptica dentro del cuerpo mediante un catéter para irradiar luz en el tumor minimizando las pérdidas energéticas.

De todos modos, para aplicar la terapia a pacientes humanos deben controlarse multitud de factores que no se han estudiado en esta monografía. Quizá el estudio más importante es el de si la terapia es capaz de eliminar todas las células de un tumor, ya que de lo contrario este se vuelve a reproducir. Para ello debería estudiarse el proceso de inserción de las nanopartículas en las células mediante la molécula cRGD, así como las inyecciones de nanopartículas a subministrar al paciente durante el tratamiento. Otras cuestiones a investigar son la relación entre la potencia del láser y el incremento de temperatura de los nanocilindros de oro, la cuál todavía no se ha resuelto por completo<sup>[7]</sup>, o qué concentraciones de oro son toleradas por nuestro cuerpo a largo plazo y a la vez son suficientes para eliminar células tumorales.

Todas estas posibles ampliaciones de la investigación hacen evidente que esta monografía es solo un primer paso en el laborioso y complejo proceso de curar una enfermedad. De todos modos, encuentro muy enriquecedor haber tenido acceso a un tema de investigación tan presente en nuestra sociedad como la cura del cáncer.

## 6 Bibliografía

### 6.1 Referencias bibliográficas

- [1] M. Heidari, N. Sattarahmady, N. Azarpira, H. Heli, A. R. Mehdizadeh, T. Zare. *Photothermal cancer therapy by gold-ferrite nanocomposite and near-infrared laser in animal model*. Lasers in Medical Science, 2016.
- [2] S. Boca-Faracau, M. Potara, T. Simon, A. Juhem, P. Baldeck, S. Astilean. *Folic acid-conjugated, SERS-labeled silver nanotriangles for multimodal detection and targeted photothermal treatment on human ovarian cancer cells*. Molecular Pharmaceutics, 2014.
- [3] D. Mateo, P. Morales, A. Ávalos, A. I. Haza. *Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro*. Acta Toxicológica Argentina, 2013.
- [4] Y. Xiao, H. Hong, V. Z. Matson, A. Javadi, W. Xu, Y. Yang, Y. Zhang, J. W. Engle, R. J. Nickles, W. Cai, D. A. Steeber, S. Gong. *Gold Nanorods Conjugated with Doxorubicin and cRGD for Combined Anticancer Drug Delivery and PET Imaging*. Theranostics, 2012.
- [5] K. L. Kelly, E. Coronado, L. L. Zhao, G. C. Schatz. *The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment*. The Journal of Physical Chemistry B, 2003.
- [6] M. Hu, J. Chen, Z. Li, L. Au, G. V. Hartland, X. Li, M. Marquez, Y. Xia. *Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications*. Chemical Society Reviews, 2006. [Citado por: X. Huang, M. A. El-Sayed. *Plasmonic photothermal therapy (PPTT)*. Alexandria Journal of Medicine, 2011.]
- [7] S. Soni, R. K. Sinha. *Controlling Parameters for Plasmonic Photothermal Ablation of a Tumor*. IEEE, 2016.

### 6.2 Libros de texto consultados

T. Kirk. *Physics for the IB diploma*. Oxford University Press, 2014

S. Serra, M. Armengol, J. Mercadé. *Física 1 Batxillerat*. McGraw-Hill, 2012.

### 6.3 Fuentes figuras

Figura 1: [http://www.laserandhealthacademy.com/en/public/lasers\\_medicine/](http://www.laserandhealthacademy.com/en/public/lasers_medicine/)

Figura 2: [http://photonicswiki.org/index.php?title=File:Plasmon\\_oscillation.jpg](http://photonicswiki.org/index.php?title=File:Plasmon_oscillation.jpg)

## 6.4 Webgrafía

A continuación proporciono acceso a las fuentes de información de Internet que he consultado durante la realización del trabajo, pero que no son mencionadas de forma explícita a lo largo del mismo.

<http://www.acercaciencia.com/2012/10/15/ciclo-celular/>

<http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>

[http://www.anestesia.org.ar/search/articulos\\_completos/1/1/284/c.php](http://www.anestesia.org.ar/search/articulos_completos/1/1/284/c.php)

<http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia/materiales-de-clase-1/capitulo-5.-bases-celulares-del-envejecimiento/5.4-la-muerte-celular-necrosis-y-apoptosis>

[http://www.laserandhealthacademy.com/en/public/lasers\\_medicine/](http://www.laserandhealthacademy.com/en/public/lasers_medicine/)

[http://photonicswiki.org/index.php?title=Gold\\_Nanoparticles\\_%E2%80%93\\_Surface\\_Plasmon\\_Resonance](http://photonicswiki.org/index.php?title=Gold_Nanoparticles_%E2%80%93_Surface_Plasmon_Resonance)

<http://www.ece.utah.edu/~blair/T/ece7960/papers/kelly03opmn.pdf>

[http://www.espectrometria.com/espectrometra\\_de\\_absorción](http://www.espectrometria.com/espectrometra_de_absorción)

<http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Espectrofotometria.pdf>

<https://secpre.org/pacientes/cirugia-reconstructiva/tumores-de-la-piel>

## 7 Apéndices

### 7.1 Síntesis de nanopartículas de oro

#### Síntesis de nanoesferas

Existen diversos métodos de fabricación de nanopartículas de oro, que varían según los propósitos de la nanofabricación. En esta sección, se ha optado por el método de síntesis de nanoesferas mediante la reducción del oro gracias al citrato trisódico. Los pasos de la síntesis se disponen a continuación.

1. A partir de una disolución de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) a concentración 4 mM, que es la que contiene el oro que constituirá las nanoesferas, se forman dos disoluciones de  $\text{HAuCl}_4$  en agua destilada a concentración de 0,5 mM y 1,0 mM respectivamente.
2. Se calientan las disoluciones de  $\text{HAuCl}_4$  hasta su punto de ebullición, que al estar en disolución acuosa muy poco concentrada será alrededor de los 100 °C.
3. Se prepara una disolución de citrato trisódico a una concentración 0,01 g/ml.
4. Cuando hiervan las disoluciones de  $\text{HAuCl}_4$ , se introducen 10 ml de citrato trisódico disuelto. Este es el responsable de la reducción del oro, que hace posible la formación de nanopartículas.
5. Tras la reducción de las partículas de oro, se formarán puntos de nucleación el tamaño de los cuales empezará a aumentar hasta formar las nanoesferas. Se esperan 10 minutos y se separa la disolución de la fuente de calor. El resultado de la síntesis son las muestras de nanoesferas Esferas #1 y Esferas #2, que se muestran en la Figura 10.

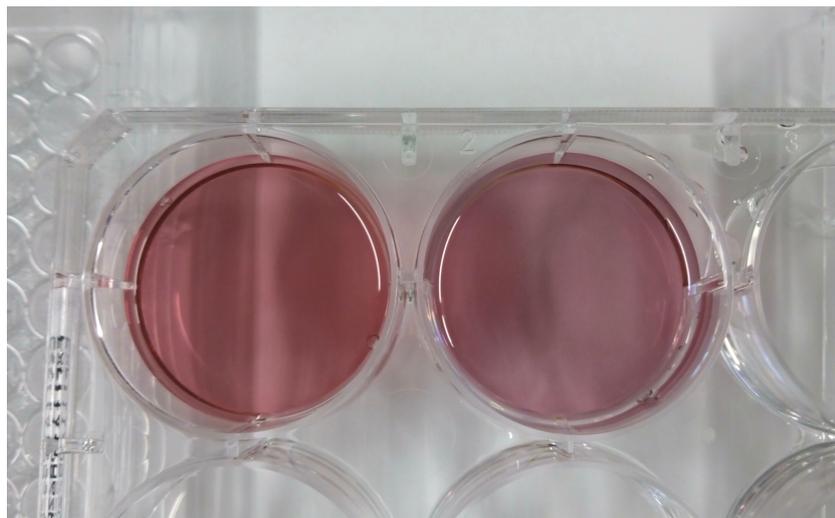


Figura 10: Muestras de AuNPs Esferas #1 y Esferas #2, tras la síntesis. Realización: 18/07/2016

## Síntesis de nanocilindros

En el caso de la síntesis de nanocilindros, se seguirá el método *Seed-Mediated Growth*, basado en el uso de semilla, una disolución de pequeñas AuNPs que durante la síntesis forman puntos de nucleación a partir de los cuales pueden fabricarse nanopartículas del tamaño deseado. El procedimiento seguido en el laboratorio figura a continuación:

1. Se preparan tres soluciones de 100 ml conteniendo ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ , 0,5 mM) y CTAB (75 mM). Se observa que la mezcla de estos dos componentes cobra un color amarillo-dorado, debido a la formación de un complejo oro-bromo.
2. Se prepara una solución de nitrato de plata (4mM). Mientras el CTAB es el responsable de la forma cilíndrica, el  $\text{AgNO}_3$  permite modular este crecimiento (cuanto más  $\text{AgNO}_3$  se añade más alargados son los nanocilindros). Por lo tanto se prepararán tres soluciones distintas con distintos volúmenes de  $\text{AgNO}_3$ : 1,200 ml, 1,950 ml y 3,800 ml: de esta forma, las muestras resultantes contendrán cilindros de distintas dimensiones y por lo tanto diferirán en cuanto a pico de absorbancia.
3. Se prepara una solución de ácido ascórbico 13,9 mg/ml, ya que se utilizará como reductor para transformar el oro soluble  $\text{Au}^{3+}$  que proviene del  $\text{HAuCl}_4$  en oro metálico  $\text{Au}^0$ .
4. Se añade la cantidad deseada de nitrato de plata 4 mM a cada solución de  $\text{HAuCl}_4$  con CTAB y se introducen en un agitador magnético con control de temperatura, estabilizándola a 30 °C.
5. Se añade progresivamente la solución de ácido ascórbico 13,9 mM hasta que la solución queda incolora. En ese momento se añaden 0,3 ml de semilla y se sigue añadiendo de forma progresiva ácido ascórbico hasta alcanzar 1 ml.
6. La formación de nanocilindros se traduce en un tono rosado de la disolución tras unos 3 minutos. Al terminar la adición de ácido ascórbico, se permite que la reacción continúe durante 15 minutos más. Se repite el proceso con las tres distintas cantidades de nitrato de plata. El resultado se muestra en la Figura 11.



Figura 11: Muestras de AuNPs Cilindros #1, Cilindros #2 y Cilindros #3, tras la síntesis. La diferencia de color indica la obtención de nanocilindros de distinto *aspect ratio*. Realización: 18/07/2016

## Síntesis de nanoprismas

El método seguido para la síntesis de nanoprismas es muy semejante al seguido para la síntesis de nanocilindros, aunque hay algunas novedades como el uso de salicato de sodio o la concentración del CTAB, que son causa de que el crecimiento de las nanopartículas sea distinto. El procedimiento seguido en el laboratorio es el siguiente:

1. Se disuelven 150 g de salicato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) en 62,5 ml de agua desionizada.
2. Se añaden 25 ml de CTAB (200mM). La solución debe estar en constante agitación mediante un agitador magnético, y a una temperatura constante de 30°C.
3. Se añade cierto volumen de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ , 4 mM). El volumen de  $\text{AgNO}_3$  es variable: se preparan tres soluciones distintas variando el volumen de nitrato de plata, ya que este determina la forma de los nanoprismas: 0 ml, 0,2 ml y 0,4 ml.
4. Se introducen 12,5 ml de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ , 4mM) en la solución, que se mantiene en constante agitación hasta que se vuelva incolora.
5. Tras la espera, se introducen 0,3 ml de semilla a la disolución, que creará los puntos de nucleación para la formación de los nanoprismas.
6. Se prepara una solución de ácido ascórbico 13,9 mg/ml, ya que se utilizará como reductor para transformar el oro soluble  $\text{Au}^{3+}$  que proviene del  $\text{HAuCl}_4$  en oro metálico  $\text{Au}^0$ .
7. Se esperan 20 minutos mientras se mantiene la solución en agitación vigorosa. Tras la espera, se almacenan las disoluciones de nanoprismas de oro resultantes, mostradas en la Figura 12.



Figura 12: Muestras Prismas #1, Prismas #2 y Prismas #3, tras la síntesis. Realización: 18/07/2016