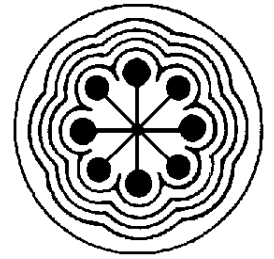




**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES NUCLEARES**



ININ

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN FÍSICA MÉDICA

**Evaluación teórica-experimental del cambio
de temperatura en tejido por efecto
fototérmico plasmónico del sistema
 ^{177}Lu -AuNP-RGD**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN FÍSICA MÉDICA

P R E S E N T A

Andrés Carrillo Cázares

Comité de Tutores:

Dra. en C. Nallely Patricia Jiménez Mancilla

Dra. en C. Keila Isaac Olivé

Dr. en C. Miguel Ángel Camacho López



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

2017



Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER), adscrito a la Gerencia de Aplicaciones Nucleares en Salud en el Departamento de Materiales Radiactivos bajo la dirección académica de la Dra. en C. Nallely Patricia Jiménez Mancilla, con financiamiento del proyecto CATEDRÁS-CONACyT-ININ-337 y CONACYT-SEP-CB-2014-01-242443.



Universidad Autónoma del Estado de México

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRIA EN FISICA MÉDICA

Toluca Méx., a 25 de Septiembre de 2017

DR. EN C. ALBERTO ERNESTO HARDY PÉREZ

COORDINADOR DEL CIEACS

PRESENTE:

Por este conducto informo a usted, que después de haber revisado el trabajo de TESIS titulado:

“Evaluación teórica-experimental del cambio de temperatura en tejido por efecto fototérmico plasmónico del sistema $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$.”

A cargo del **FIS. ANDRÉS CARRILLO CÁZARES**, alumno egresado de la Maestría en Física Médica, de la Facultad de Medicina, UAEM

No se encontró ninguna corrección, por lo tanto se **APRUEBA** el mencionado trabajo de TESIS.

ATENTAMENTE
LA COMISIÓN DE REVISORES
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

“2017, Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos”

Dra. en C. Nallely Patricia Jiménez Mancilla (CONACyT-ININ) _____

Dra. en C. Keila Isaac Olivé. (UAEMéx) _____

DR. en C. Miguel Ángel Camacho López (UAEMéx) _____



DEDICATORIA

A mi papá y mamá.

A quienes debo el regalo más importante que tengo que es la vida; y que con su apoyo, amor y cariño he podido alcanzar los sueños que he tenido, por el apoyo en todo momento, por sus consejos, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero sobre todo, por su amor.

¡LOS AMO!

A mis Hermanos.

A mi hermano Tomás y Alejandro, por mostrarme que el cariño prevalece aun cuando existen diferencias y por haber compartido conmigo alegrías, tristezas, enojos y, por supuesto, llantos.

¡LOS QUIERO!

A Dios.

Por haberme permitido lograr mis objetivos y llegar a este momento tan especial además de su infinita bondad y amor. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorar cada día más.

¡Gracias!

AGRADECIMIENTOS

A la *Gerencia de Aplicaciones Nucleares a la Salud* y al *Departamento de Materiales Radiactivos* del *Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ)* por haberme provisto de las excelentes condiciones de trabajo y por la confianza de haberme permitido trabajar en sus instalaciones.

A la *Universidad Autónoma del Estado de México*, por haberme brindado la oportunidad de escalar un peldaño más en el campo del conocimiento y por acercarme un paso más a la realización de mis sueños.

A mi asesora, la *Dra. Nallely*, por haber compartido sus conocimientos conmigo, por la inmensa ayuda brindada para la interpretación de los resultados, por todos y cada uno de sus consejos, pero sobre todo gracias por ser el guía que me acompañó a lo largo de este trabajo.

A la *Dra. Guillermina*, por haber compartido sus consejos y enseñanzas, y por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio

A la *Dra. Leticia, Erika, Blanca y Myrna*, por todos y cada uno de sus consejos durante el desarrollo de este proyecto y por sus comentarios para enriquecer mi trabajo de tesis.

A la *Dra. Keila*, porque además de mi maestra fue una segunda madre que siempre ha estado pendiente de mi formación y mi desarrollo personal, nunca podré agradecerle todo eso que ha hecho por mí. Esas pláticas, esos consejos o simplemente, ese tiempo que hemos compartido. Gracias por su apoyo.

Al *Dr. Eugenio y Miguel*, porque además de ser mis profesores y darme algunos de sus conocimientos los considero mis amigos por tantas charlas y consejos, muchas gracias.

Al *Dr. Hardy* y la *Maestra Eleni*, gracias por permitirme aprender, por sus sabias sugerencias y por todo su apoyo!!

A mis queridos amigos del Lab. de Radiofármacos: *Abram, Hertor, Perlita, Karensita, Alondra* y *Miriam*, con quienes trabajé de manera muy cercana durante el desarrollo de este proyecto e hicieron de mi estancia en el ININ una experiencia más amena.

A **TODOS** y cada uno de mis maestros, que me han formado desde la educación básica y a **TODOS** mis compañeros que me han acompañado en la travesía de la vida, **¡MUCHAS GRACIAS!**

Índice

Resumen	5
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO II: ESTADO DEL ARTE.....	15
2.1. Estado del Arte	15
2.2. Planteamiento del problema	20
2.2.1. Pregunta de investigación:.....	20
2.3. Hipótesis	21
2.4. Objetivos	21
2.4.1 Objetivo General.....	21
2.4.2. Objetivos Específicos	21
CAPÍTULO III: MARCO TEÓRICO	22
3.1. Interacción de Luz con AuNPs.....	22
3.2. Teoría MIE	23
3.3. Radiación electromagnética: Láser.....	24
3.3.1. Características Físicas de la Emisión Láser	25
3.3.2. Producción de Radiación Láser	26
3.3.3. DESCRIPCION DE UN LASER DE Nd:YAG PULSADO	26
3.3.4. Parámetros característicos de un Láser Pulsado	27
3.4. Distribución de la Temperatura: Modelo de una Temperatura	27
CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA.....	30
4.1. Caracterización química y estructural del sistema AuNP-c[RGDfK(C)].....	30
4.1.1. Caracterización por UV-Vis	30
4.1.2. Caracterización por TEM	30
4.2. Determinación de los índices de refracción del Oro, Hígado y Colon.....	31
4.2.1. Oro.....	31
4.2.2. Hígado	32
4.2.3. Colon	33
4.3. Determinación de las constantes dieléctricas del Oro, Hígado y Colon.....	34
4.3.1. Oro.....	34
4.3.2. Hígado y Colon.....	34
4.4. Cálculo teórico de los coeficientes de absorción, dispersión y extinción.....	34

4.5.	Determinación del cambio de temperatura en tejido y agua.....	34
4.6.	Determinación experimental de la temperatura generada por los sistemas AuNP y AuNP-RGD en agua	37
4.7.	Correlación teórica y experimental de los resultados.....	39
CAPÍTULO V: RESULTADOS.....		40
5.1.	Caracterización química y estructural antes y después de la irradiación láser del sistema AuNP-c[RGDfK(C)].....	40
5.1.1	Caracterización por UV-Vis	40
5.1.2	Caracterización por TEM	42
5.2.	Determinación Teórica de los índices de refracción del Oro, Hígado y Colon	42
5.2.1.	Oro	42
5.3.	Determinación Teórica de las constantes dieléctricas del Oro, Hígado y Colon	45
5.4.	Curvas de los coeficientes de absorción, dispersión y extinción.....	48
5.5.	Curva Teórica de temperatura en Agua	51
5.6.	Curvas experimentales de la temperatura generada por el sistema ¹⁷⁷ Lu-AuNP-RGD en tejido y agua.....	53
5.7.	Correlación teórica y experimental de los resultados obtenidos en el cambio de temperatura	57
CAPÍTULO VI: DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.....		60
CAPÍTULO VII: REFERENCIAS.....		61
ANEXO		65
1.	CONGRESO.....	65
2.	ARTÍCULO	66

Resumen

El grupo de trabajo del Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER) del ININ desarrolla desde hace más de 20 años radiofármacos para diagnóstico y terapia. Recientemente desarrolló uno basado en nanopartículas de oro (AuNPs) funcionalizadas con la secuencia peptídica Arg-Gly-Asp (RGD). La secuencia RGD ha mostrado una gran afinidad por las integrinas $\alpha_v\beta_3$ sobre expresadas en diversas células de cáncer.

Cuando las AuNPs se exponen a radiación electromagnética como luz láser, se induce el efecto de resonancia de plasmón de superficie (SPR), en este, los electrones libres absorben y dispersan a la luz. Estos procesos son descritos por la teoría de Mie, la cual determina la probabilidad del proceso mediante sus secciones eficaces C_{abs} y C_{sca} , y considera a la suma de éstas como la sección eficaz de extinción C_{ext} . La C_{abs} está directamente relacionada con la producción de calor que genera la AuNP (con un alcance de temperatura de $\approx 800^\circ\text{C}$) y se ha demostrado que causa destrucción celular térmica irreversible por el aumento incontrolado de temperatura, proceso denominado Terapia Fototérmica Plasmónica.

Por lo anterior, el objetivo general de este proyecto fue evaluar teóricamente el cambio de temperatura en tejido por la presencia del conjugado AuNP-RGD al ser irradiado con luz láser mediante un modelo de difusión de calor que considera los coeficientes de absorción, dispersión y extinción del sistema. De igual manera, el valor teórico se correlacionó con el valor experimental obtenido al irradiar dicho sistema con luz láser de 532 nm.

El desarrollo de este proyecto se planteó en dos fases, una teórica y una experimental. En la primera, se determinaron los C_{abs} , C_{sca} y C_{ext} mediante teoría Mie, considerando a las AuNP-RGD en agua y tejido (hígado y colon). En la segunda se irradiaron muestras de AuNP-RGD en agua y tejido con un láser pulsado de Nd:YAG a una longitud de onda de 532 nm y frecuencias de repetición variables (5, 10 y 15 Hz) y se monitoreó la temperatura cada segundo usando un termopar, se construyeron las gráficas de temperatura vs tiempo y se planteó un modelo de distribución de temperatura ente los datos teóricos y los experimentales.

De la teoría Mie se determinó que el C_{ext} obtenido a 532 nm para las diferentes muestras no representa el valor máximo, sino, el 94%, 98% y 96% de su valor máximo para AuNP-RGD en agua, colon e hígado respectivamente, obtenidos a 522.5 nm y 525 nm. En la parte experimental se determinó que el incremento de temperatura a nivel macroscópico después de una irradiación de 200 s a una frecuencia de 10 Hz ó 90 s a una frecuencia de 15 Hz es alrededor de 13°C para una concentración de 6.54×10^{11} AuNP/mL. A partir de las curvas de temperatura vs tiempo se construyó un modelo de una temperatura basado en los valores teóricos de C_{abs} y un factor de corrección por pérdida de masa que describe el comportamiento a nivel macroscópico del sistema.

Como conclusión de este proyecto tenemos que los cálculos de los C_{abs} , C_{sca} y C_{ext} para (AuNP-RGD)-agua, (AuNP-RGD)-colon y (AuNP-RGD)-hígado ayudan a entender el incremento de temperatura observado cuando son irradiados con luz láser de 532 nm. El

incremento de temperatura fue suficiente para producir muerte celular por terapia Fototérmica Plasmónica.

Summary

The working group of National Laboratory of Research and Development of Radiopharmaceuticals (LANIDER) from ININ has developed radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy at last for the last 20 years. Recently it developed a radiopharmaceutical based on gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with the peptide sequence Arg-Gly-Asp (RGD). The RGD sequence has shown a high affinity for $\alpha_v\beta_3$ integrins over-expressed in various cancer cells.

When AuNPs are exposed to electromagnetic radiation as laser light, the surface plasmon resonance (SPR) effect is induced, in which the free electrons absorb and disperse to light. These processes are described by Mie theory, which determines the probability of the process by its effective sections C_{abs} and C_{sca} and considers the sum of these as effective extinction section C_{ext} . C_{abs} is directly related to the heat production generated by the AuNP (with a temperature range of ≈ 800 °C) and has been shown to cause irreversible thermal cell destruction due to uncontrolled temperature increase, a process called Plasma Photothermal Therapy.

Therefore, the overall objective of this project was to theoretically evaluate the change in tissue temperature by the presence of the AuNP-RGD conjugate when irradiated with laser light using a heat diffusion model that considers the absorption, dispersion and extinction coefficients of the system. Likewise, the theoretical value was correlated with the experimental value obtained when irradiating the system with laser light of 532 nm.

The development of this project was planned in two phases, one theoretical and one experimental. In the first, C_{abs} , C_{sca} and C_{ext} were determined by Mie theory, considering the AuNP-RGD in water and tissue (Liver and Colon). In the second, samples of AuNP-RGD were irradiated in water and tissue with a pulsed Nd: YAG laser at a wavelength of 532nm and variable repetition frequencies (5, 10 and 15 Hz) and temperature was monitored every second using a thermocouple, temperature vs time graphs were constructed and a model of temperature distribution was proposed between the theoretical and experimental data.

From Mie theory it was determined that C_{ext} obtained at 532nm for different samples does not represent the maximum value, otherwise, for AuNP-RGD in water, colon and liver are respectively 94%, 98% and 96% of their maximum value obtained at 522.5 nm and 525 nm. From experimental part, it was determined that temperature increase at macroscopic level is about 13 °C with a concentration of 6.54×10^{11} AuNP /mL after an irradiation of 200s at a 10Hz frequency and after 90s at 15 Hz frequency. Using temperature vs time curves a temperature model was constructed based on theoretical values of C_{abs} and a mass loss correction factor describing the behavior at the macroscopic level of the system.

As a conclusion of this project, we have that calculations of C_{abs} , C_{sca} and C_{ext} for (AuNP-RGD)-water, (AuNP-RGD)-colon and (AuNP-RGD)-liver help to understand temperature increase observed when they are irradiated with laser light at 532 nm. Observed temperature increase was approximately 13 °C which is sufficient to produce cell death by plasmonic photothermal therapy.

Abreviaturas.

AuNPs	Nanopartículas de oro
SPR	Resonancia del plasmón de superficie
RGD	Arginina - Glicina - Ácido Aspártico
C_{sca}	Sección eficaz de dispersión
C_{abs}	Sección eficaz de absorción
C_{ext}	Sección eficaz de extinción
Q_{sca}	Coefficiente de dispersión
Q_{abs}	Coefficiente o eficiencia de absorción
Q_{ext}	Coefficiente de extinción
^{177}Lu	Lutecio-177
Nd:YAG	neodymium-doped y ttrium aluminium garnet
PBS	Disolución buffer de fosfatos (pH 7.0)
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotón único
UV-Vis	Ultravioleta-visible
KeV	Kiloelectronvolt
MeV	Megaelectronvolt
ϵ_m	Constante o función dieléctrica
ϵ_1	Parte real de la función dieléctrica
ϵ_2	Parte compleja de la función dieléctrica
\tilde{n}	Índice de refracción
n	Parte real del índice de refracción
k	Parte compleja del índice de refracción
C	Capacidad calorífica
C_e	Calor específico
C_{ew}	Calor específico del agua

C_{e_o}	Calor específico del oro
m_w	Masa de agua
V_w	Volumen de agua
ρ_w	Densidad de agua
m_o	Masa de una AuNp
V_o	Volumen de una AuNp
ρ_o	Densidad de una AuNp
c_o	Velocidad de la luz en el vacío
f	Frecuencia
E_p	Energía pico (por pulso)
t_p	Tiempo pico (por pulso)
P_p	Potencia pico
P_m	Potencia media
DP_m	Densidad de potencia o irradiancia
DE_m	Energía total liberada
L	Calor de evaporación
μ_o	Conductividad térmica del oro
R_o	Radio de la AuNp

Índice de Figuras.

Figura 1: Las integrinas $\alpha\beta$ reconocen a diferentes proteínas de la matriz extracelular con secuencia RGD [24].....	17
Figura 2: Esquema del fenómeno de Resonancia del Plasmón de Superficie [15].	19
Figura 3: Esquema del fenómeno de Resonancia del Plasmón de Superficie [15].	22
Figura 4: Arreglo experimental de irradiación de muestras en placa de 96 pozos	38
Figura 5: UV-Vis antes y después de irradiación a 5 Hz	40
Figura 6: UV-Vis antes y después de irradiación a 10 Hz.....	41
Figura 7: UV-Vis antes y después de irradiación a 15 Hz.....	41
Figura 8: Gráfica de n y k para AuNPs	43
Figura 9: Gráfica de n y k para Hígado	44
Figura 10: Gráfica de n y k para Colon	45
Figura 11: Gráfica de la función dieléctrica de las AuNPs	46
Figura 12: Gráfica de la función dieléctrica del Hígado	47
Figura 13: Gráfica de la función dieléctrica del Colon	47
Figura 14: Secciones eficaces para AuNPs en Agua	48
Figura 15: Secciones eficaces para AuNPs en Hígado	49
Figura 16: Secciones eficaces para AuNPs en Colon	50
Figura 17: Incremento de temperatura teórico de AuNPs en Agua	53
Figura 18: Aumento de temperatura para las diferentes muestras a 5, 10 y 15 Hz.	54
Figura 20: Aumento de temperatura a 5 Hz para los diferentes medios	55
Figura 21: Aumento de temperatura a 10 Hz para los diferentes medios.....	55
Figura 22: Aumento de temperatura a 15 Hz para los diferentes medios.....	56
Figura 23: Comparación de aumento sin corrección de temperatura teórico-experimental	58
Figura 24: Comparación de aumento con corrección de temperatura teórico-experimental	59

Índice de tablas.

Tabla 1: Valores que definen las funciones n y k del oro.....	32
Tabla 2: Valores que definen las funciones n y k del medio hígado.....	33
Tabla 3: Valores que definen la función n del medio colon.....	33
Tabla 4: Valores que definen la función k del medio colon.....	33
Tabla 5: Posiciones de las diferentes muestras a irradiar a diferentes frecuencias.....	39
Tabla 6: Valores que definen las funciones n y k del oro.....	42

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

El grupo de trabajo del Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) ha desarrollado diversos radiofármacos entre los cuales se encuentran sistemas basados en nanopartículas de oro (AuNPs).

Las AuNPs se caracterizan por su alta biocompatibilidad, sus propiedades ópticas (absorción y dispersión de la luz) y capacidad de formación de los enlaces Au-S y Au-N con alta estabilidad química lo que hace posible la funcionalización de éstas con una gran variedad de moléculas como péptidos, proteínas, cadenas de ADN, polímeros y otras moléculas [1]; además es posible combinar simultáneamente algunos de estos elementos funcionales en una misma partícula. Varios estudios han demostrado que estos sistemas presentan biocompatibilidad, estabilidad, multimericidad y alto reconocimiento molecular específico [1-4].

Uno de los sistemas desarrollado por LANIDER que ha mostrado una amplia aplicación en el área de Medicina Nuclear para tratamiento de diversos tipos de cáncer [1,2,5], es el formado por nanopartículas de oro funcionalizadas con la secuencia tripeptídica Arg-Gly-Asp (RGD) y radiomarcado con ^{177}Lu [6]. La secuencia RGD ha mostrado una gran afinidad por las integrinas $\alpha_v\beta_3$. Estas integrinas están expresadas en bajos niveles en las células epiteliales y en las células endoteliales maduras, pero están altamente expresadas en células endoteliales activas en la neovasculatura de tumores, incluyendo osteosarcomas, neuroblastomas, glioblastomas, melanomas, carcinomas de pulmón y cáncer de mama [7-10].

Por otro lado, el ^{177}Lu es uno de los radionúclidos más empleados en el área de Medicina Nuclear para dar tratamiento a diversos tipos de cáncer, debido al depósito de su energía en las inmediaciones del decaimiento, lo que genera una irradiación homogénea al sitio de interés (efecto de fuego cruzado). El ^{177}Lu es un emisor beta negativo con una $E_{max} = 497$ KeV (abundancia 78.6%), 384 KeV (9.1%) y 176 KeV (12.2%) y una $E_{min} = 0.134$ MeV con un alcance promedio de 2 mm en tejido blando, además, es un emisor de gamma $E_\gamma = 113$ KeV (6.4%) y 208 KeV (11% de abundancia), apropiado para la adquisición de imágenes *in vivo* en cámara gamma y SPECT, para la realización de estudios dosimétricos personalizados previos a la terapia radionuclídica [11,12].

Actualmente, el uso de las AuNPs no solo radica en la formación de nanosistemas multiméricos; por sus propiedades ópticas, son consideradas buenas candidatas para la obtención de imágenes ópticas por contraste de fase, microscopía de campo oscuro, imagen fototérmica y/o imagen fotoacústica. Además, han sido propuestas como nanocalentadores ya que al absorber luz son capaces de convertir esa luz en energía calorífica [1-4].

Cuando las AuNPs se exponen a radiación electromagnética como luz láser, la oscilación del campo electromagnético de la luz induce una oscilación colectiva de los electrones libres presentes en el arreglo periódico de los átomos. Los electrones libres forman un dipolo en dirección al campo eléctrico de la luz. Se sabe que la máxima amplitud de oscilación se da a una frecuencia específica, llamada resonancia de plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) [5,13-15]. La SPR depende de la longitud de onda incidente, el tipo de metal de la nanopartícula, forma, estructura, composición y la constante dieléctrica del medio circundante. Cabe señalar que para que se genere el efecto de SPR es necesario que se cumpla la siguiente relación: $\varepsilon_1 = -2\varepsilon_m$, donde ε_1 es determinada por la parte real de la función dieléctrica de las AuNPs y ε_m por la función dieléctrica del medio. En el caso de AuNPs suspendidas en agua el efecto de SPR se encuentra alrededor de los 520 nm [13].

En el proceso de SPR los electrones libres de la AuNPs absorben y dispersan a la luz incidente, estos procesos son descritos analíticamente por la teoría de Mie. Esta teoría provee la solución analítica exacta de las ecuaciones de Maxwell para la dispersión y absorción de las ondas electromagnéticas en nanopartículas esféricas. Dicha teoría, determina la probabilidad de absorción y dispersión mediante la sección eficaz de absorción C_{abs} (m²) y la sección eficaz de dispersión C_{sca} (m²) respectivamente y considera a la suma de éstas como la sección eficaz de extinción C_{ext} (m²). Cuando la sección eficaz es dividida por el área de interacción da como resultado la eficiencia, ya sea de absorción, dispersión y/o extinción [16].

El coeficiente de absorción (C_{abs}) está directamente relacionado con la producción de calor que genera la AuNP y se ha demostrado que este causa destrucción celular térmica irreversible, proceso que ha sido llamado Terapia Fototérmica Plasmónica.

Las propiedades ópticas de absorción y dispersión son fuertemente dependientes del tamaño, forma y función dieléctrica del medio circundante, por ejemplo para partículas pequeñas esféricas (5-10 nm de diámetro) en agua, la eficiencia de extinción C_{ext} es igual a la eficiencia de absorción C_{abs} y la eficiencia de dispersión C_{sca} es insignificante, pero al aumentar el tamaño de las AuNPs se observa la disminución en la eficiencia de absorción y un aumento en eficiencia de dispersión [17-20].

Se ha demostrado que *in vitro* las AuNPs son eficientes para terapia Fototérmica Plasmónica ya que la energía absorbida por la AuNPs se convierte rápidamente en calor (en el orden de los femtosegundos). Se alcanzan temperaturas de aproximadamente 800 °C alrededor de la nanopartícula, generando aumento de unas pocas decenas de grados a nivel macroscópico, suficientes para producir a nivel celular desnaturalización de proteínas, cambios conformacionales de ADN y/o ARN, entre otros que llevan a la muerte celular por destrucción celular térmica [21-25].

Una limitación de la aplicación de la terapia Fototérmica Plasmónica a nivel *in vivo*, es la alta absorción de la luz que presentan los tejidos biológicos, esto debido a la gran cantidad de agentes absorbentes presentes como la hemoglobina y la melanina, lo que ha impedido llevar al campo de aplicación clínica este tipo de terapia. Los estudios hasta ahora realizados en esta terapia comprenden medios homogéneos como el agua, donde las constantes dieléctricas son conocidas y la cantidad de calor generada por la nanopartícula sigue un modelo de distribución bien definido. Por otro lado, los estudios con medios complejos como tejidos biológicos no han sido descritos en su totalidad, ya que se presentan diversas dificultades para establecer los parámetros que determinan la cantidad de calor útil para impartir terapia Fototérmica Plasmónica.

Para establecer una metodología capaz de impartir de manera eficiente terapia Fototérmica Plasmónica se debe tomar en cuenta las propiedades ópticas del tipo de tejido y de las nanopartículas, además de las propiedades físicas del láser usado para la irradiación. Lo que hace extenso el campo de estudio en esta área.

Tomando en cuenta lo descrito anteriormente, el objetivo general de este proyecto es evaluar teóricamente el cambio de temperatura en tejido por la presencia del conjugado AuNP-RGD al ser irradiado con luz láser mediante un modelo de difusión de calor que considera los coeficientes de absorción, dispersión y extinción del sistema y correlacionar el valor teórico obtenido con el valor experimental al irradiar dicho sistema con luz láser de 532 nm.

CAPÍTULO II: ESTADO DEL ARTE

2.1. Estado del Arte

El cáncer es un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de “tumores malignos” o “neoplasias malignas”. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, este proceso es conocido como metástasis según el Instituto Nacional Del Cáncer [26]. La Organización Mundial de la Salud da por hecho que las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer [27]. Las células que forman estos tumores son llamadas células de cáncer.

Además, se sabe que el cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, acorde con la organización mundial de la salud (OMS) ya que en el 2012 se le atribuyeron 8.2 millones de muertes y se espera que los casos anuales diagnosticados aumentarán de 14 millones en el 2012 a 22 millones por año en las próximas décadas [28].

El cáncer es también la tercera causa de muerte en México y estimaciones de la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), cada año se suman más de 128,000 casos de mexicanos. Existen 100 tipos de cáncer, la mayoría son curables si se detectan en etapas tempranas. En México, el Institucional del Instituto Nacional de Cancerología reporta que el 60% de los casos son detectados en etapa avanzada.

El Instituto Nacional del Cáncer reporta que entre las terapias actuales empleadas para el tratamiento del cáncer se encuentran la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, entre otras [26]. Si bien estas han sido aceptadas y practicadas durante décadas presentan un gran número de inconvenientes y efectos secundarios, por tal motivo es necesaria la búsqueda de nuevas técnicas de diagnóstico y/o tratamiento que sean específicamente dirigidas a las células tumorales y así evitar el daño a las células normales, contrarrestando los efectos ocasionados.

Dentro de la Medicina Nuclear, encontramos a la radioterapia de blancos moleculares, la cual tiene como objetivo, entregar una dosis máxima de radiación a los tumores mediante el empleo de radiofármacos. Dicha entrega deberá ser de forma selectiva y localizada, para poder generar un efecto terapéutico a través del depósito de energía de las emisiones de partículas cargadas.

Con el propósito de implementar una radioterapia específica se han introducido metodologías que utilizan una gran cantidad de biomoléculas (anticuerpos monoclonales, péptidos bioactivos, agentes derivados de anticuerpos, unidades de reconocimiento

molecular, entre otros) radiomarcadas para terapia de tumores y terapia paliativa ósea (tratamiento del dolor en metástasis óseas) [29,30].

La angiogénesis según R. Haubner y C. Decristoforo es un proceso invasor caracterizado por la formación de vasos sanguíneos provenientes de vasos sanguíneos previamente formados. Este proceso se caracteriza por la proliferación de células endoteliales que conlleva a la formación de nuevos capilares por crecimiento celular. Existen diversos desórdenes que generan un desequilibrio en el organismo, que desencadenan el proceso de angiogénesis. Dentro de estos procesos se encuentran: artritis reumatoide, retinopatía diabética, soriasis y especialmente el crecimiento de tumor [31].

El crecimiento y la metástasis de tumores sólidos dependen de la formación de nuevos vasos sanguíneos que se originan del sistema vascular. Sin neovascularización suficiente que provea oxígeno y nutrientes a los tumores, éstos no pueden crecer más allá de 1-2 mm. Por otra parte, durante el proceso de angiogénesis los vasos sanguíneos recién creados permiten a las células tumorales diseminarse a través del torrente sanguíneo y formar metástasis en órganos distantes [6].

N. Ferrera, H. Gerber y J. LeCounter publicaron en el 2003 que las células tumorales necesitan una mayor cantidad de oxígeno para sobrevivir que las células normales del cuerpo, debido a su metabolismo acelerado. Cuando un tumor se encuentra en un estado de hipoxia libera diversos factores de crecimiento endotelial que propician la creación de nueva neovascularización. La producción y secreción de dichos factores se originan en las células del tumor los cuales son capturados por el tejido conector [32].

L. Joon, M. De Canny y N. P. Jiménez-Mancilla reportaron en 2005 y 2013 que la angiogénesis es un proceso de varias fases caracterizado por la respuesta quimiotáctica y mitogénica de las células endoteliales a los factores de crecimiento angiogénicos, la degradación proteolítica de la matriz extracelular y la modulación de la interacción de las células endoteliales con las proteínas de la matriz extracelular. Esta última interacción, con una variedad de receptores como las integrinas, en particular la $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ [33,34].

En 2012, M. A. Luna-Gutiérrez explicó que las integrinas son una superfamilia de receptores celulares, formadas por dos cadenas glucoproteicas, α y β . La asociación de dichas cadenas forma heterodímeros que se unen de forma no covalente y tienen funciones de señalar respuestas celulares diversas y específicas. Las integrinas reconocen diferentes proteínas de la matriz extracelular como por ejemplo fibronectina, lamininas, colágenos y vitronectina. Algunas de estas integrinas pueden ser específicas para una sola molécula, pero en cambio hay otras que pueden reconocer diferentes ligantes [7].

Como se muestra en la Figura 1, acorde con L. Sánchez-Hernández la secuencia tripeptídica Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (Arg-Gly-Asp=RGD), presente en muchas de

estas proteínas extracelulares, reconoce de manera específica a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ entre otras [24].

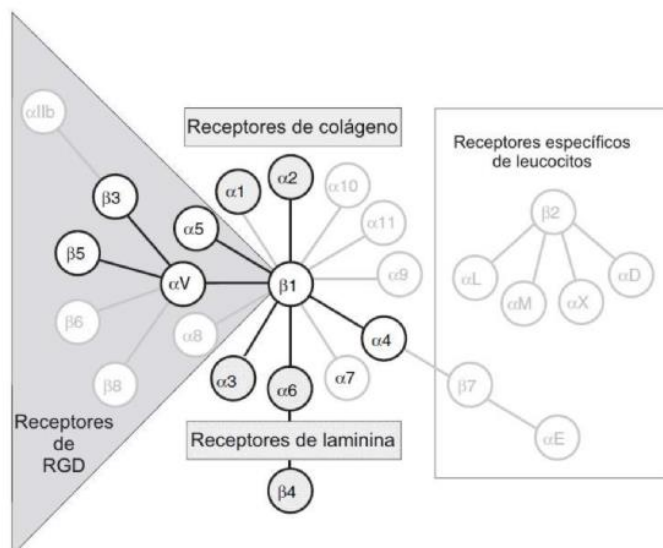


Figura 1: Las integrinas $\alpha\beta$ reconocen a diferentes proteínas de la matriz extracelular con secuencia RGD [24].

J., M. Scottelius y H. Wester en 2009 publicaron que las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ está expresada en bajos niveles sobre las células epiteliales y las células endoteliales maduras, pero está altamente expresada sobre las células endoteliales activadas en la neovascularura de tumores [35], incluyendo osteosarcomas, neuroblastomas, glioblastomas, melanomas, carcinomas de pulmón y cáncer de mama. La expresión de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ correlaciona bien con la progresión e invasividad del tumor en cáncer de mama, ovario, glioma y melanoma. Se ha demostrado que en el cáncer de mama las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ están sobreexpresadas tanto en las células endoteliales como en las células del tumor [24]. Por su expresión altamente definida durante la iniciación, el crecimiento, invasión y metástasis del tumor, las integrinas representan un blanco molecular importante para el diagnóstico temprano de tumores agresivos de rápido crecimiento y metástasis.

Por otro lado, el ^{177}Lu es uno de los radionúclidos más empleados en el área de Medicina Nuclear para dar tratamiento a diversos tipos de cáncer, debido al depósito de su energía en las inmediaciones del decaimiento, lo que genera una irradiación homogénea al sitio de interés (efecto de fuego cruzado). El lutecio-177 (^{177}Lu) es un isótopo radiactivo del Lu que tiene como número atómico 71 y masa atómica de 174.967 uma. Es un elemento sólido de color plateado y pertenece al grupo de los metales de transición. Es el metal más pesado, raro y caro de la serie de los lantánidos o tierras raras. El ^{177}Lu posee una vida media radiactiva de 6.71 días.

El sitio web Lutetium Advameg [12] reportó que el ^{177}Lu es un emisor beta negativo con una $E_{\text{max}} = 497 \text{ KeV}$ (abundancia 78.6%), 384 KeV (9.1%) y 176 KeV (12.2%) y una $E_{\text{min}} = 0.134 \text{ MeV}$ con un alcance promedio de 2 mm en tejido blando. Además, es un emisor de gamma $E_{\gamma} = 113 \text{ KeV}$ (6.4%) y 208 KeV (11% de abundancia), apropiado para la adquisición de imágenes *in vivo* en cámara gamma y por tomografía computarizada de emisión única (single photon emission computerized tomography, SPECT), para la realización de estudios dosimétricos personalizados previos a la terapia radionuclídica.

El ^{177}Lu es un candidato ideal para el radiomarcado de fármacos y tiene características favorables para ser empleado en terapia radionuclídica usando blancos moleculares específicos. La ventaja que posee el ^{177}Lu respecto a los emisores alfa es el efecto de fuego cruzado dado por las partículas que permite la irradiación de tejido tumoral en forma homogénea, incluso en regiones donde el radiofármaco no se acumula. El ^{177}Lu puede ser obtenido por reacción de captura neutrónica (n, γ) en un reactor a partir de la irradiación con neutrones térmicos de un blanco natural o enriquecido de $^{176}\text{LuO}_3$, o por la irradiación de un blanco de ^{176}Yb y la posterior separación electroquímica del ^{177}Lu del blanco de Yb.

El grupo de trabajo del Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) ha generado diversos radiofármacos entre los cuales se encuentran sistemas basados en nanopartículas de oro (AuNPs). Acorde con la página web <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/269/articulos/nanoparticulas-de-oro-aplicacion-medicina.html> [36] las nanopartículas de AuNP pueden ser definidas como sólidos ultra-finos bien definidos en forma y tamaño, con dimensiones de 1 a 100 nm. Actualmente, las aplicaciones de la nanopartículas se han incrementado en biomedicina, como liberadores de fármacos y como agentes terapéuticos y diagnósticos debido a que presentan características que las hacen adecuadas para su aplicación biomédica, incluyendo su síntesis relativamente fácil, estabilidad y su habilidad para incorporarse selectivamente a blancos moleculares específicos con alto reconocimiento molecular. Tienen excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son dependientes a su tamaño y forma. Además Chen PC. [37] en 2008 publicó que las AuNPs pueden ser fácilmente funcionalizadas con una amplia gama de biomoléculas dentro de los cuales destacan péptidos, proteínas, anticuerpos, radionúclidos, fármacos, etc.

El uso de las AuNPs no solo radica en la formación de nanosistemas multiméricos; por sus propiedades ópticas son consideradas buenas candidatas para la obtención de imágenes ópticas por contraste de fase, microscopía de campo oscuro, imagen fototérmica y/o imagen fotoacústica. Además, han sido propuestas como nanocalentadores ya que al absorber luz son capaces de convertir esa luz en energía calorífica [1-4]. Por lo anterior, en los últimos años, se han dirigido notables esfuerzos a la investigación y aplicación de las AuNPs en la detección temprana, diagnóstico y tratamiento del cáncer. En este sentido, es preciso subrayar el interés de éste proyecto dirigido a diseñar nanoplataformas en las que se combinan gracias a la utilización de AuNPs, RGD y ^{177}Lu los principios de diagnóstico y terapia del cáncer en un solo elemento.

En 2006 F. A. Moores y Goettmann explicaron que cuando la radiación electromagnética interactúa con una nanopartícula de oro en la región visible e IR del campo electromagnético, está causa una resonancia coherente de los electrones de los átomos del oro, obteniéndose así la oscilación colectiva de los electrones de superficie de los átomos de oro. A este fenómeno se le conoce como resonancia de plasmón de superficie (por sus siglas en inglés SPR), el esquema de la SPR se muestra en la Figura 2. Los electrones superficiales durante la SPR pasan de un estado estable a un estado excitado [15].

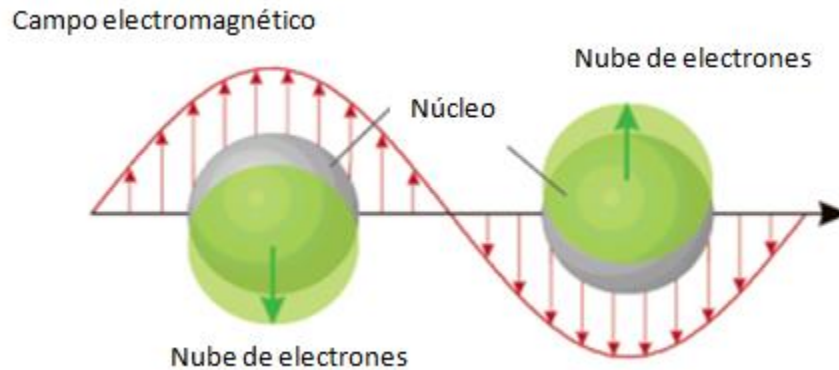


Figura 2: Esquema del fenómeno de Resonancia del Plasmón de Superficie [15].

Además, el campo eléctrico oscilante de la luz incidente induce físicamente en las AuNPs un dipolo eléctrico que desplaza parte de los electrones libres (electrones de la banda de conducción del Au) en una dirección lejos del resto de la partícula metálica. Al estar alejados los electrones exteriores de la nanopartícula, se genera una carga neta negativa en un lado de la partícula y el resto de los núcleos en conjunto con los electrones internos que no se desplazan constituyen una carga opuesta positiva. La separación de cargas actúa como una fuerza restauradora de equilibrio para las AuNPs [5,13-15,25].

Durante el fenómeno de SPR el medio circundante en el que se encuentran suspendidas las AuNPs intensifica varios procesos ópticos como: absorción, dispersión y extinción. Dichos procesos han sido relacionados con diversas aplicaciones en el campo de la medicina, por ejemplo: La dispersión causada ha sido propuesta para la obtención de imágenes ópticas por medio de campo oscuro, mientras que la energía absorbida por la AuNP ha sido propuesta con fines de calentamiento localizado [38,39].

Diversos grupos de investigación han reportado que las AuNPs de 20 nm presentan el fenómeno de SPR a una longitud de 520 nm, mientras que esta longitud es desplazada a mayor frecuencia con el aumento de tamaño de la AuNP. Las AuNPs de tamaños pequeños como 5, 10, 15 nm presentan una dispersión de energía menor en comparación con AuNPs de mayor tamaño, esto acorde con A. M. Gobin [39].

En 2012 S. Hashimoto publicó que la SPR depende de la longitud de onda incidente, el tipo de metal de la nanopartícula, forma, estructura, composición y la constante dieléctrica del medio circundante. Cabe señalar que para que se genere el efecto de SPR es necesario que se cumpla la siguiente relación: $\varepsilon_1 = -2\varepsilon_m$, donde ε_1 es determinada por la parte real de la función dieléctrica de las AuNPs y ε_m por la función dieléctrica del medio. En el caso de AuNPs suspendidas en agua, el efecto de SPR se encuentra alrededor de los 520 nm [13].

En el proceso de SPR la absorción y dispersión de la luz incidente por los electrones libres de la AuNPs, son descritas analíticamente por la teoría de Mie. Esta teoría provee la solución analítica exacta de las ecuaciones de Maxwell para la dispersión y absorción de las ondas electromagnéticas en nanopartículas esféricas. Esta teoría determina la probabilidad de absorción y dispersión mediante la sección eficaz de absorción C_{abs} (m²) y la sección eficaz de dispersión C_{sca} (m²) respectivamente y considera a la suma de éstas como la sección eficaz de extinción C_{ext} (m²). Cuando la sección eficaz es dividida por el área de interacción da como resultado la eficiencia, ya sea de absorción, dispersión y/o extinción [16].

Warner, Johnson y Giannios publicaron que las propiedades ópticas de absorción y dispersión son fuertemente dependientes del tamaño, forma y función dieléctrica del medio circundante, por ejemplo, para partículas pequeñas esféricas (5-10nm de diámetro) en agua la eficiencia de extinción C_{ext} es igual a la eficiencia de absorción C_{abs} y la eficiencia de dispersión C_{sca} es insignificante, pero al aumentar el tamaño de las AuNPs se observa la disminución en la eficiencia de absorción y un aumento en eficiencia de dispersión [17-20]. Estos parámetros C_{abs} , C_{sca} y C_{ext} se han calculado en el caso de AuNPs dispersas en un medio homogéneo, pero no para tejidos específicos.

2.2. Planteamiento del problema

La terapia fototérmica plasmónica generada a partir de AuNPs tiene como fin principal ocasionar daños celulares irreversibles por medio del aumento incontrolado de temperatura, efecto conocido como hipertermia. Debido a que este aumento de temperatura es producido alrededor de la AuNP y por las dimensiones nanométricas que esta tiene es imposible cuantificar el incremento de la temperatura por nanopartícula.

2.2.1. Pregunta de investigación:

¿Es posible calcular el cambio de temperatura en tejido por efecto fototérmico plasmónico a partir de un modelo de difusión de calor que considere como variables fundamentales parámetros de irradiación (frecuencia, tiempo y área) y los coeficientes de absorción, dispersión y extinción del ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD?

2.3. Hipótesis

A partir de un modelo de difusión de calor que considere como variables fundamentales los parámetros de irradiación (frecuencia, tiempo y área) y los coeficientes de absorción, dispersión y extinción de $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$, se puede determinar el cambio de temperatura en tejido por efecto fototérmico plasmónico.

2.4. Objetivos

2.4.1 Objetivo General

Evaluar teóricamente el cambio de temperatura en tejido por la presencia del $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ al ser irradiado con luz láser mediante un modelo de difusión de calor que considere los coeficientes de absorción, dispersión y extinción del sistema y correlacionarlo con el valor experimental al irradiar dicho sistema con luz láser de 532 nm.

2.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar teóricamente las constantes dieléctricas de las AuNPs, AuNP-RGD y $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ en tejido y agua tipo 1 (control).
- Calcular teóricamente los coeficientes de absorción, dispersión y extinción de las $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ en tejido y agua tipo 1 (control).
- Determinar el cambio de temperatura en tejido y agua tipo 1 (control) mediante un modelo de difusión de calor que considere como variables fundamentales los parámetros de irradiación (frecuencia, tiempo y área) y los coeficientes de absorción, dispersión y extinción de $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$.
- Determinar experimentalmente el cambio de temperatura generado por el sistema $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ en tejido y agua tipo 1 (control), considerando diferentes niveles en los parámetros de irradiación de frecuencia y tiempo del láser de Nd:YAG (532 nm).
- Correlacionar teórica y experimentalmente los resultados obtenidos en el cambio de temperatura por el efecto fototérmico plasmónico del sistema $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ en tejido.

CAPÍTULO III: MARCO TEÓRICO

3.1. Interacción de Luz con AuNPs

Cuando las AuNPs se exponen a radiación electromagnética en el rango visible e IR, la oscilación del campo electromagnético de la luz induce una oscilación colectiva de los electrones libres presentes en el arreglo periódico de los átomos. Los electrones libres forman un dipolo en dirección al campo eléctrico de la luz. Se sabe que la máxima amplitud de oscilación se da a una frecuencia específica, llamada resonancia del plasmón de superficie (SPR, por sus siglas en inglés). La SPR depende de la longitud de onda incidente, el tipo de metal de la nanopartícula, forma, estructura, composición y la constante dieléctrica del medio circundante.

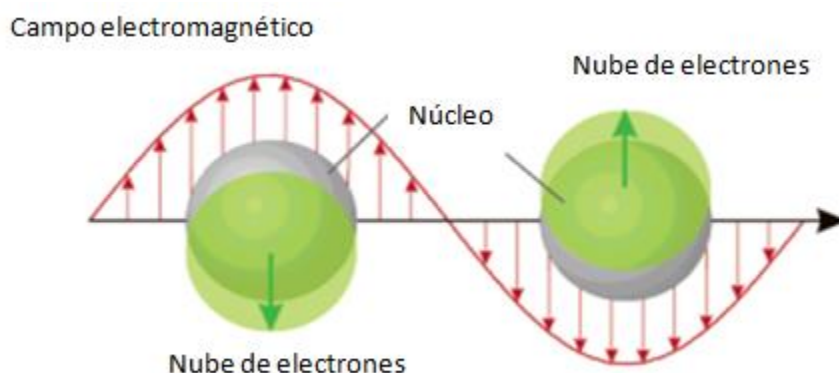


Figura 3: Esquema del fenómeno de Resonancia del Plasmón de Superficie [15].

Para que se genere el efecto de SPR es necesario que se cumpla la siguiente relación entre las nanopartículas y el medio circundante:

$$\varepsilon_1 = -2\varepsilon_m \quad (1)$$

Donde ε_1 es la parte real de la función dieléctrica de la partícula y ε_m es la función dieléctrica del medio. En el caso de AuNPs suspendidas en agua el efecto de SPR se presenta al irradiar con radiación electromagnética de 520 nm. Para generar un proceso de SPR continuo sobre la AuNP se ha recurrido a la irradiación con luz láser.

En la SPR los electrones libres de la AuNPs absorben y dispersan a la luz incidente, estos procesos son descritos analíticamente por la teoría de Mie.

3.2. Teoría MIE

Esta teoría provee la solución analítica exacta de las ecuaciones de Maxwell para la dispersión y absorción de las ondas electromagnéticas en nanopartículas esféricas. Esta teoría, determina la probabilidad de absorción y dispersión mediante la sección eficaz de absorción C_{abs} (m²) y la sección eficaz de dispersión C_{sca} (m²) respectivamente y considera a la suma de éstas como la sección eficaz de extinción C_{ext} (m²).

Para el caso específico de partículas esféricas irradiadas con una longitud de la onda λ que es mayor que el tamaño de la partícula, las C_{abs} , C_{sca} y C_{ext} son definidas como se muestran a continuación:

$$C_{ext} = \frac{12\pi\omega R^3}{c_0} \frac{\varepsilon_m^{3/2} \varepsilon_2(\omega)}{[\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_m]^2 + \varepsilon_2(\omega)^2} \quad (2)$$

$$C_{sca} = \frac{128\pi^5 R^6 \varepsilon_m^2}{(\pi R^2) 3\lambda^4} \left[\frac{(\varepsilon_1(\omega) - \varepsilon_m)^2 + \varepsilon_2(\omega)^2}{[\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_m]^2 + \varepsilon_2(\omega)^2} \right] \quad (3)$$

$$C_{abs} = C_{ext} - C_{sca} \quad (4)$$

Donde: R es el radio de la nanopartícula, c_0 es la velocidad de la luz en el vacío, λ es la longitud de onda de la luz que incide en el medio, ω es la frecuencia angular de la luz que incide en el medio, ε_m es la constante dieléctrica del medio que circundante, $\varepsilon_1(\omega)$ y $\varepsilon_2(\omega)$ son términos de la función dieléctrica de la nanopartícula [13].

Al dividir cada una de las secciones eficaces por el área de interacción se tienen como resultado las eficiencias de absorción (Q_{abs}), dispersión (Q_{sca}) y extinción (Q_{ext}), matemáticamente descritas por las siguientes ecuaciones:

$$Q_{abs} = \frac{C_{abs}}{\pi r^2} \quad (5)$$

$$Q_{sca} = \frac{C_{sca}}{\pi r^2} \quad (6)$$

$$Q_{ext} = \frac{C_{ext}}{\pi r^2} \quad (7)$$

La dispersión generada por la AuNP ha sido propuesta para la obtención de imágenes por dispersión, mientras que la absorción ha sido propuesta para impartir terapia fototérmica plasmónica. Al ocurrir la resonancia del plasmón de superficie en la nanopartícula, los electrones superficiales se encuentran en estado excitado, por lo que al regresar a su estado base necesitan liberar ese exceso de energía. Esta liberación de energía es cedida al medio por medio de energía térmica que es la que produce el aumento de temperatura alrededor de la nanopartícula. El coeficiente de absorción (C_{abs}) está directamente relacionado con la producción de calor que genera la AuNP y se ha demostrado que causa destrucción celular térmica irreversible.

Las propiedades ópticas de absorción y dispersión son fuertemente dependientes del tamaño, forma y función dieléctrica del medio circundante, por ejemplo, para partículas pequeñas esféricas (5-10 nm de diámetro) en agua la eficiencia de extinción C_{ext} es igual a la eficiencia de absorción C_{abs} y la eficiencia de dispersión C_{sca} es insignificante. Pero, al aumentar el tamaño de las AuNPs se observa la disminución en la eficiencia de absorción y un aumento en la eficiencia de dispersión.

Se ha demostrado que *in vitro* las AuNPs son eficientes para terapia fototérmica plasmónica, ya que la energía absorbida por la AuNP, se convierte rápidamente en calor (en el orden de los femtosegundos). Se alcanzan temperaturas de aproximadamente 800 °C alrededor de la nanopartícula, generando aumento de unas pocas decenas de grados a nivel macroscópico, suficientes para producir a nivel celular desnaturalización de proteínas, cambios conformacionales de ADN y/o ARN, entre otros que llevan a la muerte celular por destrucción celular térmica.

El proceso de conversión de energía a calor alrededor de la AuNP se lleva a cabo en el orden de femtosegundos generándose una red caliente que transporta esta energía por medio de fonones, que son ondas mecánicas que transmiten la energía al medio. La explicación matemática de este proceso se ha descrito por medio del uso de modelos de temperatura ya sea de una temperatura o de dos temperaturas, los cuales han considerado a todo el sistema de irradiación como una red homogénea o bien como dos muestras independientes considerándolos como un sistema con fronteras delimitadas.

3.3. Radiación electromagnética: Láser

La palabra láser es un acrónimo de las palabras en inglés: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, traducido como: amplificación de luz mediante emisión estimulada de radiación. Así bien, un láser es un dispositivo cuántico, que sirve para generar ondas

electromagnéticas con características bien definidas. La radiación láser es monocromática (una sola longitud de onda), posee una gran direccionalidad (escasa divergencia) y puede concentrar un elevado número de fotones en fase en áreas muy pequeñas.

Actualmente, existen láseres que emiten en el visible, infrarrojo, ultravioleta e, incluso, en la banda espectral de los rayos X. Algunos láseres, como los de colorantes, permiten sintonizar la emisión dentro de una gama de frecuencias.

3.3.1. Características Físicas de la Emisión Láser

La radiación láser posee todas las propiedades de la luz; sin embargo, se caracteriza por ser: monocromática, coherente y direccional (el haz de radiación presenta escasa divergencia, fruto de las dos características anteriores). La principal utilidad práctica de la radiación láser reside en que concentra un gran número de fotones por unidad de superficie. A continuación se detalla cada una de las propiedades anteriormente mencionada de los láseres.

Monocromaticidad: Está referida a la alta precisión de la frecuencia de la luz emitida. Es una de las principales características de la radiación láser. Permite aprovechar las características físicas y biológicas que posee la radiación de una longitud de onda determinada.

Coherencia: En contraposición a la radiación luminosa convencional, de componentes desorganizados o incoherentes, la radiación coherente es aquella en la que todos sus fotones están en fase. Al coincidir en una misma dirección de propagación, los estados vibracionales se suman. El resultado es un efecto de amplificación en la intensidad luminosa emitida, característica de la radiación láser.

Direccionalidad: Esta característica se refiere a la disposición de una cavidad resonante, uno de los requisitos técnicos más importantes en la construcción de los sistemas láser. La cavidad resonante asegura otra de las características de esta radiación, su escasa divergencia. Dado que sólo se amplifican los fotones emitidos en el sentido de un eje del material emisor, la radiación resultante posee una marcada direccionalidad de emisión, lo cual la hace idónea para diversas aplicaciones prácticas, en las que se requiere precisión en la iluminación.

Emisión Estimulada De Radiación: Para que se produzca una emisión coherente, es necesario que los electrones corticales del material emisor se desexciten al mismo tiempo y siempre entre los mismos niveles. El fenómeno por el que puede alcanzarse esta situación fue descrito por Einstein en 1917, quien lo denominó «emisión estimulada de radiación». Esta teoría explica el equilibrio térmico de un gas, que simultáneamente estuviera absorbiendo y emitiendo energía radiante. La teoría indica que es necesario admitir la existencia de una cierta emisión de radiación inducida, por lo que en el experimento están implicados tres procesos: absorción, emisión espontánea y emisión estimulada. La emisión

estimulada es un proceso en el que, al interactuar con un átomo excitado un fotón cuya energía es idéntica a la que este átomo emitiría al desexcitarse espontáneamente, se induce la inmediata desexcitación y, con ello, la emisión de un fotón absolutamente idéntico al primero en frecuencia, fase y dirección.

3.3.2. Producción de Radiación Láser

Un sistema de emisión láser debe constar, de un medio activo, un sistema de bombeo y una cavidad resonante. Al desexcitarse los átomos del medio activo, se genera radiación monocromática de longitud de onda característica, fenómeno que se estimula en presencia de otra radiación de igual longitud de onda. El sistema de bombeo debe aportar la energía necesaria para producir la excitación de los átomos. Por último, la cavidad resonante, constituida por dos paredes reflectantes paralelas, consigue un gran flujo de fotones en la misma dirección. Uno de los espejos de la cavidad resonante, parcialmente reflectante, permite la emisión de un haz de radiación con escasa divergencia. Al mismo tiempo, los fotones que se encuentran «en resonancia», a su paso por el medio activo, estimulan la emisión de más radiación.

3.3.3. DESCRIPCION DE UN LASER DE Nd:YAG PULSADO

Un **Láser Nd-YAG** (acrónimo del inglés *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) es un dispositivo de emisión láser de estado sólido que posee óxido de itrio y aluminio cristalino cuya red hace de anfitrión ya que está dopada con neodimio que hace de huésped formando la especie ($\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$), una variedad de granate.

Los láseres Nd:YAG se bombean de forma óptica con una lámpara de flash o matriz de diodos láser. Son uno de los tipos de láser más comunes y se los utiliza en diferentes aplicaciones. Por lo general, emiten una luz con una longitud de onda de 1064 nm, pero puede ser de doble frecuencia (532 nm, verde) o triple (266 nm, azul). Los láseres Nd:YAG funcionan tanto en modo de onda pulsada como continua (CW, por sus siglas en inglés). Los láseres Nd:YAG pulsados comúnmente funcionan en un modo por conmutación Q.

La conmutación Q se logra colocando un atenuador variable dentro del resonador óptico del láser. Cuando el atenuador está en funcionamiento, la luz que deja el medio de ganancia no vuelve y no se puede comenzar a usar el rayo láser. Esta atenuación dentro de la cavidad corresponde a una disminución en el factor Q (calidad) del resonador óptico. Un factor Q alto corresponde a bajas pérdidas de resonador por vuelta, y viceversa. El atenuador variable se denomina comúnmente "**conmutación Q**", si se lo usa con este propósito

3.3.4. Parámetros característicos de un Láser Pulsado

- Energía pico (E_p): Se le denomina energía pico a la energía de salida que tiene cada pulso del láser.
- Potencia pico (P_p): Se le denomina potencia pico o potencia de emisión a la relación entre la energía de salida y el tiempo (t_p) que tiene cada pulso.
- Potencia Media: La potencia media puede calcularse de la siguiente manera:
Energía pico de un pulso $E_p = P_p t_p$
Potencia media $P_m = P_p t_p f = E_p f$
Donde P_p es la potencia pico, t_p es el tiempo de duración del pulso y f es la frecuencia de repetición (número de pulsos por segundo).
- Densidad de Potencia (DP): Se denomina densidad de potencia a la relación entre la potencia de emisión y la superficie de irradiación: $DP = P_m/S$ (W/cm^2).
En las radiaciones ópticas, recibe el nombre de irradiancia y representa la concentración de fotones sobre el punto o superficie irradiada por unidad de tiempo.
- Densidad de Energía (DE): La densidad de energía o fluencia de energía, también denominada exposición radiante, representa la densidad de potencia o irradiancia durante el tiempo de aplicación t : $DE = DP * t$ ($W * t = J/cm^2$).

3.4. Distribución de la Temperatura: Modelo de una Temperatura

Durante la interacción de un pulso de láser de intensidad I_0 con duración de pulso τ_L y una nanopartícula metálica de radio r_0 , la energía del láser es absorbida por los electrones libres debido al fenómeno inverso de Bremsstrahlung y luego se transfiere desde el gas de electrones a la celosía [13].

En el modelo de una temperatura OTM por sus siglas en inglés, se supone que la transferencia de calor de electrones en el subsistema de fonones es muy rápida, es decir, las temperaturas de los electrones y de la red son iguales $T_e = T_o$ en cualquier momento del tiempo por lo que se considera que el sistema presenta equilibrio térmico y conservación del principio de la energía entre sus componentes.

En la aproximación OTM, podemos limitar la descripción a una distribución de la temperatura de la red, $dT_o(t, R_0)$, la cual puede ser encontrada por solución numérica de la ecuación de transferencia de masa de calor entre la partícula y el medio circundante:

$$\frac{dT_o(t, R_0)}{dt} = \frac{\mu_o(T_o)}{\rho_o C_{e_o}(T_o)} \Delta T_o(t, R_0) + \frac{Q(t, R_0)}{\rho_o C_o(T_o)} - j_D(T_o) S_0 + \frac{3L}{r_0 C_o(T_o)} \frac{dR_0}{dt} \quad (8)$$

Donde $\Delta = \partial^2/\partial x^2 + \partial^2/\partial y^2 + \partial^2/\partial z^2$ es un operador de Laplace; $\mu_o(T_o)$, $C_{e_o}(T_o)$, L , ρ_o y R_o son, respectivamente, la conductividad térmica, calor específico, calor de evaporación, la densidad y el radio de la nanopartícula; $Q(t, R_o)$ es una fuente de calor; $j_D(T_o)$ es la pérdida de calor desde la superficie de la nanopartícula en el medio circundante; $S_o = 4\pi R_o^2$ es el área de superficie de la partícula [40].

La densidad de potencia en la generación de energía en las partículas $Q(t, r)$ debido a la absorción de energía de radiación es generalmente no uniforme en todo el volumen de las partículas. La no uniformidad es dependiente de las constantes ópticas y del tamaño de la partícula. Dado que para las nanopartículas $2\pi R_o/\lambda < 1$, se puede asumir que $Q(t, r)$ es uniforme en todo el volumen de la nanopartícula, y puede ser descrita por la ecuación:

$$Q(t, R_o) = \frac{3K_{abs}(R_o, \lambda)I_0f(t)}{4R_o} \quad (9)$$

Donde $K_{abs}(R_o, \lambda)$ es la eficiencia de absorción de la nanopartícula como función de la longitud de onda λ del láser, el radio de la partícula R_o y $f(t)$ la función que describe la forma del pulso del láser [40].

El intercambio de calor entre la superficie de la nanopartícula y el medio circundante es rápido y la pérdida de calor se vuelve sustancial para pulsos de láser relativamente largos. Suponiendo que la pérdida de calor de la superficie de las nanopartículas se produce sólo debido a la difusión del calor en el medio circundante, la densidad de reflujo de energía $j_D(T_o)$ removida de la superficie de la partícula puede ser expresada como una función no lineal de la temperatura [14]:

$$j_D(T_o) = \frac{\mu_\infty T_o}{(s+1)R_o^2 C_{e_o}(T_o)\rho_o} \left[\left(\frac{T_o}{T_\infty} \right)^{s+1} - 1 \right] \quad (10)$$

Donde μ_∞ es la conductividad de calor del medio circundante a temperatura normal T_∞ y el exponente s es la constante que depende de las propiedades térmicas del medio circundante. Después de la integración sobre el volumen para el caso de simetría esférica y la transición a una temperatura uniforme en todo el volumen de la partícula, la ecuación que describe la cinética de calentamiento por láser de la nanopartícula y resultados a partir de (8) toma la siguiente forma:

$$\frac{dT_o}{dt} = \frac{3K_{abs}(R_o, \lambda)I_0f(t)}{4R_o C_{e_o}(T_o)\rho_o} - \frac{\mu_\infty T_o}{(s+1)R_o^2 C_{e_o}(T_o)\rho_o} \left[\left(\frac{T_o}{T_\infty} \right)^{s+1} - 1 \right] + \frac{3L}{R_o C_{e_o}(T_o)} \frac{dR_o}{dt} \quad (11)$$

Aquí, el primer término de la derecha de la ecuación describe la generación de calor en el volumen esférico debido a la absorción de energía por láser de la nanopartícula. El segundo término describe las pérdidas de energía de la superficie de la partícula en el medio circundante debido al proceso de difusión de calor. El último término describe las pérdidas de energía debido a la evaporación de la partícula. Esta evaporación depende de las características del pulso láser y propiedades de las partículas y se puede realizar en cuatro diferentes regímenes: molecular libre, por convección, dinámica de gas y explosión. Dentro de la aproximación de flujo libre molecular, el término evaporación en (11) se puede escribir como [14]:

$$4\pi R_0^2 \frac{dR_0}{dt} \rho_0 = -\eta 4\pi R_0^2 V_s(T_s) \rho_v(T_0) \quad (12)$$

Donde η es el coeficiente de acomodamiento, $V_s(T_s)$ y $\rho_v(T_s)$ son respectivamente, la velocidad promedio y la densidad del vapor a temperatura T_s . Si el calentamiento de la nanopartícula se produce debajo de la temperatura de transición de fase en el material de la partícula, el tercer término del lado derecho de (11) se puede despreciar [14].

CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA

En este capítulo se presenta el desarrollo experimental realizado para finalmente llegar a exponer a un campo de irradiación láser al sistema coloidal ^{177}Lu -AuNP-RGD suspendido en agua, hígado y colon. El conjugado AuNP-c[RGDfK(C)] se preparó por reacción espontánea del grupo tiol de la cisteína con los átomos de oro de la superficie de la nanopartícula, según la metodología reportada por Luna-Gutiérrez et al. [6]. El sistema fue caracterizado antes y después de la irradiación.

4.1. Caracterización química y estructural del sistema AuNP-c[RGDfK(C)]

4.1.1. Caracterización por UV-Vis

La espectrofotometría Ultravioleta-Visible (UV-Vis) es una técnica espectroscópica que brinda información sobre transiciones electrónicas que involucran absorción y emisión de energía correspondiente a esta región del espectro electromagnético. Con esta técnica se mide la energía requerida para promover electrones a un nivel energético más alto.

Los espectros UV-Vis de 400 a 800 nm para los sistemas AuNP y AuNP-c[RGDfK(C)] de 20 nm se obtuvieron con un espectrómetro Perkin-Elmer Lambda Bio usando una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico. En los nanoconjugados se monitoreó la SPR, para observar el desplazamiento de la banda de plasmón de superficie de la AuNP (520nm) antes y después de la irradiación.

4.1.2. Caracterización por TEM

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es generalmente considerado en el estudio de las propiedades de superficie de un sólido ya que proporciona información morfológica y topográfica de la muestra bajo estudio [41]. El estudio morfológico y la distribución del tamaño de las AuNP se obtuvieron por TEM, utilizando, un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL JEM 2010 HT que opera a 200 kV. Las muestras se prepararon colocando una gota de la solución de nanopartículas conjugadas en rejillas de cobre recubiertas con carbon.

4.2. Determinación de los índices de refracción del Oro, Hígado y Colon.

A nivel coloidal los materiales presentan un índice de refracción que puede representarse por un número compuesto con una parte real (n) y una parte imaginaria (k) descrito matemáticamente como sigue:

$$\tilde{n} = n + ik \quad (13)$$

Por otro lado, las constantes dieléctricas están directamente relacionadas con el índice de refracción (\tilde{n}) del material. Esta relación viene dada por la siguiente ecuación:

$$\varepsilon_m = \tilde{n}^2 \quad (14)$$

Donde ε_m representa la constante dieléctrica de un medio que también está descrita por una parte real (ε') y una compleja (ε'') y se expresa de la siguiente forma:

$$\varepsilon = \varepsilon' + i\varepsilon'' \quad (15)$$

Así, tenemos que:

$$\varepsilon' = n^2 - k^2 \quad (16)$$

$$\varepsilon'' = 2nk \quad (17)$$

4.2.1. Oro

De acuerdo con Johnson y Chisty [18], en la tabla 1 se muestra las componentes n y k del índice de refracción de oro dependientes de la energía.

Tabla 1: Valores que definen las funciones n y k del oro

E (eV)	n	Δn	k	Δk
1.26	0.22	0.02	6.35	0.05
1.39	0.17	0.02	5.663	0.03
1.51	0.16	0.02	5.083	0.025
1.64	0.14	0.02	4.542	0.015
1.76	0.13	0.02	4.103	0.01
1.88	0.14	0.02	3.697	0.007
2.01	0.21	0.02	3.272	0.007
2.13	0.29	0.02	2.863	0.007
2.26	0.43	0.02	2.455	0.007
2.38	0.62	0.02	2.081	0.007
2.50	1.04	0.02	1.833	0.007
2.63	1.31	0.02	1.849	0.007
2.75	1.38	0.02	1.914	0.007
2.88	1.45	0.02	1.948	0.007

Partiendo de la tabla 1 se obtuvieron las componentes n y k del índice de refracción del oro dependiente de la longitud de onda utilizando la siguiente ecuación:

$$\lambda = \frac{hc}{E} \quad (18)$$

Donde $h = 4.1357 \times 10^{-15}$ eVs, $c = 3.00 \times 10^8$ m/s, E la energía y λ la longitud de onda.

4.2.2. Hígado

Partiendo de los resultados reportados por Giannios y Konstantinos [20], se obtuvieron las componentes n y k del índice de refracción del tejido hígado. En el tejido hígado se tiene que la parte real del índice de refracción está dada por la siguiente función:

$$n_h = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \quad (19)$$

La parte compleja del índice de refracción del hígado está dada como:

$$k_h = a\lambda^{1-b} \quad (20)$$

Donde λ es la longitud de onda, y las constantes A , B , C , a y b se muestra en la tabla 2:

Tabla 2: Valores que definen las funciones n y k del medio hígado

	A	B (μm^2)	C (μm^4)	a	b
Hígado	1.3591	0.00827	-0,000576	0.0196	1.27

4.2.3. Colon

Partiendo de los resultados reportados por Giannios y Konstantinos [20], se obtuvieron las componentes n y k del índice de refracción del tejido Colon. Al igual que en el caso del hígado, el índice de refracción del tejido colon está descrito por la siguiente ecuación:

$$n_c = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \quad (21)$$

Donde A , B y C se muestran en la siguiente tabla 3:

Tabla 3: Valores que definen la función n del medio colon

	A	B	C
Colon	1.321743411	9941.336	-890,957E6

Y la parte compleja k del índice de refracción del colon está descrita por la siguiente ecuación:

$$k_c = A1 + \frac{B1}{\lambda^2} + \frac{C1}{\lambda^4} \quad (22)$$

Donde $A1$, $B1$ y $C1$ se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4: Valores que definen la función k del medio colon

	$A1$	$B1$	$C1$
Colon	0.003436864	682.889	-34,285E6

4.3. Determinación de las constantes dieléctricas del Oro, Hígado y Colon.

4.3.1. Oro

Utilizando los valores de n y k de Johnson y Christy [18] se obtuvo la parte real ($\epsilon_1 = n^2 - k^2$) y la parte compleja ($\epsilon_2 = 2nk$) de la función dieléctrica dependientes de la longitud de onda.

4.3.2. Hígado y Colon

Para el medio (hígado y tejido de colon) las constantes dieléctricas complejas se obtuvieron utilizando las n y k respectivas mediante el mismo procedimiento empleado para las AuNP, pero empleando el índice complejo de refracción reportado por Giannios y Koutsoumpou [19].

4.4. Cálculo teórico de los coeficientes de absorción, dispersión y extinción

Mediante el uso de las ecuaciones provistas por la Teoría Mie, referenciadas en este proyecto por las ecuaciones (2), (3), (4) y la variación de las condiciones de tamaño (Radio) y los valores de las constantes dieléctricas obtenidos en los puntos anteriores se realizó una simulación teórica computacional para obtener las funciones de la sección eficaz de absorción, dispersión y extinción de los sistemas AuNP y AuNP-RGD en los tejidos hígado y colón y en agua.

4.5. Determinación del cambio de temperatura en tejido y agua

Al considerar el equilibrio térmico y el principio de conservación de la energía en los sistemas de AuNP y AuNP-RGD suspendidos en agua y tejido al ser irradiados con luz láser se tiene que:

Las partículas de ambos sistemas logran la misma energía y por tanto la misma temperatura, por lo que la *cantidad de calor Perdido* (Q_o) de la partícula (Sistema 1) debe ser igual a la *cantidad de calor ganado* (Q_w) por el medio (Sistema 2).

Teniendo en cuenta que para el sistema 1:

$$Q_o = m_o C_{e_o} \Delta T \quad (23)$$

Donde m_o es su masa, C_{e_o} es el calor específico y $\Delta T = T_{o_0} - T_f$, donde T_f es la temperatura final que tendrán ambos sistemas debida al equilibrio térmico y T_{o_0} es el valor de temperatura inicial que tiene este sistema.

Para el sistema 2 se tiene en cuenta que:

$$Q_w = m_w C_{e_w} \Delta T \quad (24)$$

Donde m_w es la masa del sistema, C_{e_w} es su calor específico y $\Delta T = T_f - T_{w_0}$ donde T_f es la temperatura final que tendrán ambos sistemas debida al equilibrio térmico y T_{w_0} es la temperatura inicial a la que esté estará.

Así bien, para que la AuNP y una masa de agua dada entren en equilibrio térmico se tiene que cumplir que:

$$Q_o = Q_w \text{ (Cantidad de calor Perdido = Cantidad de calor Ganado)} \quad (25)$$

Entonces tenemos que:

Para el agua: $Q_w = m_w C_{e_w} \Delta T$ ($Q_w \rightarrow$ Cantidad de calor ganado)

Donde: m_w = Masa de agua, C_{e_w} = Calor específico del agua, $\Delta T = T_f - T_{w_0}$ con T_f la temperatura final que se tendrá debida al equilibrio térmico entre la AuNP y el medio y T_{w_0} es la temperatura inicial a la que estará el medio.

El valor de m_w se obtuvo conociendo la densidad y volumen de agua que le corresponde a una AuNP. El volumen de agua correspondiente a una AuNP " V_w " se obtiene al dividir el volumen total de agua entre el número de AuNPs que está contiene. Una vez calculado este Volumen de agua V_w , se calcula la masa del agua por medio de la ecuación:

$$m_w = V_w \rho_w \quad (26)$$

Donde ρ_w es la densidad del agua.

Para el oro: $Q_o = m_o C_{e_o} \Delta T$ ($Q_o \rightarrow$ Cantidad de calor perdido)

Donde: m_o = Masa de una AuNP, C_{e_o} = Calor específico del Oro y $\Delta T = T_{o_0} - T_f$, con T_f la temperatura final que se tendrá debida al equilibrio térmico entre la AuNP y el medio y T_{o_0} es el valor de temperatura que dará el modelo de una temperatura.

El valor de m_o se obtuvo conociendo la densidad del oro y el volumen de una AuNP.

El volumen de una AuNP " V_o " se obtiene por medio de la siguiente ecuación:

$$m_o = V_o \rho_o \quad (27)$$

Donde $V_o = \frac{4}{3} \pi r^3$ y ρ_o es la densidad del oro.

El cálculo de la temperatura final (T_f), de la masa de agua y de la AuNP se obtiene como ya se dijo considerando conservación de energía $Q_o = Q_w$ (Cantidad de calor Perdido = Cantidad de calor Ganado).

De donde:

$$m_o C_{e_o} \Delta T = m_w C_{e_w} \Delta T \quad (28)$$

Así bien, despejando la temperatura final a la que estará la masa de agua y la AuNP, se tiene que:

$$\rightarrow T_f = \frac{m_w C_{e_w} T_{w_0} + m_o C_{e_o} T_{o_0}}{m_w C_{e_w} + m_o C_{e_o}} \quad (29)$$

Donde T_f es la temperatura final de la masa de agua una vez que la AuNP disipa su calor, y es la misma temperatura a la que estará todo el medio. Sin embargo, experimentalmente esta temperatura no será obtenida, ya que es necesario incluir la contribución de temperatura que tendrá el medio debido a la luz láser.

La contribución de temperatura que tendrá el medio, debida al láser se obtuvo experimentalmente irradiando un medio de agua sin AuNPs de igual masa que el medio de

agua con AuNPs. Al obtener los valores de temperatura vs tiempo se construyó experimentalmente la función DE_i que modela dicho proceso.

Así bien, la temperatura final que tendrá toda la muestra de agua debida a la contribución de calor por las AuNPs y aun pulso del láser fue descrita de la forma siguiente:

$$T_f = \frac{m_w C_{e_w} T_{w_0} + m_o C_{e_o} T_{o_0}}{m_w C_{e_w} + m_o C_{e_o}} + DE_1 \quad (30)$$

Donde DE_1 es el calor generado al medio debido al primer pulso emitido por el láser; para n pulsos de laser se desarrolló el siguiente modelo de temperatura, donde la temperatura final del medio es:

$$T_{f_n} = \left(\frac{b}{c}\right)^n T_0 + \sum_{i=1}^n \left(\frac{b}{c}\right)^{n-i} DE_i + a \sum_{i=1}^n \frac{b^{i-1}}{c^i} \quad (31)$$

Donde:

$$a = C_{e_o} m_o T_{o_0}$$

$$b = C_{e_w} m_w T_{w_0}$$

$$c = C_{e_o} m_o + C_{e_w} m_w$$

4.6. Determinación experimental de la temperatura generada por los sistemas AuNP y AuNP-RGD en agua

La irradiación se llevó a cabo mediante el uso de un láser de Nd:YAG (Qsmart-100, quantel laser) con duración de pulso de 5 ns y longitud de onda de irradiación de 532 nm (energía = 45.9 mJ/pulso) con una frecuencia de repetición de 5, 10 y 15 Hz.

Se diseñó un arreglo experimental de irradiación el cual se muestra esquemáticamente en la figura 6 que consistió en la focalización del haz de energía sobre un pozo de una placa de 96 pozos, donde se contenía la muestra, de manera que el pozo de la placa quedó totalmente cubierto por la luz láser (diámetro = 7 mm, área = 0.38 cm²). La placa se colocó en una plancha de calentamiento a 37 °C (Microplaca ThermoShaker, HumanLab MB100-2A, Hangzhou Zhejia, China) durante la irradiación.

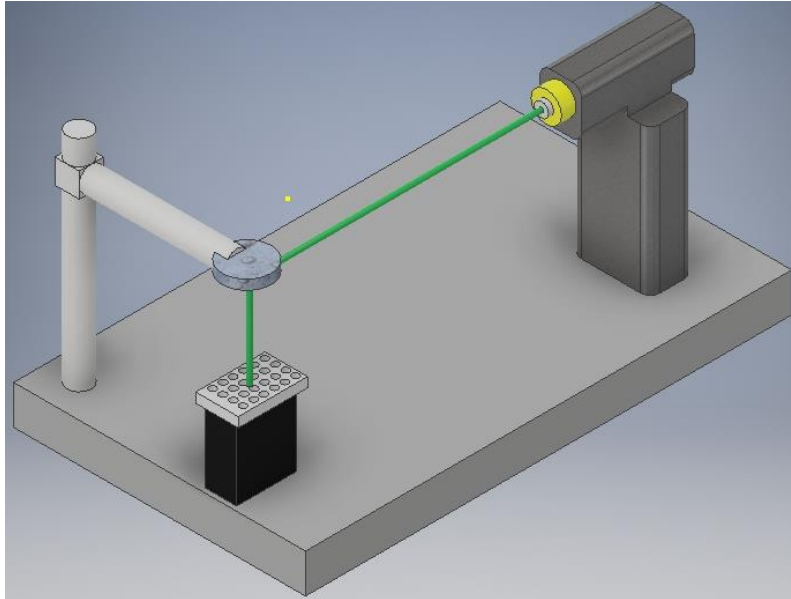


Figura 4: Arreglo experimental de irradiación de muestras en placa de 96 pozos

Las muestras utilizadas fueron las siguientes:

- a) Control (200 μL de agua y/o PBS)
- b) 100 μL de suspensión de Tejido de hígado y 100 μL de la solución de control
- c) 100 μL de suspensión de Tejido de Colon y 100 μL de la solución de control
- d) 100 μL de AuNP-c[RGDfK(C)] y 100 μL de solución de control
- e) 100 μL de suspensión de Tejido de hígado y 100 μL de AuNP-c[RGDfK(C)]
- f) 100 μL de suspensión de Tejido de Colon y 100 μL de AuNP-c[RGDfK(C)]

Se colocaron $n = 3$ pozos de la caja de 96 pozos.

Los tratamientos fueron expuestos individualmente a la irradiación láser. El aumento de temperatura fue medido usando un termopar tipo k (modelo TPK-01) de reacción inmediata que había sido previamente calibrado. El termopar se introdujo en el pozo de la placa y la temperatura se registró cada segundo usando una tarjeta microcontroladora (ArduinoOne) con una conexión USB a la computadora.

Se tuvo en cuenta que la densidad de potencia DP_m se mantuviera constante a 0.65 W/cm^2 para cada punto de tiempo de irradiación 6.5, 3.5 y 1.5 minutos, que corresponde a las frecuencias de 5, 10 y 15 Hz, respectivamente.

La irradiación se llevó a cabo bajo el diseño experimental mostrado en siguiente tabla:

Tabla 5: Posiciones de las diferentes muestras a irradiar a diferentes frecuencias

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A									
B	5Hz			10Hz			15Hz		
C									
D		5Hz*			10Hz*				15Hz*
E									
F	5Hz			10Hz			15Hz		
G									
H		5Hz*			10Hz*				15Hz*

4.7. Correlación teórica y experimental de los resultados

Se realizó una comparación de los resultados del aumento de temperatura obtenidos en el experimento de irradiación láser con los valores de aumento de temperatura obtenidos a partir del modelo de difusión de calor. En ambos desarrollos se establecieron las similitudes y diferencias con respecto a la temperatura obtenida. Estas comparaciones permitieron obtener un factor de corrección por pérdida de masa.

CAPÍTULO V: RESULTADOS

5.1. Caracterización química y estructural antes y después de la irradiación láser del sistema AuNP-c[RGDfK(C)]

Las técnicas de espectroscopia UV-Vis y las imágenes TEM demostraron que las AuNPs fueron funcionalizadas con el péptido c[RGDfK (C)] de acuerdo con los reportes previos [7,10].

5.1.1 Caracterización por UV-Vis

Las Figuras 5-7 muestran los espectros UV-Vis de las AuNP-c[RGDfK(C)] antes y después de la irradiación láser a las diferentes frecuencias estudiadas.

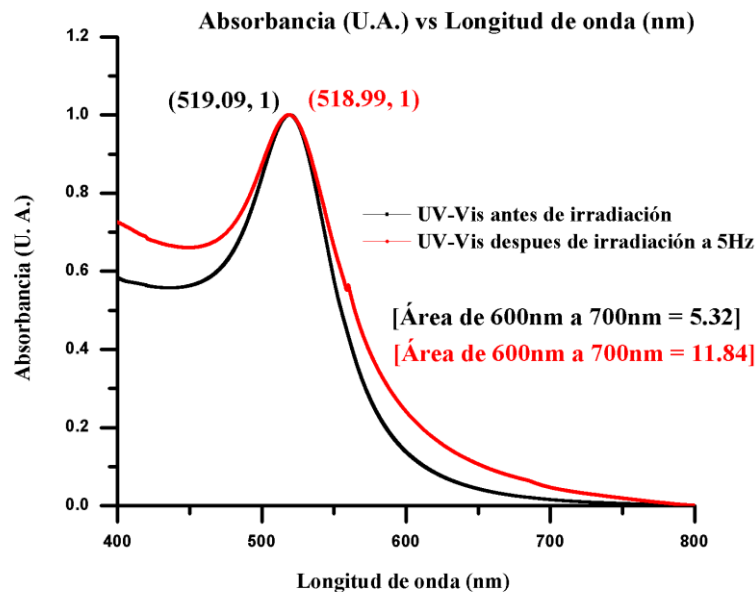


Figura 5: UV-Vis antes y después de irradiación a 5 Hz

En las tres figuras se observa la banda de resonancia plasmónica de superficie del sistema AuNP-c[RGDfK(C)] a 519.09 nm y su desplazamiento hacia el rojo a 518.99 nm, 518.49 nm y 518.89 nm para 5 Hz, 10 Hz y 15 Hz respectivamente. Este desplazamiento se atribuye a los cambios en el índice de refracción como consecuencia de la interacción entre el péptido y la superficie AuNP [7].

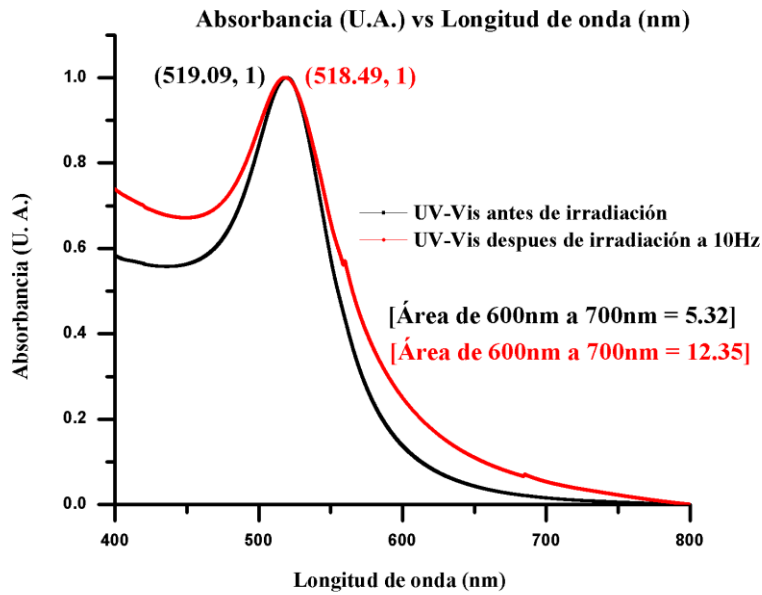


Figura 6: UV-Vis antes y después de irradiación a 10 Hz

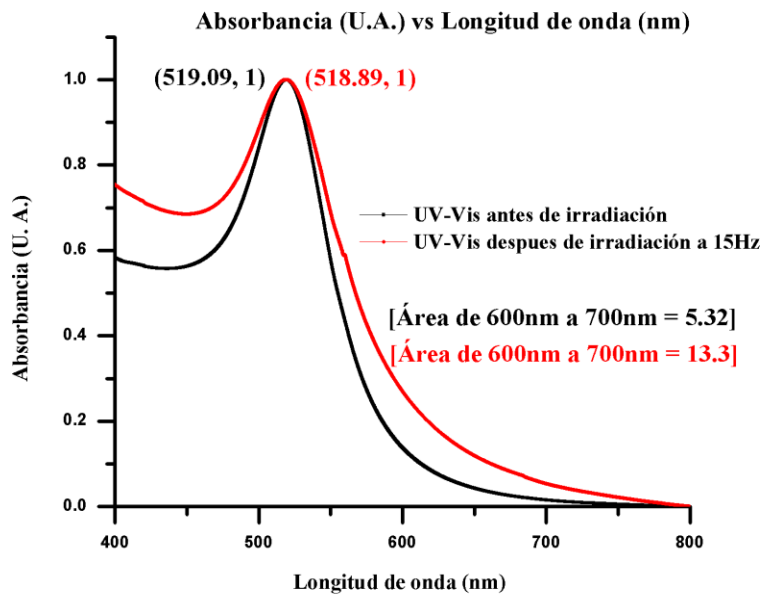


Figura 7: UV-Vis antes y después de irradiación a 15 Hz

De igual manera se observa que cuando el aumento de la frecuencia aumenta el área bajo la curva en la región de 600 a 700 nm. Esta región del espectro indica el nivel de agregación de las partículas. Las figuras muestran que el aumento de la frecuencia aumenta el grado de agregación del sistema coloidal.

5.1.2 Caracterización por TEM

Las imágenes TEM mostraron que las AuNPs estabilizadas con citrato cambian su tamaño de 20 ± 1.6 nm (antes de la irradiación) a 19.38 ± 0.02 nm (después de la irradiación). Esta modificación de tamaño es consecuencia del reordenamiento estérico molecular en la superficie de las nanopartículas.

Una vez funcionalizadas con c[RGDfK(C)] estas cambiaron su tamaño de 21.56 ± 0.06 nm (antes de la irradiación) a 21.13 ± 0.07 nm (después de la irradiación). Este resultado demuestra que el péptido [RGDfK (C)] permanece funcionalizado a la superficie de AuNP después de la irradiación con láser.

5.2. Determinación Teórica de los índices de refracción del Oro, Hígado y Colon

5.2.1. Oro

Mediante la ecuación (18) se obtienen n y k dependientes de la longitud de onda. Esta dependencia se muestra a continuación en la tabla 6:

Tabla 6: Valores que definen las funciones n y k del oro

E (eV)	λ (nm)	n	Δn	k	Δk
1.26	984.682	0.22	0.02	6.35	0.05
1.39	892.59	0.17	0.02	5.663	0.03
1.51	821.655	0.16	0.02	5.083	0.025
1.64	756.524	0.14	0.02	4.542	0.015
1.76	704.943	0.13	0.02	4.103	0.01
1.88	659.946	0.14	0.02	3.697	0.007
2.01	617.263	0.21	0.02	3.272	0.007
2.13	582.488	0.29	0.02	2.863	0.007
2.26	548.982	0.43	0.02	2.455	0.007
2.38	521.302	0.62	0.02	2.081	0.007
2.50	496.280	1.04	0.02	1.833	0.007
2.63	471.749	1.31	0.02	1.849	0.007
2.75	451.163	1.38	0.02	1.914	0.007
2.88	430.798	1.45	0.02	1.948	0.007

Partiendo de los datos de los índices de refracción dependientes de la longitud de onda que se muestran en la tabla 6, se construyó la gráfica de n y k para las AuNPs (Figura 8):

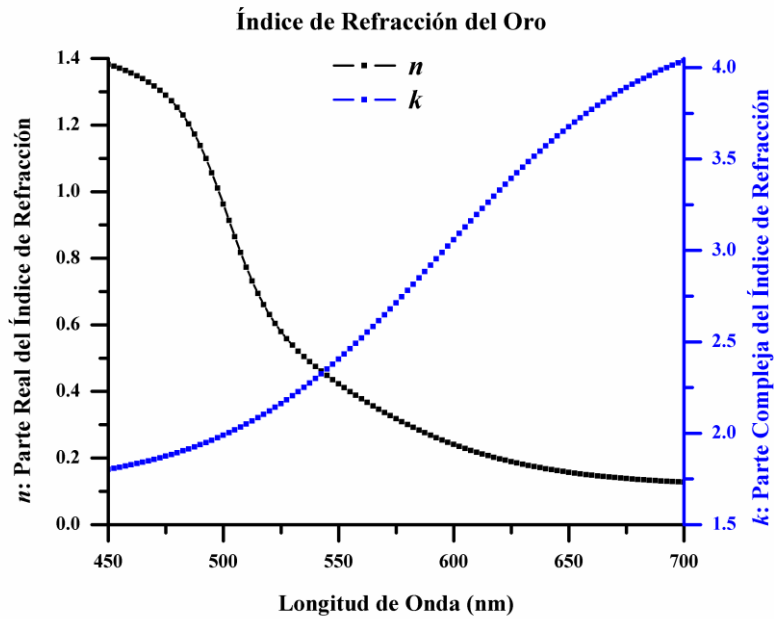


Figura 8: Gráfica de n y k para AuNPs

5.2.2. Hígado

De acuerdo con Giannios y Konstantinos [20] en el medio hígado se tiene que la parte real (n) y la parte compleja (k) del índice de refracción están descritas por la ecuación (19) y (20) respectivamente. Utilizando estos parámetros se construyó la Figura 9, donde se representa ambos componentes dependiente de la longitud de onda.

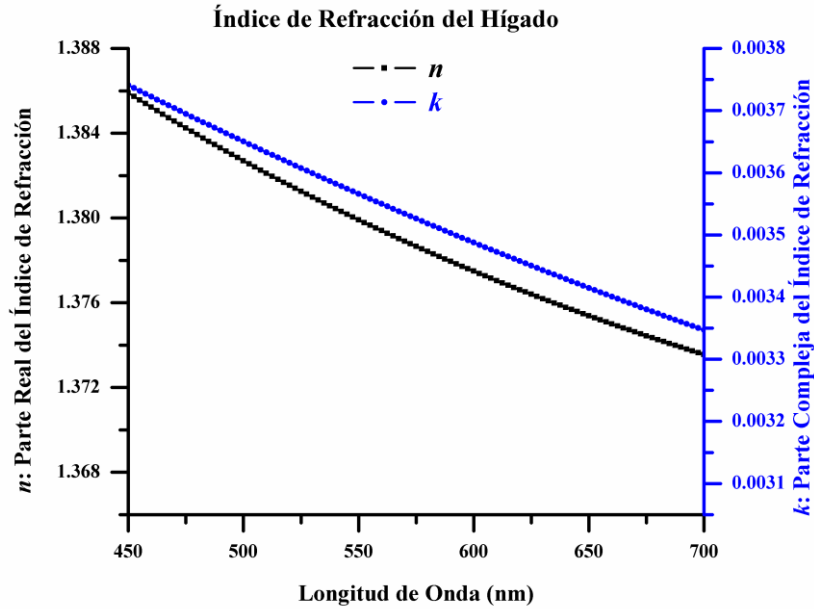


Figura 9: Gráfica de n y k para Hígado

La componente real está asociada con transmitancia, mientras que la imaginaria se asocia a reflectancia. Por tanto, el comportamiento de la figura 9 indica que la transmitancia de la luz en el hígado se mantiene casi constante. Este valor constante se debe a la irrigación constante que presenta este órgano.

5.2.3. Colon

De acuerdo con Giannios y Konstantinos [20], y utilizando las ecuaciones (21) y (22), se obtuvieron la contribución real (n) e imaginaria (k) del índice de refracción del tejido colon respectivamente. La dependencia de estas contribuciones con la longitud de onda se muestran en la Figura 10.

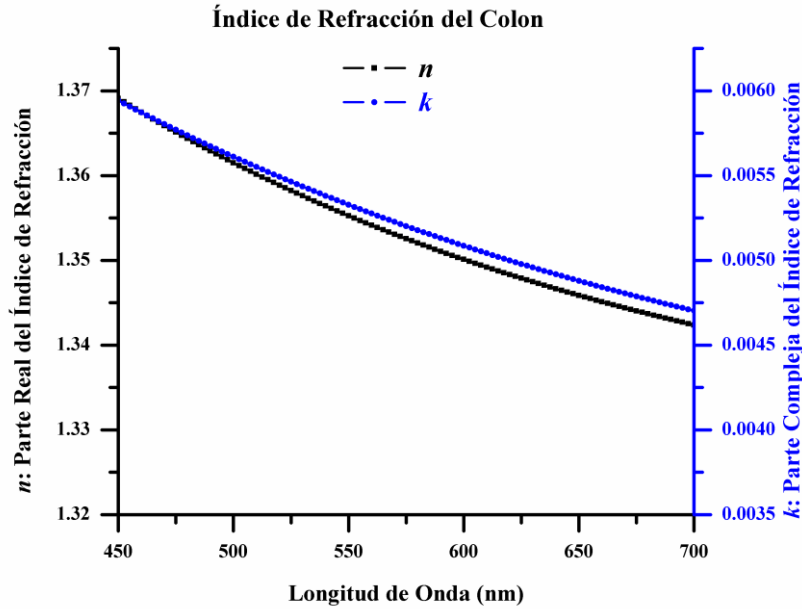


Figura 10: Gráfica de n y k para Colon

Al igual que la figura 9, en la figura 10 observamos que el valor de la parte compleja del índice de refracción (k) es prácticamente despreciable, pero se observa un mayor cambio en la parte real del índice de refracción (n). Este comportamiento es debido a que n está relacionada con la transmitancia, y si se tiene un cambio en la transmitancia por consecuencia se tiene un cambio en la absorbancia dado que este tejido cuenta con menor irrigación en comparación al hígado.

5.3. Determinación Teórica de las constantes dieléctricas del Oro, Hígado y Colon

El cálculo de las constantes dieléctricas dependientes de la longitud de onda para el sistema AuNP en agua, el medio hígado, y el colon se determinaron utilizando las ecuaciones (16) y (17) a partir de las componentes n y k de los índices de refracción. Las Figuras 11–13 muestran la dependencia de la parte real (ϵ') e imaginaria (ϵ'') con la longitud de onda de estos sistemas.

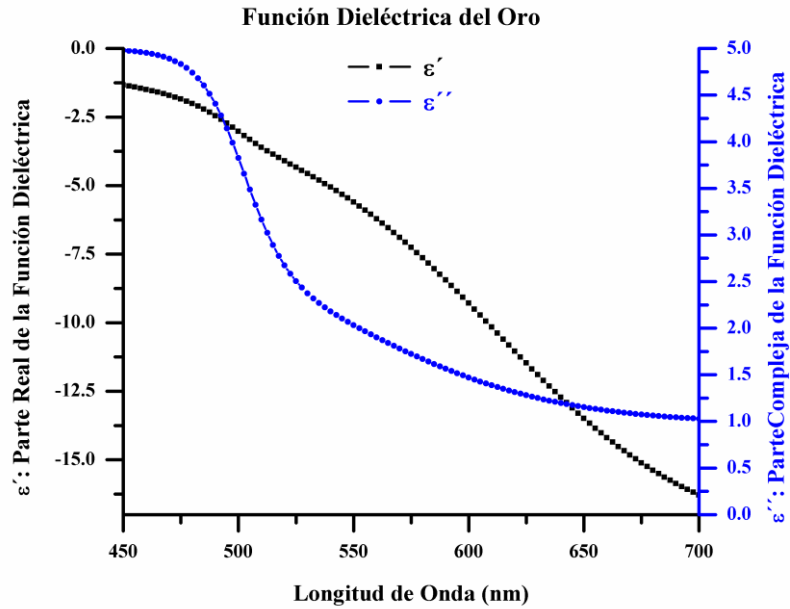


Figura 11: Gráfica de la función dieléctrica de las AuNPs

Se observa en la figura 11 que la parte real de la función dieléctrica (ϵ') tiende a aumentar su valor negativo a mayor longitud de onda del espectro visible. Esto se debe a que la figura 8 muestra que la parte compleja del índice de refracción (k) es mayor que la parte real del índice de refracción (n) a mayor longitud de onda. La parte compleja de la función dieléctrica (ϵ'') tiende a disminuir su valor a mayor longitud de onda debido a que el valor de la parte real del índice de refracción (n) es pequeño a mayor longitud de onda.

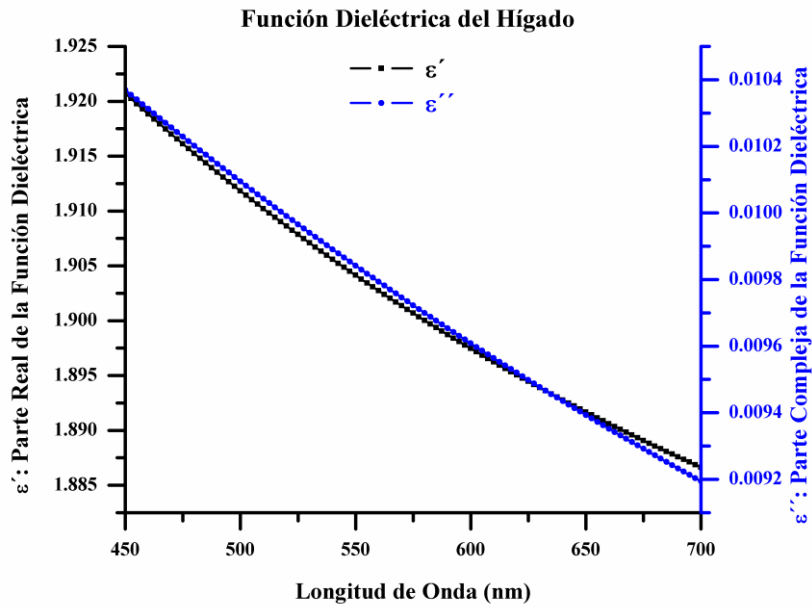


Figura 12: Gráfica de la función dieléctrica del Hígado

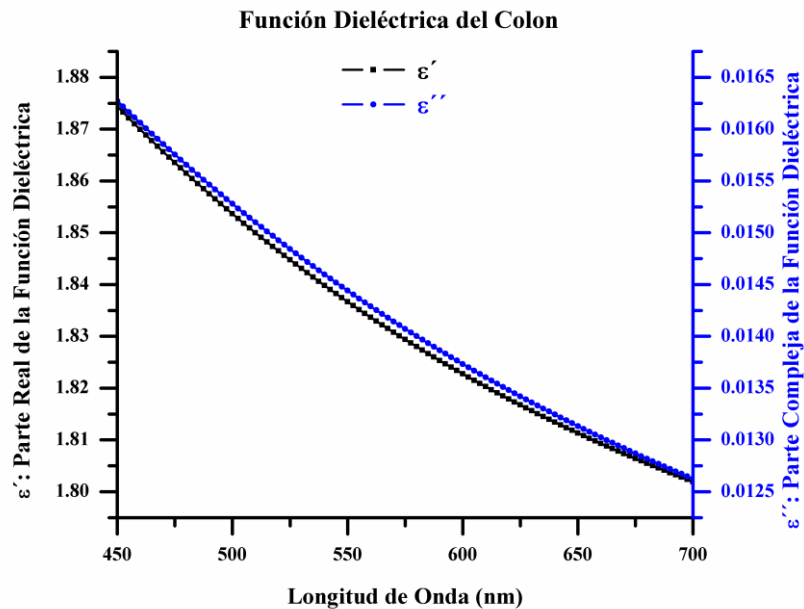


Figura 13: Gráfica de la función dieléctrica del Colon

En las figuras 12 y 13 se muestra como la parte real de la función dieléctrica (ϵ') del hígado y colon tiende a cambiar poco en todo el espectro visible. Este resultado se complementa con el resultado obtenido en las figuras 9 y 10, donde se muestra que la parte real del índice de refracción (n) sufre cambios mínimos en el mismo espectro, y la parte compleja de la función dieléctrica (ϵ'') para el hígado y colon es despreciable (las figuras

12 y 13 muestran que la parte compleja del índice de refracción (k) es despreciable en todo el espectro visible).

Para el medio agua la parte compleja de la función dieléctrica es cero debido a que $k = 0$, esto quiere decir que el agua no absorbe energía electromagnética en el espectro visible, por lo tanto $\varepsilon_m = \sqrt{\varepsilon'^2} = \varepsilon' = n^2 = 1.77$

5.4. Curvas de los coeficientes de absorción, dispersión y extinción

Mediante la teoría Mie tenemos las funciones de la sección eficaz de extinción (C_{ext}), dispersión (C_{abs}) y absorción (C_{abs}), estas funciones se definen por las ecuaciones (2), (3) y (4) respectivamente.

5.4.1. Agua

A continuación, se muestra la sección eficaz de extinción (C_{ext}), absorción (C_{abs}) y dispersión (C_{abs}) de las AuNp en agua dependientes de la longitud de onda:

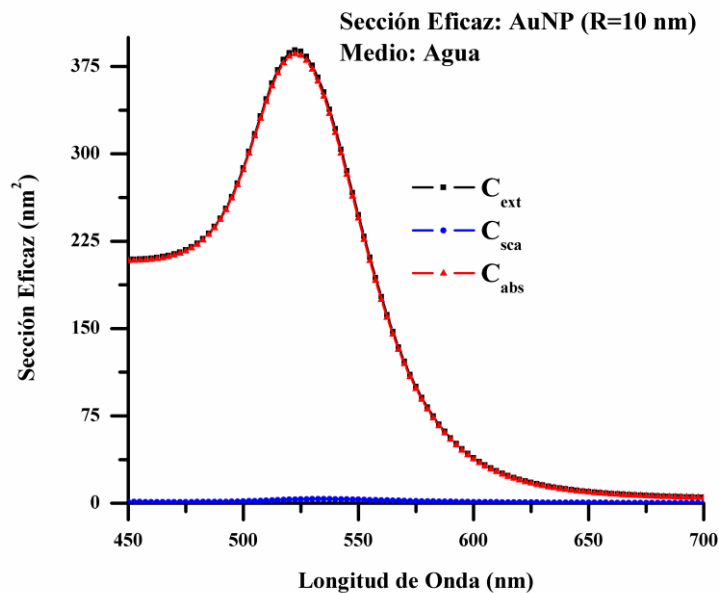


Figura 14: Secciones eficaces para AuNPs en Agua

Se aprecia que el máximo de absorción y extinción se logra a una longitud de onda de $\lambda=522$ nm teniendo $C_{abs} = 385$ nm², pero la sección eficaz de absorción para la longitud de onda del el láser de 532 nm es $C_{abs} = 362$ nm². Existe una diferencia porcentual del 6% entre el valor máximo teórico y el valor máximo posible a obtener experimentalmente.

5.4.2. Hígado

A continuación, se muestra la sección eficaz de extinción (C_{ext}), absorción (C_{abs}) y dispersión (C_{sca}) de las AuNp en hígado dependientes de la longitud de onda:

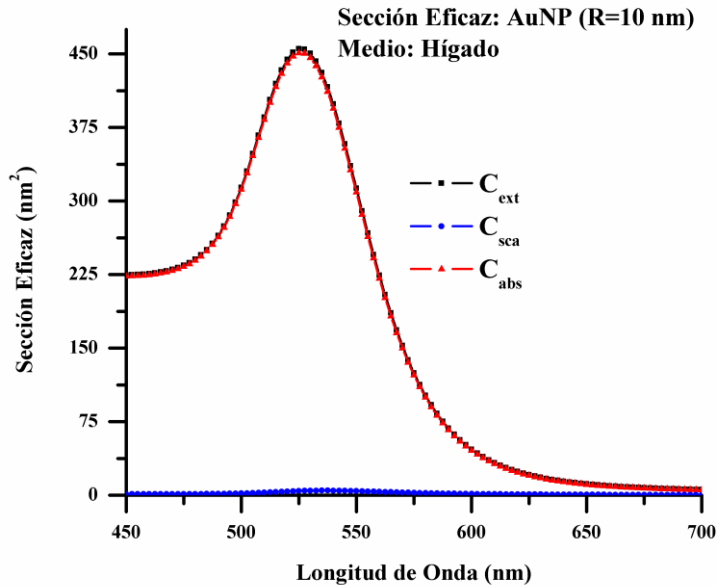


Figura 15: Secciones eficaces para AuNPs en Hígado

Se aprecia que el máximo de absorción y extinción se obtienen a una longitud de onda de $\lambda = 525$ nm, correspondiendo a $C_{abs} = 450$ nm², pero la sección eficaz para el láser de longitud de onda $\lambda = 532$ nm es $C_{abs} = 437$ nm², por lo que se tiene una diferencia porcentual de aproximadamente de 3% respecto al máximo.

5.4.3. Colon

A continuación, se muestra la sección eficaz de extinción (C_{ext}), absorción (C_{abs}) y dispersión (C_{abs}) de las AuNp en Colon dependientes de la longitud de onda:

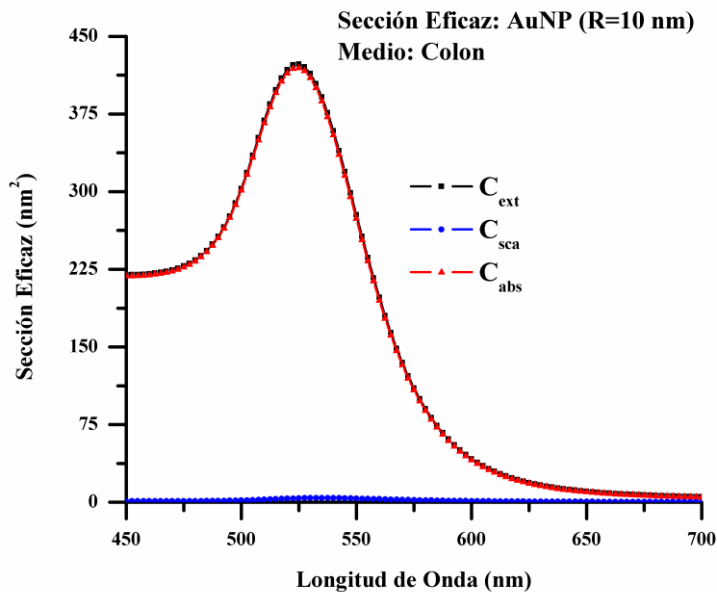


Figura 16: Secciones eficaces para AuNPs en Colon

Se aprecia que el máximo de absorción se logra a una longitud de onda de $\lambda = 525$ nm teniendo $C_{abs} = 419$ nm² pero la sección eficaz de absorción para el láser de longitud de onda $\lambda = 532$ nm es $C_{abs} = 400$ nm², por lo que se tiene una diferencia porcentual de aproximadamente de 4.5% respecto al máximo.

En concordancia con reportes anteriores [5,13], los resultados de esta investigación demostraron que el C_{ext} se debe principalmente a la contribución del proceso de absorción. La sección eficaz de absorción representa el (98.96 + 0.03)% de la C_{ext} , por lo tanto, la dispersión se puede considerar despreciable. El valor máximo de C_{ext} se observa a la longitud de onda de irradiación de 522.5 nm para AuNP-RGD en medio acuoso y a 525 nm cuando las nanopartículas son depositadas o incrustadas en los tejidos. Esto significa que la máxima absorción de energía ocurre en esas longitudes de onda. Por consiguiente, la velocidad de aumento de temperatura más alta debe alcanzarse también a tales longitudes de onda.

En esta investigación, la parte experimental se llevó a cabo utilizando un láser Nd:YAG de 532 nm. Para esta longitud de onda el AuNP-RGD en agua ($n = 1.33$) tiene un $C_{ext} = 365.66$ nm², mientras que estos valores fueron 442.39 y 404.24 nm² para (AuNP-RGD) -Hígado y (AuNP-RGD)-colon, respectivamente. Esto significa que la irradiación de estos tres medios que contienen nanopartículas aumentaría la temperatura en el hígado > colon > agua.

5.5. Curva Teórica de temperatura en Agua

El modelo de una temperatura muestra que el aumento en la superficie de la AuNP es directamente proporcional a la eficiencia de absorción como se muestra en la ecuación (9).

Este modelo arrojó datos de aumento de temperatura alrededor de la AuNP de $T_{oro}=1064$ °C, la transferencia de calor es tan rápida que no se logra la fusión del oro.

Recordando que para que una AuNP y una masa de agua dada entren en equilibrio térmico se tiene que cumplir que:

$$Q_o = Q_w \text{ (Cantidad de calor Perdido = Cantidad de calor Ganado)}$$

Por lo tanto, para una muestra de 150 μL con una concentración de 1.962×10^{11} AuNP entren en equilibrio térmico se tiene lo siguiente:

Para el agua: $Q_w = m_w C_{ew} \Delta T$ ($Q_w \rightarrow$ Cantidad de calor ganado)

Donde

$$m_w = V_w \rho_w = 7.645218 \times 10^{-16} \text{ kg}$$

$$C_{ew} = 1 \text{ Cal/g}^\circ\text{C}$$

$$\Delta T = T_f - 20^\circ\text{C}$$

Para el oro: $Q_o = m_o C_{eo} \Delta T$ ($Q_o \rightarrow$ Cantidad de calor perdido)

Donde

$$m_o = V_o \rho_o = 8.092742 \times 10^{-20} \text{ kg}$$

$$C_{eo} = 1 \text{ Cal/g}^\circ\text{C}$$

$$\Delta T = 1064^\circ\text{C} - T_f$$

Por conservación de energía $Q_o = Q_w$ (Cantidad de calor Perdido = Cantidad de calor Ganado)

$$m_o C_{eo} \Delta T = m_w C_{ew} \Delta T \rightarrow m_o C_{eo} (1064^\circ\text{C} - T_f) = m_w C_{ew} (T_f - 20^\circ\text{C})$$

$$\rightarrow T_f = \frac{m_w C_{ew} 20^\circ\text{C} + m_o C_{eo} 1064^\circ\text{C}}{m_w C_{ew} + m_o C_{eo}}$$

A partir de esta ecuación se calcula la temperatura final del medio una vez que la AuNP disipa su calor a este. Tomando en cuenta la contribución de calor transferida al medio debida al pulso del láser que interactúa con la AuNP con el que se genere esa temperatura se cumple la ecuación (30).

Por lo tanto, para n pulsos de láser se desarrolló el modelo de temperatura, donde la temperatura final del medio está dada por la ecuación (31) que se muestra a continuación:

$$T_{fn} = \left(\frac{b}{c}\right)^n T_0 + \sum_{i=1}^n \left(\frac{b}{c}\right)^{n-i} DE_i + a \sum_{i=1}^n \frac{b^{i-1}}{c^i}$$

Donde:

$$a = C_{e_o} m_o T_{o_0}$$

$$b = C_{e_w} m_w T_{w_0}$$

$$c = C_{e_o} m_o + C_{e_w} m_w$$

Y DE_i es una función que describe la contribución de calor por pulso del láser que está dada como:

$$DE_i = Ae^{-i/B} + Y$$

Donde:

$$A = 0.03543$$

$$B = 1095.185$$

$$Y = -0.00303$$

De este modelo se tiene el siguiente valor de aumento de temperatura en 5 minutos a una frecuencia de irradiación de 10 Hz.

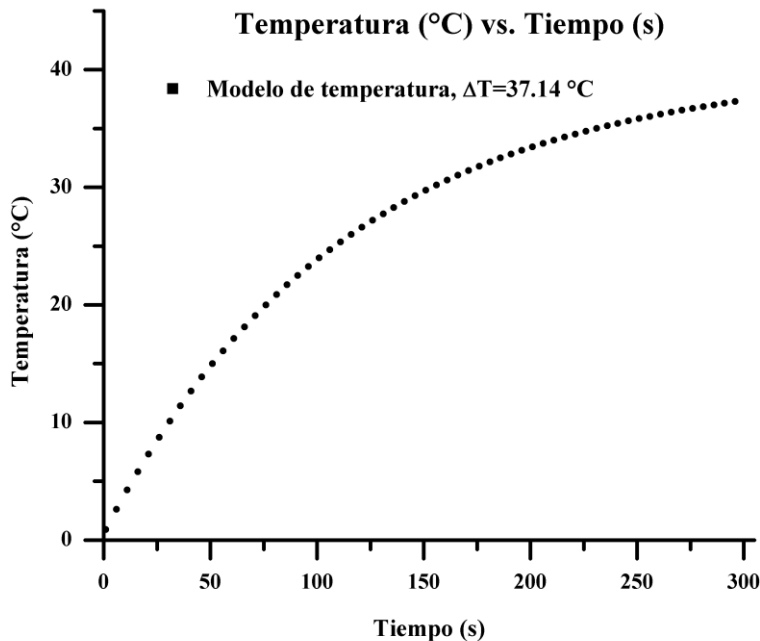


Figura 17: Incremento de temperatura teórico de AuNPs en Agua

5.6. Curvas experimentales de la temperatura generada por el sistema ¹⁷⁷Lu-AuNP-RGD en tejido y agua

La relación entre el aumento de temperatura y las frecuencias de irradiación en cada uno de los tratamientos se muestra en la Figura 6. Excepto para el tejido de colon, no hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el ΔT alcanzado con 10 o 15 Hz. Sin embargo, existen diferencias significativas entre las frecuencias más altas y la más baja a 5 Hz. Para generar la mayor cantidad de temperatura es necesario que la duración del impulso y la frecuencia de repetición estén en el mismo orden del tiempo de relajación de la onda de expansión del SPR, que es de femtosegundos. Para las tres frecuencias estudiadas, el incremento de la temperatura producido en el sistema (AuNP-RGD)-Hígado es significativamente mayor que los sistemas (AuNP-RGD)-colon y (AuNP-RGD)-agua. Estos incrementos siguieron la misma tendencia de los incrementos teóricos calculados anteriormente.

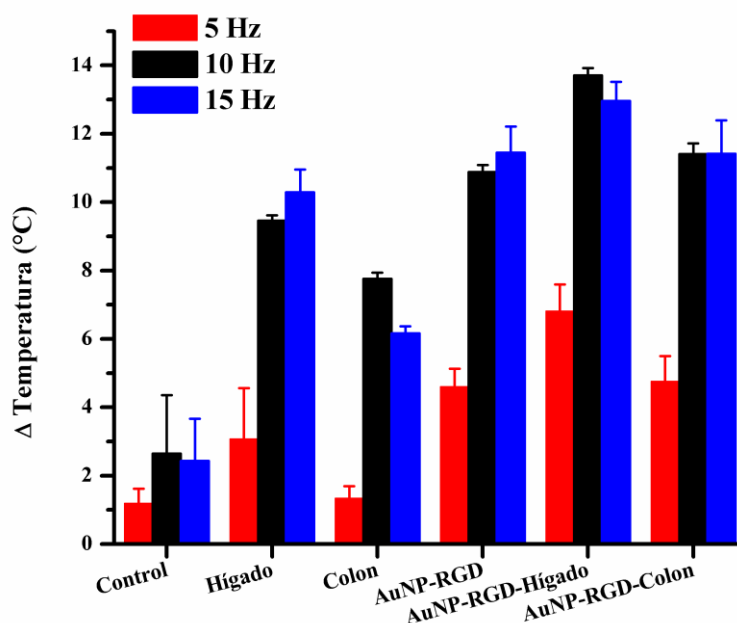


Figura 18: Aumento de temperatura para las diferentes muestras a 5, 10 y 15 Hz.

Se logra apreciar en estos datos experimentales el aumento de temperatura generada por el sistema AuNP-RGD debido a la resonancia de plasmón de superficie. Se observa que el tejido hígado sin AuNP tiene un incremento de temperatura comparable al de las AuNPs. Este comportamiento se explica por la gran absorción de este tejido de la luz debido a su mayor irrigación y concentración de melanina que se relacionan con el índice de refracción.

Se observa cómo la muestra de colon presenta menor aumento de temperatura por su menor irrigación, melanina y C_{abs} en comparación con el hígado. Sin embargo, se muestra un mayor aumento en la muestra AuNP-Hígado debido a los fenómenos de SPR, a la mayor irrigación, melanina y C_{abs} del medio hígado en comparación con los demás medios. Se logra observar que para frecuencias de 10 Hz y 15 Hz no se muestra estadísticamente diferencias significativas en los aumentos de temperatura.

Las figuras 19, 20 y 21 muestran el aumento de temperatura total alcanzado en cada uno de los tratamientos a las diferentes frecuencias de repetición. No hay diferencia estadísticamente significativa entre los valores de temperatura alcanzados por la muestra de control como los cambios de frecuencia. La temperatura alcanza un máximo y permanece constante en el tiempo, lo que indica que el aumento de la muestra de control no depende de la frecuencia de repetición.

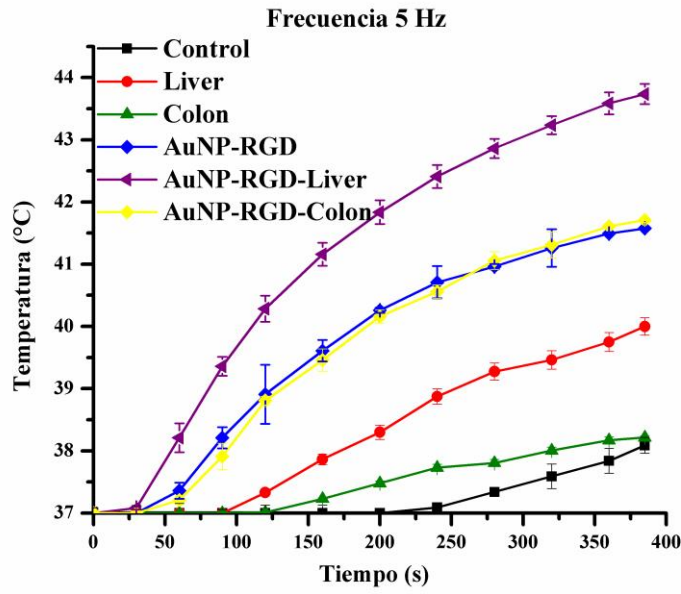


Figura 19: Aumento de temperatura a 5 Hz para los diferentes medios

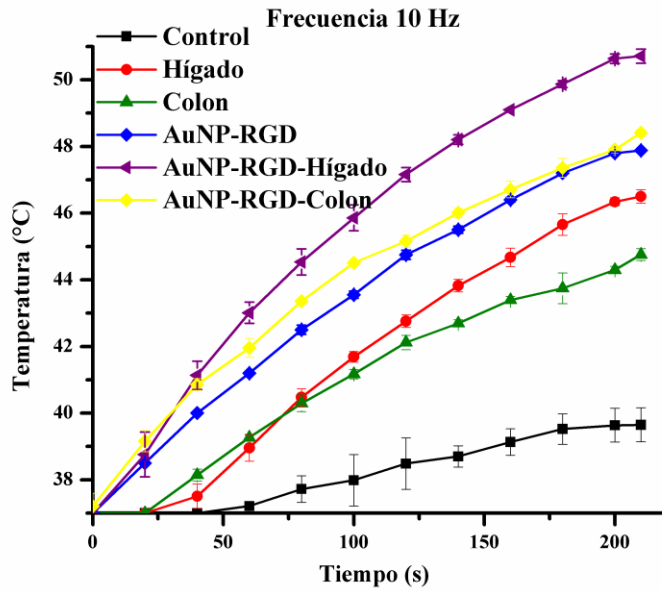


Figura 20: Aumento de temperatura a 10 Hz para los diferentes medios

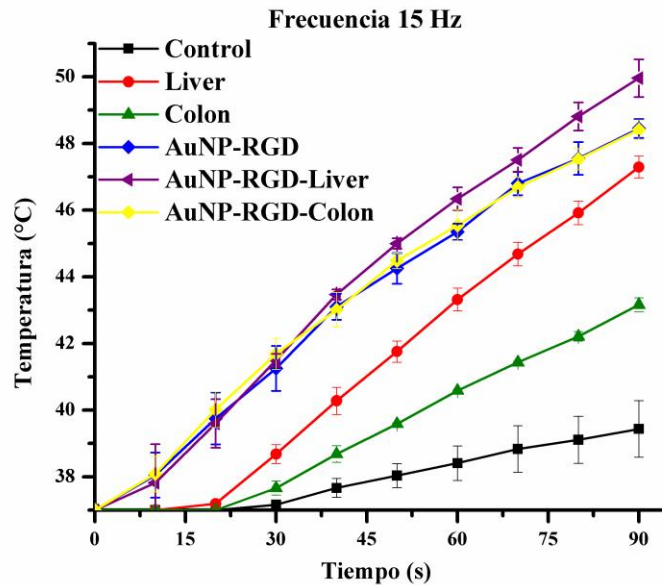


Figura 21: Aumento de temperatura a 15 Hz para los diferentes medios

La absorción óptica del tejido hepático es mayor que la del tejido del colon, ya que el primero es más irrigado que el posterior. Por lo tanto, estos dos tejidos se emplearon en este trabajo como modelos de tejidos altamente y bajamente irrigados, respectivamente. Ellos mostraron entre sí diferencias estadísticamente significativas en los valores de temperatura alcanzados al variar la frecuencia de irradiación. Se obtienen valores más altos de temperatura con el hígado (≈ 13.7 °C). Esta diferencia se atribuye a la diferencia de hemoglobina entre el hígado y el colon. La hemoglobina es uno de los componentes tisulares que más absorbe longitudes de onda cercanas a 532 nm. En consecuencia, el tejido hepático tiene una mayor absorción (C_{ext} y C_{abs}), y el sistema (AuNP-RGD-hígado) tiene el mayor aumento de temperatura.

En este trabajo, una concentración de $6,54 \times 10^{11}$ AuNP/mL generó un aumento de temperatura de aproximadamente 13 °C después de 200 s de irradiación a 10 Hz y después de 90 s de irradiación a 15 Hz. Si este aumento ocurre en células o tejidos por encima de la temperatura basal del cuerpo (37 °C), causará varios procesos que pueden conducir a la muerte celular. Algunos de estos procesos son transiciones de fases lipídicas, desnaturalización de proteínas, cambios conformacionales de ARN y ADN, entre otros; Tal es la razón por la que el uso de AuNPs podría ser útil para la terapia fototérmica usando el láser de Nd:YAG a 532 nm, porque la eficacia de la terapia (muerte celular) está directamente relacionada con la cantidad de calor producido.

Estos resultados concuerdan con los anteriormente obtenidos por Mendoza-Nava y colaboradores cuando irradiaron AuNP funcionalizadas con octreótido en células HeLa en un láser de igual condiciones al utilizado en este trabajo y obtuvieron un aumento de temperatura de 11⁰C aproximadamente (temperatura aumento hasta 48 °C) produciendo muerte celular en un 94% [22].

5.7. Correlación teórica y experimental de los resultados obtenidos en el cambio de temperatura

De las figuras 5, 6 y 7 se observa que la frecuencia óptima para obtener la generación máxima de temperatura por las AuNPs se logra a 10 Hz, ya que los UV-Vis muestran una mayor agregación de las AuNPs a 15 Hz. Por tanto, la frecuencia óptima para un tratamiento de terapia fototérmica plasmónica es a 10 Hz ya que a esta frecuencia es posible seguir generando calor durante un tiempo más prolongado sin que las AuNPs pierdan la propiedad física de SPR.

Tomando la frecuencia óptima de irradiación de 10 Hz con una densidad de potencia de 0.65 W/cm² y tomando un tiempo de irradiación de 5 minutos, se irradió una muestra de AuNp en agua la cual fue de 150μL con una concentración de 1.962x10¹¹ AuNp.

Usando el modelo de difusión de calor mencionado en la ecuación (31) para un total de 3000 pulsos de láser se tiene a continuación el resultado experimental, así como el cálculo teórico con el modelo de difusión de calor, el aumento de temperatura para cada caso es el siguiente:

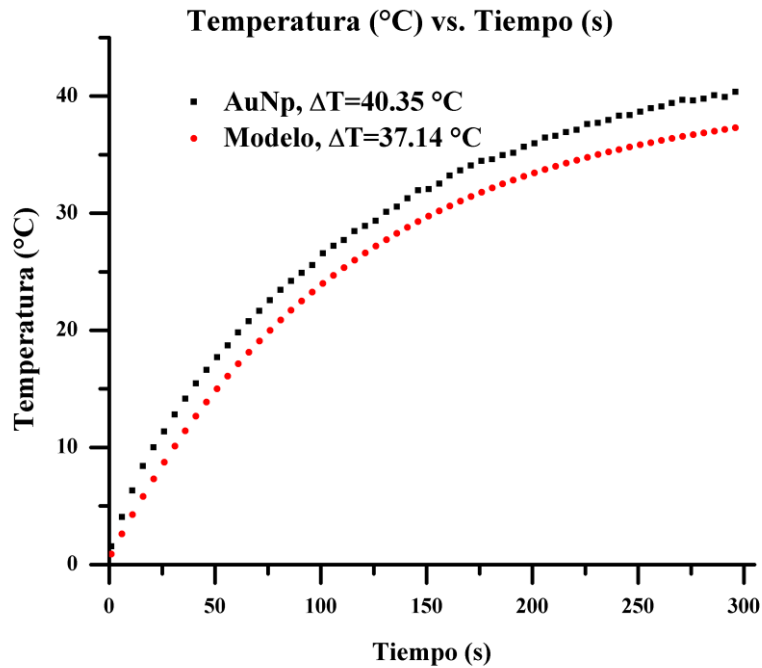


Figura 22: Comparación de aumento sin corrección de temperatura teórico-experimental

Comparando los datos de temperatura del modelo de difusión de calor con los datos de temperatura experimentales se muestra que el modelo de difusión de calor no arroja datos reales de temperatura dado que no se toma en cuenta la pérdida de masa ni la agregación que sufren las AuNPs del sistema a irradiar, por lo tanto se llega a un factor de corrección por pérdida de masa $\alpha = 2.27\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Una vez que se suma este valor al modelo de difusión de calor, la temperatura que se obtiene es la siguiente:

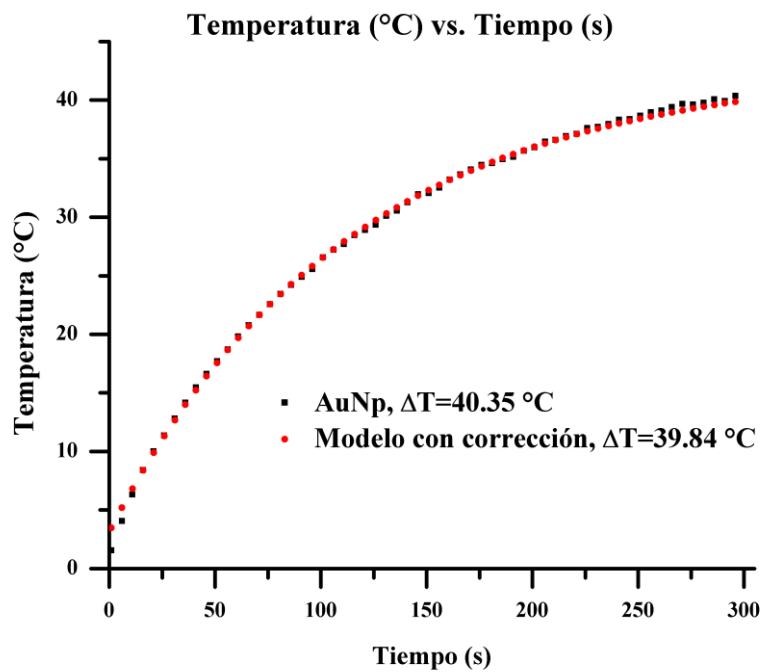


Figura 23: Comparación de aumento con corrección de temperatura teórico-experimental

Esta gráfica nos muestra que una vez que el modelo de temperatura contiene el factor de corrección por pérdida de masa y agregación, éste modelo logra llegar a los datos de temperatura que se obtienen experimentalmente.

CAPÍTULO VI: DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

El sistema $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ exhibe propiedades que son adecuadas para la terapia fototérmica plasmónica y radioterapia dirigida *in vitro*. Por lo anterior, el sistema multifuncional $^{177}\text{Lu-AuNP-RGD}$ mostró aplicación potencial en el diagnóstico médico y en los tratamientos terapéuticos debido a su combinación única de propiedades radiactivas, ópticas y termoablativas.

Los cálculos mostraron que C_{abs} representa el $98.96 + 0.03\%$ de C_{ext} a 532 nm, C_{ext} para el AuNP funcionalizado en agua fue 365.66 nm^2 (94% del valor máximo teórico a 522.5 nm), para el colon fue de 404.24 nm^2 (98% del valor máximo teórico a 525 nm) y para el hígado fue 442.39 nm^2 (96% del valor teórico máximo a 525 nm). Por lo tanto, las nanopartículas irradiadas a 532 nm están muy próximas a su valor de resonancia. Estos resultados eran de esperarse dado que el hígado presenta una mayor irrigación melanina en comparación con el colon, así como el colon presenta mayor irrigación en comparación con la nula irrigación del agua.

En la parte experimental se depositó la misma densidad de energía en todas las muestras y los resultados de C_{ext} , C_{abs} y C_{sca} se correlacionaron con los ensayos de irradiación en AuNP funcionalizado, donde el aumento de la temperatura de los medios, mostró el patrón de Hígado > Colon > Agua, logrando obtener aumente similares a 10 y 15 Hz sin observar estadísticamente diferencias significativas, el aumento de la temperatura (ΔT de aproximadamente $13 \text{ }^\circ\text{C}$) es suficiente para producir la muerte celular por terapia Fototérmica Plasmónica., y observando los UV-Vis se llega a la conclusión que la frecuencia óptima de irradiación es 10 Hz, ya que está no presenta la mayor agregación.

La comparación de los resultados de aumento de temperatura obtenidos en el experimento de irradiación láser con los valores de aumento de temperatura obtenidos a partir del modelo de difusión de calor mostró que el modelo de difusión de calor no arroja datos reales de temperatura dado que no se toma en cuenta la pérdida de masa ni la agregación que sufren las AuNPs del sistema a irradiar, por lo tanto, se llega a un factor de corrección por pérdida de masa de $\alpha = 2.27 \text{ }^\circ\text{C}$. En ambos desarrollos se establecieron las similitudes y diferencias con respecto a la temperatura obtenida. Con el modelo teórico de difusión de calor generado en este trabajo es posible predecir la temperatura que se generará al irradiar diferentes concentraciones de AuNPs en agua sin necesidad de realizar el experimento.

CAPÍTULO VII: REFERENCIAS

1. *Third generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy.* **G. Ferro-Flores, C. Arteaga de Murphy, & L. Meléndez-Alafort.** no. 4, pp. 339-352, 2006, Current Pharmaceutical Analysis, Vol. 2.
2. *Design strategies of hybrid metallic nanoparticles for theragnostic applications.* **J. Gautier, E. Allard-Vannier, K. Hervé-Aubert, M. Soucé, & I. Chourpa.** no. 43, pp. 432002, 2013, Nanotechnology, Vol. 24.
3. *Multifunctional radiolabeled nanoparticles for targeted therapy.* **G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-García, C. L. Santos-Cuevas, E. Morales-Avila, & E. Azorín-Vega.** no. 1, pp. 124-138, 2014, Current medicinal chemistry, Vol. 21.
4. *Luminescent gold nanoclusters as biocompatible probes for optical imaging and theranostics.* **A. Cantelli, G. Battistelli, G. Guidetti, J. Manzi, M. Di Giosia, & M. Montalti.** pp. 64-79, 2016, Dyes and Pigments, Vol. 135.
5. *Gold nanoparticles: optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy.* **X. Huang, & M. A. El-Sayed.** 2010, Journal of Advanced Research.
6. *A Therapeutic System of ^{177}Lu -labeled Gold Nanoparticles-RGD Internalized in Breast Cancer Cells.* **M. A. Luna-Gutiérrez, G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo García, Santos-Cuevas C.L., N. P. Jiménez-Mancilla, De León L, E. Azorín-Vega, K. Isaac-Olivé.** 2013, J. Mex. Chem. Soc. , págs. 57 (3), 212-219.
7. *^{177}Lu -labeled monomeric, dimeric and multimeric RGD peptides for the therapy of tumors expressing $\alpha(v)\beta(3)$ integrins.* **M. A. Luna-Gutiérrez, G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-García, N. P. Jiménez-Mancilla, E. Morales-Avila, D. León-Rodríguez, & K. Isaac-Olivé.** 2012, Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals.
8. *Design and biological evaluation of ^{99m}Tc -N2S2-Tat(49–57)-c(RGDyK): A hybrid radiopharmaceutical for tumors expressing $\alpha(v)\beta(3)$ integrins.* **B. E. Ocampo-García, C. L. Santos-Cuevas, L. M. De León-Rodríguez, R. García-Becerra, D. Ordaz-Rosado, M. A. Luna-Gutiérrez, N. P. Jiménez-Mancilla, M. E. Romero-Piña, G. Ferro-Flores.** 2013, Nuclear Medicine and Biology.
9. *Molecular targeting radiotherapy with cyclo-RGDFK (C) peptides conjugated to ^{177}Lu -labeled gold nanoparticles in tumor-bearing mice.* **A. Vilchis-Juárez, G. Ferro-Flores, C. L. Santos-Cuevas, E. Morales-Avila, B. E. Ocampo-García, L. Díaz-Nieto, ... & L. Gómez-Oliván.** 2014, Journal of biomedical nanotechnology.
10. *Engineered Multifunctional RGD-Gold Nanoparticles for the Detection of Tumour-Specific $\alpha(v)\beta(3)$ Expression: Chemical Characterisation and Ecotoxicological Risk*

Assessment. **E. Morales-Avila, G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-García, & L. M. Gómez-Oliván.** 2012, Journal of biomedical nanotechnology.

11. *Therapeutic Radionuclides: Biophysical and Radiobiologic Principles. I,* **A. Kassis** 2008, Seminars in Nuclear Medicine, págs. 358-66.

12. <http://www.chemistryexplained.com/elements/L-P/Lutetium.html>. **Lutetium Advameg.** [En línea] [Citado el: 26 de 08 de 2016.]

13. *Studies on the interaction of pulsed lasers with plasmonic gold nanoparticles toward light manipulation, heat management, and nanofabrication.* **S. Hashimoto, D. Werner, & T. Uwada.** 2012, Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry.

14. *Ultrashort Laser Pulse Heating of Nanoparticles: Comparison of Theoretical Approaches.* **R. R. Letfullin, T. F. George, G. C. Duree, and B. M. Bollinger.** Department of Physics and Optical Engineering, Rose-Hulman Institute of Technology, 5500 Wabash Avenue, Terre Haute, IN 47803, US : s.n., 2008.

15. *The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications.* **A. Moores, & F. Goettmann.** 2006, New Journal of Chemistry.

16. *Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine.* **P. K. Jain, K. S. Lee, I.H. El-Sayed, & M. A. El-Sayed.** 2006, Phys. Chem. B,.

17. *Optical constants and inelastic electron-scattering data for 17 elemental metals.* **W. S. M. Werner, K. Glantschnig, C. Ambrosch-Draxl.** 2009, J. Phys Chem Ref.

18. *Optical constants of the noble metals.* **P. B. Johnson, & R. W. Christy.** 1972, Physical review B,.

19. *Complex refractive index of normal and malignant human colorectal tissue in the visible and near-infrared.* **P. Giannios, S. Koutsoumpos, K. G. Toutouzas, M. Matiatou, G. C. Zografos, & K. Moutzouris.** 2016, Journal of biophotonics.

20. *Visible to near-infrared refractive properties of freshly-excised human-liver tissues: marking hepatic malignancies.* **Giannios, Panagiotis.** 2016, Scientific reports, Vol. 6.

21. *Modeling nanophotothermal therapy: kinetics of thermal ablation of healthy and cancerous cell organelles and gold nanoparticles.* **R. R. Letfullin, C.B. Iversen, & T. F. George.** 2011, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.

22. *Laser Heating of Gold Nanospheres Functionalized with Octreotide: In Vitro Effect on HeLa Cell Viability.* **H. Mendoza-Nava, G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-García, J. Serment-Guerrero, C. L. Santos-Cuevas, N. P. Jiménez-Mancilla, M. A. Luna-Gutiérrez, M. A. Camacho-López.** Photomedicine and Laser Surgery.

23. *Interaction of gold nanoparticles with nanosecond laser pulses: Nanoparticle heating.* **N. N. Nedyalkov, S. E. Imamova, P. A. Atanasov, R. A. Toshkova, E. G. Gardeva, L. S. Yossifova, ... & M. Obara.** 2011.
24. *Comparative effect between laser and radiofrequency heating of RGD-gold nanospheres on MCF7 cell viability.* **L. Sánchez-Hernández, G. Ferro-Flores, N. P. Jiménez-Mancilla, M. A. Luna-Gutiérrez, C. L. Santos-Cuevas, B. E. Ocampo-García, ... & K. Isaac-Olivé.** 2015, Journal of nanoscience and nanotechnology.
25. *Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles .* **X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed and M. A. El-Sayed.** 2008, Lasers in Medical Science , págs. 23(3):217-28.
26. <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>, **INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER.** [En línea] 29 de abril de 2015. [Citado el: 26 de agosto de 2016.].
27. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. Organización Mundial de la Salud. [En línea] Febrero de 2015. [Citado el: 26 de 08 de 2016.]
28. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. Globocan. [En línea] 2012. [Citado el: 26 de 08 de 2016.]
29. *Properties of [¹¹¹In]-labelled HIV-1 tat peptide radioimmunoconjugates in tumor-bearing mice following intravenous or intratumoral injection.* **B. Cornelissen, et al.** 2008, Nucl Med Biol. .
30. *^{99m}Tc-N2S2-Tat(49-57)-bombesin Internalized in Nuclei of Prostate and Breast Cancer Cells: Kinetics, Dosimetry and Effect on Cellular Proliferation.* **C.L. Santos-Cuevas, G. Ferro-Flores, et al.** 2011, Nucl. Med. Comm. .
31. *Radiolabelled RGD peptides and peptidomimetics for tumour targeting.* **R . Haubner, C. Decristoforo.** 2009, Front Biosci, págs. 14: 872-886.
32. *The biology of VEGF and its receptors.* **N. Ferrera, H. Gerber, y J. LeCounter.** 2003, Nature Medicine., págs. 9 (6), 669-676.
33. *Multifunctional Targeted Therapy System Based on ^{99m}Tc/¹⁷⁷Lu-labeled Gold Nanoparticles-Tat(49-57)-Lys3-Bombesin Internalized in Nuclei of Prostate Cancer Cells.* **N. P. Jiménez-Mancilla, G. Ferro-Flores, C. L. Santos-Cuevas, et al.** 2013, J. Labelled Compds Radioph, págs. 56, 663-671. .
34. *A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165.* **L. Joon, M. De Canny, A. De Erkenez, D. Krilleke, Ng. Yin, D. Shima, A. Pardi, y F. Jucker.** 2005, págs. 102 (52), 18902-18907.
35. *Molecular imaging targeting peptide receptors. .* **J., M. Scottelius y H. Wester.** 2009, Methods Journal., págs. 48(2):161-77.

36. <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/269/articulos/nanoparticulas-de-oro-aplicacion-medicina.html>. **MONTSERRAT FERNÁNDEZ TORRES et al.** [En línea] 2014.
37. *Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing* . **Chen PC, Mwakwari SC, Oyelere AK.** 2008, *Nanotechnol. Sci. Appl.*, págs. 44-66.
38. *Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles.* **P. Mulvaney.** 1996, *Langmuir*, págs. 12 (3):788–800.
39. *Near Infrared Resonant Gold / Gold Sulfide Nanoparticles as a Photothermal Cancer Therapeutic Agent.* **A.M. Gobin, E. M. Watkins, E. Quevedo, V. L. Colvin, and J. L. West.** 2010, NIH Public Access, págs. 6(6):745-52.
40. *Generating heat with metal nanoparticle.* **Richardson, O. Alexander, Govorov and H. Hugh.** Department of Physics and Astronomy, and Department of Chemistry and Biochemistry, Ohio University, Athens, OH 45701, USA : s.n., 2007.
41. *Principios de análisis instrumental.* **D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman y M. d. C. M. Gómez,** Madrid : McGraw-Hill, 2001.

ANEXO

1. CONGRESO



VIII Congreso Nacional de Ciencia e Ingeniería en Materiales

Cuernavaca Mor. a 10 de marzo de 2017

A quien corresponda

PRESENTE

El Comité Organizador del VIII Congreso Nacional de Ciencia e Ingeniería en Materiales otorga la presente

CONSTANCIA

a:

Andrés Carrillo Cazares

quien presentó la contribución **Determinación experimental de la temperatura generada por el sistema ^{177}Lu - AuNP-RGD al ser irradiado con luz láser**, de los autores: Andrés Carrillo Cazares, Dra. en C. Nallely Patricia Jiménez Mancilla, Dra. en C. Guillermina Ferro Flores, Dr. en C. Miguel Ángel Camacho López y Dra. en C. Keila Isaac Olivé en el VIII Congreso Nacional de Ciencia e Ingeniería en Materiales celebrado en la Ciudad de Cuernavaca Mor. del 8 al 10 de marzo de 2017.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Socorro Valdez Rodríguez', written over a faint circular stamp.

Dra. Socorro Valdez Rodríguez
Instituto de Ciencias Físicas
Universidad Nacional Autónoma de México

2. ARTÍCULO

De: Ajayan Vinu <jnm@hindawi.com>

Enviado: miércoles, 20 de septiembre de 2017 4:47

Para: nplimenezma@conacyt.mx

Cc: ajayan.vinu@unisa.edu.au; andres199269@gmail.com; myrna.luna@inin.gob.mx; Keila Isaac Olive; Miguel Angel Camacho Lopez

Asunto: 3628970: Your manuscript has been accepted

Dear Dr. Jiménez-Mancilla,

The review process of Research Article 3628970 titled "Study of the optical properties of functionalized gold nanoparticles in different tissues and their correlation with the temperature increase" by Andrés Carrillo-Cazares, Nallely P Jiménez-Mancilla, Myrna Alejandra Luna-Gutiérrez, Keila Isaac-Olive and Miguel Camacho-Lopez submitted to *Journal of Nanomaterials* has been completed. I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in the journal.

The publication process of your manuscript will be initiated upon the receipt of electronic files. Please log in to the Manuscript Tracking System at the link below using your username and password, and upload the electronic files of your final accepted version within the next 2-3 days.

1 **Study of the optical properties of functionalized gold nanoparticles in**
2 **different tissues and their correlation with the temperature increase**

3 A. Carrillo-Cazares^{1,2}, N.P. Jiménez-Mancilla^{1,2,3*}, M.A. Luna-Gutiérrez¹,
4 K. Isaac-Olivé², M.A. Camacho-López².

5 ¹Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares,
6 Ocoyoacac, 52750, Estado de México, Mexico

7 ²Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Estado de
8 México, Mexico.

9 ³CONACyT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, 52750, Estado de
10 México, Mexico. *Corresponding author

11
12 **Abstract**

13
14 Mie theory explains the interaction of light with a gold nanoparticle (AuNP) through
15 the absorption (C_{abs}), scattering (C_{sca}) and extinction (C_{ext}) cross-sections. These
16 parameters have been calculated in the case of AuNPs dispersed in homogeneous
17 media, but not for specific tissues. The aim of this research was to theoretically
18 obtain the optical cross-sections (C_{abs} , C_{sca} and C_{ext}) of functionalized AuNPs in liver
19 and colon tissues through Mie Theory, and correlate them with the temperature
20 increase observed experimentally in tissues containing AuNPs under plasmonic
21 photothermal irradiation using a Nd-YAG laser ($\lambda = 532$ nm). Calculations showed
22 that C_{abs} represents $98.96 \pm 0.03\%$ of C_{ext} at 532 nm. The C_{ext} value for a
23 functionalized AuNP in water was 365.66 nm^2 (94% of the theoretical maximum
24 value at 522.5 nm), 404.24 nm^2 in colon (98% of the theoretical maximum value at
25 525 nm), and 442.39 nm^2 in liver (96% of the theoretical maximum value at 525 nm).
26 Therefore, nanoparticles irradiated at 532 nm are very close to their resonance
27 value. These results correlated with the experimental irradiations of functionalized
28 AuNPs in different tissues, where the average temperature increase showed the
29 pattern liver>colon>water. The temperature increase observed (ΔT up to 13°C) is
30 sufficient to produce cellular death.

31
32 **1. Introduction**

33
34 The optical properties (absorption and scattering) present in gold nanoparticles
35 (AuNPs) play a significant role in the development of new photothermal ablation
36 systems potentially applicable in cancer treatment [1-3]. The photothermal ablation
37 process generated by AuNPs is due to the optical absorption phenomenon present
38 when AuNPs are exposed to light that induces a collective oscillation of the free
39 electrons (Surface Plasmon Resonance, SPR) [1,4-6]. The temperature around the
40 AuNPs reaches 800°C and causes irreversible thermal destruction to the tissue [7-
41 11].
42

43 Gold nanoparticles (AuNPs) have been synthesized in various size and shapes. For
44 instance, spheres, rods, cubic, prisms forms, etc. [12, 13]. Some of these structures
45 have been proposed for a variety of medical applications [2,3,14,15]. Many
46 biomolecules such as DNA chains, proteins, peptides, and aptamers, can be
47 conjugated to one AuNP [3]. The Arg-Gly-Asp (RGD) sequence has been reported
48 to have high affinity and selectivity for the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin. This integrin is expressed
49 on the surface of healthy endothelial cells at low levels but is overexpressed in the
50 tumor neovasculature of osteosarcoma, neuroblastoma, glioblastoma, melanoma,
51 lung carcinoma and breast cancer [16-19].

52

53 The SPR band intensity and wavelength characteristics of the AuNPs depend on
54 factors affecting the electron charge density on the particle surface, such as the
55 metal type, particle size, shape, structure, composition and the dielectric constant of
56 the surrounding medium (water, type of tissue). In the SPR phenomenon, the
57 electrons of gold resonate in response to incoming radiation, causing both the
58 absorption and scattering of light; these processes can be explained by Mie theory.
59 This approach provides exact analytical solutions to Maxwell's equations for spheres
60 with various diameters; the absorption and scattering probabilities are represented
61 by the absorption, scattering and extinction cross-sections (C_{abs} , C_{sca} and C_{ext}) [13].
62 The optical absorption and scattering phenomena strongly depend on the size of the
63 nanoparticles and the dielectric constant of the surrounding medium. For small
64 AuNPs in water (refractive index $n = 1.33$ and dielectric constant $\epsilon = n^2$), total
65 extinction is completely ruled by absorption; when the size increases, the scattering
66 process appears and intensifies [20-23].

67

68 The theoretical calculations of the C_{abs} , C_{sca} and C_{ext} coefficients through Mie Theory
69 have been previously reported in the case of light interacting with AuNPs dispersed
70 in a homogeneous medium, where the refractive index is considered a constant.
71 However, such parameters have not been determined for specific tissues, where the
72 refractive index has to be evaluated as a function of the interacting wavelength since
73 the absorption and scattering cross-sections are strongly affected by the
74 composition of the tissue (amount of the water, hemoglobin, and melanin). The
75 determination of these parameters could explain the temperature increase
76 generated by the AuNP, which is a critical point in the potential clinical application of
77 the plasmonic photothermal therapy.

78

79 This research aimed to calculate the optical coefficients (C_{abs} , C_{sca} and C_{ext}) of
80 functionalized gold nanoparticles in different tissues (liver and colon) by Mie Theory,
81 and to determine their correlation with the temperature increase observed
82 experimentally in tissues containing AuNPs under plasmonic photothermal
83 irradiation using a Nd-YAG laser.

84

85 **2. Materials and Methods**

86

87 **2.1. Materials**

88

89 Gold nanoparticles (20 nm) were obtained from Sigma-Aldrich (6.54×10¹¹
90 particles/mL). A 50 μM solution of c[RGDfK(C)] and PBS pH 7 were prepared in type
91 I-grade water. Homogeneous suspensions of pork liver and chicken intestinal viscera
92 (for simulating colon tissue) were blended with a small volume of water. The mixtures
93 were then passed through a strainer for sieving and homogenization.

94

95 **2.2. Preparation of the AuNP-c[RGDfK(C)] Conjugate.**

96

97 The synthesis of cyclo[Arg-Gly-Asp-Phe-Lys(Cys)] (c[RGDfK(C)]) was carried out
98 according to the method reported by Luna Gutierrez [14]. In the c[RGDfK(C)]
99 molecule, the sequence Arg-Gly-Asp-(-RGD-) acts as the active biological site. The
100 D-Phe (f) and Lys (K) residues completed the cyclic and the pentapeptide structure,
101 and Cys (C) is the spacer that contains the active thiol group that interacts with the
102 gold nanoparticle surface. For conjugate preparation, a 50 μM solution of
103 c[RGDfK(C)] was prepared using type I grade water, and then 0.02 mL (6.023×10¹⁴
104 molecules) were added to 1 mL of the AuNP suspension (20 nm, 6.54×10¹¹
105 particles/mL) followed by stirring for 5 min. No further purification was required.

106

107 **2.3. Characterization Before and After Laser Irradiation**

108

109 Before laser irradiation, the chemical conjugation was confirmed by UV-Vis, medium
110 and far IR, Raman spectroscopy and Transmission Electron Microscopy (TEM), as
111 previously reported [16,19].

112

113 After laser irradiation, TEM and the absorption spectrum in the range of 400–800 nm
114 were also obtained. The UV-Vis analysis was performed with a Perkin-Elmer
115 Lambda-Bio spectrometer using a 1 cm quartz cuvette to monitor the size and the
116 AuNP surface plasmon band around 520 nm.

117

118 **2.4. Absorption Cross-Section Evaluation**

119

120 **2.4.1. Complex dielectric constant**

121

122 The complex dielectric constant ($\varepsilon_p = \varepsilon_p' + i\varepsilon_p''$) of the AuNP was obtained from the
123 complex refractive index of gold ($\widetilde{n}_p = n_p + ik_p$) at different wavelengths (450 to 700
124 nm), according to Johnson and Christy [20]. These values were corrected by the
125 nanoparticle size using a cubic interpolation and calculated as:

126

$$\widetilde{n}_p = n_p + ik_p$$

127

The complex dielectric constant $\varepsilon_p' + i\varepsilon_p''$ was obtained as follows:

128

$$\varepsilon_p = (\widetilde{n}_p)^2 = (n_p + ik_p)^2$$
$$\varepsilon_p = (n_p)^2 - (k_p)^2 + i2(n_p * k_p)$$

129

Where:

130

$$\begin{aligned}\varepsilon_p' &= (n_p)^2 - (k_p)^2 \\ \varepsilon_p'' &= 2(n_p * k_p)\end{aligned}$$

For the ε_m media (liver or colon tissue) the complex dielectric constants were obtained using the same procedure employed for AuNP, but employing the complex refractive index reported by Giannios and Koutsoumpos [22,23]. The experimental data was used to obtain the values for the refractive index as a continuous function dependent on the wavelength.

2.4.2. Calculations of Optical properties of AuNP-RGD-Tissue by the Mie theory

Theoretical calculations were carried out using the Generalized Mie Theory considering spherical nanoparticles ($r = 20$ nm) whose diameter is lower than the irradiation wavelength (532 nm). In this case, the Mie-Drude theory was not employed. Therefore, free electron density was not directly considered. However, electron movement is taken into account indirectly in the dielectric functions of materials.

Mie Theory explains the interaction between the light and AuNPs where the absorption and scattering probabilities process are represented by the absorption cross section C_{abs} (m^2), the scattering cross section C_{sca} (m^2), and the extinction cross section C_{ext} , which is the sum of both ($C_{ext} = C_{sca} + C_{abs}$). These cross sections were calculated as follows:

$$C_{ext} = \frac{24\pi^2 R^3 \varepsilon_m^{3/2}}{\lambda} * \frac{\varepsilon_p''}{(\varepsilon_p' + 2\varepsilon_m)^2 + \varepsilon_p''^2}$$

$$C_{sca} = \frac{2^7 \pi^5 R^6}{\lambda} * \left| \frac{\varepsilon_p' - \varepsilon_m}{\varepsilon_p' + 2\varepsilon_m} \right|^2$$

$$C_{abs} = C_{ext} - C_{sca}$$

Where R is the radius of the particle and λ is the incident wavelength.

All the calculations were carried out considering the real and imaginary parts of the dielectric constant of the AuNP and tissue.

2.5. Laser Arrangement

Laser experiments were conducted using an Nd-YAG laser (Qsmart-100, Quantel laser) pulsed for 5 ns at 532 nm (energy=45.9 mJ/pulse), with a repetition rate of 5, 10 and 15 Hz. The power of each laser pulse was measured by a Dual-Channel Joulemeter/Power Meter (Molelectron EPM 200, Coherent). A diverging lens was used in the path of the laser beam in a way that the well plate was fully covered by the laser (diameter = 7 mm, area = 0.38 cm^2) (Fig. 1). The well plate was placed on a

170 heating plate at 37°C (Microplate Thermo Shaker, Human Lab MB100-2A,
171 Hangzhou Zhejia, China) during laser irradiation.

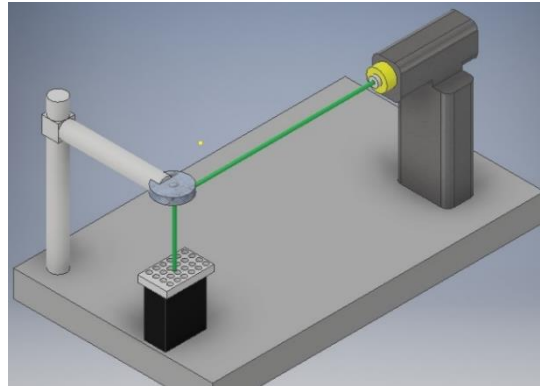


Figure1. Laser arrangement.

172
173
174

2.5.1. Laser Irradiation Experiments

175
176

The effect of laser irradiation on the temperature increasing rate was measured in the following treatments:

177

- 178 a) Control (200 μ L of type I grade water or 200 μ L of PBS pH7)
- 179 b) 100 μ L liver tissue and 100 μ L of control solution
- 180 c) 100 μ L colon tissue and 100 μ L of control solution
- 181 d) 100 μ L of AuNP-c[RGDfK(C)] and 100 μ L of control solution
- 182 e) 100 μ L liver tissue and 100 μ L of AuNP-c[RGDfK(C)]
- 183 f) 100 μ L colon tissue and 100 μ L of AuNP-c[RGDfK(C)]

184
185
186

The described treatments were exposed individually to the laser ($n= 6$). The temperature was measured using a type k thermocouple (model TPK-01) of immediate reaction that had been previously calibrated (probe diameter = 0.8 mm). A thermocouple was introduced into the well plate, and the temperature was registered every single second using a cold-junction-compensated K-thermocouple fixed to a digital converter (MAX6675, Maxim Integrated TM) connected to a microcontroller board (Arduino Uno) with a USB computer connection.

187

The total delivered energy ($DE_m, J/cm^2$) to the well plate was calculated as follows:

188

$$DE_m = DP_m * t$$

Where t is the irradiation time, DP_m is the irradiance or density power in W/cm^2 and is calculated by:

189

$$DP_m = \frac{P_m}{A}$$

Where P_m is the average power ($P_m = E * f$), f is the repetition rate in Hz, E is the energy by pulse in Joule/pulse, and A is the irradiation area in cm^2 . The density

202 power DP_m was kept constant at 0.65 W/cm^2 for each irradiation time point 6.5, 3.5,
203 1.5 min which corresponds to the 5, 10 and 15 Hz frequencies, respectively [8,24].

204

205 **2.6. Statistical Analysis**

206

207 Differences among treatment data were evaluated with Student's t-test (grouped
208 analysis, significance was defined as $p < 0.05$).

209

210 **3. Results and Discussion**

211

212 **3.1. Characterization Before and After Laser Irradiation**

213

214 **3.1.1. Before laser irradiation**

215

216 Spectroscopy techniques and TEM images demonstrated that AuNPs were
217 functionalized with the c[RGDfK(C)] peptide accordingly with previous reports
218 [16,19]. The average particle diameter was $21.56 \pm 0.06 \text{ nm}$.

219

220 The UV-Vis spectrum showed the surface plasmon resonance band at 520 nm for
221 AuNPs, and a red shift to 522 nm for AuNP-c[RGDfK(C)] was observed. This shifting
222 is attributed to the changes in the refraction index as consequence of the interaction
223 between the peptide and the AuNP surface [16].

224

225 Raman spectroscopy and Medium and Far-infrared showed several well-defined
226 bands characteristics of the AuNP-c[RGDfK(C)] conjugate [16]. The Far-IR spectrum
227 of the AuNP-c[RGDfK(C)] showed a characteristic band at $279 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, which is
228 representative of the Au-S bond [18,19].

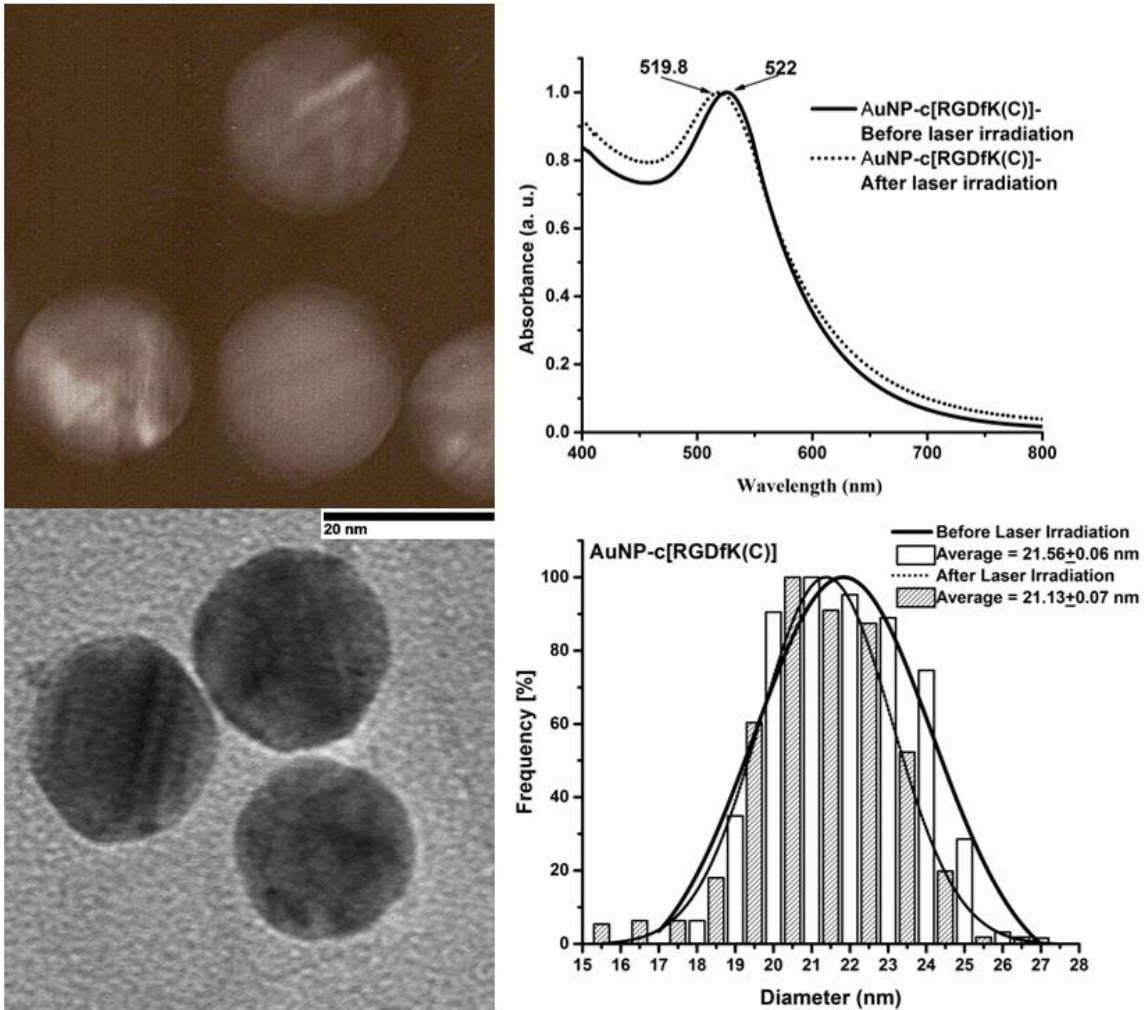
229

230 **3.1.2. After laser irradiation**

231

232 TEM images after laser irradiation demonstrated that the [RGDfK(C)] peptide,
233 remain functionalized to AuNPs surface. The particle average diameter changes
234 from $21.56 \pm 0.06 \text{ nm}$ to $21.13 \pm 0.07 \text{ nm}$ (Figure 2). The observed size modification
235 after laser irradiation on AuNP citrate-stabilized was from $20 \pm 1.6 \text{ nm}$ to $19.38 \pm$
236 0.02 nm , which can be explained as a consequence of molecular steric
237 rearrangement on the nanoparticle surface.

238



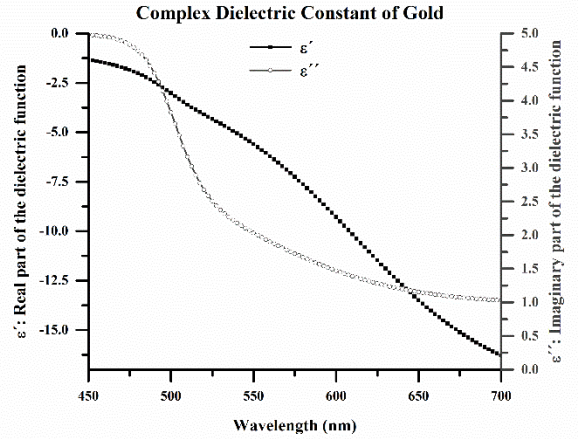
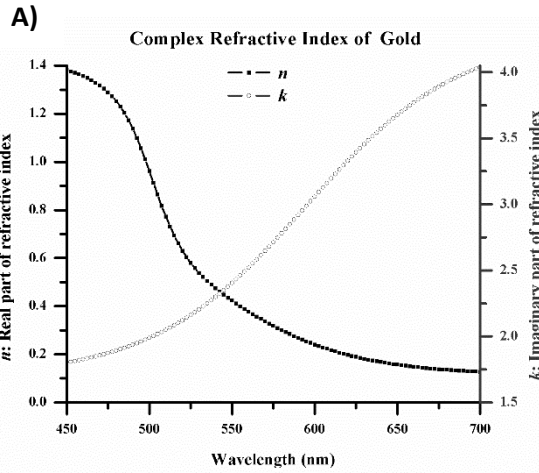
239
240 Figure 2. Morphological Results Before and After Laser Irradiation.

241 TEM measurements were supported by SPR band on UV-Vis spectra. The SPR for
242 AuNP-c[RGDfK(C)] shifted from 522 nm to 519.8 nm after irradiation, while for AuNP
243 the shifting was from 520 nm to 517.5 nm (Figure 2). These shifts to a lower
244 wavelength are also an indication of a reduction in the nanoparticle size.

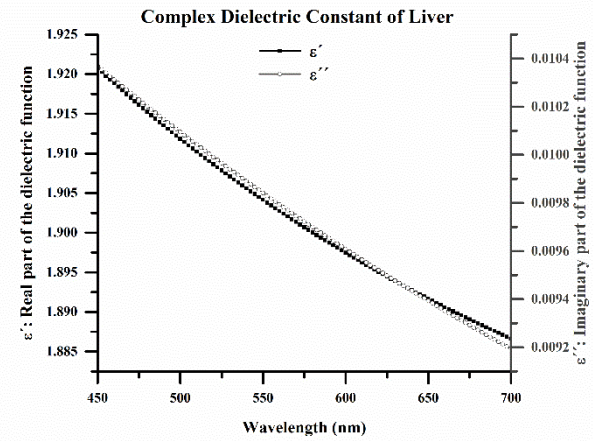
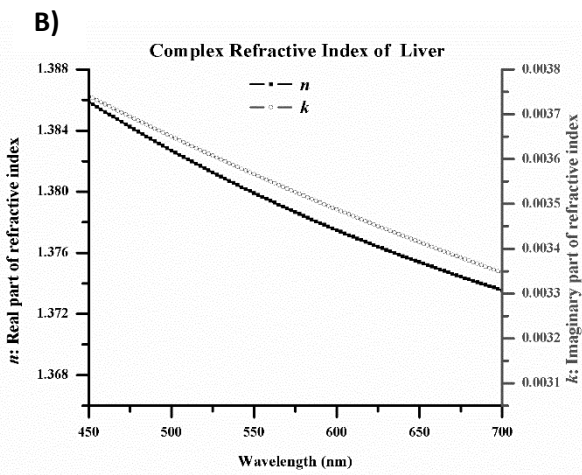
245
246
247 **3.2. Absorption Cross-Section Evaluation**

248
249 3.2.1. Complex Dielectric Constant

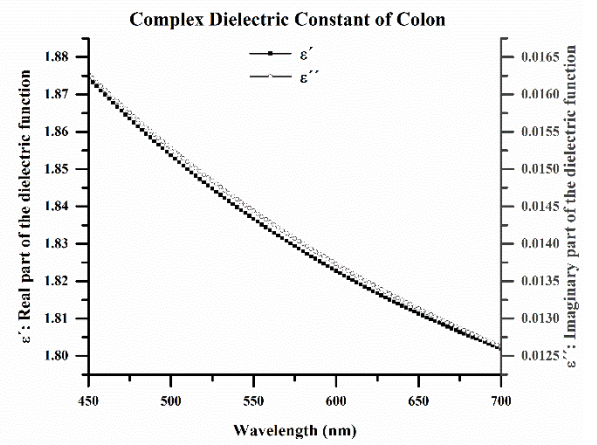
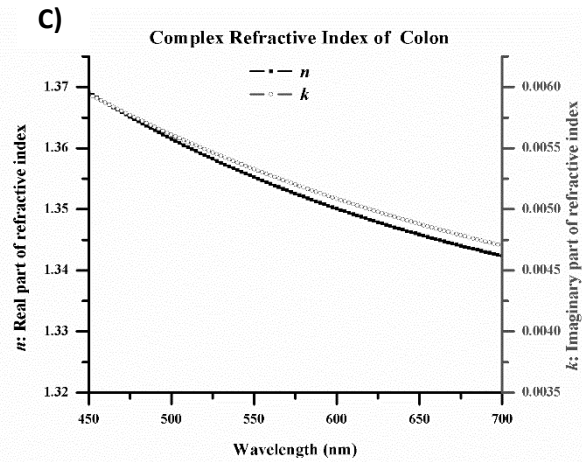
250
251 Figure 3 shows the differences between the real and imaginary parts of the refractive
252 index and dielectric constant of a) gold, b) liver tissue and c) colon tissue. The real
253 part of the dielectric constant is related to the stored energy, and the imaginary part
254 is related to the dissipation of the energy within the medium.



256



257



258

259

260

Figure 3. Real and imaginary parts of the refractive index (n , k) and dielectric constant (ϵ' , ϵ'') of the A) gold, B) liver tissue and C) colon tissue.

261

262

263

264

3.3. Optical coefficients of AuNP-RGD-Tissue by the Mie theory

In agreement with previous reports [1,4] the results showed in this research demonstrated that the C_{ext} is mainly due to the absorption process contribution (Figure 4). The effective absorption section represents the $98.96 \pm 0.03\%$ of the total extinction effective section (C_{ext}). Therefore the scattering one can be considered negligible. The maximum C_{ext} value is observed at the irradiation wavelength of 522.5 nm for AuNP-RGD in a water medium and 525 nm when the nanoparticles are deposited or embedded in the tissues. This result means that the maximum energy absorption occurs at those wavelengths; consequently, the highest temperature increase rate should be reached at such wavelengths as well.

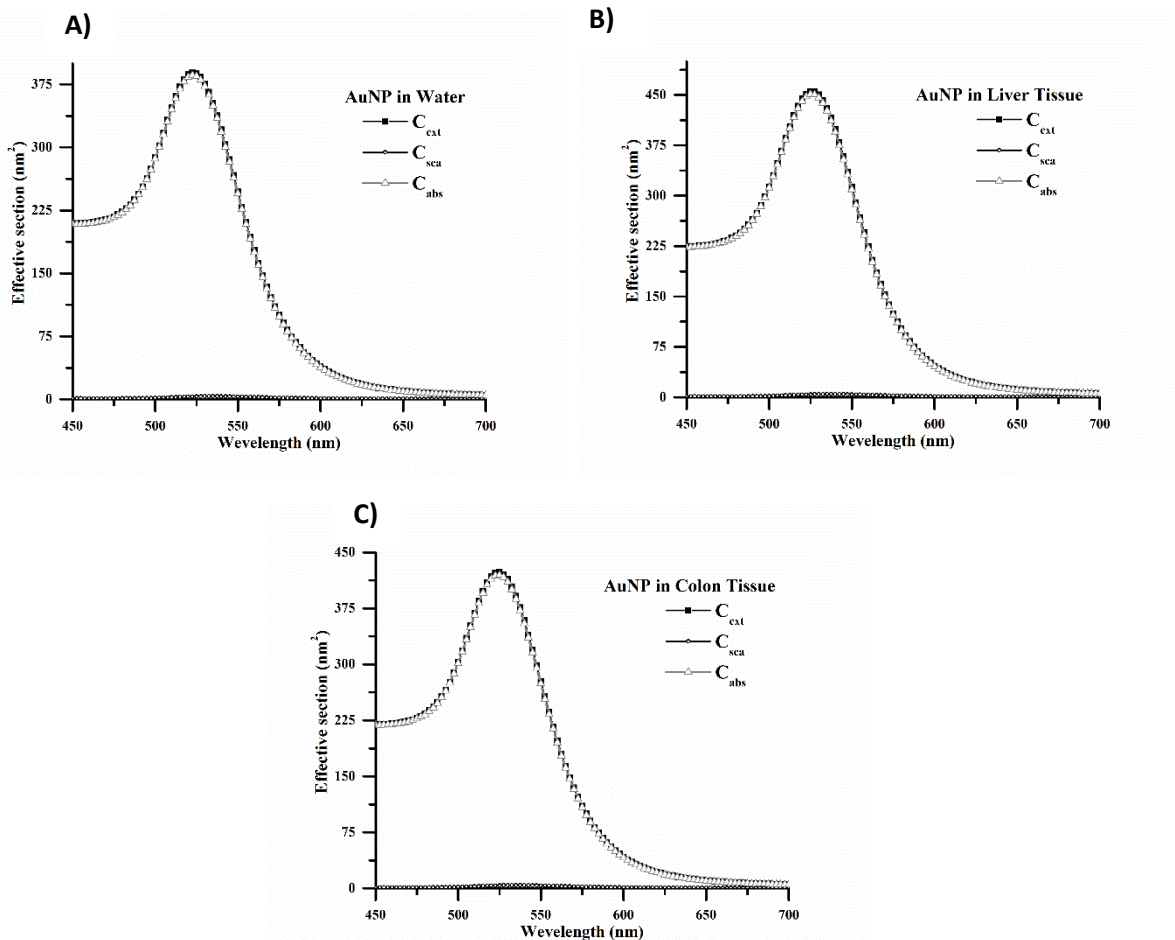


Figure 4. Cross section absorption, scattering, and extinction, for AuNP in A) water, B) liver tissue and C) colon tissue.

In this research, the experimental part was carried out using a 532 nm Nd-YAG laser. For this wavelength, the AuNP-RGD in water ($n=1.33$) has a $C_{ext} = 365.66 \text{ nm}^2$, while these values were 442.39 and 404.24 nm² for (AuNP-RGD)-liver and (AuNP-RGD)-colon, respectively. This result means that the irradiation of these three media

299 containing nanoparticles would increase the temperature in the pattern
300 liver>colon>water.

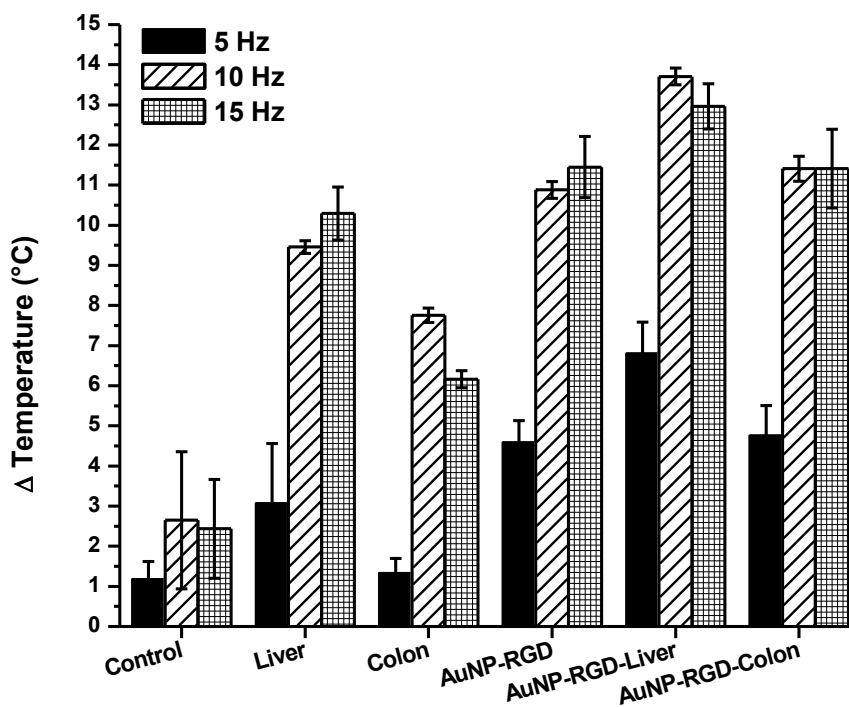
301

302 3.4 Laser irradiation

303

304 The ratio between the temperature increase and the irradiation frequencies in each
305 one of the treatments is shown in Figure 5. Except for colon tissue, there is no
306 significant difference ($p < 0.05$) between the ΔT reached with 10 or 15 Hz. However,
307 there are significant differences between the higher frequencies with the lowest
308 tested (5 Hz). To generate the greatest amount of temperature, it is necessary that
309 the pulse duration and repetition frequency be in the same order the relaxation time
310 of the SPR expansion wave, which is of femtoseconds. For the three frequencies
311 studied, the temperature increased produced in the system (AuNP-RGD)-liver is
312 significantly higher than the (AuNP-RGD)-colon and (AuNP-RGD)-water systems.
313 These increments followed the same trend of the theoretical C_{ext} calculated before.

314



315

316

Figure 5. Total temperature increase vs. irradiation frequency with laser

317

318 The C_{ext} obtained at 532 nm for AuNP-RGD in the water media, colon tissue, and
319 liver tissue are respectively 94%, 98% and 96% of the C_{ext} maximum values obtained
320 at 522.5 nm and 525 nm. In other words, the nanoparticles were irradiated with a λ
321 very close to that of the resonance value. This incident energy reached the
322 nanoparticle at all the tested frequencies (5, 10, 15 Hz), so the higher the frequency,
323 the higher the energy deposited in the nanoparticle. This energy deposited is
324 absorbed in a 98.96%, meaning that almost all the absorbed energy is converted
325 into heat, leading to temperature increase. Therefore, the calculation of C_{ext} , C_{abs}

326 and C_{sca} helps in the prediction of a pattern of temperature increase when AuNP-
327 RGD immersed in a medium is irradiated.

328

329 Figure 6 shows the total temperature increase reached in each of the treatments at
330 the different repetition frequencies. There is no statistically significant difference
331 between the temperature values reached by the control sample as the frequency
332 changes. The temperature reaches a maximum and remains constant over time,
333 which indicates that the increase in the control sample does not depend on the
334 repetition frequency.

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

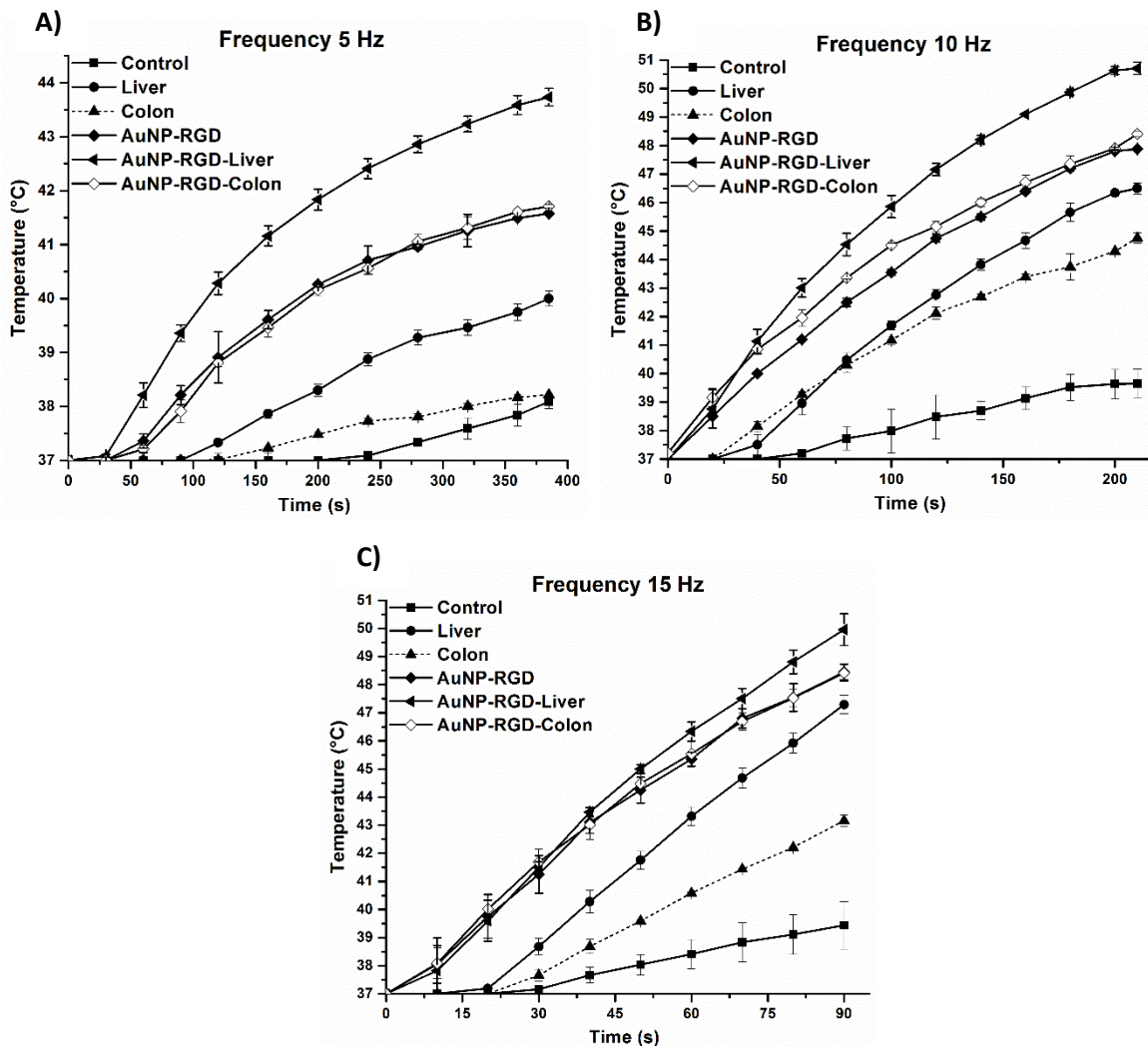
368

369

370

371

372



365 Figure 6. Temperature increase at different frequencies A) 5Hz, B) 10Hz and C)
366 15Hz.

367

368

369

370

371

372

Holmer et al. reported that the optical absorption of liver tissue is higher than that of
colon tissue because the former contains more blood irrigation than the later [25].
Therefore, liver and colon were employed in this work as models of high and low
blood irrigation tissues, respectively. Tissues showed statistically significant
difference between them regarding the temperature values reached by varying the

373 frequency. Higher temperature values are obtained with the liver ($\approx 13.7^\circ\text{C}$). This
374 difference is attributed to the different hemoglobin concentration between liver and
375 colon and agrees with the Holmer et al. results. Hemoglobin is the tissue component
376 of greater absorbance to wavelengths close to 532 nm. Consequently, liver tissue
377 has higher absorption (C_{ext} and C_{abs}), and the (AuNP-RGD)-liver system has the
378 highest temperature increase.

379

380 Several authors have mentioned that the local temperature near the AuNP is
381 increased up to approximately $700 - 800^\circ$, which is lower than the fusion temperature
382 of gold (1063°C) [7-11]. Therefore, it could be expected a temperature increase of
383 the order of 10°C at macroscopic levels. In this work, gold nanoparticles (6.54×10^{11}
384 AuNP/mL) generated a temperature rise of approximately 13°C (200 s of irradiation
385 at 10 Hz or after 90 s of irradiation at 15 Hz).

386 If a temperature increase of 13°C occurs in cells or tissues above basal body
387 temperature (37°C), several processes could lead to cellular death. These
388 processes are related to transitions of lipid phases, denaturalization of proteins,
389 conformational changes of RNA and DNA, among others. This is the reason why the
390 use of AuNPs could be useful for photothermal therapy using a Nd-YAG laser at 532
391 nm because the therapy efficiency (cell death) is directly related to the amount of
392 heat produced.

393

394 **4. Conclusions**

395

396 The calculation of C_{ext} , C_{abs} and C_{sca} for the (AuNP-RGD)-water, (AuNP-RGD)-colon
397 and (AuNP-RGD)-liver systems helps to understand the temperature increase
398 observed when they are irradiated with a Nd-YAG laser at 532 nm. The temperature
399 increased obtained (approximately 13°C) is sufficient to produce cellular death by
400 photothermal therapy.

401

402

403 **Competing Interests**

404

405 The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of
406 this paper.

407

408 **Acknowledgments**

409

410 This study was supported by the Mexican National Council of Science and
411 Technology CATEDRAS-CONACYT-ININ-337 and CONACYT-SEP-CB-2014-01-
412 242443. This research was carried out as part of the activities of the "Laboratorio
413 Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos, CONACyT." The
414 scholarship granted to Andres Carrillo Cazares through CONACyT-PNPC program
415 is also acknowledged.

416

417 **References**

418

- [1] X. Huang, & M. A. El-Sayed, "Gold nanoparticles: optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy," *Journal of Advanced Research*, vol. 1, no. 1, pp. 13-28, 2010.
- [2] J. Gautier, E. Allard-Vannier, K. Hervé-Aubert, M. Soucé, & I. Chourpa, "Design strategies of hybrid metallic nanoparticles for theragnostic applications," *Nanotechnology*, vol. 24, no. 43, pp. 432002, 2013.
- [3] G. Ferro-Flores, C. Arteaga de Murphy, & L. Meléndez-Alafort, "Third generation radiopharmaceuticals for imaging and targeted therapy," *Current Pharmaceutical Analysis*, vol. 2, no. 4, pp. 339-352, 2006.
- [4] S. Hashimoto, D. Werner, & T. Uwada, "Studies on the interaction of pulsed lasers with plasmonic gold nanoparticles toward light manipulation, heat management, and nanofabrication," *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry*, vol. 13, no. 1, pp. 28-54, 2012.
- [5] R. R. Letfullin, T. F. George, G. C. Duree, & B. M. Bollinger, "Ultrashort laser pulse heating of nanoparticles: comparison of theoretical approaches," *Advances in Optical Technologies*, vol. 2008, 2008.
- [6] A. Moores, & F. Goettmann "The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications," *New Journal of Chemistry*, vol. 30, no. 8, pp. 1121-1132, 2006.
- [7] R. R. Letfullin, C. B. Iversen, & T. F. George, "Modeling nanophotothermal therapy: kinetics of thermal ablation of healthy and cancerous cell organelles and gold nanoparticles," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 7, no. 2, pp. 137-145, 2011.
- [8] H. Mendoza-Nava, G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-García, J. Serment-Guerrero, C. L. Santos-Cuevas, N. P. Jiménez-Mancilla, M. A. Luna-Gutiérrez, & M. A. Camacho-López, "Laser Heating of Gold Nanospheres Functionalized with Octreotide: In Vitro Effect on HeLa Cell Viability," *Photomedicine and Laser Surgery*, vol. 31, no. 1, pp. 17-22, 2013.
- [9] N. N. Nedyalkov, S. E. Imamova, P. A. Atanasov, R. A. Toshkova, E. G. Gardeva, L. S. Yossifova, M.T. Alexandrov & M. Obara, "Interaction of gold nanoparticles with nanosecond laser pulses: Nanoparticle heating". *Applied Surface Science*, vol. 257, no. 12, pp. 5456-5459, 2011.
- [10] L. Sánchez-Hernández, G. Ferro-Flores, N. P. Jiménez-Mancilla, M. A. Luna-Gutiérrez, C. L. Santos-Cuevas, B. E. Ocampo-García, E. Azorín-Vega, & K. Isaac-Olivé, "Comparative effect between laser and radiofrequency heating of RGD-gold nanospheres on MCF7 cell viability," *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 15, no. 12, pp. 9840-9848, 2015.
- [11] X. Huang, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, & M. A. El-Sayed, "Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles," *Lasers in medical science*, vol. 23, no. 3, pp. 217, 2008.
- [12] Wang, M. X., Brodin, J. D., Millan, J. A., Seo, S. E., Girard, M., Olvera de la Cruz, M., ... & Mirkin, C. A. (2017). Altering DNA-Programmable Colloidal Crystallization Paths by Modulating Particle Repulsion. *Nano Letters*, 17(8), 5126-5132.
- [13] K. S. Lee, P. K. Jain, I. H. El-Sayed, & M. A. El-Sayed, "Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine," *Journal of Physical and Chemical. B*, vol. 110, no. 14, pp. 7238-7248, 2006.
- [14] G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-García, C. L. Santos-Cuevas, E. Morales-Avila, & E. Azorín-Vega, "Multifunctional radiolabeled nanoparticles for targeted therapy," *Current medicinal chemistry*, vol. 21, no 1, pp. 124-138. 2014.
- [15] A. Cantelli, G. Battistelli, G. Guidetti, J. Manzi, M. Di Giosia, & M. Montalti, "Luminescent gold nanoclusters as biocompatible probes for optical imaging and theranostics," *Dyes and Pigments*, vol. 135, pp. 64-79, 2016.

- [16] M. Luna-Gutiérrez, G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-García, N. P. Jiménez-Mancilla, E. Morales-Avila, D. León-Rodríguez, & K. Isaac-Olivé, "177Lu-labeled monomeric, dimeric and multimeric RGD peptides for the therapy of tumors expressing $\alpha(v)\beta(3)$ integrins," *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, vol. 55, no. 4, pp. 140-148, 2012.
- [17] B. E. Ocampo-García, C. L. Santos-Cuevas, L. M. De León-Rodríguez, R. García-Becerra, D. Ordaz-Rosado, M. A. Luna-Gutiérrez, N. P. Jiménez-Mancilla, M. E. Romero-Piña & G. Ferro-Flores, "Design and biological evaluation of 99mTc-N2S2-Tat(49–57)-c(RGDyK): A hybrid radiopharmaceutical for tumors expressing $\alpha(v)\beta(3)$ integrins," *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 40, no. 4, pp. 481-487, 2013.
- [18] A. Vilchis-Juárez, G. Ferro-Flores, C. L. Santos-Cuevas, E. Morales-Avila, B.E. Ocampo-García, L. Díaz-Nieto, M. A. Luna-Gutiérrez, N. P. Jiménez-Mancilla, M. Pedraza-López, & L. M. Gómez-Oliván, "Molecular targeting radiotherapy with cyclo-RGDFK (C) peptides conjugated to 177Lu-labeled gold nanoparticles in tumor-bearing mice," *Journal of biomedical nanotechnology*, vol. 10, no 3, pp. 393-404, 2014.
- [19] E. Morales-Avila, G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-García, & L. M. Gómez-Oliván, "Engineered Multifunctional RGD-Gold Nanoparticles for the Detection of Tumour-Specific $\alpha(v)\beta(3)$ Expression: Chemical Characterisation and Ecotoxicological Risk Assessment," *Journal of biomedical nanotechnology*, vol. 8, no. 6, pp. 991-999, 2012.
- [20] W. S. M. Werner, K. Glantschnig, & C. Ambrosch-Draxl, "Optical constants and inelastic electron-scattering data for 17 elemental metals," *Journal of Physical and Reference Data*, vol. 38, no. 4, pp. 1013-1092, 2009.
- [21] P. B. Johnson & R. W. Christy, "Optical constants of the noble metals," *Physical review B*, vol. 6, no. 12, pp. 4370, 1972.
- [22] P. Giannios, S. Koutsoumpou, K. G. Toutouzas, M. Matiatou, G. C. Zografos, & K. Moutzouris, "Complex refractive index of normal and malignant human colorectal tissue in the visible and near-infrared," *Journal of biophotonics*, 2016.
- [23] P. Giannios, K. G. Toutouzas, M. Matiatou, K. Stasinou, M. M. Konstadoulakis, G. C. Zografos, & K. Moutzouris, "Visible to near-infrared refractive properties of freshly-excised human-liver tissues: marking hepatic malignancies," *Scientific reports*, vol. 6, 2016.
- [24] N. Jiménez-Mancilla, G. Ferro-Flores, C. Santos-Cuevas, B. Ocampo-García, M. Luna-Gutiérrez, E. Azorín-Vega, M. Camocho López & E. Torres-García. "Multifunctional targeted therapy system based on 99mTc/177Lu-labeled gold nanoparticles-Tat (49–57)-Lys3-bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells", *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, vol. 56, no 13, p. 663-671, 2013.
- [25] C. Holmer, K. S. Lehmann, J. Risk, A. Roggan, C.T. Germer, C. Reissfelder & J. P. Ritz. "Colorectal tumors and hepatic metastases differ in their optical properties-relevance for dosimetry in laser-induced interstitial thermotherapy". *Lasers in surgery and medicine*, vol. 38, no. 4, p. 296-304, 2006.