UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES

ININ

FACULTAD DE MEDICINA

Terapia fototérmica plasmónica multifotónica utilizando AuNP-iPSMA en células de cáncer de próstata

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN FÍSICA MÉDICA

P R E S E N T A

L.B.M. Flonth Viena Gutiérrez Cruz

Comité de Tutores: **Dra. en C.S. Nallely Patricia Jiménez Mancilla**
Dr. en C. Miguel Ángel Camacho López
Dra. en C. Keila Isaac Olivé

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO **2020**

Índice

Resumen **1**

Abstract **3**

Abreviaturas **5**

Capítulo 1: Introducción **8**
1.1. Problemática social 8
1.2. Planteamiento del problema 8

Capítulo 2: Estado del arte **10**
2.1. Antecedentes 10
2.2. Pregunta investigación 14
2.3. Hipótesis 14
2.4. Objetivos 14
Objetivo general 14
Objetivos específicos 14

Capítulo 3: Marco Teórico **15**
3.1. Terapia fototérmica 15
3.2. Resonancia de plasmón de superficie (SPR) 16
3.3. Interacción de la luz con las AuNPs 17
3.4. Transferencia de calor al medio 18
3.5. Irradiación laser de AuNPs a 532 nm 20
3.6. Absorción multifotónica 21
3.7. Ventana óptica biológica 22
3.8. Antígeno prostático específico de membrana (PSMA) 23
Inhibidor del antígeno prostático específico de membrana (iPSMA) 24
Cáncer de próstata 24
3.9. Daño celular provocado por la terapia fototérmica 25

Capítulo 4: Metodología **27**
4.1. Síntesis del sistema AuNP-HYNIC-iPSMA 27
4.2. Caracterización físico-química de AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA 27
Caracterización por UV-Vis 27
Caracterización por TEM 28

Caracterización por DLS 28
4.3. Irradiación y monitoreo de la temperatura de AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA 29
4.4. Determinación de la viabilidad celular de células LNCaP 30

Capítulo 5: Resultados y Discusión 32
5.1. Síntesis del sistema AuNP-HYNIC-iPSMA 32
5.2. Caracterización físico-química de AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA 33
5.3. Irradiación y monitoreo de la temperatura de AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA 36
5.4. Efectos térmicos y de viabilidad de células LNCaP 43

Capítulo 6: Conclusiones y trabajo futuro 45
6.1. Conclusiones 45
6.2. Trabajo futuro 46

Capítulo 7: Referencias 47

ANEXOS 54
Anexo 1: Congreso 54
Anexo 2: Artículo 56

Resumen

El calentamiento de nanopartículas de oro (AuNPs) inducido por excitación fotónica es la base de la terapia fototérmica plasmónica (PPT), que utiliza el calor generado por las AuNPs cuando estas son irradiadas por luz láser para producir ablación térmica celular. La producción de calor se debe a que, al exponer a las AuNPs a luz láser, estas experimentan resonancia del plasmón de superficie (SPR), debido a que los electrones libres de los átomos superficiales de la nanopartícula de oro (AuNP) se excitan. La SPR da a la AuNP la propiedad de absorber o dispersar parte de la luz incidente. La luz absorbida es transformada en calor, dado que, los electrones en estado excitado regresan a su estado base, mediante la liberación de energía térmica al medio.

La limitante de la PPT, es la longitud de onda de irradiación ya que esta, debe coincidir con la longitud a la que se presenta la SPR y está en el caso de AuNPs de 20 nm se encuentra en los 520 nm. La aplicación de la PPT a nivel *in vivo*, se ve limitada por la alta absorción que presentan los tejidos biológicos, debido a la gran cantidad de agentes absorbentes como la melanina y la hemoglobina.

Una alternativa a la PPT es la terapia fototérmica plasmónica multifotónica (MPPT) en la cual la excitación de un electrón de la banda de valencia se lleva a cabo por la absorción simultanea de dos o más fotones de energía más baja, mientras que la suma de las energías de los fotones exceda la energía de la banda. La ventaja que presenta la MPPT es que, al utilizar longitudes de onda con menor energía esta presentaría menor absorción por los componentes del tejido.

El objetivo de este proyecto fue sintetizar, caracterizar y evaluar el sistema AuNP-HYNIC-iPSMA para terapia fototérmica plasmónica multifotónica con irradiación láser a una longitud de onda de 1064 nm en células de cáncer de próstata.

La síntesis del sistema AuNP-HYNIC-iPSMA, se realizó mediante la interacción electrostática del grupo amino (NH_2) del péptido (HYNIC-iPSMA) con la superficie de la nanopartícula (20 nm de diámetro). La SPR de las AuNPs se observó en 522 nm y las imágenes de TEM mostraron que las AuNPs tienen forma esférica homogénea con un diámetro promedio de de 19 ± 4 nm, mientras que en los estudios de DLS mostraron diámetro promedio de 21.97± 3 nm. El espectro UV-Vis del sistema AuNP-HYNIC-iPSMA mostró además de la banda SPR de las AuNPs dos bandas más, una centrada a 229 nm y la otra a 280 nm, relacionadas con la presencia del péptido. Las imágenes TEM del sistema mostraron un aro alrededor de la

nanopartícula, causado por los péptidos en las inmediaciones de esta y un diámetro promedio de 20± 3 nm, mientras que por DLS presentaron diámetros de 21.7± 5 nm.

La irradiación de las AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA se realizaron utilizando un láser Nd:YAG a longitudes de onda de 1064 y 532 nm a frecuencias de 5, 10 y 15 Hz. El monitoreo de la temperatura se llevó a cabo mediante un termopar tipo k acoplado a una tarjeta ARDUINO codificada para lecturas de temperatura cada segundo. Los resultados de temperatura de forma independiente a la frecuencia utilizada mostraron un incremento de esta con respecto su grupo control para ambas longitudes de onda. Sin embargo, la frecuencia de 10 Hz mostró mejores resultados.

Los efectos del incremento de temperatura sobre la viabilidad celular se realizaron en células de cáncer de próstata humano LNCaP que presentan receptores al péptido -HYNIC-iPSMA. Las células fueron incubadas durante 2 horas con AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA, posteriormente irradiadas a las 2 longitudes de onda del láser y frecuencias mencionadas anteriormente. La medición de la viabilidad se realizó mediante el kit XTT, obteniendo los porcentajes de viabilidad. Los resultados mostraron mayor disminución en el porcentaje de viabilidad celular en las células expuestas al sistema AuNP-HYNIC-iPSMA con irradiación a 1064 nm a una frecuencia 10 Hz.

Con los resultados obtenidos, se puede afirmar que el sistema AuNP-HYNIC-iPSMA con irradiación láser a 1064 nm a una frecuencia de 10 Hz puede ser utilizado para la realización de terapia fototérmica plasmónica multifotónica ya que el incremento de temperatura y la disminución de la viabilidad celular en células de cáncer de próstata son mayores a los obtenidos en la terapia fototérmica plasmónica con irradiación láser de 532 nm.

Abstract

Heating of gold nanoparticles (AuNPs) induced by photon excitation is the base of the Plasmonic Photothermal Therapy (PPT), which is a phenomenon that happen when gold nanoparticles (AuNP) are heated by laser light and these generate cellular thermal ablation.

The heat is produced due to surface plasmon resonance (SPR), where free electrons of the AuNPs are irradiated and excitado by a laser. An important property is that SPR makes AuNPs capable of light absorbing and scattering. When excitado electrons return to the minimum state of energy, they liberate their energy as heat to the environment, which is used for therapy. On the other hand, SPR is limited by laser wavelength, which must be the same as the SPR wavelength, for example, spherical AuNPs of 20 nm should be irradiated with 520 nm laser wavelength. PPT application for living beings is limited by radiation absorption of biological tissues, which contain absorbent agents like melanin and hemoglobin.

An alternative to Multiphoton Plasmon Photothermic Therapy (MPPT), where the excitation of electrons is produced by the simultaneous absorption of at least two low-energy photons, with the condition that the combined energy of these photons is at least the energy of the valence band. The advantage of MPPT is its ability to achieve deeper biological tissue.

Due to these advantages, the main objective of this project was to synthesize, characterize and evaluate the AuNP-HYNIC-iPSMA system to be used for MPPT using a 1064 nm laser wavelength to threat prostate cancer cells.

The AuNP-HYNIC-iPSMA system was synthesized by electrostatic interaction of the NH2 amine with the HYNIC-iPSMA peptide in the gold nanoparticle surface of the 20 nm diameter gold nanoparticle. SPR was observed using a 522 nm laser wavelength, and the nanoparticles size was determined by TEM images, where these had spherical shapes of 19±4 nm diameter, and by DLS technique, where these had spherical shapes of 21.97±3 nm diameter. The UV-Vis spectrum of this AuNP-HYNIC-iPSMA system showed another two SPR bands, which were centered in the 229 and 280 nm wavelength, related to the peptide used. TEM images showed some rings around nanoparticles with 20+ 3 nm diameter and DLS showed the same, with 21.7+ 5 nm though.

A Nd:YAG laser, with 532 and 1064 nm wavelengths and 5, 10, 15 Hz frequencies, was used to irradiate the AuNPs and AuNP-HYNIC-iPSMA. The temperature was controlled by a type K thermocouple which was coupled to an ARDUINO capable of reading the temperature every second. The temperature results, which were frequency independent, showed a

bigger increase of this than the control group. Nevertheless, the 10 Hz frequency got the best results.

Temperature increase effect was evaluated on human prostate cancer LNCaP cells, which have HYNIC-iPSMA adequate receptors. These cells were incubated 2 hours with AuNPs and AuNP-HYNIC-iPSMA, and then they were irradiated with both of the laser wavelengths and all the frequencies. The survival cells measure was done with the XTT kit. These measures showed more dead cells when these were treated with the AuNP-HYNIC-iPSMA system, using a 1064 nm wavelength and 10 Hz frequency.

To sum up, the AuNP-HYNIC-iPSMA system, using 10654 nm wavelength and 10 Hz frequency, could be used to produce MPPT, with de advantage of a great temperature increase and, as a consequence, a great number of dead prostate cancer cells, which is bigger than those produced with a 532 nm laser wavelength irradiation condition.

Abreviaturas

NIR I	Primera ventana biológica
NIR II	Segunda ventana biológica
SPR	Resonancia de plasmón de superficie
PPT	Terapia fototérmica plasmónica
AuNP	Nanopartícula de oro
Nd: YAG	Granate de itrio y aluminio dopado con impurezas de neodimio
iPSMA	Inhibidor de antígeno prostático específico de membrana
PSMA	Antígeno prostático específico de membrana
UV/VIS	Ultravioleta-visible
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
DLS	Dispersión dinámica de luz
$\boldsymbol{P_m}$	Potencia media
$\boldsymbol{DP_m}$	Densidad de Potencia
$\boldsymbol{DE_m}$	Densidad de energía

Índice de figuras

Figura 1. Termoablación celular por irradiación láser a AuNPs en tejido tumoral 15
Figura 2. Oscilación plasmónica de una AuNP bajo la irradiación láser 16
Figura 3. Mecanismos que ocurren al interactuar la luz láser con la AuNP..... 18
Figura 4. Generación de burbujas por láser en AuNPs en agua 20
Figura 5. SPR para AuNP esférica de diferentes diámetros 20
Figura 6. Mecanismo de absorción multifotónica..... 21
Figura 7. Coeficientes de absorción de componentes del tejido 23
Figura 8. Estructura química del péptido HYNIC-iPSMA y AuNP..... 27
Figura 9. Arreglo para la irradiación láser 30
Figura 10. Estructura tridimensional AuNP-HYNIC-iPSMA..... 32
Figura 11. Espectro UV-Vis de AuNPs de 20 nm de diámetro..... 33
Figura 12. Micrografía TEM de AuNPs en buffer de citrato 33
Figura 13. Histograma de las AuNPs por TEM..... 34
Figura 14. Espectro UV-Vis del HYNIC-iPSMA 34
Figura 15. Espectro UV-Vis de AuNP, HYNIC-iPSMA y AuNP-HYNIC-iPSMA 35
Figura 16. Micrografía TEM de las AuNP-HYNIC-iPSMA..... 36
Figura 17. Energía por nivel a 532 nm y 1064 nm del láser. 37
Figura 18. Temperatura de AuNP, AuNP-HYNIC-iPSMA irradiadas a 532 nm..... 39
Figura 19. Temperatura de AuNP, AuNP-HYNIC-iPSMA irradiadas a 164 nm..... 40
Figura 20. Temperatura total de los sistemas irradiados a 532 nm y 1064nm. 40
Figura 21. Espectro UV-Vis de AuNP-HYNIC-iPSMA con y sin irradiación a 532 nm..... 41
Figura 22. Espectro UV-Vis de AuNP-HYNIC-iPSMA con y sin irradiación a 1064 nm..... 42
Figura 23. Viabilidad celular de células LNCaP con irradiación a 532 nm..... 43
Figura 24. Viabilidad celular de células LNCaP con irradiación a 1064 nm..... 44

Índice de tablas

Tabla 1. Características del láser Nd:YAG Q-smart 100 29

Tabla 2. Cálculos del tiempo de irradiación láser a 532 nm y 1064 nm a 5, 10 y 15 Hz. 38

Tabla 3. Resultados de DLS después de la irradiación a 532 nm y 1064 nm. 42

Capítulo 1: Introducción

1.1. Problemática social

El cáncer es una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, y cada año hay alrededor de 14 millones de pacientes con cáncer nuevos, de los cuales, 8 millones mueren a causa de enfermedades relacionadas con este (1). Los tipos de cáncer que afectan a los hombres con más frecuencia son los de próstata, colon, pulmón y piel (2).

Las terapias comúnmente utilizadas incluyen quimioterapia, radioterapia, cirugía o terapias concomitantes. En estas terapias, los pacientes suelen sufrir efectos secundarios, además, presentan baja eficiencia en la erradicación total de este. Lo cual, ha motivado el desarrollo de estrategias de tratamiento y/o diagnóstico más precisas y efectivas.

Entre las técnicas emergentes de tratamiento podemos encontrar la inmunoterapia, terapia génica, terapia fotodinámica y terapia fototérmica. Esta última ha logrado mejorar potencialmente los resultados terapéuticos (3) *in vitro* e *in vivo*. Las técnicas emergentes permiten tener alternativas cada vez más precisas que pueden, por si solas o de manera conjunta con las ya implementadas, mejorar el pronóstico de recuperación (4,5).

1.2. Planteamiento del problema

El cáncer de próstata es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos, además ocupa el cuarto lugar de todas las enfermedades cancerígenas y es el segundo más común entre hombres a nivel mundial. De acuerdo a lo reportado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en 2018 el cáncer de próstata fue la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos con un 16% de incidencia en México (6).

En los últimos años se han reportado nuevas técnicas para el tratamiento del cáncer, como la terapia fototérmica plasmónica (PPT) que utiliza el calor generado por nanopartículas de metales nobles como el oro y la plata para producir ablación térmica celular. La producción de calor se debe a que, al exponer a las nanopartículas a luz láser, estas experimentan resonancia del plasmón de superficie (SPR), debido a que los electrones libres de los átomos superficiales de la nanopartícula se excitan. La SPR da a la nanopartícula la propiedad de absorber o dispersar parte de la luz incidente. La luz absorbida es transformada en calor ya que, los electrones excitados regresan a su estado base, mediante la liberación de energía

térmica al medio. La limitante de la PPT, es la longitud de onda de irradiación ya que esta, debe coincidir con la longitud a la que se presenta la SPR y el caso de las nanopartículas de oro (AuNPs) de 20 nm de diámetro se encuentra en los 520 nm. La aplicación de la PPT a nivel *in vivo*, se ve limitada por la alta absorción que presentan los tejidos biológicos permitiendo una corta penetración en el tejido (1-2 cm) (5,7,8).

Una alternativa a la PPT es la terapia fototérmica plasmónica multifotónica, en la cual, la excitación de un electrón se lleva a cabo por la absorción simultánea de dos o más fotones de energía más baja, lo cual ocurre siempre que la suma de las energías de los fotones exceda la energía de la banda. La ventaja que ofrece esta terapia, es que, al poder utilizar fotones con menor energía, y por ende de mayor longitud de onda, hay menor absorción por los componentes de los tejidos biológicos, lo que permitiría mayor penetración en el tejido alcanzando células de cáncer más profundas (9,10,11). Para lograr que la PPT sea dirigida de manera específica las AuNPs deben estar unidas a un péptido de reconocimiento específico, que para cáncer de próstata puede utilizarse el inhibidor del antígeno prostático específico de membrana (iPSMA) ya que este, se une al antígeno prostático específico de membrana (PSMA) que se sobreexpresa en este cáncer (12).

En la actualidad no existen estudios donde se emplee la PPT con AuNPs funcionalizadas con iPSMA a una longitud de onda de irradiación de 1064 nm, para el tratamiento de cáncer de próstata.

Capítulo 2: Estado del arte

2.1. Antecedentes

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como un grupo de enfermedades que pueden comenzar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo y se produce cuando las células crecen o se reproducen sin control pudiendo invadir partes adyacentes al lugar de origen, proceso conocido como metástasis (13). En 2018 el cáncer se reportó como la segunda causa de muerte a nivel mundial (6). La OMS reporta que los tipos de cáncer más comunes en hombres a son de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado (13). En donde, el cáncer de próstata ocupa el cuarto lugar de todas las enfermedades cancerígenas y es el segundo más común en hombres.

En particular, el cáncer es un padecimiento de alta incidencia en México y se ubica como la tercera causa de muerte (6). De acuerdo con el IMSS en México el cáncer de próstata es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos con un 16% de incidencia. Por otro lado, el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) reporta que la tasa de mortalidad es de 13 por cada 100,000 habitantes en México (14).

En cuanto a los tratamientos empleados para el cáncer dependiendo del estadío se recomienda tratamiento hormonal, quimioterapia, radioterapia, cirugía y/o tratamientos concomitantes. En etapas muy avanzadas solo se da tratamiento paliativo con radiofármacos (14).

En los últimos años debido a su alta incidencia a nivel mundial el cáncer ha sido objeto de estudio por parte de equipos multidisciplinarios que buscan mejorar y encontrar nuevas técnicas de diagnóstico y tratamiento. Según el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) de Estados Unidos los tratamientos para cáncer pueden causar efectos secundarios, es decir, problemas que ocurren cuando el tratamiento afecta tejidos u órganos sanos (15), siendo lo último una de las grandes desventajas de los mismos, en consecuencia, es de suma importancia contar con alternativas que puedan disminuir estos efectos secundarios en los pacientes, pero manteniendo una eficiencia igual o mayor que los tratamientos convencionales.

Una de las técnicas de tratamiento que se han utilizado desde hace mucho tiempo es la termoterapia, considerada en este proyecto como el incremento de temperatura, que consiste en utilizar calor para ablación de las células de cáncer, y cuya aplicación se remonta a 4000 años atrás, siendo Hipócrates quien describió que si un tumor no se podía extraer

entonces debía quemarse (16). Se conoce que las células mueren cuando se exponen a temperaturas superiores a 55 °C, pero las células de cáncer son las más propensas a morir por este aumento. Por su parte Idir Mellal definió la termoterapia como el aumento de la temperatura del tejido que permite eliminar células malignas y salvar el tejido sano (17).

Las primeras evidencias de una cura del cáncer por medio de la termoterapia se remontan a los siglos XVIII-XIX, donde se utilizaban reacciones febriles para la disminución tumoral. Los países donde se desarrolló esta técnica fueron Alemania, Rusia, Francia y Estados Unidos, siendo este último donde se registraron casos de éxito. Además, también se tiene registrado un caso exitoso del uso de la termoterapia localizada para tratar cáncer de cuello uterino. A pesar de los resultados obtenidos la comunidad científica se mantuvo expectante y no aceptó esta terapia, y con la invención de la quimioterapia y la radioterapia esta técnica se fue dejando de lado (18).

Como se mencionó previamente la termoterapia consiste en un aumento de la temperatura, que puede ser inducida por medio de diferentes técnicas como radiofrecuencia, microondas de ultrasonido, ultrasonido de alta intensidad y láser. Además, la termoterapia también se puede aplicar de manera conjunta con otras técnicas como la radioterapia y la quimioterapia.

Un láser puede provocar termoablación en el tejido al aumentar su temperatura y producir destrucción celular. La primera aplicación del láser para el tratamiento de tumores sucedió en 1964 cuando Goldman y Wilson usaron un láser de rubí para destruir un epitelioma de células basales de humanos. El mismo año, Minton y colaboradores utilizaron un láser de neodimio pulsado muy potente para tratar dos sistemas tumorales experimentales (19). Posteriormente, a principios de la década de 1980, Toty y colaboradores verificaron la eficiencia y la efectividad del láser de granate de itrio y aluminio dopado con impurezas de neodimio (Nd-YAG) para recanalizar bronquios obstruidos o tráqueas bloqueadas por tumores(20). Por otro lado en 1983 Bown y colaboradores estudiaron un caso de hipertermia localizada en un paciente con cáncer de pulmón con ayuda de un láser Nd:YAG, produciendo daño irreversible en las células tumorales (destrucción *in situ*) (21).

En años recientes en diversas investigaciones se ha estudiado la eficiencia de la producción de calor por medio de irradiación con luz láser a un nanomaterial, convirtiéndolo en un nanocalentador (22). Para poder entender el concepto de nanomaterial es necesario comprender primero el término de nanomedicina, la cual es definida por la Fundación Europea de la Ciencia como "La ciencia que utiliza herramientas de tamaño nanométrico para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades y para obtener una mayor comprensión de la compleja fisiopatología subyacente de la enfermedad. El objetivo final

es mejorar la calidad de vida " (23). Por otro lado, un nanometarial es definido de acuerdo a la Unión Europea como “Un material natural, incidental o manufacturado que contiene partículas, en un estado no unido o como agregado o como aglomerado y donde, para el 50% o más de las partículas en la distribución de tamaño numérico, una o más dimensiones externas están en el rango de tamaño 1 nm - 100 nm” (24). Los nanomateriales se clasifican en nanopartículas y materiales nanoestructurados. Los nanomateriales se pueden clasificar a su vez en tamaño, origen, síntesis, y forma; en particular según su origen pueden ser de carbono, inorgánicos (metales), orgánicos y compuestos (25). Para que un nanomaterial pueda ser usado en el campo de la medicina tiene que tener características específicas que permitan su uso, como su biocompatibilidad y ser funcionalizadas (26). Una vez cumplidas las características anteriores estos materiales pueden ser utilizados en diagnóstico y terapia contra el cáncer.

En particular, las nanopartículas de metales nobles como el oro, la plata y aleaciones de éstos han sido utilizadas dentro de la nanomedicina por su biocompatibilidad, su capacidad de ser funcionalizadas y de poder liberar fármacos de su interior (4), permitiendo que estas sean utilizadas para terapia o diagnóstico, por medio de imágenes de fluorescencia o fotoacústica, o como agente teranóstico (27).

Las nanopartículas pueden ser funcionalizadas con un biomarcador, el cual se define como "una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas biológicas a una intervención terapéutica" (28). En el caso de procesos patogénicos como el cáncer hay marcadores tumorales que se sobreexpresan, por ejemplo, el Antígeno Prostático Específico de Membrana(PSMA) que se sobreexpresa principalmente en adenocarcinoma prostático y por lo tanto representa un blanco ideal para fines diagnósticos y terapéuticos (12). En los últimos años se han desarrollado trazadores del PSMA , siendo uno de los de mayor éxito el inhibidor del Antígeno Prostático Específico de Membrana (iPSMA), que ha sido utilizado en investigaciones recientes , tal como lo reportó en 2019 Escudero-Castellanos y colaboradores, donde se utilizó el iPSMA como marcador específico para las líneas celulares del nódulo linfático de cáncer de próstata (LNCaP) y PC3. Este marcador fue capaz de unir el complejo radioteranóstico ^{177}Lu-DOTA-iPSMA-Lys$_3$-BN de manera exitosa en ambas líneas celulares, aumentando la eficiencia de la terapia (29).

En 2013, Kasten B y colaboradores hicieron la síntesis de una nanopartícula de oro (AuNP) con iPSMA (AuNP-HYNIC-iPSMA) mediante la biotina, que sirvió como agente bifuncional entre la nanopartícula y el iPSMA, siendo el iPSMA el elemento que permite la unión selectiva a células LNCaP. En esta investigación se utilizaron dos grupos: el primero utilizó la nanopartícula unidas al iPSMA y el otro grupo la nanopartícula sin iPSMA. Los resultados

mostraron que las AuNPs unidas con iPSMA exhibieron una unión significativamente mayor y selectiva a las células LNCaP en comparación con las AuNP no ligadas (12).

Las AuNP son sólidos ultra-finos bien definidos en forma y tamaño, con dimensiones de 1 a 100 nm, que son ampliamente utilizadas debido a sus propiedades, ya que pueden ser utilizadas para liberar fármacos, obtener imágenes fotoacústicas y para producir terapia fototérmica (30). La terapia fototérmica (PPT) consiste en el uso de la hipertermia o ablación térmica inducida por luz láser (31), y en donde las AuNPs son utilizadas como medio productor de calor al ser irradiadas por luz láser mediante un fenómeno conocido como resonancia de plasmón de superficie (SPR).

En 2006 Moores y Goettmann explicaron que la SPR se produce cuando la luz en una longitud cercana al infrarrojo interactúa con los electrones de la capa de valencia de una nanopartícula metálica donde éstos absorben un fotón, permitiendo que los electrones pasen de un estado estable a uno excitado (32). Liang Li en 2010 reportó que las AuNPs pueden convertir rápidamente la energía absorbida en energía térmica en el dominio del tiempo de picosegundos, lo que los convierte en excelentes agentes para el tratamiento del cáncer con hipertermia (33). Stern, J. y colaboradores en 2008 publicaron un estudio donde se utilizaron nanoshells de oro de 110 nm de diámetro para el tratamiento de cáncer de próstata utilizando un modelo murino con tumores inducidos en el dorso mediante la inyección de células PC3. En este trabajo se utilizaron 3 grupos de nanopartículas: en el primer grupo se utilizaron nanopartículas irradiadas con láser, en el segundo grupo se le inyectó además solución salina y en el tercer grupo sólo se irradió con luz cercana al NIR. Los resultados mostraron una disminución significativa en el tamaño del tumor del primer grupo (8).

En 2014 González-Ruiz y colaboradores utilizaron el sistema ^{177}Lu–Au-NLS-RGD-Aptamero para realizar un estudio *in vitro* de un tumor en un modelo murino utilizando la línea celular de glioma de ratón U87MG. Este trabajo combinó el uso del radionúclido ^{177}Lu y la fototerapia, irradiado con luz láser de 532 nm y se observó una disminución de la viabilidad celular y del tamaño del tumor en el ratón (34).

Para que ocurra la SPR se requiere que las AuNPs absorban un fotón que tenga la energía suficiente para que ocurra la excitación del electrón de la capa de valencia de la AuNP, no obstante también hay casos donde los fotones no tienen la suficiente energía para excitar a los electrones y entonces se compensa con una absorción simultanea de 2 o más fotones, fenómeno conocido como absorción multifotónica (9). Este fenómeno se presenta debido a las propiedades ópticas no lineales de las AuNPs.

2.2. Pregunta investigación

¿La terapia fototérmica plasmónica multifotónica con irradiación láser de 1064 nm del sistema AuNP-HYNIC-iPSMA produce efectos térmicos y de viabilidad comparables a los de la terapia fototérmica plasmónica con irradiación láser de 532 nm en células de cáncer de próstata?

2.3. Hipótesis

La terapia fototérmica plasmónica multifotónica con irradiación láser de 1064 nm del sistema AuNP-HYNIC-iPSMA produce los mismos efectos térmicos y de viabilidad en células de cáncer de próstata que la terapia fototérmica plasmónica con irradiación láser de 532 nm.

2.4. Objetivos

Objetivo general

Sintetizar, caracterizar y evaluar el sistema AuNP-HYNIC-iPSMA para terapia fototérmica plasmónica multifotónica con irradiación láser de 1064nm en células de cáncer de próstata.

Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar físico-químicamente el sistema AuNP-HYNIC-iPSMA
- Realizar la irradiación del sistema AuNP-HYNIC-iPSMA a las longitudes de onda láser de 532nm y 1064 nm y determinar las condiciones óptimas para la absorción multifotónica de las AuNPs mediante el monitoreo del incremento de temperatura generada por la AuNPs.
- Determinar los efectos térmicos y de viabilidad celular producidos por las condiciones de irradiación láser a 532 y 1064 nm en células de cáncer de próstata expuestas al sistema AuNP-HYNIC-iPSMA.
- Establecer los parámetros físicos de irradiación láser a 1064 nm para células de cáncer de próstata, para un posible tratamiento mediante terapia fototérmica plasmónica multifotónica.

Capítulo 3: Marco teórico

3.1. Terapia fototérmica

La terapia es el tratamiento de diversas enfermedades por medio de distintos recursos o métodos, con la finalidad de erradicar un enfermedad, aliviar los síntomas o bien encontrar una cura (35). Por su parte la terapia térmica es el uso de la temperatura ya sea calor o frio con el fin de tratar una o varias enfermedades. En particular, la hipertermia es una aplicación de la terapia térmica que utiliza el aumento de la temperatura para conducir una parte o todo el cuerpo por encima de su temperatura normal (36.7 °C) durante un período de tiempo definido. Por lo anterior el incremento de temperatura debe ser de manera controlada que resulta en efectos positivos en pacientes con enfermedades como el cáncer (31). La energía térmica se puede aprovechar para causar termoablación de células de cáncer (36), que son más susceptibles a los efectos de la hipertermia en comparación a las células normales debido a su alta tasa de reproducción, este proceso se puede ver en la Figura 1. Esta técnica puede ser localizada, no solo permitiendo tratar tumores que se encuentran en regiones de difícil acceso quirúrgico (37) sino también logrando una gran reducción en el tamaño del tumor después de este tratamiento (36).

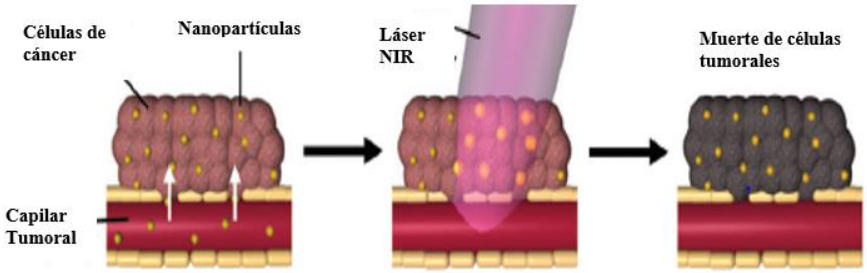

Figura 1.Termoablación celular por irradiación láser a AuNPs en tejido tumoral (38)

El uso de la hipertermia para el tratamiento del cáncer no es nuevo. El primer texto médico que se conoce hoy contiene un estudio de un caso que describe a una paciente con un tumor de mama tratado con hipertermia, el cual es un rollo de papiro egipcio que data de hace más de 3,500 años y que es una copia de un texto aún más antiguo. A lo largo de la historia de la medicina se ha utilizado el calor como fuente terapéutica para tratar distintas enfermedades. Por ejemplo, en 1898 Westermark, un ginecólogo sueco, publicó un artículo que describía una marcada regresión de grandes carcinomas del cuello uterino después de la hipertermia local, aunque los tratamientos implicados estaban mal controlados (39).

Existen diferentes métodos para la generación de calor, como la irradiación por microondas (40), los pulsos de radiofrecuencia (41), y el ultrasonido (42). Estos métodos, aunque permiten penetrar en el tejido producen efectos hipertérmicos no deseados en los tejidos circundantes. El láser también ha sido utilizado para provocar calor en el tejido y que como consecuencia ocurra termoablación de tejido (43), esto ha tenido resultados como la disminución de la masa tumoral (34). Entonces el uso de luz láser con fines terapéuticos se le conoce como terapia fototérmica.

Estudios recientes muestran que el uso de nanomateriales como las nanopartículas de metales nobles como el oro ayudan a mejorar la eficiencia de esta terapia (44), esto debido a su capacidad de aumentar la temperatura del medio al ser irradiadas con luz, y cuyo fenómeno es explicado a continuación.

3.2. Resonancia de plasmón de superficie (SPR)

Cuando una nanopartícula de metal como el oro se irradia con luz en la región visible e infrarrojo, el campo electromagnético oscilante de la luz induce una oscilación colectiva coherente de los electrones libres de la banda de conducción del metal, obteniendo una oscilación colectiva de los electrones de superficie de los átomos de oro. Esta oscilación electrónica alrededor de la superficie de la partícula provoca una separación de carga con respecto a la red iónica, formando una oscilación dipolar a lo largo de la dirección del campo eléctrico de la luz, esto se esquematiza en la Figura 2.

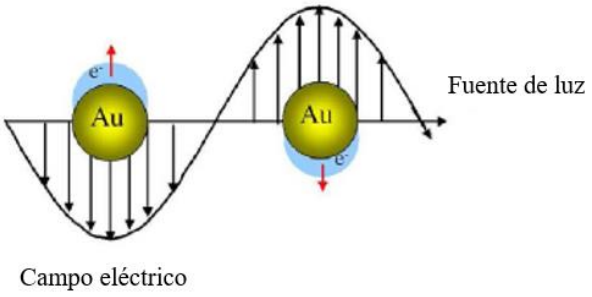

Figura 2. Oscilación plasmónica de una AuNP bajo la irradiación láser (33)

La amplitud de la oscilación alcanza el máximo a una frecuencia específica, llamada Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) (45,46). La banda SPR es mucho más fuerte para las nanopartículas de metales nobles, como el oro y plata, aunque también se ha probado en nanopartículas de aleaciones de otros metales (47). La intensidad de la banda SPR y la longitud de onda dependen de la densidad de carga electrónica en la superficie de la partícula, tipo de metal, tamaño de la partícula, forma, estructura, composición y la

constante dieléctrica del medio que la rodea (33,46). La SPR es la propiedad óptica más destacada de las nanopartículas metálicas (48).

3.3. Interacción de la luz con las AuNP

La absorción de luz visible por una AuNP da como resultado el calentamiento instantáneo de la nanopartícula. Este calentamiento tiene un efecto en la nanopartícula y en el medio circundante, estos fenómenos se resumen en la Figura 3.

El efecto en la AuNP se puede describir por la dinámica de electrones, fonones acústicos coherentes, fusión y evaporación de la superficie de la partícula y fragmentación explosiva. Este último se describe por cavitación y generación de ondas de tensión, como resultado de la transferencia de calor de la partícula al entorno. La cantidad de calor generado por una nanopartícula puede controlarse mediante el tamaño de partícula, la forma y el estado de agregación, así como la intensidad del láser de iluminación, la longitud de onda y la duración del pulso (49).

La deposición de energía resultante de la interacción láser con las AuNP se produce en cuatro etapas la dinámica de la luz con los electrones, primero, la luz láser es absorbida por el sistema electrónico, creando electrones no térmicos. Después de unos 100 femtosegundos, se alcanza un equilibrio térmico que corresponde a la distribución de Fermi como resultado de la dispersión electrón-electrón con electrones de banda de conducción fría. Posteriormente, la energía electrónica se transfiere a la red de la nanopartícula mediante acoplamiento electrón-fonón (a pocos picosegundos). La energía de la red se transfiere más tarde al medio circundante a través de la interacción fonón-medio (varias decenas a varios cientos de picosegundos) a través del calentamiento del medio a expensas del enfriamiento de la nanopartícula, la dinámica de la luz con la red electrónica se resume en la primera parte de la Figura 3 (50).

Las nanopartículas metálicas al exponerse a la luz sufren cambios en su forma, reducción de tamaño, aglomeración y fusión. En primer lugar, los cambios en la forma se dan especialmente en las nanopartículas en forma de nanobastones, este cambio ocurre por las altas temperaturas (377 K) que alcanzan al irradiarse. Por otro lado, la reducción del tamaño de las AuNP ocurre por medio de tres mecanismos, estos son evaporación de la superficie de la nanopartícula, explosión Coulomb y ablación del campo cercano, estos mecanismos se han demostrado en diversos estudios, en donde se observa la reducción del tamaño del promedio de las nanopartículas (51), esto a su vez da lugar a la creación de AuNP de unos cuantos nanómetros de diámetro.

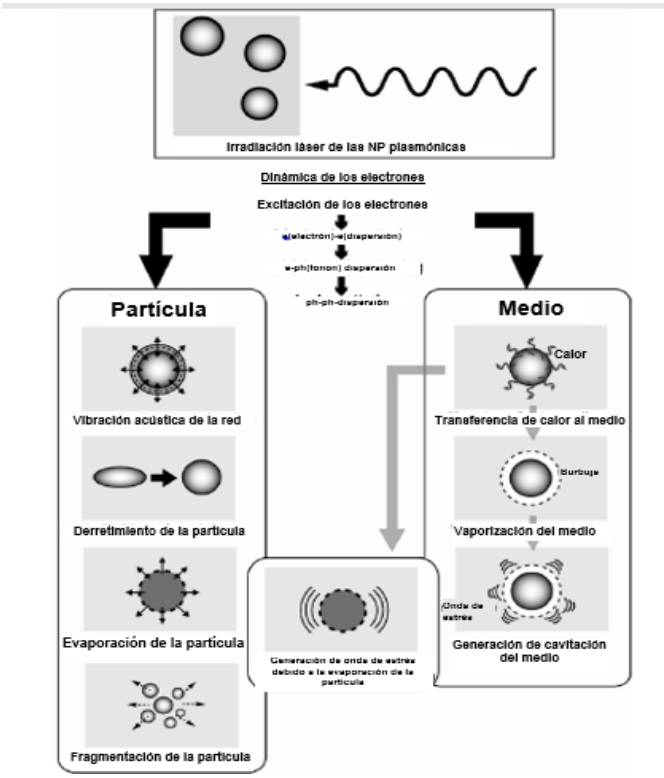

Figura 3. Mecanismos que ocurren al interactuar la luz láser con la AuNP (49)

La irradiación de luz láser a las nanopartículas también provoca aumento del tamaño de las AuNP, en investigaciones se observaron que algunas nanopartículas al ser irradiadas con láser pulsado aumentan su tamaño, en donde se observó que el mecanismo de aglomeración se atribuyó a la reacción de combinación de fragmentos catiónicos generados por la ablación con láser de las AuNP (52).

Cabe mencionar que todos los mecanismos mencionados anteriormente pueden ocurrir de manera simultánea.

3.4. Transferencia de calor al medio

La pérdida de calor de una nanopartícula de oro al estar en contacto con agua viene descrita por la siguiente ecuación:

$$F = \frac{3h}{R(T_L)}[T_L - T_m(R)] \quad (1)$$

Donde h es conductancia térmica de la interfaz AuNP-agua, R es el radio de la nanoesfera, T_m temperatura del medio y T_L la temperatura reticular.

En la ecuación 1 se puede observar que la pérdida de calor a través de la interfaz AuNP-agua es proporcional al gradiente de temperatura entre la red y el agua. Además, F es inversamente proporcional al radio de la nanopartícula, lo que conduce a un aumento en la transferencia de calor al reducir su tamaño (49).

Por otra parte, durante el calentamiento con láser de pulso de nanosegundos de las AuNP, la energía térmica que se transfiere al agua circundante y la temperatura del medio circundante (T_m) aumenta de manera constante. A medida que se alcanza la temperatura de 573 K, se produce una evaporación explosiva del agua y una burbuja de alta presión se expande rápidamente, lo que deprime los coeficientes de absorción (C_{abs}) a través de una reducción del índice de refracción en la región SPR. Si la intensidad del láser es lo suficientemente alta como para calentar las AuNP térmicamente aisladas hasta el punto de ebullición, la evaporación de la superficie y, por lo tanto, se produce la reducción del tamaño de las AuNP originales (49).

Una consecuencia importante de la transferencia de calor al líquido circundante de las AuNP calentadas con láser es la formación de nanoburbujas de vapor. La nanoburbuja de vapor con una alta presión inicial se expande hasta un radio máximo, donde la presión interna se reduce a un valor equivalente a la presión del agua externa, y luego la burbuja comienza a colapsar. El radio máximo que alcanza la burbuja depende en gran medida de la energía del láser. Después del primer ciclo, los líquidos circundantes se calientan nuevamente a la temperatura crítica a través de la transferencia de calor desde la superficie de la AuNP y se produce otra formación de burbujas, estos fenómenos se esquematizan en la Figura 4. Este proceso se repite de manera secuencial con una disminución en los radios máximos de burbuja hasta que el AuNP se enfría muy por debajo de la temperatura de cavitación (53). Además, se estima que la temperatura de formación de burbujas depende ligeramente del tamaño de AuNP, pero es aproximadamente igual al punto crítico del agua (647 K). En la Figura 4 se muestra el resumen los fenómenos que ocurren al interactuar la luz con la AuNP.

Otra parte a considerar de la interacción de la luz láser con las AuNP son los picos máximos de absorción para cada tamaño de AuNP. Una de las longitudes de onda más utilizadas para irradiar es la de 532 nm. A continuación, se explica cómo actúan las AuNP al ser irradiadas a esta longitud de onda.

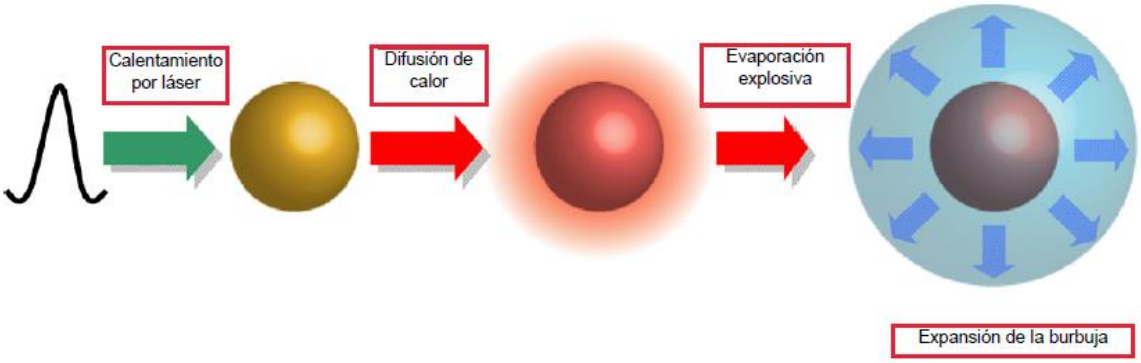

Figura 4. Generación de burbujas por láser en AuNPs en agua (49)

3.5. Irradiación laser de AuNPs a 532 nm

En el caso de una nanopartícula de oro (AuNP) con un tamaño menor que la longitud de onda de la luz incidente, la presencia de un campo electromagnético a una cierta longitud de onda puede inducir SPR (33). La longitud de onda de luz láser que provoca este fenómeno depende del tamaño y forma de la nanopartícula, como se muestra en la Figura 5, y donde se observa que los diferentes picos de absorbancia para SPR ocurren en diferentes longitudes de onda, variando de acuerdo al tamaño.

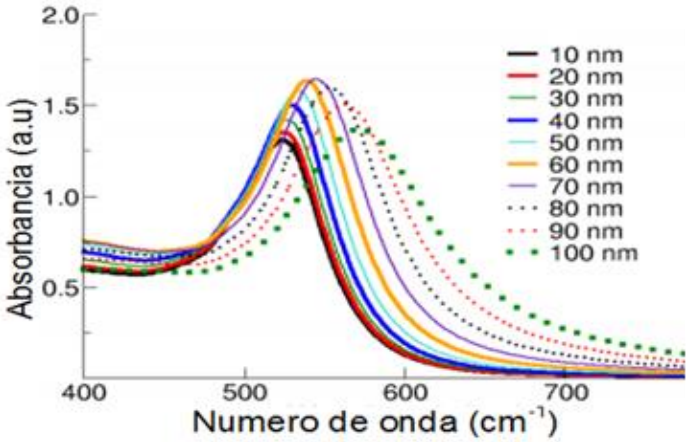

Figura 5. SPR para AuNP esférica de diferentes diámetros (3)

Casi el 100% de la luz absorbida por la AuNP se convierte en calor por procesos no radiativos, y es este aumento de temperatura en el medio es lo que conlleva a la muerte celular causando efectos térmicos irreversibles, es decir, termo ablación (31).

Para que un electrón de la superficie de la nanopartícula metálica se excite se necesita que la energía del fotón sea al menos tan grande como la energía de la banda, lo que se denomina absorción fotónica lineal (9), pero existe el caso donde el fotón no alcanza a excitar al electrón de la capa superficial siendo necesario otro fotón de forma simultanea

que pueda excitarlo y así lograr la SPR, cuyo fenómeno se describirá con detalle a continuación.

3.6. Absorción multifotónica

La absorción fotónica lineal solo puede ocurrir si la energía del fotón es al menos tan grande como la energía de banda. Esto se debe a la mínima cantidad de energía que una excitación electrónica requiere para liberar el electrón de la banda de valencia hacia la banda de conducción. Sin embargo, es posible excitar un electrón de la banda de valencia mediante la absorción simultánea de dos o más fotones de energía más baja, mientras que la suma de las energías de los fotones exceda la energía de esta banda. Tales procesos se denominan absorción múltiple de fotones (REMPI del inglés *Resonance Enhanced MultiPhoton Ionization*) y el caso más simple es donde sólo se requieren dos fotones para excitar a los electrones (9).

Es posible llevar a cabo la excitación por absorción de varios fotones a través de estados electrónicos intermedios (estado virtual entre la banda de valencia y la de conducción), esto se puede observar en la Figura 6 (54,55). La tasa de absorción para la absorción lineal es proporcional a la intensidad óptica, mientras que para los procesos de absorción multifotónica es de orden n, la tasa de absorción es proporcional a la n potencia de la intensidad óptica. Además, el coeficiente de absorción es proporcional a (n-1) potencia de la intensidad óptica (9). Este fenómeno permite la excitación electrónica para lograr la SPR.

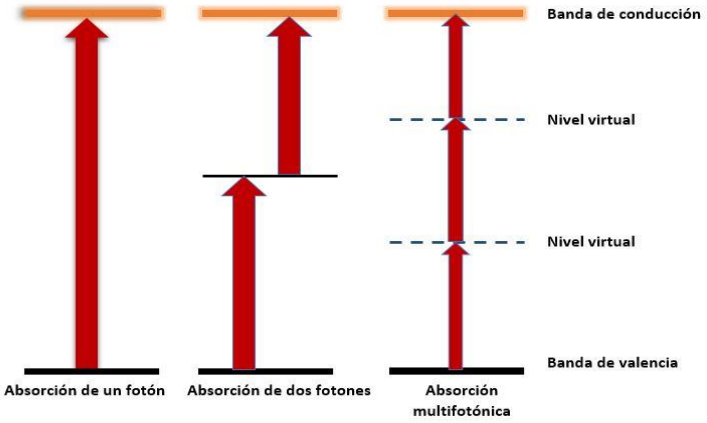

Figura 6. Mecanismo de absorción multifotónica

En años recientes se han hecho investigaciones en este campo, como por ejemplo en 2014 Wang y colaboradores demostraron que la absorción multifotónica aplicada en la irradiación láser para PPT permite un mayor incremento de temperatura produciendo la ablación de tejido tumoral (56). Otro ejemplo del mismo año es el de Xianguang Ding y

colaboradores que diseñaron e implementaron PPT en la segunda ventana óptica, con nanopartículas de Au−Cu_9S_5, y demostraron la eficiencia en la segunda ventana biológica, este concepto es de importancia en la PPT el cual se aborda a detalle a continuación (47).

3.7. Ventana óptica biológica

La ventana óptica bilógica se puede definir como los rangos espectrales donde los tejidos llegan a ser parcialmente transparentes a la luz visible e infrarroja debido a la reducción simultánea de la absorción y dispersión (31,42).

Existe un rango en el espectro de la luz donde ésta tiene su máxima penetración en tejido, que está entre los 650 nm y 1350 nm, y se le conoce como ventana de infrarrojo cercano (NIR). Dentro de esta ventana la probabilidad de absorción de los fotones aumenta (57), y esta probabilidad está dada por el coeficiente de absorción que posee diferentes valores dependiendo del tejido que se esté estudiando, esto se debe a los diferentes componentes químicos del mismo. Respecto a las ventanas NIR existen dos tipos: la primera es la NIR I (650–850 nm) y la segunda es la NIR II (950–1350 nm). Estas ventanas se pueden aprovechar para alcanzar una mayor penetración del tejido durante la terapia, esto se debe a que la primera ventana biológica (NIR I) corresponde al rango espectral definido entre la banda de absorción visible de la hemoglobina y la banda de absorción de característica del agua y la segunda ventana biológica (NIR II) corresponde a las bandas de absorción de agua.

En la Figura 7, puede observarse los diferentes valores de coeficientes de absorción dependientes de la longitud para diferentes componentes del tejido bilógico en donde el más abundante es el agua y donde se tiene un mayor coeficiente en la longitud de 1064 nm en comparación con la de 532 nm.

Las propiedades ópticas de un tejido afectan tanto a las aplicaciones diagnósticas como a las terapéuticas de la luz. La capacidad de la luz para penetrar en un tejido y depositar energía a través de las propiedades de absorción óptica del tejido es importante para las aplicaciones terapéuticas (58), como en la fototerapia. En el caso del láser la penetración desde la capa superficial de la piel hasta algunos milímetros de profundidad depende de la longitud de onda de la luz incidente (59).

El uso de láser para la PPT que opera en la región de las ventanas biológicas reduce el calentamiento no selectivo de tejido y al mismo tiempo permite tratamientos de tejido profundo. De hecho, esto se debe a la mayor profundidad de penetración óptica obtenida de la minimización simultánea de los procesos de dispersión y absorción (31).

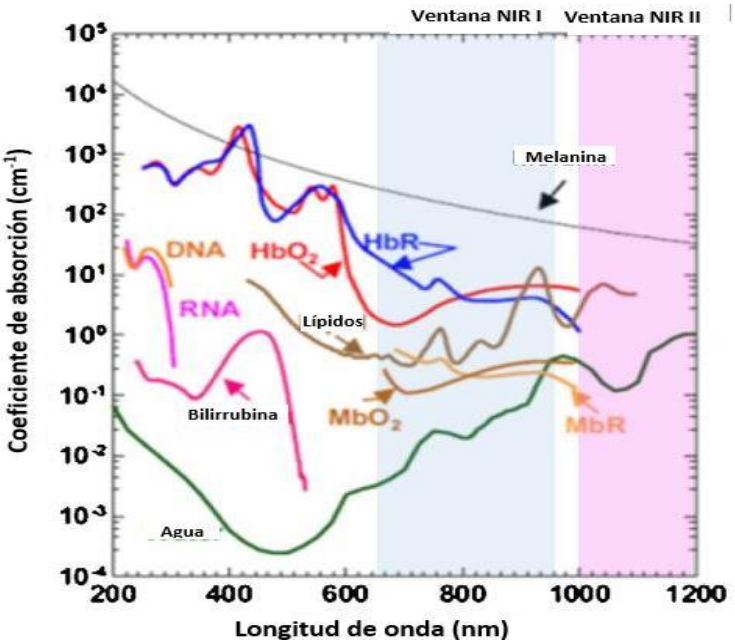

Figura 7. Coeficientes de absorción de componentes del tejido (60)

3.8. Antígeno prostático específico de membrana (PSMA)

Los receptores de membrana son proteínas o glicoproteínas que permiten la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular. Éstas, permiten la comunicación entre la célula y sus alrededores.

Los receptores de membrana de células de cáncer cambian su expresión según el estado del cáncer, se conoce que determinados receptores de membrana, encargados principalmente de señalizaciones relacionadas con la supervivencia y proliferación celular, se sobreexpresan en la superficie de la membrana celular. Esto permite que estos receptores sean utilizados como blancos moleculares para su localización.

La enzima glutamato carboxipeptidasa II, también conocida como antígeno prostático específico de membrana (PSMA), está expresada en las células epiteliales de la próstata y altamente sobreexpresada en el 95 % de los cánceres de próstata avanzados. Los niveles de expresión del PSMA se correlacionan directamente a la independencia de andrógenos, la metástasis y la progresión de cáncer de próstata (61).

El PSMA es un blanco molecular adecuado para la radioterapia de cáncer de próstata metastásico que utiliza radiofármacos específicos ya que tiene una mayor expresión en estadíos avanzados de la enfermedad.

Inhibidor del antígeno prostático específico de membrana

El PSMA contiene Zn en el centro activo de la enzima, por lo que la secuencia Glu-NH-CO-NH-Lys(β-naftil alanina) = Glu-Urea-Lys(NaI) (iPSMA), péptido inhibidor del antígeno prostático específico de membrana (iPSMA), se ha propuesto como un inhibidor efectivo de su actividad (62). En la interacción química específica, los tres grupos carboxílico del fragmento Glu-Urea-Lys interactúan electrostáticamente con las cadenas laterales peptídicas en el centro activo del PSMA, y el oxígeno de la urea se coordina al Zinc y la estructura aromática en NaI interactúa para el acoplamiento con el sitio hidrofóbico activo de la enzima (61).

Hasta este momento se ha hablado de las ventajas de usar nanopartículas para la producción de hipertermia a células tumorales, así como de la biomolécula iPSMA que al ser enlazada a las primeras permitiría mejorar su eficiencia para eliminar células tumorales, pero aún es necesario hablar acerca del cáncer de próstata que sería tratado mediante esta técnica mencionada.

Cáncer de próstata

La próstata es la mayor glándula accesoria del aparato reproductor masculino y la cual rodea la uretra prostática. La porción glandular constituye unos dos tercios de la glándula, mientras que el otro tercio es fibromuscular. Respecto al cáncer este es un proceso de crecimiento incontrolado de células (63) donde éstas empiezan a dividirse sin detenerse y se pueden diseminar a los tejidos circundantes (64). Con base en lo anterior el cáncer de próstata se define como la proliferación incontrolada de células epiteliales de la glándula prostática (65). Casi todos casos de cáncer de próstata son adenocarcinomas, los cuales se desarrollan a partir de las células de la glándula.

La unidad funcional de la próstata es el acino, compuesto de elementos epiteliales y estromales que están separados por una membrana basal. El compartimiento epitelial está conformado por células glandulares epiteliales, células basales, neuroendocrinas, linfocitos y macrófagos. Además, en el acino prostático predominan las células glandulares y son el sitio donde se producen y secretan el PSA y la fosfatasa ácida, los cuales son excretados con el líquido de la eyaculación. Estás células dependen de la acción androgénica y el crecimiento y la maduración del epitelio prostático dependen de los niveles periféricos de la testosterona y de la conversión de la misma a dihidrotestosterona, por acción de la enzima 5-alfa reductasa, a nivel celular dentro de la glándula. Dentro de la célula prostática, la dihidrotestosterona se liga al receptor de andrógeno y forma un complejo

(dihidrotestosterona-receptor androgénico) que interactúa con secuencias específicas de ADN, alterando la regulación celular. El cáncer prostático se origina por el crecimiento clonal de una célula epitelial alterada en su genoma; no obstante, se han identificado múltiples clonas malignas dentro de la misma glándula, como consecuencia de la inestabilidad genética de la próstata (66).

Existen líneas celulares para la investigación del cáncer de próstata como la línea celular LNCaP (*Lymph Node Carcinoma of the Prostate*) que se deriva de células de adenocarcinoma de próstata humana, obtenidas de una metástasis de ganglio linfático de humano y es utilizada en investigación en oncología. Las células LNCaP son células epiteliales adherentes sensibles a los andrógenos que crecen en agregados, así como en células individuales. La línea celular LNCaP es utilizada porque expresa receptores de Antígeno Prostático Específico de Membrana (PSMA).

Los receptores de andrógenos están presentes en el citosol de las células LNCaP tanto en el cultivo como en los tumores, por lo que es sensible a los andrógenos. Las células que crecen en cultivo y en el tejido de la próstata secretan fosfatasa alcalina. Las células tienen además receptores de estrógeno citosólicos, con el crecimiento celular y la producción de fosfatasa ácida respondiendo a la modulación hormonal (las células son sensibles a la 5-alfa-dihidrotestosterona) (67,68).

Uno de los objetivos de la PPT es provocar daño celular. El daño celular se logra por diferentes factores y provoca diferentes tipos de muerte celular. A continuación, se explican más a detalle los mecanismos de daño celular provocados por la PPT.

3.9. Daño celular provocado por la terapia fototérmica

La PPT causa diversos cambios fisiológicos y biológicos en el entorno del tumor que pueden maximizar los efectos citotóxicos de la PPT en sí, mejora la eficacia de las terapias secundarias y también puede disminuir las dosis de tratamiento requeridas para los agentes secundarios. Además de aumenta la permeabilidad de los vasos tumorales y de la membrana celular, la PPT también causa efectos intracelulares como daño al ADN y desnaturalización de proteínas. Los mecanismos de muerte celular desencadenados por la PPT (es decir, necrosis versus apoptosis) activan diferentes vías de señalización celular que pueden influir en el éxito del tratamiento.

La PPT utiliza irradiación de alta energía para provocar un calentamiento rápido de las AuNP que conduce a la necrosis celular; si bien esta estrategia es eficaz para la ablación de tumores establecidos, también puede inducir efectos indeseables. La PPT de alta energía

que produce necrosis celular puede desencadenar la liberación de desechos celulares y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) que inducen inflamación, esto puede conducir a un aumento del crecimiento de tumores secundarios. Por el contrario, la PPT de baja energía inicia la apoptosis celular, que puede conducir a respuestas inmunogénicas beneficiosas. Por ejemplo, la apoptosis celular puede desalentar potencialmente la inflamación al hacer que los fagocitos produzcan moléculas antiinflamatorias como TGF-β46, los macrófagos y las células dendríticas (DCs) que entran en un estado antiinflamatorio cuando entran en contacto con células apoptóticas. La capacidad de inducir apoptosis frente a necrosis con PPT depende de muchos factores, incluidas las propiedades fototérmicas de AuNP, la concentración de AuNP en el tejido enfermo y las condiciones de irradiación. Dado que iniciar la apoptosis frente a la necrosis con PPT puede producir efectos celulares muy distintos es necesario caracterizar los paramentos de la irradiación (38).

Uno de los efectos que produce la interacción de las AuNP con la luz láser son los efectos fotomecánicos como cavitación, esta se pueden producir cuando la exposición de nanopartículas plasmónicas a la luz láser pulsado (nanosegundos a los femtosegundos), y las burbujas resultantes son capaces de romper las membranas de las células de cáncer (69,70). También existen los efectos fotoquímicos, como la producción de especies reactivas de oxígeno, a partir de la irradiación láser de nanopartículas de oro, teniendo los láseres pulsados un efecto mayor que los láseres de onda (continua como el láser Nd:YAG) (71).

Otro efecto secundario a la irradiación laser de AuNP se mostró en un estudio de Letfullin y colaboradores donde concluyeron de que la explosión de nanopartículas puede ir acompañada de plasma óptico, generación de ondas de choque con expansión supersónica y fragmentación de partículas con fragmentos de alta energía cinética, todo lo cual puede contribuir a la destrucción de las células cancerosas (72).

Capítulo 4: Metodología

4.1. Síntesis del sistema AuNP-HYNIC-iPSMA

La secuencia peptídica HYNIC-iPSMA, fue sintetizada por Ontores Biotechnology Co. con una pureza >98 %. Las nanopartículas de oro de 20 nm de diámetro estabilizadas en citrato ($6.99x10^{11}$ partículas/ml) fueron adquiridas de Sigma-Aldrich.

La conjugación de la secuencia peptídica HYNIC-iPSMA con las nanopartículas de oro se realizó por la interacción electrostática del grupo amino (NH_2) del péptido con la superficie de la nanopartícula, aunque no se descartan interacciones de los grupos carboxilo de la secuencia peptídica con la superficie de la nanopartícula.

En la Figura 8, se muestran la estructura química del péptido HYNIC-iPSMA y la AuNP.

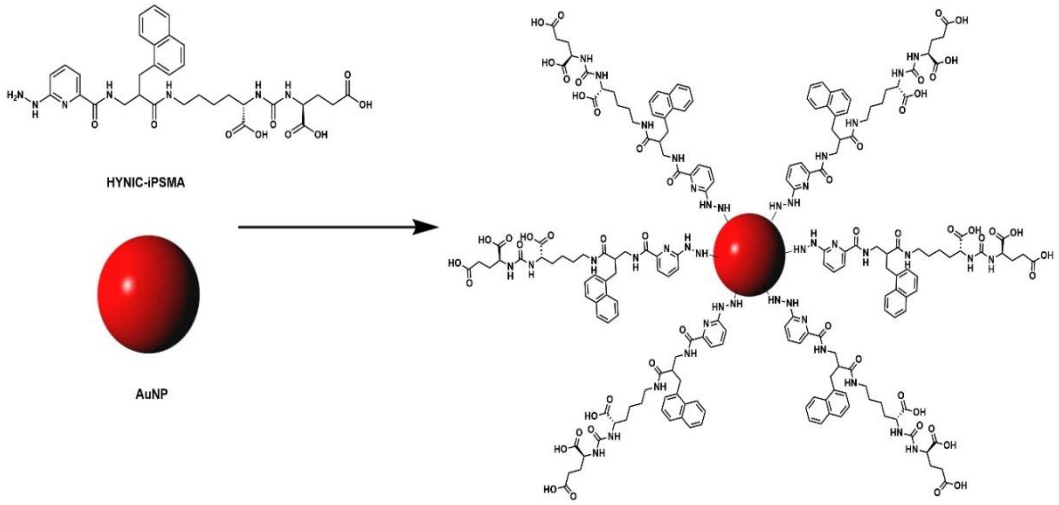

Figura 8. Estructura química del péptido HYNIC-iPSMA y AuNP

4.2. Caracterización físico-química de AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA

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 monitoreo la banda de resonancia de plasmón de superficie (SPR) de las AuNPs y las AuNP-HYNIC-iPSMA. El desplazamiento de la banda SPR, está asociado al tamaño y forma de las AuNPs, además da información de la unión entre las moléculas del péptido y la superficie de las AuNPs ya que los cambios o corrimientos de dicha banda se debe a los cambios causados por el entorno de las AuNPs al ser conjugadas con los péptidos; así como también permite evaluar la estabilidad de las soluciones en el tiempo.

Los espectros de absorción UV-Vis fueron realizados en un espectrómetro UV-VIS marca Perkin-Elmer modelo Lambda Bio. Se utilizó una muestra de 1000 µl de cada solución colocada en una celda de cuarzo de 1cm y los espectros de absorción UV-Vis fueron adquiridos con barridos de 400 a 700 nm.

Los espectros UV-Vis de las AuNPs y las AuNP-HYNIC-iPSMA fueron obtenidos antes y después de las irradiaciones con el láser, con la finalidad de conocer los cambios entre las nanopartículas antes y después de la irradiación.

Caracterización por TEM

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) utiliza un haz de electrones para visualizar objetos, utiliza muestras muy delgadas, la imagen se forma por los electrones que la atraviesan (73); utiliza luz en una longitud de 380 y 780 nm y la radiación utilizada provoca transiciones electrónicas que se cuantifican. El TEM se utiliza por lo general para evaluar la forma, tamaño y distribución de una muestra.

Esta técnica fue utilizada para conocer el tamaño y forma de las AuNPs y las AuNP-HYNIC--iPSMA. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL JEM 2010 HT que opera a 200 kV. Las muestras se prepararon colocando una gota de la cada solución en rejillas de cobre recubiertas con carbón. Las imágenes por TEM, de ambas muestras, fueron obtenidos antes y después de las irradiaciones con el láser.

Caracterización por DLS

La espectroscopia por dispersión dinámica de luz es una técnica que permite la determinación del peso molecular de sustancias macromoleculares cuando estas se encuentran en soluciones diluidas y permite también conocer el tamaño de partículas con orden de la longitud de onda de la luz.

En este caso esta técnica permitió conocer el diámetro hidrodinámico de las AuNPs y las AuNP-HYNIC-iPSMA antes y después de las irradiaciones con el láser.

4.3. Irradiación y monitoreo de la temperatura de AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA

Para la irradiación de las muestras de AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA, se utilizó un láser Nd:YAG marca Quantel® modelo Q-smart 100, este láser cuenta con las especificaciones física descritas en la Tabla 1.

Tabla 1.Características del láser Nd:YAG Q-smart 100

Longitud de onda (nm)	Fluencia (J/m^2)	Fluencia (J/cm^2)
1064	11937	1.194
532	8356	0.836

El láser Q-smart 100 posee una tasa de repetición variable de 1 a 20 Hz y cuenta con 10 niveles de energía. La energía entregada por pulso dependiendo del nivel, se determinó mediante un sensor piroelectrico con revestimiento cerámico de la marca Thorlabs® modelo ES220C, este sensor se conectó a una consola de la misma marca modelo PM100. Se configuró el sensor para medir cada nivel de energía a 1 Hz realizando 60 lecturas, para cada una de las longitudes usadas 532 nm y 1064 nm.

Una vez conociendo la cantidad de energía entregada por pulso se determinó el tiempo de irradiación para cada una de las muestras considerando que la Densidad de energía para ambas longitudes de onda provistas por el láser fuera la misma. La densidad de energía fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$D_E = D_P * t \qquad (2)$$

Donde: D_P**,** es la densidad de potencia [mW/cm^2] y t es el tiempo de irradiación [s].La densidad de potencia [D_P] fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$D_P = P_m/A \qquad (3)$$

Donde: P_m es la potencia media del láser a la longitud de onda utilizada y nivel de energía, obtenida en mJ/s, y A es el área de irradiación en cm^2.

Los tiempos de irradiación de las muestras fueron calculados para las longitudes de onda de 1064 nm y 532 nm del láser Nd:YAG a las frecuencias de repetición de 5, 10 y 15 Hz, para el nivel máximo de energía.

Las irradiaciones se llevaron a cabo utilizando, un mililitro de las muestras de AuNPs, AuNP-HYNIC-iPSMA y control (PBS, solución salina con fosfatos) y fue colocado en un vial de vidrio durante la irradiación con la finalidad de evitar absorción de la energía del láser por el medio contenedor de la muestra. El esquema estructural de la irradiación de las muestras se puede observar en la Figura 9.

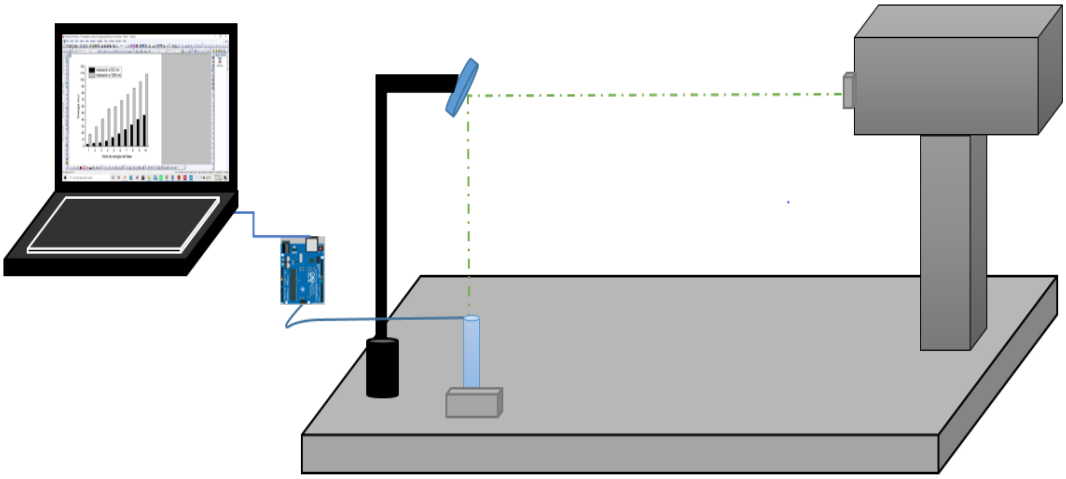

Figura 9. Arreglo para la irradiación láser

El incremento de temperatura fue monitoreado mediante el uso de un termopar tipo K acoplado a una tarjeta Arduino® UNO (Figura 9), codificada para la medición de temperatura por segundo. El termopar fue sumergido en cada una de las muestras durante las irradiaciones.

Se realizaron las curvas de temperatura vs tiempo para cada una de las variaciones de parámetros de irradiación, con la finalidad de determinar las condiciones óptimas para la realización de PPT plasmónica multifotónica.

4.4. Determinación de la viabilidad celular en células LNCaP

En los experimentos de viabilidad celular, se utilizó la línea celular LNCaP dado que expresa receptores de Antígeno Prostático Específico de Membrana (PSMA). Las células LNCaP fueron obtenidas originalmente de la ATCC (American Type Culture Collection), fueron cultivadas a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO2 y 100 % de humedad, en medio RPMI con suplemento de suero fetal bovino al 10 % y antibióticos (al 1% de anfotericiana β).

Las células fueron colocadas en una placa de 96 pozos con 1x103 células/pozo, suspendidas en 200 ml de medio de cultivo. Al día siguiente, fue retirado el medio, considerando que las células estaban unidas al fondo de cada pozo. Las células fueron incubadas durante 2 horas

con 200 µl de cada solución de AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA y se consideró un grupo control al que se le coloco 200 µl de solución PBS. Cada uno de los tratamientos fue realizado por cuadruplicado. La incubación de las células con los tratamientos promueve la unión y/o internalización de los tratamientos a la célula. Posterior a la incubación, las células fueron irradiadas a las 2 longitudes de onda del láser, con la variación en la frecuencia de pulso del láser y durante los tiempos calculados de irradiación para cada longitud de onda.

La medición de la viabilidad se realizó mediante el kit colorimétrico XTT. El XTT es un kit colorimétrico para la cuantificación de la viabilidad celular a partir de sales de tetrazolio que al interactuar con las células viables son transformadas en formazan y sólo está activo en células metabólicamente intactas. El formazan es un colorante que se cuantifica usando un espectrofotómetro multipozo, la absorbancia medida se correlaciona directamente con el número de células viables. Así bien, se obtuvieron los porcentajes de viabilidad de cada muestra irradiada (74).

Una vez obtenidos los porcentajes de viabilidad celular a las dos longitudes de onda, se realizará una comparación uno a uno de los resultados de las curvas de temperatura vs tiempo y viabilidad celular vs tratamiento (AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA y grupo control) obtenidos entre las longitudes de onda de irradiación, la frecuencia del láser y tiempo de irradiación, con la finalizad de establecer un posible método de irradiación para la terapia fototérmica plasmónica multifótonica.

Capítulo 5: Resultados y discusión

5.1. Síntesis del sistema AuNP-HYNIC-iPSMA

La síntesis del sistema AuNP-HYNIC-iPSMA, se realizó mediante la preparación de una solución inicial de péptido a una concentración de 1 mg/ml y posteriormente, se realizaron dos conjugaciones.

La primera consistió en tomar 5 µl y la segunda se tomaron 50 µl de solución la solución inicial. A cada una se le agregó 1 ml de AuNPs y la solución final se dejó reposar 15 minutos con agitación de vez en cuando. La variación en la cantidad de péptido fue realizada debido a la unión del péptido a la superficie de la nanopartícula.

La conjugación de la secuencia peptídica HYNIC-iPSMA con las nanopartículas de oro se realizó por la interacción electrostática del grupo amino (NH_2) del péptido con la superficie de la nanopartícula, aunque no se descartan interacciones de los grupos carboxilo de la secuencia peptídica con la superficie de la nanopartícula. Para establecer con exactitud, es necesario realizar otras técnicas de caracterización química como espectroscopia IR, RAMAN, XPS, entre otras. En la Figura 10, se muestra la estructura tridimensional de sistema AuNP-HYNIC-iPSMA.

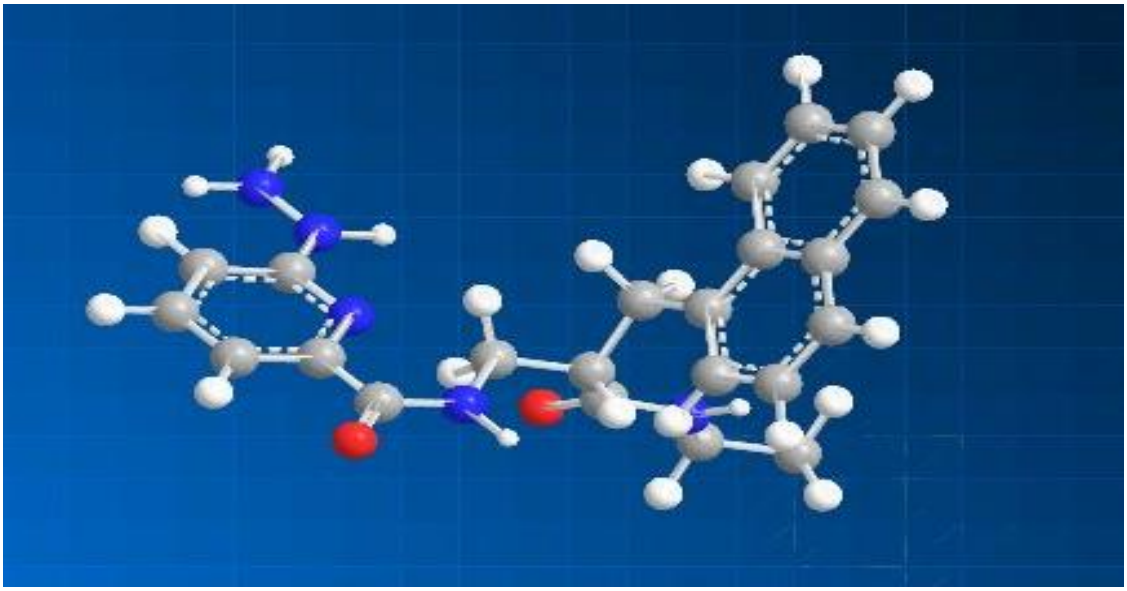

Figura 10. Estructura tridimensional de AuNP-HYNIC-iPSMA

5.2. Caracterización físico-química de AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA

La grafica de la Figura 11, muestra el espectro del UV-Vis de las AuNPs adquiridas de Sigma-Aldrich, como se puede observar, la absorción máxima se encuentra en una longitud de onda de 522 nm, lo que concuerda al 100% con las especificaciones del proveedor que señala que va de 518-522 nm (75). Recordemos que para producir el efecto de SPR es necesario excitar a las nanopartículas de oro, con una longitud de onda cercana a la longitud de máxima absorción mostrada en el UV-Vis.

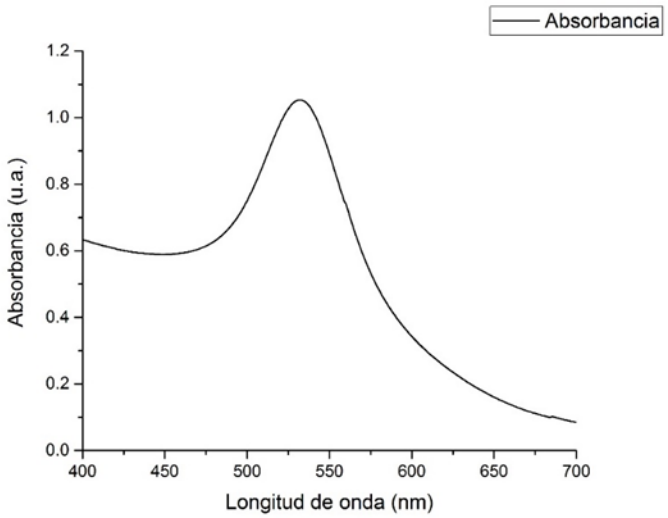

Figura 11. Espectro de absorción UV-Vis de AuNPs de 20 nm de diámetro

La Figura 12 y Figura 13, muestra las micrografías de obtenidas por TEM y el histograma de tamaño de las AuNPs. Se puede observar que las AuNPs estabilizadas con citrato tienen una forma esférica homogénea con un diámetro promedio de 19 ± 4 nm.

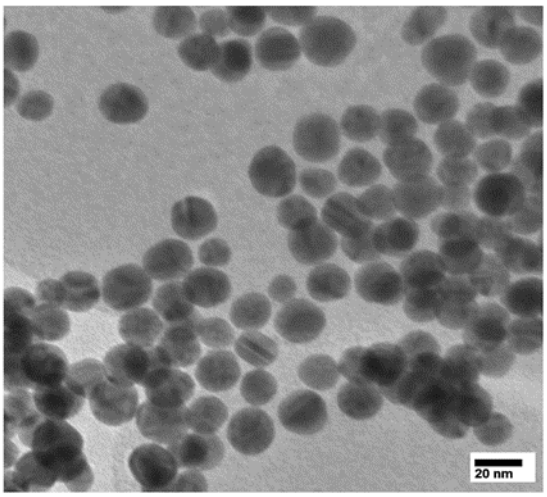

Figura 12. Micrografía TEM de AuNPs estabilizadas en buffer de citrato

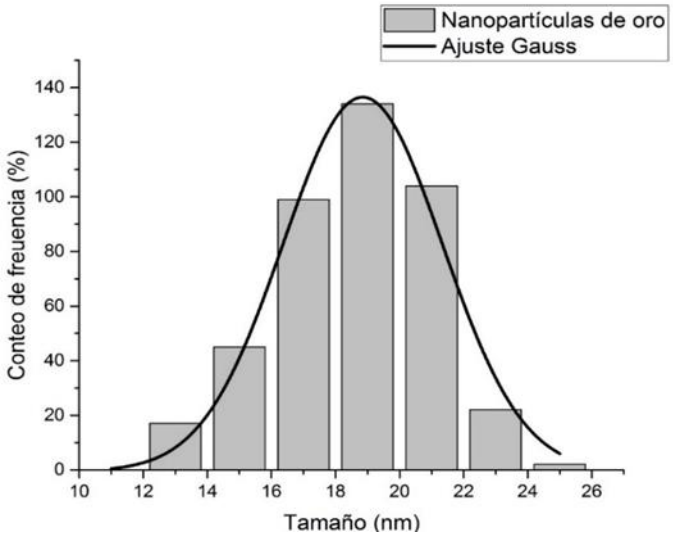

Figura 13. Histograma de distribución de tamaños de las AuNPs por conteo de imágenes TEM

Los estudios de DLS, mostraron que las nanopartículas de oro, tienen un diámetro promedio de 21.97± 3 nm, en un porcentaje del 95.7±2 %. Generalmente el tamaño obtenido por esta técnica siempre es un poco mayor, al obtenido en las micrografías por TEM.

La Figura 14, muestra el espectro UV-Vis de la secuencia peptídica HYNIC-iPSMA, donde se pueden observar bandas características, una banda centrada a 232 nm, relacionada con los grupos carboxílicos presentes y la otra a 273 nm producto de la absorbancia de los aminoácidos que conforman a la molécula.

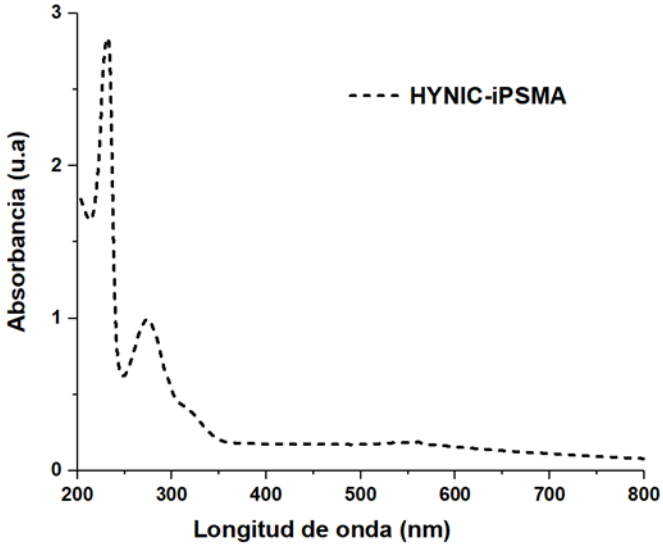

Figura 14. Espectro de absorción UV-Vis de la secuencia peptídica HYNIC-iPSMA

La imagen de la Figura 15, muestra los espectros de absorción UV-Vis, de las nanopartículas de oro, de la secuencia peptídica y de las nanopartículas de oro funcionalizadas con la secuencia peptídica.

Como ya se mencionó, el espectro UV-Vis de las nanopartículas de oro presenta una banda de absorción centrada en 522 nm y debida al fenómeno del plasmón de resonancia superficial; a la vez que es indicativa del tamaño nanométrico de las partículas.

Cuando la superficie de las AuNP se funcionaliza con la secuencia peptídica HYNIC-iPSMA en el espectro de absorción del sistema final se observan además de la banda correspondiente a las AuNP y dos bandas más, una centrada a 229 nm (relacionada con los grupos carboxílicos presentes) y la otra a 280 nm (banda principal producto de la absorbancia de los aminoácidos que conforman a la molécula). Además de la presencia de dichas bandas, estas muestran un desplazamiento al azul (con respecto al espectro del péptido libre) de 3nm y 7 nm respectivamente debido a la interacción formada entre ambos componentes y al cambio en el entorno químico de las AuNP.

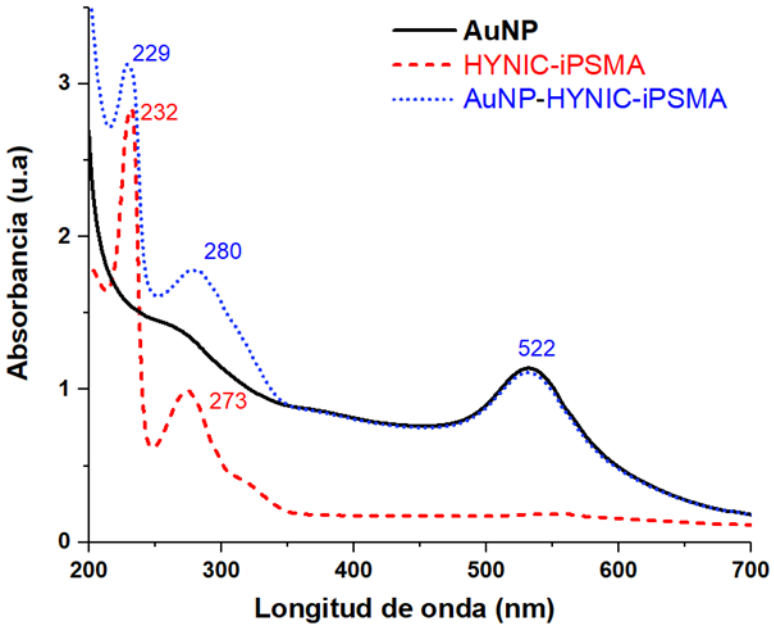

Figura 15. Espectro de absorción UV-Vis de AuNP, HYNIC-iPSMA y AuNP-HYNIC-iPSMA

La imagen mostrada en la Figura 16, son las obtenidas por TEM, de las nanopartículas de oro funcionalizadas con la secuencia peptídica HYNIC-iPSMA, como se puede observar, estas imágenes muestran un aro alrededor de la nanopartícula, dado el cambio de entorno de esta, causado por los péptidos en las inmediaciones de la nanopartícula.

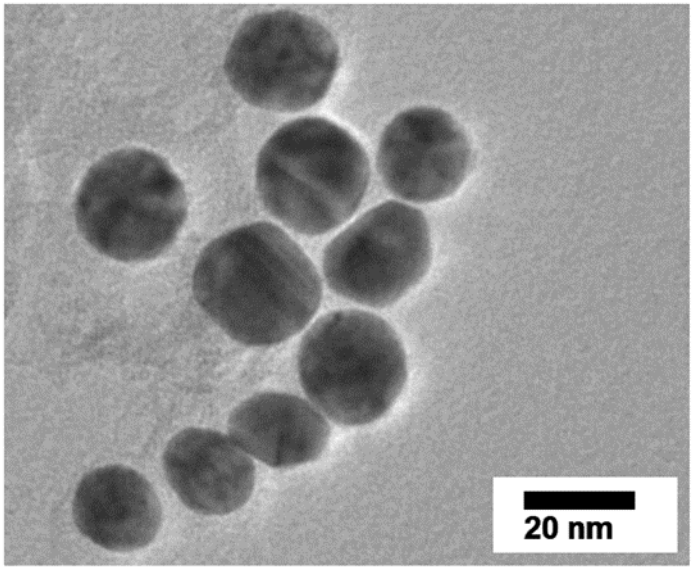

Figura 16. Micrografía TEM de las AuNP funcionalizadas con HYNIC-iPSMA

La cuantificación de tamaños manualmente de las imágenes de TEM, mostro un diámetro promedio de las nanopartículas cuantificando el aro formado alrededor de estas de 20± 3 nm. Mientras los estudios de DLS, mostraron diámetros de 21.7± 5 nm en un porcentaje de 97.3±2 %.

5.3. Irradiación y monitoreo de la temperatura de AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA

Para la irradiación de las muestras de AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA, como ya se mencionó en la metodología, se utilizó un láser Nd:YAG marca Quantel® modelo Q-smart 100, que posee una tasa de repetición variable de 1 a 20 Hz y cuenta con 10 niveles de energía. Este láser cuenta con dos longitudes de onda de salida, la fundamental de 1064 nm y su segundo armónico de 532 nm.

La energía entregada por pulso en cada uno de los niveles de energía, fueron caracterizadas mediante un sensor piroeléctrico con revestimiento cerámico de la marca Thorlabs® modelo ES220C, conectado a una consola de la misma marca modelo PM100. Los resultados de este monitoreo se muestran en la Figura 17.

El nivel de energía utilizado en este proyecto fue el 10, dado que el valor de la energía obtenida en por la irradiación de 532 nm, es la mitad de la obtenida en la irradiación a 1064 nm. Recordemos que para que se produzca absorción multifotónica, el papel de la energía y la frecuencia de repetición es muy importante. Por otro lado, las tasas de repetición utilizadas fueron (frecuencias) 5, 10 y 15 Hz, en cada longitud de onda.

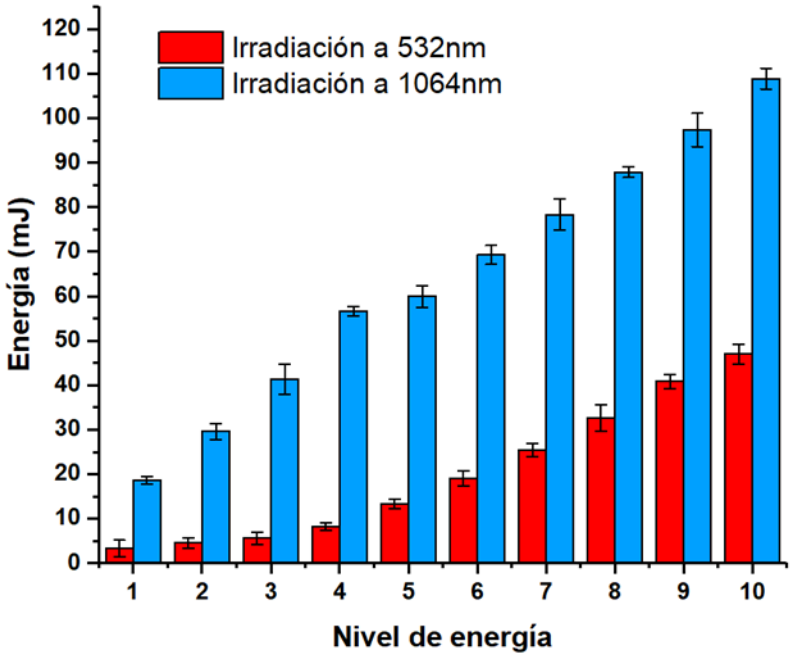

Figura 17. Energía por nivel a 532 nm y 1064 nm del láser.

Se realizaron los calculados de los tiempos de irradiación, para tener la misma cantidad de Densidad de energía entregada en todas las irradiaciones. Dicha densidad de energía fue de 233.85 J/cm^2, la cual ha sido utilizada por diversos autores y ha mostrado resultados favorables en la PPT plasmónica en irradiaciones con la longitud de onda de 532 nm.

En la Tabla 2, se muestran los resultados obtenidos para el tiempo de irradiación considerando la energía suministrada en cada longitud de irradiación y las diferentes tasas de repetición del equipo (5, 10 y 15 Hz).

Como ya se mencionó en el apartado de metodología, las irradiaciones se llevaron a cabo utilizando, un mililitro de las muestras de AuNPs, AuNPs-iPSMA y control (PBS, solución salina con fosfatos) colocadas en un vial de vidrio, como se mostró en el esquema estructural de la Figura 9.

El incremento de temperatura fue monitoreado mediante el uso de un termopar tipo K acoplado a una tarjeta Arduino® UNO codificada en Matlab para la medición de la temperatura durante cada segundo. El termopar fue sumergido en cada una de las muestras durante las irradiaciones y se realizaron las curvas de temperatura vs tiempo para cada una de las variaciones de parámetros de irradiación.

Tabla 2. Cálculos del tiempo de irradiación láser a 532 nm y 1064 nm a las frecuencias de 5, 10 y 15 Hz.

Longitud (nm)	**532**	**1064**
Energía (mJ)	49	108
Potencia media ($P_m = P_i * Frecuencia$)		
$Frecuencia\ (Hz)$	$P_m\ (mJ/s)$	
5	245	540
10	490	1080
15	735	1620
Área a irradiar 0.5026 cm²		
Densidad de Potencia ($DP_m = P_m/Área$)		
$Frecuencia\ (Hz)$	$DP_m\ (w/cm^2)$	
5	0.487	1.074
10	0.974	2.148
15	1.462	3.223
Densidad de energía considerada a entregar = 233.85 J/cm² ($DE_m = DP_m * tiempo$)		
Cálculo del tiempo de irradiación $Tiempo(s) = DE_m/DP_m$		
$Frecuencia\ (Hz)$	$Tiempo(s)$	
5	479.726	217.653
10	239.863	108.826
15	159.908	72.551
$Frecuencia\ (Hz)$	$Tiempo(minutos)$	
5	7.995	3.627
10	3.997	1.813
15	2.665	1.209

Los incrementos de temperatura de cada una de las muestras irradiadas a 532 nm, se pueden observar en la gráfica de la Figura 18, de donde se determina que el mayor incremento de temperatura es el obtenido a una taza de repetición de 15 Hz (Δ= 42 °C), sin embargo a esta misma tasa de repetición la muestra control también expresa un incremento de temperatura mayor (Δ= 6 °C) que a las tasas de 5 y 10 Hz.

Cabe destacar, que los resultados obtenidos en la irradiación corresponden a los de las nanopartículas funcionalizadas con la secuencia peptídica, ya que se ha demostrado que el incremento de la temperatura, entre nanopartículas y nanopartículas funcionalizadas no muestran diferencias significativas (76).

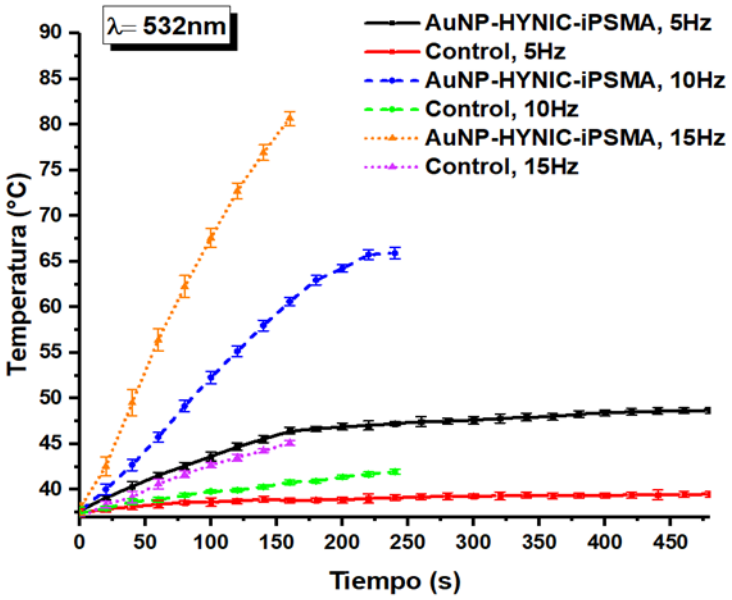

Figura 18. Monitoreo de la temperatura de AuNP, AuNP-HYNIC-iPSMA y grupo control, irradiadas a 532 nm a 5, 10 y 15 Hz

La gráfica de la Figura 19, muestra los resultados del incremento de temperatura obtenidos en la irradiación laser con una longitud de onda de 1064 nm. De la gráfica se puede observar, que el mayor incremento de temperatura se tiene en la frecuencia de 15 Hz, sin embargo, nuevamente se observa que la muestra control también sufre de un incremento de temperatura considerable (Δ= 42 °C, para AuNP-HYNIC-iPSMA y Δ= 33.5 °C, para el control).

En general, los incrementos de temperatura obtenidos en la irradiación se muestran en la Figura 20, donde podemos observar que, de forma independiente cada frecuencia mostró un incremento de temperatura con respecto su grupo control, esto tanto para la longitud de 532 y 1064 nm. Sin embargo, la frecuencia de 10 Hz, en ambas longitudes de onda mostró mejores resultados en cuanto a diferencia de incremento de temperatura con respecto al control. Teniendo para la irradiación a 1064 nm un incremento de temperatura de 1.3 veces

más en el sistema y 3.7 veces más en el grupo control de la obtenida en la irradiación a 532 nm. Recordemos que el tejido humano, esta principalmente formado por agua, y la longitud de onda de 1064 nm, es mayor mente absorbida por el agua, en comparación con la longitud de 532 nm.

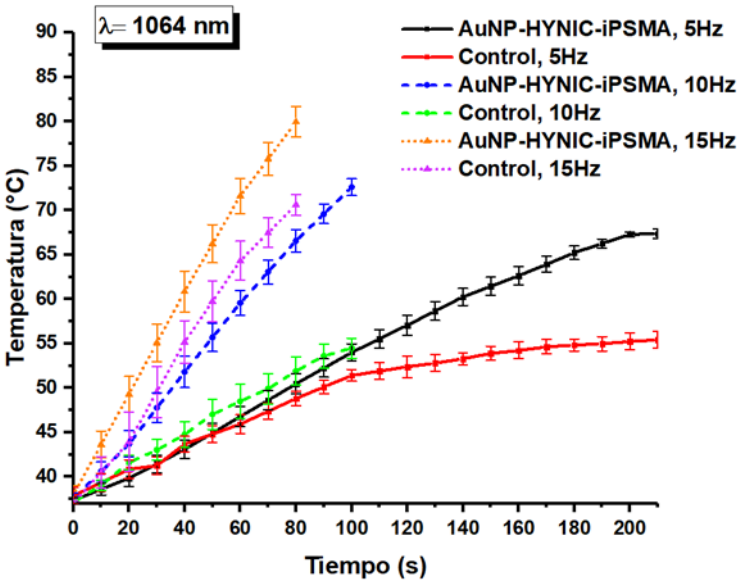

Figura 19. Monitoreo de la temperatura de AuNP, AuNP-HYNIC-iPSMA y grupo control, irradiadas a 164 nm a 5, 10 y 15 Hz

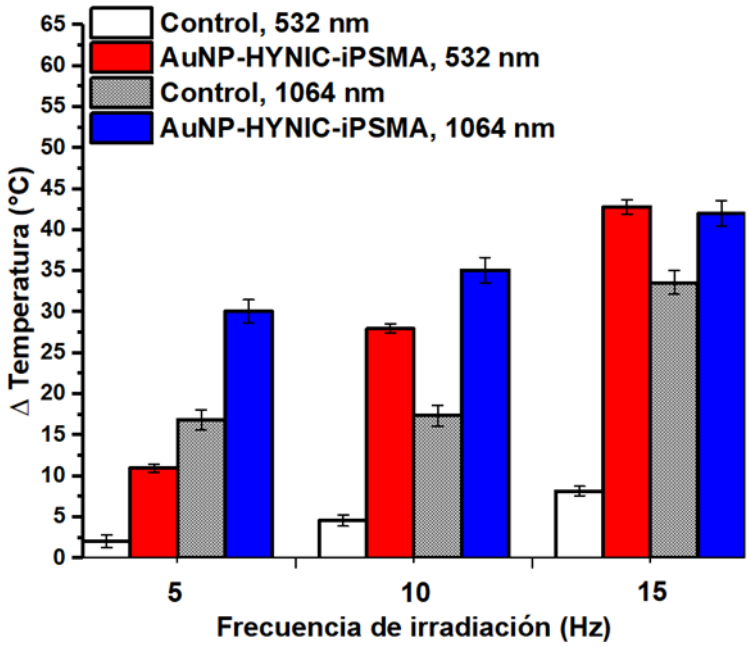

Figura 20. Incremento total de la temperatura de AuNP, AuNP-HYNIC-iPSMA y grupo control, irradiadas a 532 nm y 1064nm a 5, 10 y 15 Hz.

La Figura 21, muestra los resultados del espectro UV-Vis obtenidos del análisis después de irradiar las nanopartículas de oro funcionalizadas con la cadena peptídica HYNIC-iPSMA a una longitud de irradiación de 532 nm, de donde se puede observar un ligero corrimiento de la resonancia del plasmón de superficie de 3 nm hacia mayor energía entre el sistema no irradiado y los irradiados a las diferentes frecuencias, lo que podemos asociar con la variación de tamaño de los sistemas, lo cual fue corroborado mediante el análisis LDS, que se muestra en la Tabla 3. Además, también podemos observar la sección de área bajo la curva entre 600 y 700 nm, la cual diversos autores han mencionado que el incremento de esta se puede asociar al proceso de aglomeración y/o incremento del tamaño de las nanopartículas de oro.

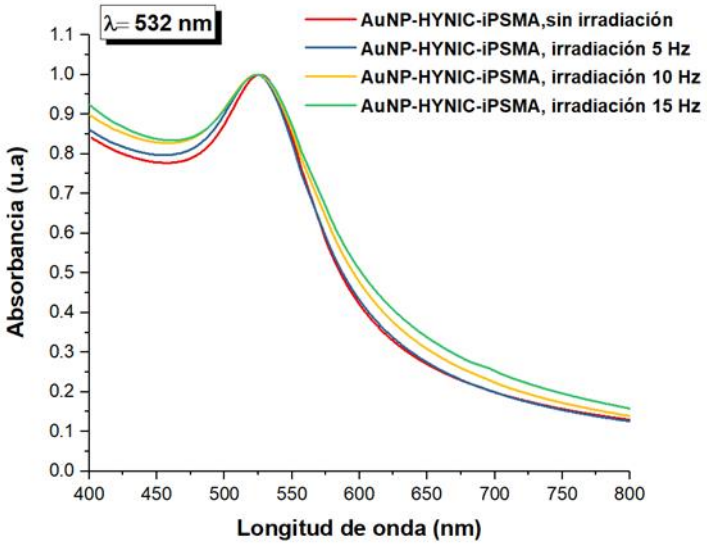

Figura 21. Espectro de absorción UV-Vis de las AuNP-HYNIC-iPSMA sin irradiación e irradiadas a 532 nm con frecuencias de 5, 10 y 15 Hz.

El análisis UV-Vis realizado después de irradiar las nanopartículas de oro funcionalizadas con la cadena peptídica HYNIC-iPSMA a una longitud de irradiación de 1064 nm, puede observarse en la Figura 22, de donde se puede ver un ligero corrimiento de la resonancia del plasmón de superficie de 2 nm hacia mayor energía, entre el sistema no irradiado y los irradiados a las frecuencias de 5 y 10 Hz; mientras que para el sistema irradiado a 15 Hz, se encontró un desplazamiento de la banda hacia menor energía de 3 nanómetros con respecto al sistema no irradiado, como ya se mencionó, un cambio en la máxima absorción puede ser asociado con un cambio en el tamaño de los sistemas, lo cual fue corroborado mediante el análisis LDS, que se muestra en la Tabla 3. Además, también podemos observar el incremento en el área bajo la curva entre 600 y 700 nm, la cual a simple vista se observa que sufrió mayor incremento el sistema al ser irradiado con una frecuencia de 15 Hz.

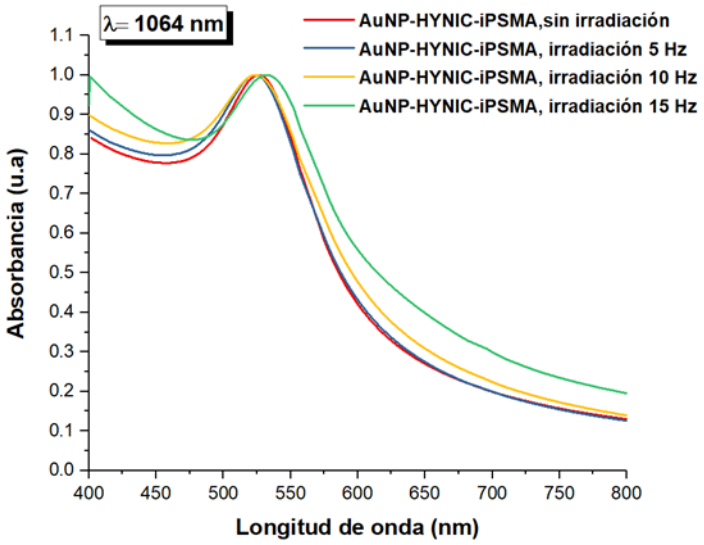

Figura 22. Espectro de absorción UV-Vis de las AuNP-HYNIC-iPSMA sin irradiación e irradiadas a 1064 nm con frecuencias de 5, 10 y 15 Hz.

Tabla 3. Análisis de los resultados de DLS después de la irradiación del sistema AuNP-HYNIC-iPSMA a 532 nm y 1064 nm a frecuencias de 5, 10 y 15 Hz.

Longitud de irradiación	**532 nm**		**1064 nm**	
Frecuencia de irradiación (Hz)	Diámetro hidrodinámico (nm)	Frecuencia porcentual	Diámetro hidrodinámico (nm)	Frecuencia porcentual
5	19.55 ± 1.9	100	20.4 ± 1.5	100
10	20.45 ± 2.3	100	21.38 ± 1.3	97
			2.8 ± 1.6	3
15	17.06 ± 1.19	96.3	25.29 ± 2.6	95.4
	1.72 ± 1.2	3.7	2.18 ± 1.4	4.6

5.4. Efectos térmicos y de viabilidad en células LNCaP

Como ya se mencionó en el apartado de metodología las células fueron colocadas en una placa de 96 pozos con $1x10^3$ células/pozo, suspendidas en 200 µl de medio de cultivo. Al día siguiente, fue retirado el medio, considerando que las células estaban unidas al fondo de cada pozo. Las células fueron incubadas durante 2 horas con 200 µl de cada solución de AuNPs y AuNPs-iPSMA y control al que se le coloco 200 µl de solución PBS. Posterior a la incubación, las células fueron irradiadas a las 2 longitudes de onda del láser, con la variación en la frecuencia de pulso del láser en 5, 10 y 15 Hz y durante los tiempos calculados de irradiación para cada longitud de onda, mostrados en la Tabla 2.

La medición de la viabilidad se realizó mediante el kit colorimétrico XTT, obteniendo los porcentajes de viabilidad de cada muestra irradiada.

Las gráficas de la Figura 23 y Figura 24, muestra los resultados de viabilidad de las células LNCaP irradiadas a 532 nm y 1064 nm. Recuérdese, que el 100 de viabilidad fue un grupo control para cada uno de los casos, es decir, células sin irradiación, un grupo de células expuestas a AuNP y un grupo de células expuestas al sistema AuNP-HYNIC-iPSMA.

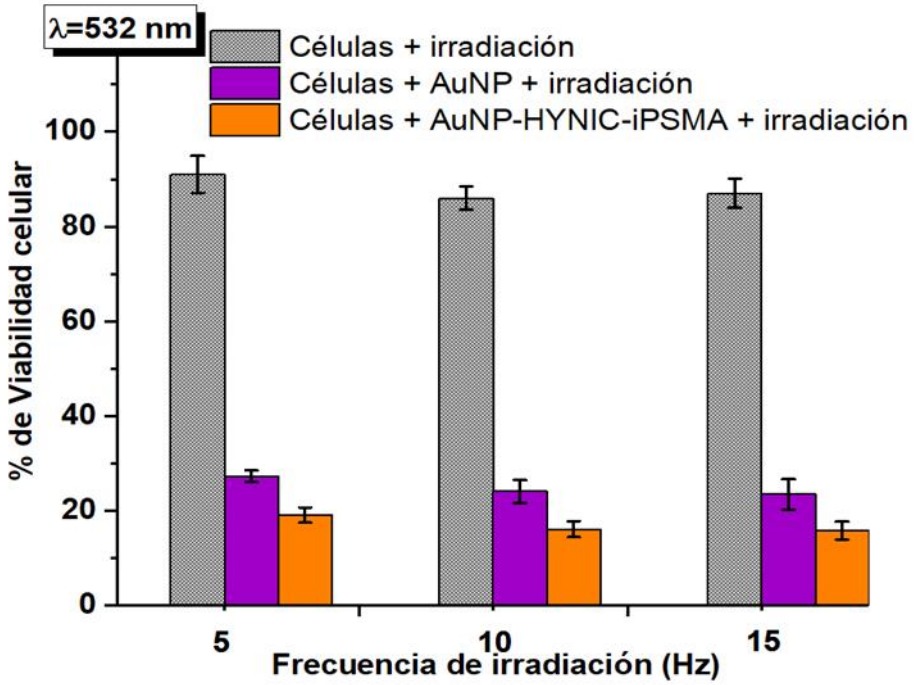

Figura 23. Porcentaje de la viabilidad celular de células LNCaP expuestas a AuNPs, AuNP-HYNIC-iPSMA e irradiadas a 532 nm y frecuencias de a 5, 10 y 15 Hz

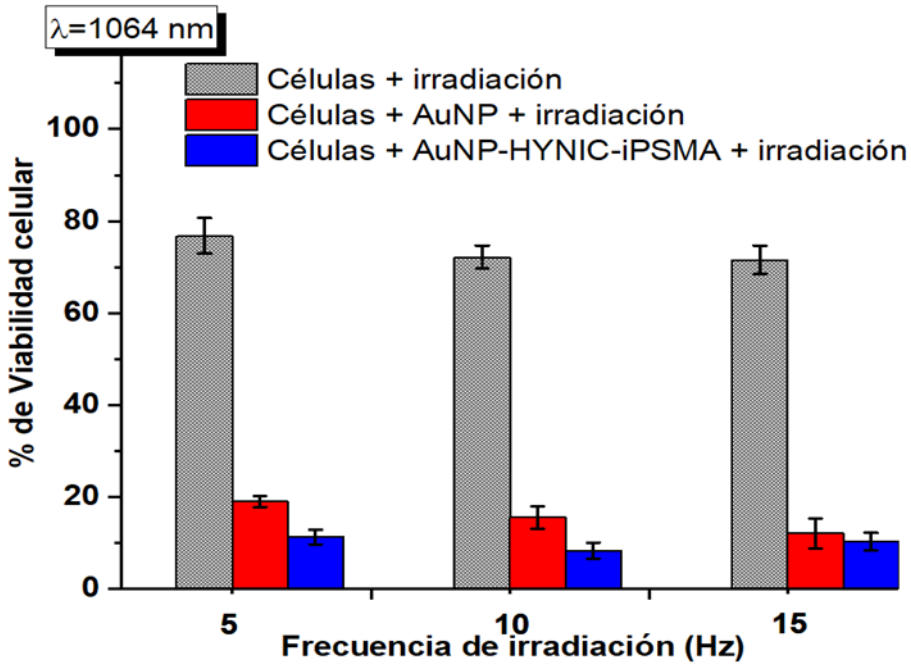

Figura 24. Porcentaje de la viabilidad celular de células LNCaP expuestas a AuNPs, AuNP-HYNIC-iPSMA e irradiadas a 1064 nm y frecuencias de a 5, 10 y 15 Hz

De cada una de las gráficas de viabilidad (figura 24 y 25), se puede observar que la irradiación de células con nanopartículas disminuye la viabilidad celular considerablemente, teniendo para las frecuencias de 5, 10 y 15 Hz una disminución en esta de 0.7, 0.65 y 0.52 veces en la irradiación a 1064 nm en comparación con la irradiación a 532 nm. Sin embargo, los resultados de viabilidad muestran mayor disminución al ser irradiado el sistema completo a 1064 nm, con una frecuencia de repetición de 10 Hz, obteniendo una disminución esta de 0.5 veces menor que en la irradiación a 532 nm.

Capítulo 6: Conclusiones y trabajo futuro

6.1. Conclusiones

La síntesis del sistema AuNP-HYNIC-iPSMA mostró la banda de SPR de las AuNPs en los 522 nm y dos bandas más, una centrada a 229 nm y la otra a 280 nm, relacionadas con la presencia del péptido. Las micrografías de TEM del sistema mostraron un aro alrededor de la nanopartícula, causado por los péptidos en las inmediaciones de esta, así como un diámetro promedio de 20± 3 nm, mientras que, en los estudios de DLS el sistema mostro un diámetro promedio de 21.7± 5 nm.

En la irradiación de las AuNPs y AuNP-HYNIC-iPSMA, se observó que los resultados de temperatura de forma independiente a la frecuencia utilizada (5, 10 y 15 Hz) mostraron un incremento de esta con respecto su grupo control para ambas longitudes de onda (532 y 1064 nm). Sin embargo, la frecuencia de 10 Hz mostró mejores resultados en el incremento de temperatura con respecto a su grupo control. Teniendo para la irradiación a 1064 nm un incremento de temperatura de 1.3 veces más en el sistema y 3.7 veces más en el grupo control de la obtenida en la irradiación a 532 nm.

El sistema después de ser irradiado a 532nm mostro un corrimiento en las bandas de SPR de 3 nm hacia mayor energía para cada una de las variaciones de frecuencia (5, 10 y 15 Hz), mientras que para la irradiación a 1064 nm, se observó un corrimiento de 2nm hacia mayor energía, entre el sistema no irradiado y los irradiados a las frecuencias de 5 y 10 Hz; mientras que para la frecuencia de15 Hz, se encontró un desplazamiento de la banda de SPR de 3 nm hacia menor energía. El análisis por DLS del sistema después de ser irradiado mostró, en el caso de la irradiación a 532 nm a las frecuencias de 5 y 10 nm que el diámetro promedio de las AuNP-HYNIC-iPSMA se mantenía al 100 % de la muestra y para la frecuencia de 15 Hz se encontró que el diámetro disminuía entre 1 y 2 nm en una frecuencia porcentual del 96% de la muestra. Para el caso de la irradiación de 1064 nm con frecuencia de 5 Hz el sistema AuNP-HYNIC-iPSMA mantuvo el diámetro promedio al 100 %, mientras que para las frecuencias de 10 y 15 Hz el diámetro promedio de la muestra se incrementó entre 1 y 5 nm con una frecuencia porcentual de 97 y 95 % respectivamente, además de observarse la presencia de nanopartículas de entre 2 y 3 nm con frecuencias porcentuales de 3 y 4.6 %.

Los efectos del incremento de temperatura sobre la viabilidad celular en células de cáncer de próstata mostraron que, la irradiación de células con AuNPs disminuye la viabilidad celular considerablemente, teniendo para las frecuencias de 5, 10 y 15 Hz una disminución en esta de 0.7, 0.65 y 0.52 veces en la irradiación a 1064 nm en comparación con la

irradiación a 532 nm. Sin embargo, los resultados de viabilidad muestran mayor disminución al ser irradiado el sistema completo (AuNP-HYNIC-iPSMA) a 1064 nm, con la frecuencia de repetición de 10 Hz, obteniendo una disminución en la viabilidad celular de 0.5 veces menor que en la irradiación a 532 nm.

Con los resultados obtenidos, se puede afirmar que el sistema AuNP-HYNIC-iPSMA con irradiación láser a 1064 nm a una frecuencia de 10 Hz puede ser utilizado para la realización de terapia fototérmica plasmónica multifotónica ya que el incremento de temperatura y la disminución de la viabilidad celular en células de cáncer de próstata son mayores a los obtenidos en la terapia fototérmica plasmónica con irradiación láser de 532 nm.

6.2. Trabajo futuro

Los resultados obtenidos en este proyecto fueron a nivel *in vitro*, por lo que, se hace necesario realizar este estudio a nivel *in* vivo, con la finalidad de obtener resultados más cercanos a la realidad y con ello, llegar a la implementación de la terapia fototérmica plasmónica multifotónica en el área clínica.

Capítulo 7: Referencias

1. World Health Organization.Tratamiento del cáncer. WHO [Internet]. 2012 [citado 2019 Mar 23];0–19. Disponible en: https://www.who.int/cancer/treatment/es/
2. Sociedad Americana Contra El Cancer. Información sobre el cáncer para hombres [Internet]. 2018 [citado 2020 Mar 31]. p. 1. Disponible en: https://www.cancer.org/es/saludable/encontrar-cancer-tempranamente/salud-para-el-hombre/informacion-sobre-el-cancer-para-hombres.html
3. Liu Y, Bhattarai P, Dai Z, Chen X. Photothermal therapy and photoacoustic imaging via nanotheranostics in fighting cancer. Chem Soc Rev [Internet]. 2019;48(7):2053–108. Disponible en: http://xlink.rsc.org/?DOI=C8CS00618K
4. Banu H, Sethi D, Edgar A, Sheriff A, Rayees N, Renuka N, et al. Doxorubicin loaded polymeric gold nanoparticles targeted to human folate receptor upon laser photothermal therapy potentiates chemotherapy in breast cancer cell lines. J Photochem Photobiol B Biol [Internet]. 2015;149:116–28. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.05.008
5. Jiménez-Mancilla N, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas C, Ocampo-García B, Luna-Gutiérrez M, Azorín-Vega E, et al. Multifunctional targeted therapy system based on 99mTc/ 177Lu-labeled gold nanoparticles-Tat(49-57)-Lys3-bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells. J Label Compd Radiopharm. 2013;56(13):663–71.
6. IMSS. Cáncer de próstata [Internet]. 2019 [citado 2019 Mar 25]. Disponible en: http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-prostata
7. Jain P, Huang X, El-Sayed I, El-Sayed M. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. Plasmonics. 2007;2(3):107–18.
8. Stern JM, Stanfield J, Kabbani W, Hsieh J-T, Cadeddu JA. Selective Prostate Cancer Thermal Ablation With Laser Activated Gold Nanoshells. J Urol [Internet]. 2008 Feb;179(2):748–53. Disponible en: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022534707024895
9. RP Photonics Consulting GmbH. Multiphoton absorption, two-photon, three-photon absorption, bandgap energy, laser material processing [Internet]. 2019 [citado 2019 Abr 17]. Disponible en: https://www.rp-photonics.com/multiphoton_absorption.html
10. Kucher A. A femtosecond infrared lasers applied to fundamental and bio-imaging studies in time of fligth secondary ion mass spectrometry [Internet]. Pensilvania; 2014 [citado 2019 Mar 26]. Disponible en: https://etda.libraries.psu.edu/files/final_submissions/9741
11. Smith A, Mancini M, Nie S. Second window for in vivo imaging. Nat Nanotechnol

[Internet]. 2009 Nov 1 [citado 2019 Mar 23];4(11):710–1. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898521

12. Kasten B, Liu T, Nedrow-Byers J, Benny P, Berkman C. Targeting prostate cancer cells with PSMA inhibitor-guided gold nanoparticles. Bioorg Med Chem Lett [Internet]. 2013 Ene 15 [citado 2019 Apr 20];23(2):565–8. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23232055
13. World Health Organization. Cancer [Internet]. 2020 [citado 2020 Apr 3]. Disponible en: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
14. Jiménez M, Solares M, Martínez P, Aguilar J, Martínez J, Hinojosa J, Rivera L, Zamora J. Oncoguía: Cáncer de Próstata [Internet]. Vol. 6, Cancerología. 2011. Disponible en: http://incan-mexico.org/revistainvestiga/elementos/documentosPortada/1298053652.pdf.
15. National Cancer Institute USA. Efectos secundarios.National Cancer Institute [Internet]. 2017 [citado 2019 Mar 25]. p. 3. Disponible en: https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/efectos-secundarios
16. Glazer E, Curley S. The Ongoing History of Thermal Therapy for Cancer. Surg Oncol Clin N Am [Internet]. 2011 Abr;20(2):229–35. Disponible en: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S105532071000116X
17. Mellal I, Oukaira A, Kengene E, Lakhssassi A. Thermal Therapy Modalities for Cancer Treatment: A Review and Future Perspectives. Int J Appl Sci - Res Rev [Internet]. 2017;04(02). Disponible en: http://www.imedpub.com/articles/thermal-therapy-modalities-for-cancertreatment-a-review-and-future-perspectives.php?aid=21099
18. Roussakow S. The History of Hyperthermia Rise and Decline. Conf Pap Med [Internet]. 2013;2013:1–40. Disponible en: http://www.hindawi.com/archive/2013/428027/
19. Pacella C, Mauri G. History of Laser Ablation. In: Image-guided Laser Ablation [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 1–5. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-21748-8_1
20. Toty L, Personne C, Colchen A, Vourc'h G. Bronchoscopic management of tracheal lesions using the neodynium yttrium aluminium garnet laser. Thorax [Internet]. 1981 Mar 1 [citado 2020 May 14];36(3):175–8. Disponible en: http://thorax.bmj.com/cgi/doi/10.1136/thx.36.3.175
21. Bown S. Phototherapy in tumors. World J Surg [Internet]. 1983 Nov [citado 2020 May 14];7(6):700–9. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6419477
22. Tsai S-W, Huang W-Y, Liaw J-W, Rau L-R. Photothermal effects of laser-activated surface plasmonic gold nanoparticles on the apoptosis and osteogenesis of osteoblast-like cells. Int J Nanomedicine [Internet]. 2016 Jul;Volume 11:3461–73. Disponible en: https://www.dovepress.com/photothermal-effects-of-laser-activated-surface-plasmonic-gold-nanopar-peer-reviewed-article-IJN

23. European Science Foundation. Forward Look Nanomedicine: An EMRC Consensus Opinion 2005 [Internet]. 2005 [citado 2020 May 15]. Disponible en: http://archives.esf.org/coordinating-research/forward-looks/biomedical-sciences-med/completed-forward-looks-in-biomedical-sciences/nanomedicine.html
24. European Commission (E.C). Environment: Definition of a nanomaterial [Internet]. 2016 [citado 2020 May 15]. Disponible en: https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm
25. Jeevanandam J, Barhoum A, Chan Y, Dufresne A, Danquah M. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. Beilstein J Nanotechnol [Internet]. 2018 Abr 3;9(1):1050–74. Disponible en: https://www.beilstein-journals.org/bjnano/articles/9/98
26. El-Meligi A. Application of nanomaterials in the field of nanomedicine. In: 2017 4th IEEE International Conference on Engineering Technologies and Applied Sciences (ICETAS) [Internet]. IEEE; 2017. p. 1–5. Disponible en: http://ieeexplore.ieee.org/document/8277906/
27. Rai M, Ingle AP, Birla S, Yadav A, Santos C. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine [Internet]. Vol. 42, Critical Reviews in Microbiology. Informa Healthcare USA, Inc; 2016. p. 696–719. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2015.1018131
28. Zhang J, Chen K, Fan Z. Circulating Tumor Cell Isolation and Analysis [Internet]. 1st ed. Vol. 75, Advances in Clinical Chemistry. Elsevier Inc.; 2016. 1–31 p. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/bs.acc.2016.03.003
29. Escudero-Castellanos A, Ocampo-García B, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas C, Morales-Ávila E, Luna-Gutiérrez M, et al. Synthesis and preclinical evaluation of the 177 Lu-DOTA-PSMA(inhibitor)-Lys 3 -bombesin heterodimer designed as a radiotheranostic probe for prostate cancer. Nucl Med Commun. 2019;40(3):278–86.
30. Guo J, Rahme K, He Y, Li L-L, Holmes J, O'Driscoll C. Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics. Int J Nanomedicine [Internet]. 2017 Aug;Volume 12:6131–52. Disponible en: https://www.dovepress.com/gold-nanoparticles-enlighten-the-future-of-cancer-theranostics-peer-reviewed-article-IJN
31. Jaque D, Martínez Maestro L, del Rosal B, Haro-Gonzalez P, Benayas A, Plaza J, et al. Nanoparticles for photothermal therapies. Nanoscale [Internet]. 2014;6(16):9494–530. Disponible en: http://xlink.rsc.org/?DOI=C4NR00708E
32. Moores A, Goettmann F. The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. New J Chem [Internet]. 2006;30(8):1121. Disponible en: http://xlink.rsc.org/?DOI=b604038c
33. Jing-Liang L, Min G. Gold-Nanoparticle-Enhanced Cancer Photothermal Therapy. IEEE J Sel Top Quantum Electron [Internet]. 2010 Jul;16(4):989–96. Disponible en:

http://ieeexplore.ieee.org/document/5280255/
34. González-Ruíz A, Ferro-Flores G, Jiménez-Mancilla N, Escudero-Castellanos A, Ocampo-García B, Luna-Gutiérrez M, et al. In vitro and in vivo synergistic effect of radiotherapy and plasmonic photothermal therapy on the viability of cancer cells using 177Lu–Au-NLS-RGD-Aptamer nanoparticles under laser irradiation. J Radioanal Nucl Chem [Internet]. 2018 Dec 24;318(3):1913–21. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/s10967-018-6266-6
35. EcuRed. Terapia [Internet]. [citado 2020 May 17]. Disponible en: https://www.ecured.cu/Terapia
36. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. Lancet Oncol. 2002;3:487–97.
37. Iancu C. Photothermal Therapy of Human Cancers (PTT) Using Gold Nanoparticles. Biotechnol Mol Biol Nanomedicine. 2013;1(1):53–60.
38. Riley R, Day ES. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology [Internet]. 2017 Jul;9(4):e1449. Disponible en: http://doi.wiley.com/10.1002/wnan.1449
39. Hall, Eric J; Giaccia A. Radiobiology for the Radiologist. 8th Ed. Lippincott Williams & Wilkins (LWW); 2018. 624 p.
40. Kumaradas J, Sherar M. An edge-element based finite element model of microwave heating in hyperthermia: method and verification. Int J Hyperth [Internet]. 2002 Jan 9 [citado 2019 May 20];18(5):426–40. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12227929
41. Golovynskyi S, Golovynska I, Stepanova L, Datsenko O, Liu L, Qu J, et al. Optical windows for head tissues in near-infrared and short-wave infrared regions: Approaching transcranial light applications. J Biophotonics [Internet]. 2018 Dec;11(12):e201800141. Disponible en: http://doi.wiley.com/10.1002/jbio.201800141
42. Arthur R, Straube W, Trobaugh J, Moros E. Non-invasive estimation of hyperthermia temperatures with ultrasound. Int J Hyperth [Internet]. 2005 Sep 9 [citado 2019 May 20];21(6):589–600. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16147442
43. Kurt B, Gulsoy M. Optical and thermal response of laser irradiated tissue. In: 2009 14th National Biomedical Engineering Meeting [Internet]. IEEE; 2009 [citado 2019 Mar 24]. p. 1–3. Disponible en: http://ieeexplore.ieee.org/document/5130352/
44. Faheem S, Banu H. Gold Nanoparticles in Cancer Diagnosis and Treatment : A Review. Austin Joural Biotechnol Bioeng [Internet]. 2014;1(6):5. Disponible en: www.austinpublishinggroup.com
45. Müller H. Optical Properties of Metal Clusters. Zeitschrift für Phys Chemie [Internet].

1996 Jan;194(Part_2):278–9. Disponible en: http://www.degruyter.com/doi/10.1524/zpch.1996.194.Part_2.278

46. Huang X, Jain P, El-Sayed I, El-Sayed M. Gold nanoparticles: Interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. Nanomedicine. 2007.
47. Ding X, Liow C, Zhang M, Huang R, Li C, Shen H, et al. Surface Plasmon Resonance Enhanced Light Absorption and Photothermal Therapy in the Second Near-Infrared Window. J Am Chem Soc [Internet]. 2014 Nov 5 [citado 2019 Mar 25];136(44):15684–93. Disponible en: http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja508641z
48. Garcia M. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. J Phys D Appl Phys [Internet]. 2011 Jul 20;44(28). Disponible en: http://stacks.iop.org/0022-3727/44/i=28/a=283001?key=crossref.2fb281a5516975ab0e55d53c03a645b2
49. Hashimoto S, Werner D, Uwada T. Studies on the interaction of pulsed lasers with plasmonic gold nanoparticles toward light manipulation, heat management, and nanofabrication. J Photochem Photobiol C Photochem Rev [Internet]. 2012 Mar;13(1):28–54. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.01.001
50. Ekici O, Harrison R, Durr N, Eversole D, Lee M, Ben-Yakar A. Thermal analysis of gold nanorods heated with femtosecond laser pulses. J Phys D Appl Phys [Internet]. 2008 Sep 21 [citado 2020 Sep 7];41(18):185501. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21799542/
51. Yamada K, Miyajima K, Mafuné F. Thermionic Emission of Electrons from Gold Nanoparticles by Nanosecond Pulse-Laser Excitation of Interband. J Phys Chem C [Internet]. 2007 Aug 2 [citado 2020 Sep 8];111(30):11246–51. Disponible en: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0730747
52. Werner D, Hashimoto S, Tomita T, Matsuo S, Makita Y. In-Situ Spectroscopic Measurements of Laser Ablation-Induced Splitting and Agglomeration of Metal Nanoparticles in Solution. J Phys Chem C [Internet]. 2008 Oct 30 [citado 2020 Nov 11];112(43):16801–8. Disponible en: https://shibaura.pure.elsevier.com/en/publications/in-situ-spectroscopic-measurements-of-laser-ablation-induced-spli
53. Kotaidis V, Plech A. Cavitation dynamics on the nanoscale. Appl Phys Lett [Internet]. 2005 Nov 21 [citado 2020 Sep 13];87(21):213102. Disponible en: http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.2132086
54. Universidad Complutense Madrid.Centro de Láseres Ultrarrápidos (CLUR) [Internet]. 2019 [citado 2019 Mar 26]. Disponible en: https://www.ucm.es/clur/introduccion
55. Szepes L, Tarczay G. Photoelectron Spectrometers. Encycl Spectrosc Spectrom

[Internet]. 1999 Jan 1 [citado 2019 Mar 26];1822–30. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122266803002350

56. Wang S, Xu H, Ye J. Plasmonic rod-in-shell nanoparticles for photothermal therapy. Phys Chem Chem Phys. 2014;16(24):12275–81.
57. Smith A, Mancini M, Nie S. Bioimaging: second window for in vivo imaging. Nat Nanotechnol [Internet]. 2009 Nov [citado 2019 May 29];4(11):710–1. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898521
58. Jacques S. Optical properties of biological tissues: a review. Phys Med Biol Phys Med Biol [Internet]. 2013 [citado 2019 May 29];58:37–61. Disponible en: http://iopscience.iop.org/0031-9155/58/11/R37
59. Douplik A, Saiko G, Schelkanova I, Tuchin V . The response of tissue to laser light [Internet]. Lasers for Medical Applications: Diagnostics, Therapy and Surgery. Woodhead Publishing Limited; 2013. 47–109 p. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1533/9780857097545.1.47
60. Yao J, Wang L. Photoacoustic microscopy. Laser Photon Rev [Internet]. 2013 Sep;7(5):758–78. Disponible en: http://doi.wiley.com/10.1002/lpor.201200060
61. Santoni M, Scarpelli M, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Cascinu S, et al. Targeting prostate-specific membrane antigen for personalized therapies in prostate cancer: morphologic and molecular backgrounds and future promises [Internet]. Vol. 28, Journal of biological regulators and homeostatic agents. 2014 [citado 2019 May 20]. p. 555–63. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25620167
62. Eder M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Hull W-E, Wängler C, Mier W, et al. ^{68} Ga-Complex Lipophilicity and the Targeting Property of a Urea-Based PSMA Inhibitor for PET Imaging. Bioconjug Chem [Internet]. 2012 Apr 18 [citado 2019 May 20];23(4):688–97. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22369515
63. World Health Organization.Cáncer. WHO [Internet]. 2017 [citado 2019 Abr 16]; Disponible en: https://www.who.int/topics/cancer/es/
64. National Cancer Institute. ¿Qué es el cáncer? Conjunto de enfermedades relacionadas[internet]. 2015[citado 2019 Abr 16]. p. 8. Disponible en : https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#:~:text=Cancer%20is%20the%20name%20given,up%20of%20trillions%20of%20cells.
65. Xin L. Cells of origin for cancer: an updated view from prostate cancer. Oncogene [Internet]. 2013 Aug 26 [citado 2019 Abr 16];32(32):3655–63. Disponible en: http://www.nature.com/articles/onc2012541
66. Álvarez-Blanco M, Escudero-de Los Ríos P, Hernández-Toríz N. Cáncer de próstata. Rev Mex Urol [Internet]. 2008;68(4):250–9. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/uro/ur-2008/ur084l.pdf.

67. Fanelli A. LNCaP Cells General Information and Resources [Internet]. 2016 [citado 2019 Apr 20]. Disponible en: http://www.lncap.com/
68. Horoszewicz J, Leong S, Kawinski E, Karr J, Rosenthal H, Chu T, et al. LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma1 [Internet]. Vol. 43, ICANCER RESEARCH. 1983 [citado 2019 Abr 20]. Disponible en: http://cancerres.aacrjournals.org/content/43/4/1809.full-text.pdf
69. Peeters S, Kitz M, Preisser S, Wetterwald A, Rothen-Rutishauser B, Thalmann G, et al. Mechanisms of nanoparticle-mediated photomechanical cell damage. Biomed Opt Express [Internet]. 2012 Mar 1;3(3):435. Disponible en: https://www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?uri=boe-3-3-435
70. Kitz M, Preisser S, Wetterwald A, Jaeger M, Thalmann GN, Frenz M. Vapor bubble generation around gold nano-particles and its application to damaging of cells. Biomed Opt Express [Internet]. 2011 Feb 1;2(2):291. Disponible en: https://www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?uri=boe-2-2-291
71. Bolze F, Jenni S, Sour A, Heitz V. Molecular photosensitisers for two-photon photodynamic therapy. Chem Commun [Internet]. 2017;53(96):12857–77. Disponible en: http://xlink.rsc.org/?DOI=C7CC06133A
72. Letfullin R, Joenathan C, George T, Zharov V. Laser-induced explosion of gold nanoparticles: potential role for nanophotothermolysis of cancer. Nanomedicine [Internet]. 2006 Dic;1(4):473–80. Disponible en: https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/17435889.1.4.473
73. IPICYT. Microscopios Electrónicos de Transmisión (TEM) [Internet]. 2017 [citado 2019 May 24]. p. 3. Disponible en: http://www.linan-ipicyt.mx/Microscopio_HR-TEM.html
74. Abcam plc. XTT Assay Kit (ab232856) Abcam [Internet]. 2019 [citado 2019 May 24]. p. 3. Disponible en: https://www.abcam.com/xtt-assay-kit-ab232856.html
75. Merck KGaA. Gold nanoparticles 20 nm diameter, OD 1, stabilized suspension in citrate buffer Au NP , Sigma-Aldrich [Internet]. 2019 [citado 2019 Nov 20]. Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/741965?lang=es&region=MX
76. Luna-Gutiérrez M, Ferro-Flores G, Ocampo-García BE, Santos- Cuevas CL, Jiménez-Mancilla N, De León-Rodríguez LM, et al. A Therapeutic System of 177Lu-labeled Gold Nanoparticles-RGD Internalized in Breast Cancer Cells. J Mex Chem Soc [Internet]. 2017 Oct 12;57(3):421–9. Disponible en: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937837902084